

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

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 :

**Séparation d'un mélange issu d'une culture de la souche
Aspergillus tubingensis par catalyse enzymatique suivie d'une
distillation**

Présenté par : **BOUSNANE HALIMA**

Le 25/06/2022

DOULA AYA

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mme Benlounissi Aïcha (M.C.A- ENSB, Constantine)

Présidente de jury : Mme kassalaouar Mounia (M.C.B- UFC1)

Examinatrice: Mme Benouchenne Djamilia (M.A.B- ENSB, Constantine)

Année universitaire : 2022 – 2023

Remerciements

Tout d'abord nous remercions Allah qui nous a donné le courage ,la force, la patience et la volonté et nous permis de reprendre nos études universitaires après une longue rupture afin de finaliser ce travail.

Nous remercions notre encadreur Mme Benlounissi Aïcha pour la confiance qu'elle nous a accordées et son aidé lors de la réalisation de ce travail.

Toute notre gratitude va aux membres de jury Kassalaouar Mounia et Benouchenne Djamilia pour avoir accepté de présider et examiner ce manuscrit.

Notre plus grand merci s'adresse à tous nos enseignant de L'université des Frères Mentouri, Constantine 1, qui nous ont formées et beaucoup appris.

Nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de pris ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à :

- *Ma tante paternelle Souad -DOUDOU- aucun dédicace ne saurait exprimer mon respect mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon bien être je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours que de modeste travail soit tant formulés le fruit de vos innombrables sacrifice puisse que dieu vous accorde santé, bonheur et longue vie pour tous ses sacrifices son amour et sa tendresse tout au long de mes étude.je ne saurai jamais remercier assez.*
- *Ma tante paternelle Fadila -FAPI- Merci pour tout...pour votre amour, la confiance et l'énergie que vous m'aviez donnée ...votre aide précieuse gentillesse bonne humer*
- *Je suis la grâce aux prières de Ma grand-mère paternelle -CHAMMAMA-*
- *Yara : Pour votre soutien, pour votre aide et pour les moments heureux*
- *Mes oncles :AbdAlghani, Moudji*
- *Ma tante paternelleWassila -WAWA-*
- *Mes amis : Yousra et Halima*

- AYA DOULA-

Dédicace

Au début et avant tout, mon profond remerciement à Dieu le tout puissant, de m'avoir donné le courage et la patience à fin de réaliser cette étude.

Je dédie ce travail à :

Mon père Said et ma mère Safia que dieu les protèges pour moi.

A mes frères AbdElhmid ,Rabeh,moussa

A mes sœurs Amina,Fatima

A mes neveux Abderrahmane et el baraa

A mon nièce Zyneb

A toute ma grande famille.

A meilleur ami Chourok .Tyma. AYA

A tous ce que j'aime et qui m'aiment.

A tous mes camarades d'études.

HALIMA

Sommaire

Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii
Introduction	2
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
1. Moisissures	4
1.1 Développement	4
1.2 Conditions de croissance	4
a- Éléments nutritifs	4
b- Facteurs physicochimiques	5
1.3 Appareil végétatif	5
1.4 Reproduction	5
1.5 Rôle des moisissures sur le plan économique	6
a. Moisissures utiles	6
b. Moisissures nuisibles et toxigènes	6
1.6 Intérêts industriels	6
2. Genre <i>Aspergillus</i>	6
2.1 Taxonomie	7
2.2 Morphologie	8
2.3 Identification des <i>Aspergillus</i>	9
2.4 Caractères culturels	9
2.5 Habitat	10
2.6 Condition de développement	10
2.7 Mode de contamination	10
3. Espèce <i>Aspergillus Tubingensis</i>	11
3.1 Description d' <i>Aspergillus tubingensis</i>	12
3.2 Habitat et écologie	12

4. Lactosérum	12
4.1. Lactosérum et pollution de l'environnement	13
4.2. Valorisation du lactosérum	13
4.3. Intérêt de lactosérum	14
4.3.1-Intérêt alimentaire	14
4.3.2Intérêt industriel du lactosérum	14
4.3.3Intérêt médical	14
5. Méthodes d'analyse biochimique d'un mélange	15
5.1Filtration	15
5.2 Centrifugation	16
5.3 Comptage cellulaire	17
5.3.1 Définition du comptage cellulaire	17
5.3.2. Les règles de comptage	18
5.4. Distillation	19
5.4.1 Définition de la distillation	19
5.4.2 Principe de la distillation	19
5.4.3 Montage de distillation simple	19
5.5 Distillation Réactive	20
a. Principes de la distillation réactive	20
5.6 Chromatographie	21
5.6.1 Principe	21
5.6.2 Différentes méthodes chromatographiques	21
5.7. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	22
5.7.1 Principe de la HPLC	22
5.7.2 Domaines d'application de HPLC	23
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	
1. Matériel biologique	25
2. Revivification et l'isolement de la souche	25

2.2 Milieux de culture	25
a. préparation des milieux	25
2.3 Ensemencement	26
3. Récupération des spores	26
4. Comptage des spores	26
5. Méthode de culture	27
5.1 Préparation du milieu de culture	27
5.2 Condition de culture	27
6. Distillation	28
6.1 Mode opératoire	28
6.2 Distillation après catalyse enzymatique	28
7. Centrifugation et filtration	29
8. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	30
Chapitre 3 : Résultats et discussions	
1. Revivification et l'isolement de la souche	32
2. Milieu culture	32
3. Résultat de la distillation	33
3.1 Résultat de la distillation simple	33
3.2 Résultat de la distillation réactive	34
4. Centrifugation et filtration	34
5. Résultats de chromatographie liquide à haut performance	34
Conclusion	40
Références bibliographiques	42
Annexe	50
Résumés	

Liste des abréviations

- Bar :** Unité de pression
- °C :** Celsius unité de température
- FCR :** Force centrifuge relative
- HPLC :** Chromatographie Liquide à Haute Pression
- Min :** Minute
- ml :** Millilitre
- mm² :** Millimètre carré
- mm³ :** Millimètre cube
- Nm :** Nanomètre
- PDA:** Potato Dextrose Agar
- pH :** Potentielle d'hydrogène
- Rpm :** Rotation par minute
- SAB:** Sabouraud Dextrose Agar
- λ :** Longueur d'onde
- μl :** Microlitre

Liste des figures

Figure 01 : Structure de mycélium	5
Figure 02 : Structure d'hyphe	5
Figure 03 : Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure	6
Figure 04 : Structure de l' <i>Aspergillus</i>	7
Figure 05 : Représentation schématique d'une tête <i>Aspergillaire</i>	9
Figure 06 : Structure <i>Aspergillus Tubingensis</i>	11
Figure 07 : Schéma d'un montage de filtration	16
Figure 08 : Centrifugeuse	17
Figure 09 : Lame de cellule malassez	17
Figure 10 : Quadrillage de la Malassez.	18
Figure 11 : Règle de comptage cellulaire	18
Figure 12 : Schéma de montage de distillation simple.	19
Figure 13 : Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC	22
Figure 14 : Revivification de la souche lyophilisée	25
Figure 15 : Méthode de récolte	26
Figure 16 : Matériel de remplissage	26
Figure 17 : Milieu de culture	27
Figure 18 : Filtration de milieu fermenté	27
Figure 19 : Représentation de l'appareillage de la distillation simple	28
Figure 20 : Tubes falquons continent le distillat 1	28
Figure 21 : Présentation de distilla traité par le mélange enzymatique	29
Figure 22 : Dispositif de la distillation réactive	29
Figure 23 : Méthode de filtration	29

Figure 24 : Présentation de l'appareillage de l'HPLC	30
Figure 25 : Résultats de la revivification et l'isolement de la souche	32
Figure 26 : Un Milieu fermenté	32
Figure 27: Biomasse récupère après filtration du milieu fermenté	33
Figure 28 : Extrait brut récupère à partir de la fermentation du milieu	33
Figure 29 : Distillation simple	33
Figure 30 : Distillation après traitement enzymatique	34
Figure 31 : Résultat du distillat non traité dans 254 nm par HPLC	35
Figure 32 : Résultat du distillat non traité dans 365 nm par HPLC	35
Figure 33 : Résultat du distillat traité dans 254 nm par HPLC	36
Figure 34 : Résultat du distillat traité dans 365 nm par HPLC	37

Liste des Tableaux

Tableau 01: Classification de genre <i>Apergillus</i>	8
Tableau 02: Composition du lactosérum	13
Tableau 03 : Activité biologique des protéines et des peptides du lactosérum	15

Introduction

Introduction

Les moisissures ou champignons filamenteux représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre. Certains sont bénéfiques voire essentiels à notre vie. Toutefois, ils peuvent être nocifs pour l'homme. Dans ce cas il s'agit d'organismes pathogènes. (Nicklin et al, 2000 ; Guiraud, 1998).

Les moisissures jouent un rôle majeur dans plusieurs domaines tel que : la santé, la biotechnologie, l'alimentation, l'agriculture, l'environnement, l'industrie. En effet elles sont utilisées pour leur facilité de culture, leur rapidité de croissance et leur capacité à synthétiser des métabolismes primaires et secondaires (Thomas, 2010 ; Abdalaziz, 2006). Parmi les intérêts d'utilisation des moisissures, il est possible de citer ici, la production de biomasse (Benserradj, 2022).

L'objectif majeur de cette étude est la séparation des constituants d'un filtrat obtenu par la culture de la souche fongique *Aspergillus tubingensis* sur milieu de culture à base d'un déchet agroalimentaire, le lactosérum, par distillation avec et sans traitement enzymatique. Dans cette optique, nous nous sommes intéressées à la moisissure *Aspergillus tubingensis* en réalisant trois parties de travail :

- Synthèse bibliographique sur le sujet ;
- Partie expérimentale ;
- Report et discussion des résultats obtenus.
- Résultats et discussion.

On clôture ce travail par une conclusion dont laquelle on récapitule les connaissances acquises lors de ce travail suivis par des perspectives.

Chapitre 1

Synthèse Bibliographique

1. Moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques eucaryotes, filamenteux et pluricellulaires appartenant au règne des mycètes. Ils sont caractérisés par l'absence de chlorophylle, ce qui les rend incapables de produire leur propre énergie par photosynthèse. Par conséquent, les moisissures sont des organismes hétérotrophes qui doivent se nourrir sur des composés organiques pour survivre (**Regnault, 1990**).

Elles constituent de 60 000 à 100 000 (60 à 100 milles) espèces fongiques, pour ce la elles sont très répandues dans notre environnement (**Rebouxet al., 2010**).

Elles sont considérées comme des agents pathogènes, entraînant des infections fongiques chez les humains et les animaux. Ils peuvent causer des mycoses, des infections de la peau, des ongles, des muqueuses ou des infections systémiques plus graves. De plus, les champignons peuvent également provoquer des réactions allergiques chez certaines personnes sensibles (**Pfohl-Leszkowicz, 1999**).

Elles sont dotées des propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiques et lipolytiques), qui en font des alliés utiles en industries laitières (affinage des fromages), production des molécules à activité pharmaceutique (antibiotiques) et production d'enzymes industrielles (**Leclerc et al., 1995 ; Bouix et Leveau, 1999 ; Benkakouz, 2002**).

1.1 Développement

Elles se développent en tant que saprophytes, se nourrissant de matière organique en décomposition dans le sol, la terre et les plantes ou sur les débris végétaux en voie de putréfaction. Le développement des moisissures est influencé par la nature des substrats disponibles (la cellulose, la lignine, les protéines, les graisses, etc...) les conditions physiques (températures, activité de l'eau (aw) ou disponibilité en eau, pH et oxygène) et d'autres facteurs environnementaux (**Gibson et al., 1994 ; Rebouxet al., 2010**).

1.2 Conditions de croissance

a- Éléments nutritifs

Le carbone et l'azote sont les éléments nutritifs les plus importants pour les moisissures, avec la présence de quelques ions minéraux (Potassium, Phosphore, Magnésium...) en très faibles quantités (**Gherras & El himer, 2017**).

b- Facteurs physicochimiques

Ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination. Nous citons la température, l'humidité, la lumière, le pH, l'oxygène.....

1.3 Appareil végétatif

Elles possèdent un appareil végétatif appelé le thalle, qui se présente sous la forme d'un réseau filamenteux appelé mycélium présenté dans la figure 1. Le mycélium est constitué de longs filaments appelés hyphes voire Figure 2. Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale des spores. (Bourgeois, 1989).

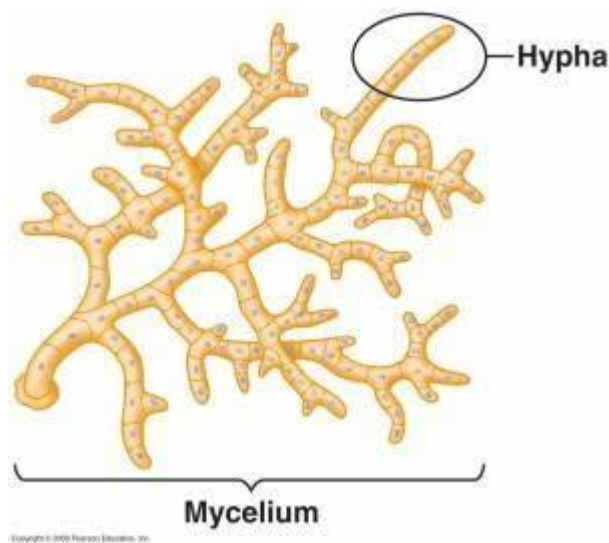


Figure 01 : Structure de mycélium
(www.researchgate.net)

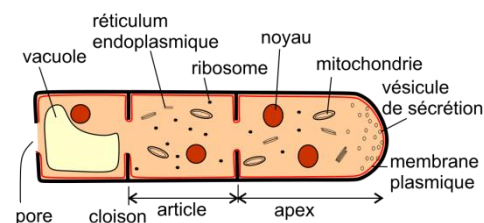


Figure 02 : Structure de hyphe
(Silar & Malagnac, 2013)

1.4 Reproduction

Peut se faire de deux manières principales, soit par germination soit par des spores (schématisé dans la figure 3).

-Reproduction sexuée par fécondation (fusion des gamètes des cellules de deux individus de sexe différent pour former un œuf) est correspondant à la forme téléomorphe (Duran *et al.*, 2010).

-Reproduction asexuée (un seul individu est impliqué pour former des spores) par bourgeonnement ou bien par fragmentation est correspondant à la forme anamorphe (Duran *et al.*, 2010)

Ou bien les deux formes de reproduction sexuée et asexuée sont coexistent est correspondant à la forme holomorphe. (Duran *et al.*, 2010)

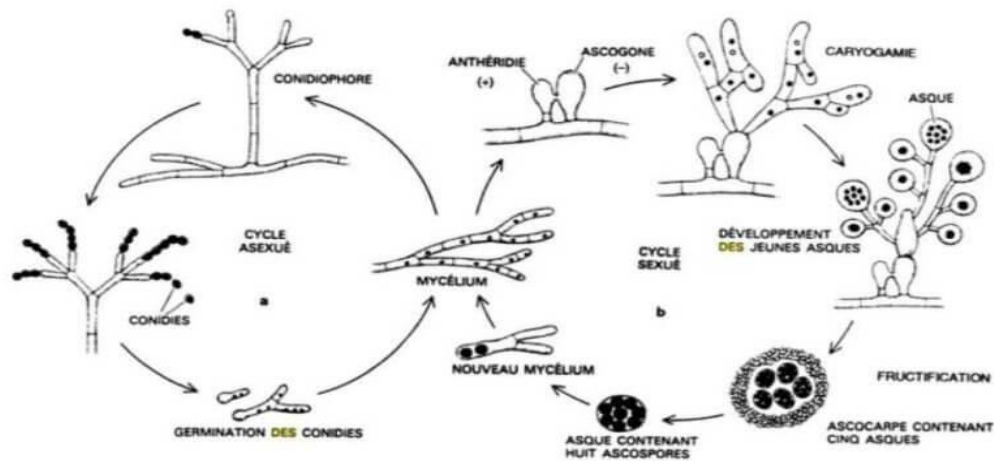


Figure 03 : Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure (Leceiller, 2013)

1.5 Rôle des moisissures sur le plan économique

On peut classer les moisissures en deux groupes :

a. Moisissures utiles

Sont utilisées dans diverses industries pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques (arôme, saveur) et technologiques (conservation, texture). Par exemple : certaines moisissures sont utilisées dans la production de fromages, de vins, de pains et de produits fermentés tels que le miso ou le tempeh. Elles contribuent à la formation de saveurs caractéristiques et à la transformation des matières premières.

b. Moisissures nuisibles et toxigènes

Elles peuvent se développer sur différents substrats et y produire tels que les céréales, les fruits, les légumes et les noix, et dans certaines conditions de température et d'humidité favorable. Au cours de leur croissance elles produisent des molécules toxiques dénommées mycotoxines (Boudra, 2009).

1.6 Intérêts industriels

Les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications ; elles sont utilisées dans les industries alimentaires, chimiques, la biolixiviation et la biotransformation, etc. Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (Boiron, 1996).

2. Genre *Aspergillus*

Aspergillus signifie « aspersoir » à cause de la forme de ses têtes Aspergillaires (Galinas, 1995). Ce genre a été découvert et reconnu comme un

microorganisme en 1729 par Antonio Micheli. Il se trouve dans le monde entier et se constitue de plus de 300 espèces officiellement reconnues (Balajeet *et al.*, 2006).

Ce genre comprend plusieurs espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Raper & Fennell, 1965 ; Botton *et al.*, 1990).

Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines (Roquebert, 1998). Ce sont des moisissures à filaments cloisonnés hyalins, appartenant à la famille des Aspergillaceae, et à la classe des Ascomycètes (Galinas, 1995 ; Champion, 1997).

Les champignons du genre *Aspergillus* sont caractérisés par leur apparence filamentaire et leur capacité à produire des spores asexuées appelées conidies. (Balajeet *et al.*, 2006).

La structure de ce genre *Aspergillus* présentée dans la Figure 4



Figure 04 : Structure de *l'Aspergillus*

(www.aquaportail.com)

2.1 Taxonomie

Les espèces du genre *Aspergillus* appartiennent au règne des Fungi, à l'embranchement des Ascomycota qui regroupe des champignons à mycélium cloisonné. Ils sont inclus dans le sous-embranchement des Pezizomycotina, la classe des Eurotiomycetes, la sous-classe des Eurotiomycetidae, et l'ordre des Eurotiales. Les aspergillus sont caractérisés par leur reproduction sexuée avec formation d'asques contenant des ascospores de type cleistothèce ou plus rarement de type gymnothèce, et ils sont reproduisent également de

manière asexuée (une multiplication asexuée) par phialides produisant des phialoconidies. (Hibbett *et al.*, 2007 ; Bennett, 2010).

La classification d'*Aspergillus* selon Michel présentée dans le Tableau 1.

Tableau 01 : Classification de genre *Aspergillus* (Micheli 1809)

Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Sous –classe	<i>Eurotiomycetidae</i>
Ordre	<i>Eurotiales</i>
Famille	<i>Trichomaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i>

Le genre *Aspergillus* comprend 250 espèces, regroupées au sein de 18 sections distinctes. Ces sections comprennent : *Flavi, Nigri, Circumdati, Terrei, Fumigati, Clavati, Nidulantes, Candidi, Usti, Restricti, Flavipedes, Cremei, Cervini, Sparsi, Ornati, Warcupi et Zonati*. (Raper & Fennell., 1965; Peterson *et al.*, 2000 ; Samson & Varga., 2010 ; Celiker *et al.*, 2015).

Plus récemment, la section *Aspergillus* qui correspond aux espèces autre fois regroupées sous le nom d'Eurotium. (Chenet *et al.*, 2017). De plus, l'utilisation des outils de biologie moléculaire a conduit à l'identification fréquente des nouvelles espèces et la taxonomie de ce genre fongique (*Aspergillus*) est donc en constante évolution à mesure que de nouvelles espèces sont découvertes et que notre compréhension de leur diversité évolue : des espèces telle que *A. hancockii* (Pitt *et al.*, 2017; Carvajal-Campos *et al.*, 2017).

2.2 Morphologie

Les espèces d'*Aspergillus* sont caractérisées par leur structure morphologique. Leur mycélium végétatif constitué d'hyphes cloisonnés hyalins, de diamètre fin et régulier, portant des conidiophores qui sont des structures spécialisées de reproduction.

Ces conidiophores sont constitués d'un stipe non ramifié se dressant à partir des hyphes végétatifs et se terminant par une vésicule de forme variable (globuleuse, sphérique, pyriforme, claviforme ou en forme de spatule) sur laquelle, sont disposées les phialides.

Chez certaines espèces d'*Aspergillus*, les phialides produisant les conidies sont directement formées sur la vésicule (tête conidienne unisériée).

D'autres espèces possèdent une autre structure entre la vésicule et les phialides, nommée métule qui ce donne une tête conidienne bisériée. L'ensemble vésicule, phialide, conidies forme ce qu'on appelle la tête aspergillaire(voire la Figure 5) qui caractéristique distinctive du genre *Aspergillus*. Les conidies sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées et sont plus ou moins pigmentées(Chabasseet *al.*, 2002).

Il est également possible de trouver des cellules à paroi épaisse appelées (Hüllecells) parfois présentes (Botton *et al.*, 1990).

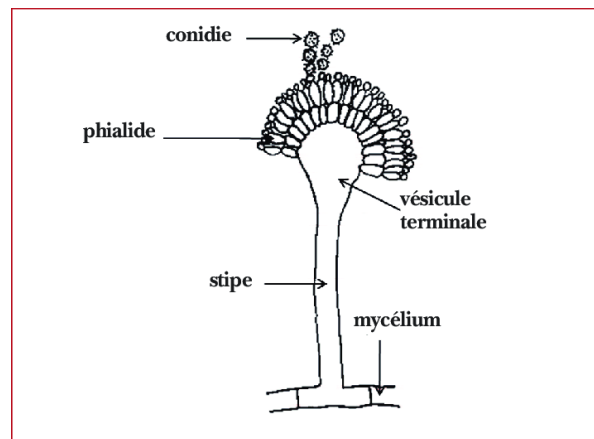


Figure 05 :Représentation schématique d'une tête Aspergillaire.

www.mycologie.adelaide.edu.au

2.3 Identification des *Aspergillus*

L'identification est basée sur leur morphologie et en particulier la couleur des colonies, l'aspect des têtes aspergillaires, l'aspect des conidies, des conidiophores.(Rapper & Fennell, 1965 ; Samson *et al.*, 2006).

Elle est aussi basée sur l'analyse moléculaire de la séquence de certains gènes et en particulier les ITS, la Béta-tubuline et la calmoduline (Maghubietal., 2013;Adjovietet *al.*, 2014 ;Carvajal-Campos *et al.*, 2017).

2.4 Caractères cultureux

Les *Aspergillus* Ce sont des champignons filamenteux qui présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose, malt, agar, YES agar et malt salé) et le milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques. Ils sont cependant en majorité inhibés par

l'actidione. Après (24 à 48 heures) d'incubation, on peut observer des colonies plates, formées de courts filaments aériens blancs. C'est suite à la maturation des structures conidiogènes.

Après (48 à 96 heures) d'incubation, les colonies présentent leur teinte caractéristique: brune, verte, jaune, ou même noire selon les espèces. Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses.

La couleur de la culture permet une orientation rapide du diagnostic d'espèce (d'identification des espèces morphologiquement proche nécessitent un examen plus approfondi à l'échelle microscopique).

Les *Aspergillus* se développent bien sur les milieux classiques de mycologie comme celui de Sabouraud. Mais si nécessaire, leur fructification peut être stimulée par repiquage de la colonie sur une gélose au malt, ou sur milieu de Czapek qui constituent leurs milieux de référence. Enfin, les *Aspergillus* poussent à 22-25°C et à 37°C pour les espèces qui sont thermophiles.

2.5 Habitat

Les *Aspergillus* sont largement répandus dans l'environnement et peuvent être retrouvés dans divers endroits mais beaucoup plus dans les denrées alimentaires, la poussière de maison et dans les endroits peu accessibles au nettoyage. Elles sont rencontrées dans les denrées alimentaires, les poussières de la maison, les climatiseurs et humidificateurs, les Solutions liquides et les vêtements (Mallea M *et al.*, 1982). Les *Aspergillus* peuvent se retrouver sur les vêtements, en particulier lorsqu'ils sont exposés à des environnements humides ou à des conditions favorables à la croissance fongique. 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 (Stankovic K *et al.*, 2006).

2.6 Condition de développement

Selon l'étude de Masimango (1978), les *Aspergillus* sont des champignons de type moisissures qui prospèrent dans des conditions spécifiques.

Les meilleures conditions de développement pour les *Aspergillus* sont généralement offertes lorsque deux facteurs clés sont réunis : une humidité relative de 80 à 90 % et une température comprise entre 20 et 35 °C. Ces conditions sont considérées comme favorables à leur croissance et à leur reproduction.

2.7 Mode de contamination

Les spores d'*Aspergillus* étant en suspension dans l'air, leur inhalation est obligatoire et quotidienne. La voie principale de pénétration dans l'organisme est la voie respiratoire,

c'est donc l'appareil broncho-pulmonaire qui est le plus fréquemment concerné par la maladie aspergillaire.

Dans certaines circonstances, comme lors de la manipulation de grains ou de foin moisissus, l'inhalation des spores peut être massive.

Dans ce cas, le champignon est retrouvé dans l'expectoration pendant plusieurs jours après la contamination, que le sujet soit malade ou non.

La voie aérienne est aussi responsable des localisations sinusiennes (infections fongiques au niveau des sinus) (Dupont, 1981).

3. Espèce *Aspergillus Tubingensis*

Aspergillus tubingensis est une moisissure appartient à la section Nigri (*Aspergillinoir*) de la famille des *Trichocomaceae*. Elle a été décrite en 1943 par Raoul Mosseray au Congo belge (Samson *et al.*, 2014). La confusion entre les deux espèces, *Aspergillus Tubingensis* et l'*Aspergillus Nigri*, en raison de leur morphologie et de leur habitat similaires (Oisewacz, 2002). *Aspergillus Tubingensis* montre une croissance rapide en couvrant la gélose avec une poudre blanche au début de la croissance qui devient noire pendant le développement. Les diamètres des colonies sont supérieurs à 85 mm après 7 jours de culture à 28 °C. Dans ces conditions, le champignon filamenteux présente une forte sporulation (Olarte *et al.*, 2015, Meghnous, 2020).

A. tubingensis est souvent impliqué dans la détérioration des aliments particulièrement des fruits et du blé, ainsi dans la fermentation industrielle. Cette espèce est un agent rare d'infection opportuniste (Perron *et al.*, 2007).



Figure 06 : Structure d'*Aspergillus Tubingensis*

(blueberriesconsulting.com)

3.1 Description d'*Aspergillus tubingensis*

Cette espèce est caractérisée par leur Thalle à croissance modérée, des colonies à villosités radicales, mycélium blanc en début de croissance, vésicules rondes et radicales, mutules 6 μm , conidies 2.5 μm , sporanges composées d'un grand nombre de spores, spores elliptiques, et des sclérotés fréquents chez certaines souches dans les isolats récents, blancs virant au rose 0.5-0.8 mm.

Sous microscope optique *Aspergillus tubingensis* présente des têtes conidiennes brunes foncées à noires, généralement abondantes et légèrement floclées. Les conidiophores environ **70-90 μm** et semblent avoir une granulation de surface limitée. Les conidies avec un aspect épineux. D'ailleurs, ces caractéristiques morphologiques sont vraiment proches (similaires) de celles d'*A. niger* (Olarteet *al.*, 2015).

3.2 Habitat et écologie

Aspergillus tubingensis est connue pour sa résistance élevée à la lumière ultraviolette (UV). Cette caractéristique lui permet de survivre et se développer dans des environnements exposés à des niveaux élevés de lumière UV. Elle est capable de croître dans des conditions à température élevée, notamment entre 86 et 99 ° F (Botanaet *al.*, 2015).

4. Lactosérum

Le lactosérum est un sous-produit laitier liquide de couleur jaune verdâtre obtenu pendant la fromagerie, de la caséinerie ou de produits similaires, par séparation du caillé après coagulation du lait. Le caillé représente l'ensemble des protéines non solubles et la matière grasse, alors que le lactosérum contient toutes les substances solubles du lait : eau, lactose, protéines, minéraux solubles et de trace de matière grasse. Il représente 85 à 90% du volume de lait utilisé (Guidini *et al.*, 1984).

Il renferme 94 % d'eau, 4 à 5 % de lactose, des protéines solubles, des vitamines et des sels minéraux et un peu de matière grasse. Le lactosérum doux est pauvre en calcium et phosphore contrairement au lactosérum acide (Schuck, 2004).

Les différents types de vitamines présentes dans le lactosérum sont représentés en mg/ml dans le (tableau 02) ci-dessous :

Tableau 02: Composition du lactosérum (Linden et Lorient, 1994).

Composition	Concentration en vitamine (mg /ml)	
	Lactosérum doux	Lactosérum acide
thiamine	0.38	
riboflavine	1.20	
acide nicotinique	0.85	
acide panothénique	3.4	
pyrodoxine	0.42	
cobalamine	0.03	
acide ascorbique	2.2	
	Lactosérum doux	Lactosérum acide
olides totaux	63.0-70.0	63.0-70.0
lactose	46.0-52.0	44.0-46.0
Protéine	6.0-10.0	6.0-8.0
Calcium	4.0-6.0	1.2-1.6
Phosphate	1.0-3.0	2.0-4.5
Lactate	2	6.4
Chlorite	1.1	1.1

4.1. Lactosérum et pollution de l'environnement

Le rejet de lactosérum dans l'environnement (sols, rivières, les eaux résiduaires.....) provoque des effets polluants. Les microorganismes bondir certains constituants du lactosérum (lactose principalement). Par exemple les microorganismes peuvent consommer l'oxygène dans l'eau, ce qui peut entraîner une diminution de la disponibilité de l'oxygène pour les poissons et les plantes aquatiques cette manque d'oxygène provoque leur dégradation et leur mort (YANG *et al.*, 1980). Le rejet du lactosérum est considéré comme un polluant car il impose une forte demande biochimique en oxygène (DBO), de 30000-50000 ppm (MARWAHA *et al.*, 1988).

4.2. Valorisation du lactosérum

La valorisation du lactosérum permet de diminuer au maximum le risque de pollution provoquée par le lactosérum rejeté dans les eaux résiduaires. Le lactosérum entre dans la composition de divers produits alimentaires et pharmaceutiques, notamment les produits diététiques.

Les progrès de la technologie ont permis ces dernières décennies de résoudre les problèmes de valorisation d'un produit agricole qui contient encore la moitié de la matière sèche du lait. À cette fin, il faut procéder à une série d'extractions :

- éliminer l'eau, le principal constituant du lactosérum : par évaporation et séchage sur cylindre ou par pulvérisation (**Thomaset al., 2008**).
- enrichir et extraire les protéines sériques et matière grasse : par ultrafiltration
- éliminer une partie des minéraux : par échange d'ion et électrodialyse (**Gaucheron, 2004**).
- et en fin extraire le lactose. Plusieurs expériences ont été tentées pour la valorisation de lactosérum en utilisant comme substrat de production de différents produits : supplément protéiques pour les ruminants, levure de boulangerie, acide lactique, éthanol et protéases. Il permet en particulier la production de l'aspartyl protéase (**Mechakraet al., 1999**).

Le lactosérum est un bon milieu de culture pour les bactéries lactiques (production d'acide lactique) et les levures et des souches de *Streptococcus lactis* (**Botofonja, 1994**)

4.3. Intérêt de lactosérum

4.3.1-Intérêt alimentaire

Le lactosérum utilisé pour remplacer partiellement le lait dans la chocolaterie et la biscuiterie industrielle. La matière grasse du lactosérum « la crème de sérum » peut être utilisée pour la fabrication de fromage à pâte fondue ou de beurre de second choix. (**Luquet&Boudier, 1990**). De plus ingrédient, il est utilisé pour enrichir les aliments ou les régimes pauvres en protéines (**Lowisfert, 1994 ; Dryeret al., 2001**). En pathologie, il est utilisé pour l'alimentation des diabétiques, des malades diabétiques ou des sujets souffrant de mal nutrition, et en alimentation de soutien, pour les sportifs, les personnes âgées (**Dryer, 2001**).

4.3.2Intérêt industriel du lactosérum

Les recherches effectuées pendant plusieurs années ont permis de comprendre l'intérêt nutritionnelle du lactosérum, ainsi que les possibilités de son utilisation en alimentation du bétail (vache), comme milieux de fermentation pour la production par voie microbienne de l'acide lactique, acide citrique, des vitamines (B2, et 12), d'enzymes (protéase, amylase, galactosidase et cellulase) et de biomasse.....(**BENAOUIDA, 2008**).

4.3.3Intérêt médical

Les différents types de protéine ou peptide se trouvant dans le lactosérum peuvent être utiles lorsqu'on les applique dans l'alimentation humaine. Ils ont un effet bénéfique sur la santé. Ce qui est mentionné dans le tableau suivant

Tableau 03 : Activité biologique des protéines et des peptides du lactosérum (McIntoch, 1998 ; Berry, 2000).

Protéine	Activité probable
Protéine du lactosérum brut	Anti-cancérogène Stimule le système immunitaire Prolonge la durée de vie Réduire le cholestérol
Beta lactoglobuline	Facilite la digestion
Beta lactorphine	Augmente le contrôle de la douleur
Alpha lactalbumine	Anti-cancérogène
Alpha lactorphine	Augmente le contrôle de la douleur
Lactoferrine	Antimicrobien (antiviral/anti-B) Contrôle le transport du fer Stimule le système immunitaire Anti-inflammatoire Favorise la croissance cellulaire Anti-cancérogène Antimicrobien
Immunoglobuline	Immunité passive
Lactoperoxydase	Antibactérien
Sérum-albumine sérorphine	Augmente le contrôle de la douleur
Glucomacropéptide	Facilite la digestion

5. Méthodes d'analyse biochimique d'un mélange

5.1 Filtration

La filtration est un procédé physique destiné à clarifier un liquide qui contient des matières solides en suspension en le faisant passer à travers un milieu poreux (Dinnate, 2003).

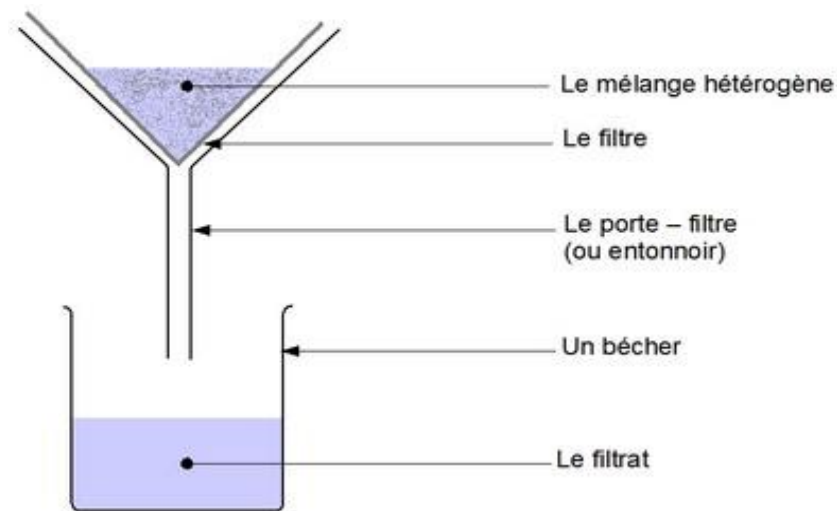


Schéma d'un montage de filtration

Figure 07:Schéma d'un montage de filtration

(physique.buil(at)orange.fr)

5.2 Centrifugation

La centrifugation est une technique permettant de séparer les composés d'un mélange qui peut être constitué soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide en fonction de leur densité en les soumettant à une force centrifuge par l'utilisation d'une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse. **(Gaillet & Garnier, 2013)**.

Le champ d'accélération terrestre ($g = 9.8 \text{ m.s}^{-2}$) ne permet que la sédimentation de grosses particules qu'on appelle la décantation, et pour les plus petits éléments, la diffusion s'oppose à la sédimentation. Il faut donc faire appel à des accélérations importantes → on utilise des centrifugeuses ou des ultracentrifugeuses. Cette séparation est sous l'influence d'une force centrifuge relative en g est fonction de la vitesse en tours/min du rotor et de la distance entre l'axe du rotor et le point considéré (ou rayon de rotation) selon la formule :

$$\text{FCR} = 1.118 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot n^2$$

Avec : r = distance en cm entre l'axe du rotor et le point considéré (rayon de rotation)

n = vitesse de rotation en tours par minute **(Gaillet & Garnier, 2013)**.



Figure 08:Centrifugeuse
(DirectIndustry.fr)

5.3. Comptage cellulaire

5.3.1 Définition du comptage cellulaire

Fait partie du quotidien du biologiste cellulaire. C'est une étape obligatoire, parfois fastidieuse mais incontournable en culture cellulaire. Elle permet d'avoir une information qualitative, et surtout quantitative sur sa culture cellulaire à un temps T. Selon les besoins de l'utilisateur ou de l'expérience, les résultats obtenus peuvent être décisifs pour la réussite de l'expérience. C'est pourquoi, le comptage cellulaire ne doit pas être négligé (Dahmani., 2020).



Figure 09:Lame de cellule malassez

La partie centrale possède un quadrillage différent selon le **type de lame**(Par ex : Malassez, Neubauer, Bürker, Fuchs Rosenthal, Thoma, ou Bürker Türk) (Dahmani, 2020).

• **Les lames Malassez:** généralement utilisées pour le comptage d'échantillons à forte densité cellulaire, tel que le sang. Ces lames permettent le comptage d'une majorité d'échantillons et sont donc les plus répandues en laboratoire.

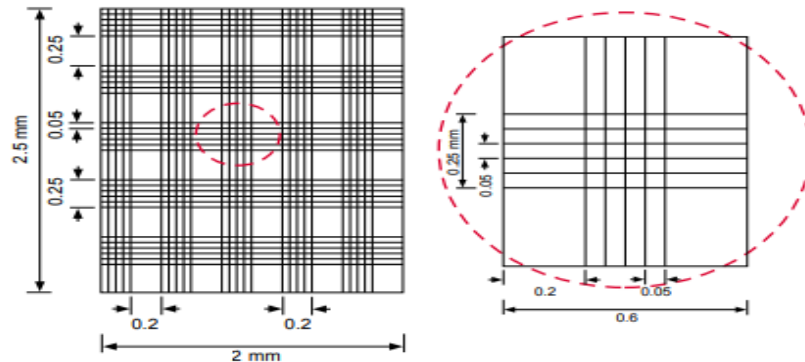


Figure 10: Quadrillage de la Malassez.

(Marienfeld ,2019).

-**Quadrillage de la cellule de Malassez:** le volume total est de **1 mm³**. Chaque bande verticale ou horizontale fait **1/10 mm³**, et chaque rectangle fait **1/100 mm³**. C'est la base de la formule de comptage. Image tirée du catalogue.

5.3.2. Les règles de comptage

- **Grille de comptage:** en culture cellulaire, on peut utiliser uniquement le grand carré central .Il est lui-même subdivisé en 25 petits carrés.
- **Ordre de comptage:** lorsque nous comptons les cellules, il est essentiel de le faire de façon très structurée afin de ne pas compter une même cellule 2 fois .Tout d'abord l'utilisateur établit sa propre routine dans l'ordre de comptage des petits carrés(**Dahmani, 2020**).

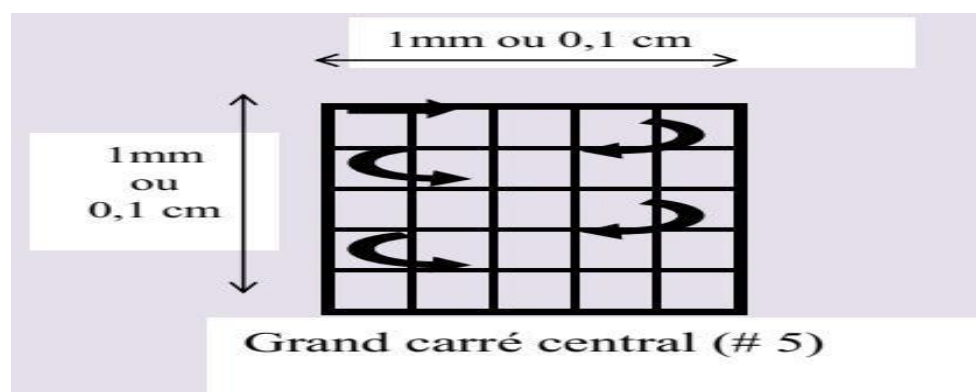


Figure 11 : Règle de comptage cellulaire

(**Dahmani, 2020**).

5.4. Distillation

5.4.1 Définition de la distillation

La distillation est une des méthodes de séparation les plus utilisées industriellement. Cette opération permet la séparation et la purification des constituants d'un mélange en fonction de leurs températures d'ébullition différentes, et leur capacité de vaporisation et la condensation de ces vapeurs permette la récupération d'un des constituants (**Belazreg, 2012 ; Wuithier, 1972 ; Cicile, 2001**).

5.4.2 Principe de la distillation

La distillation consiste à chauffer jusqu'à l'ébullition un mélange liquide, le constituant le plus volatile s'évapore le premier. Par condensation de la phase vapeur, on récupère un liquide nommé distillat ou extrait (dit aussi produit de tête) avec une concentration élevée du composé le plus volatil. La phase liquide non évaporée constitue le résidu ou le raffinat (appelée également produit de pied ou de fond) (**Aggoune, 2015 ; Ardit, 1972**).

Comme la thermodynamique la montre, le contact des deux phases conduit à un change des constituants, les plus volatils s'accumulent dans la vapeur et sont éliminés au sommet de la colonne, alors que les éléments lourds passent en phase liquide et sont extraits du fond de la colonne.

5.4.3 Montage de distillation simple

Le montage d'un dispositif de distillation simple est reporté sur la figure 12.

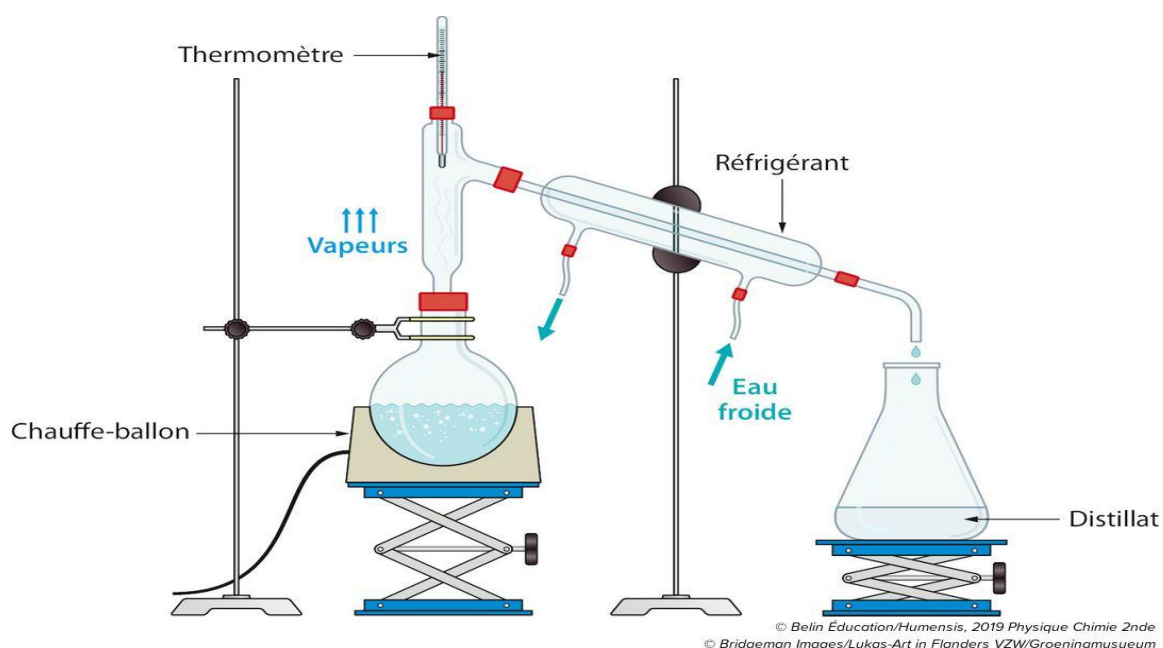


Figure 12 :Schéma de montage de distillation simple.

5.5 Distillation Réactive

La distillation réactive (RD) est l'une des meilleures réussites de la technologie d'intensification de procédé. Récemment, elle est devenue un grand intérêt dans la recherche en génie chimique, bien que le concept de distillation réactive soit connu depuis longtemps. La distillation réactive est développée depuis le début des années 1920 et par conséquent, les divers aspects de celui-ci sont étudiés dans le monde entier. La plupart des études de synthèse par distillation ont concerné des mélanges non idéaux à plusieurs composants. Les principaux avantages de ce procédé par rapport aux alternatives conventionnelles sont la possibilité de mener à terme des réactions chimiques limitées à l'équilibre et la séparation simultanée des produits de réaction en une seule unité. Cela réduit ou élimine les coûts de réacteur et de recyclage. Les procédés de distillation réactive ont gagné en importance dans la conception des procédés. Ils sont économiquement favorables dans de nombreux cas cela a eu un fort impact positif sur l'industrie des procédés chimiques (IPC) (**Kiss, 2013**).

La RD permet réaction et séparation à avoir lieu simultanément à l'intérieur de la colonne fournissant ainsi une synergie précieuse effet qui surmonte les limitations d'équilibre de Notions de base sur la distillation réactive 5 nombreuses réactions, par exemple: estérification, éthérification, hydrolyse, (dés-) alkylation, (dés-) hydrogénation, isomérisation. La RD est également utilisé pour les réactions rapides où la concentration élevée de l'un des produits ou réactifs peut conduire à des réactions secondaires indésirables, d'où la nécessité de réduire leur concentration dans la phase de réaction à des niveaux minimaux pour empêcher la réaction indésirable (**Site web, 2021**).

a. Principes de la distillation réactive

Typiquement, un équipement de colonne RD se compose d'une colonne réactive avec l'entrée d'alimentation. La colonne de distillation réactive peut être divisée en trois zones différentes: rectification, réactive et d'épuisement (stripping). La section de rectification et la section d'épuisement servent à la récupération de réactif à partir du produit. Cependant, elles peuvent ne pas être nécessaires en fonction de la réaction et de la séparation souhaitée. Dans la zone réactive la réaction chimique et la distillation se produisent simultanément (**Hoyme, 2004**). La zone réactive est également le lieu de conditionnement des catalyseurs, qu'ils soient homogènes ou hétérogènes. L'entrée d'alimentation peut être simple ou double. Une double entrée d'alimentation peut améliorer le contact entre les réactifs, résultant en une réaction plus uniformément répartie dans la colonne (**Dragomir, 2004**). La distillation réactive est

appliquée chaque fois qu'une réaction en phase liquide est effectuée avec un grand excès d'un réactif, où le procédé conventionnel subit des coûts élevés en raison du recyclage du réactif en excès. Dans certains cas, la RD peut normalement être effectuée plus près des conditions d'alimentation stœchiométriques, éliminant ainsi le coût de recyclage.

5.6 Chromatographie

Le mot chromatographie vient du mot Grec : Chromatos= Couleur et graphas = écrire. La chromatographie (introduite en 1952) est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles. En chromatographie, l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation. Ce procédé hydrodynamique a donné naissance à une méthode analytique instrumentale qui a un très grand domaine d'applicabilité et par suite se trouve très répandue. Aucun laboratoire analysant des composés moléculaires ne peut ignorer la chromatographie (Francis & Rouessac, 2014).

5.6.1 Principe

L'expérience de base en chromatographie peut être décrite comme suit :

- Immobilisation dans une colonne d'un solide finement divisé appelé phase stationnaire.
- Placement au sommet de cette colonne un petit volume de l'échantillon à séparer.
- Cet échantillon à traverser la colonne de haut en bas au moyen de la phase mobile afin d'entraîner ses divers constituants. Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément, chacun en solution dans la phase mobile (Francis & Rouessac, 2014).

5.6.2 Différentes méthodes chromatographiques

-Il existe de très nombreux types de chromatographies en fonction de la nature de la phase stationnaire et de la phase mobile, ainsi que la nature des interactions entre ces phases et les molécules à purifier ou à séparer.

- La chromatographie en phase gazeuse CPG
- La chromatographie sur couche mince CCM
- La chromatographie en phase liquide CPL
- La chromatographie liquide à haute performance HPLC
- La chromatographie en phase supercritique CPS

Parmi les techniques chromatographiques les plus employées actuellement dans les laboratoires d'analyse chimique la HPLC (High Performance Liquid Chromatography ou Chromatographie Liquide à Haute Performance anciennement appelée High-Pressure Liquid Chromatography pour Chromatographie Liquide à Haute Pression). Cette technique est devenue un outil analytique indispensable, elle permet l'identification, la séparation et le dosage des composés chimiques dans un mélange. Son succès est dû à la meilleure exploitation des mécanismes d'interactions, aux grandes efficacités des phases stationnaires de plus en plus fines (3μ) et au progrès importants effectués dans le domaine d'appareillage.

5.7. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

5.7.1 Principe de la HPLC

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme (Louis, 2001).

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire. Ce principe est traduit par le schéma suivant :

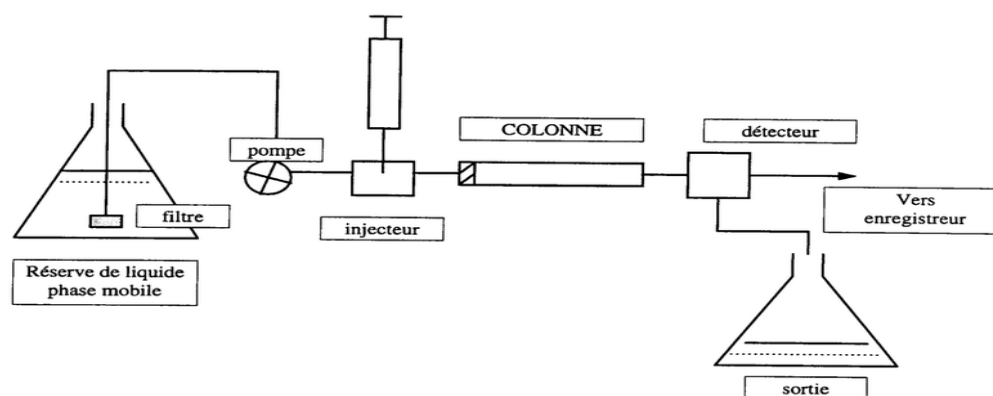


Figure 13 : Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC (François Gambier, 2011)

5.7.2 Domaines d'application de HPLC

Les domaines d'application de HPLC sont nombreux mais elle est particulièrement employée en :

- Biochimie pour l'analyse des constituants d'un composé.
- Séparation et identification des acides aminés, acides nucléiques, protéines, hydrocarbures, pesticides, glucides, antibiotiques, stéroïdes et d'innombrables autres substances organiques et inorganiques.
- Quantification des analytes présents.
- Détermination de la pureté de l'échantillon.
- Assurance qualité et contrôle (**Boutaghane, 2020**).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

L'objectif majeur de cette étude est la séparation des constituants d'un filtrat obtenu par la culture de la souche fongique *Aspergillus tubingensis* sur milieu de culture à base d'un déchet agroalimentaire, le lactosérum, par distillation avec et sans traitement enzymatique.

1. Matériel biologique

La souche fongique de moisissure *Aspergillus Tubingensis* utilisée dans ce travail est isolée et identifiée lors d'un travail précédent par **Benlounissiet al. (2012)**.

Ce travail mentionné est réalisé au sein de l'équipe de Génie Enzymatique et Biomimétisme du laboratoire de Bioengineering au niveau de l'École Nationale Supérieure de Biotechnologie TaoufikKhaznada de Constantine.

2. Revivification et l'isolement de la souche

La revivification est effectuée par la mise en suspension de la souche susmentionnée lyophilisée dans des tubes à vis contenant de l'eau physiologique stérile (**annexe 1**) (**Harold Eddleman, 1998**).



Figure 14 : Revivification de la souche lyophilisée

Pour avoir une solution homogène deux méthodes d'homogénéisation ont été utilisées : Agitation par vortex (IKA VORTEX 3) pendant 2 minutes suivie d'une sonication par un sonicateur(ATU) pendant 2 minutes séparer afin d'éviter la destruction des parois répartis sur plusieurs jours jusqu'à l'homogénéisation de cette solution.

2.1 Milieux de culture

a. préparation des milieux

Préparation de Potato Dextrose Agar (PDA) (**Annexe 2**) et préparation de Sabouraud(**Annexe3**).

Après la stérilisation des deux milieux par l'autoclave(SANOCK) pendant 1 heure et 20 minutes, laissez les milieux refroidir à température ambiante de laboratoire pendant quelques heures.

Ensuite, dans la zone stérile nous versons doucement les deux milieux dans les boîtes de Pétri stérile, nous inclinons légèrement les boîtes de Pétri pour faciliter le remplissage uniforme des milieux, nous attendons jusqu'à le milieu soit complètement solidifié.

2.2 Ensemencement

La souche revivifiée est ensemencée par stries sur chaque milieu, puis incubée à 30°C pendant 7 jours dans une étuve (POL-EKD / APARATURA) (Traoré *et al.*, 2012).

3. Récupération des spores

Afin de récolter les spores, la souche est repiquée sur milieu PDA dans des Erlenmeyers de 250 ml à raison de 50 ml de milieu, puis incubée à 30°C pendant 7 jours. Les spores sont récupérées sous agitation par introduction de 40ml d'eau physiologique stérile (Lenoir *et al.*, 1973 ; Mechakra, 2002).



Figure 15 : Méthode de récolte

4. Comptage des spores

On dépose entre la cellule Malassez et la lamelle environ 10 µl de la solution des spores, laissée au repos pendant 30 min (Dahmani, 2020).



Figure 16 : Matériel de remplissage

Une observation sous microscope (OPTIKA) est réalisée afin de compter les cellules et déduire leur volume exact par rapport à une courbe d'étalonnage établie préalablement.

5. Méthode de culture

5.1 Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture est à base d'un déchet agroalimentaire, le lactosérum, il est préparé par addition de tampon phosphate de pH 6 (v/v) puis supplémenté par 2,506 g/l de l'extrait de levure, 2,809 g/l de Peptone, 4,998 g/l de $MgSO_4$ et 0,496 g/l de $FeSO_4$. (Annexe 5)

Les cultures sont réalisées dans deux Erlenmeyers de 500 ml à raison de 150 ml de milieu de culture stérilisé préalablement à 120°C pendant 20min à pression 1,1 bar. Chaque Erlenmeyer est inoculé avec $0,2 \cdot 10^6$ spores/ml.

5.2 Condition de culture

Les fermentations sont conduites dans un incubateur-agitateur à 30°C pendant 5 jours.



Figure 17 : Milieu de culture

Après culture, les milieux de culture sont filtrés sur du papier WHATMAN n°1, la biomasse pesée et séchée à 105°C pendant 20 h afin de déterminer son poids et le filtrat est utilisé dans la suite du travail.



Figure 18: Filtration de milieu fermenté

6. Distillation



Figure 19 : Représentation de l'appareillage de distillation simple

6.1 Mode opératoire

L'opération consiste à placer le mélange à distiller, l'extrait brute, dans un ballon avec un barreau magnétique stérile. Le mélange des liquides sous agitation est chauffé à l'aide de chauffe ballon-agitateur. Les composants du milieu n'entrent pas tous en ébullition en même temps mais les uns à la suite des autres, en commençant par le plus volatil, c'est à dire se lui dont la température d'ébullition est la plus basse.

Les vapeurs sont entraînées dans le réfrigérant pour être condensées grâce à l'entrée et la sortie de l'eau du robinet. Puis les vapeurs condensées sont récupérées dans une Erlenmeyer jusqu'à la fin de la distillation. Les distillats sont récoltés dans des falcons pour la suite des manipulations.



Figure 20: Tubes falcons contenant le distillat 1

6.2 Distillation après catalyse enzymatique

Le filtrat obtenu a été traité par un mélange enzymatique formé d'une lipase, une cellulase et une protéase afin de comparer les résultats de distillations par HPLC.



Figure 21 : Présentation de distillat traité par le mélange enzymatique

La distillation est réalisée dans les mêmes conditions après action des enzymes à 30 °C pendant 45 min.



Figure 22: Dispositif de la distillation réactive

7. Centrifugation et filtration

Tous les échantillons ont été centrifugés à 12000 rpm pendant 10 min, +4°C puis filtrés sur un filtre de $\varnothing = 0.2 \mu\text{m}$ de diamètre.



Figure 23 : Méthode de filtration

8. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les constituants du filtrat obtenu après culture du microorganisme traité et non traité par la préparation enzymatique ont subi une séparation par chromatographie liquide à haute performance (SHIMADZU).



Figure 24 : Présentation de l'appareillage de l'HPLC

Dans laquelle une colonne C18 et deux phases mobiles ont été utilisées, un tampon phosphate 0,02M, pH 6,0 et une solution méthanol/eau (50:50, v/v).

Les conditions de la HPLC étaient comme suit : le volume injecté : 10 μ L, débit : 1ml/minutes, la durée : une heure, la longueur d'ondes : 254 et 365 nm.

Chapitre 3

Résultats et discussions

1. Revivification et l'isolement de la souche

La revivification de la souche permet de redonner vie à la souche lyophilisée. Et l'opération de l'isolement a été réalisée sur les milieux PDA et Sabouraud afin d'observer l'apparition des colonies. Elle a permis d'avoir les résultats mentionnés sur la figure 25:



Figure 25: Résultats de la revivification et l'isolement de la souche

2. Milieu culture

Le milieu de culture de la souche *A. tubingensis* avec du lactosérum, ce dernier est obtenu par coagulation du lait de vache par de la présure commerciale, et du tampon phosphate 0,1M, pH 6,0 (50 :50, v/v) supplémenté.

On faire cette préparation pour avoir un milieu prêt pour la fermentation mais est nécessaire d'inoculé ce milieu avec $0,2 \cdot 10^6$ spores/ml (Ces spores qui ont obtenu à partir de la purification de la souche).

Les résultats de cette étape c'est l'obtention d'un milieu fermenté qui contient la biomasse et l'extrait brute qui motionnés sur les figures suivants :



Figure 26: Un Milieu férmenté



Figure 27 : Biomasse récupérée après filtration du milieu fermenté



Figure 28 : Extrait brute récupérée à partir de la fermentation du milieu

3. Résultat de la distillation

3.1 Résultat de la distillation simple

-On réalise une distillation simple pour la séparation de filtrat (extrait brute) obtenu par l'opération précédente, les résultats avant et après cette distillation dans les figures suivants :



Avant

après

Figure 29 : Distillation simple

3.2 Résultat de la distillation réactive

-La quantité de distillat obtenu à partir de la première distillation (distillation simple) est traitée par un mélange enzymatique formé d'une lipase, une cellulase, et une protéase ensuite distillé la dixième fois par une distillation réactive pour la séparation de distillat 1 à la présence d'un mélange enzymatique voir les résultats au-dessous :



Avant

Après

Figure 30 : Distillation réactive

4. Centrifugation et filtration

Tous les échantillons ont été centrifugés puis filtrés. Avant l'HPLC pour enlever les microparticules (particule invisibles).

5. Résultats de chromatographie liquide à haut performance

Les constituants du filtrat obtenu après culture du microorganisme traité et non traité par la préparation enzymatique ont subi une séparation par chromatographie liquide à haute performance, les résultats de cette séparation sont représentées sur les figures 31, 32, 33 et 34.

5.1. Résultats du distillat non traité par la préparation enzymatique

5.1.1 Dans la longueur d'onde 254 nm

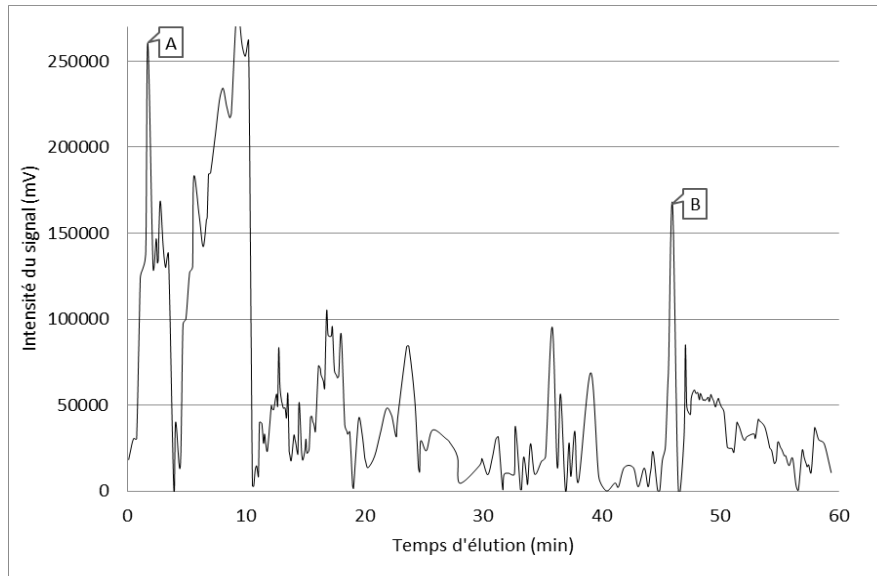


Figure 31 : Résultat du distillat non traité dans 254 nm par HPLC

Le résultat de séparation du distillat non traité par le complexe enzymatique dans la longueur d'onde 254 nm par HPLC laisse apparaître deux pics : un pic (A) avec un temps de rétention égal à **1,706** min et une intensité de **260818** mV, et un pic (B) avec un temps de rétention de **45,973** min et une intensité de **167028** mV.

5.1.2 Dans la longueur d'onde 365 nm

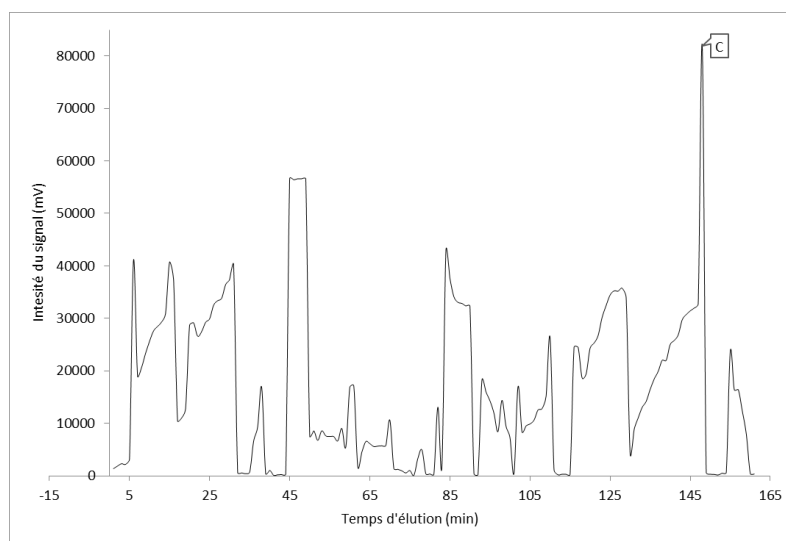


Figure 32 : Résultat du distillat non traité dans 365 nm par HPLC

le résultat de séparation du distillat non traité par le complexe enzymatique dans la longueur d'onde **365 nm** par HPLC DONNE un seul pic (C) avec un temps de rétention égal à **148 min** et une intensité de **81866 mV**.

La détection de deux pics (A) et (B) observé à la **1,706** et **45,973 min** dans longueur d'onde 254nm dans le distillat non traité sont absents dans la longueur d'onde 365nm dans laquelle un seul pic (C) apparait à **148 min**.

Dans le cas du distillat non traité le chromatogramme détecte deux pics (A et B) chaque pic correspond à une molécule à la longueur d'onde 254nm absentes à 365nm qui laisse apparaître un seul pic.

5. 2 Résultats du distillat traité par la préparation enzymatique

5.2.1 Dans la longueur d'onde 254 nm

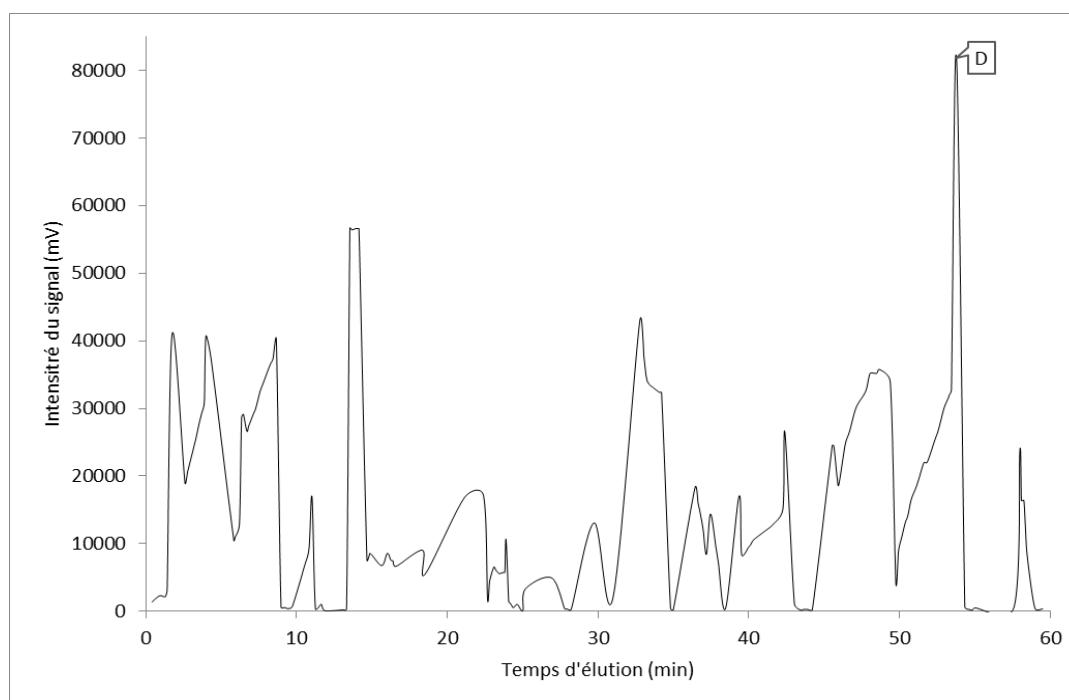


Figure 33 : Résultat de distillat traité dans 254 nm par HPLC

Le résultat de séparation du distillat traité par le complexe enzymatique dans la longueur d'onde **254 nm** par HPLC permet l'apparition d'un seul pic (D) avec un temps de rétention de **53,786 min** et une intensité de **81866 mV**.

5.2.2 Dans la longueur d'onde 365 nm

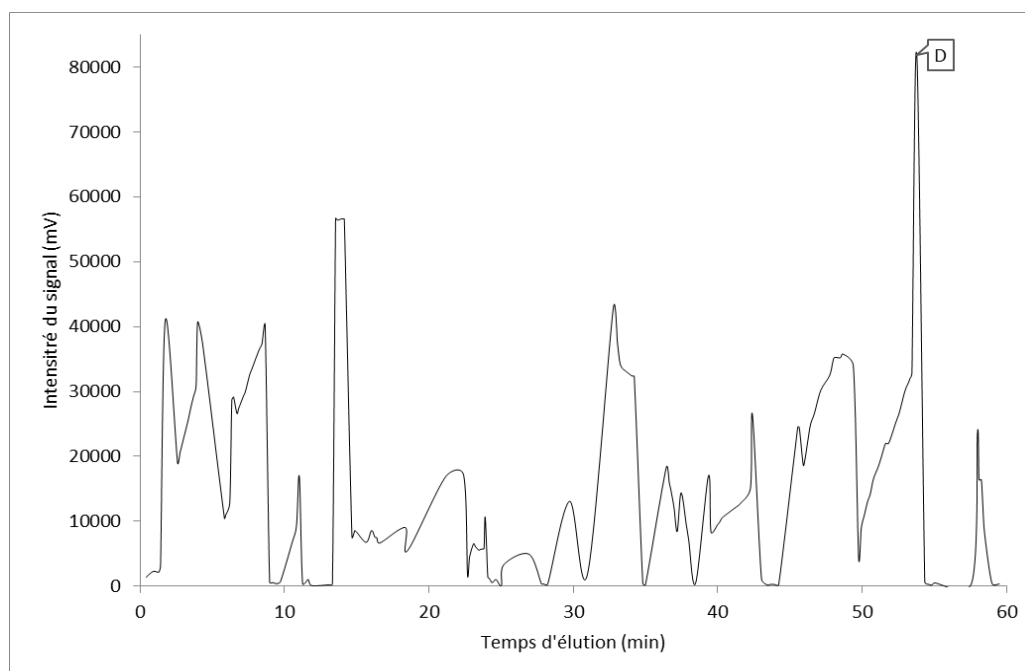


Figure 34 : Résultat de distillat traité dans 365 nm par HPLC

Le résultat de séparation du distillat traité par le complexe enzymatique dans la longueur d'onde **365** nm par HPLC permet l'apparition d'un seul pique (D) dans le temps de rétention **53,786** min avec **81866** m d'hauteur.

La détection d'un pique apparu à la **53,786** min dans le distillat traité par enzyme que ce soit à la longueur d'onde de 365nm ou bien à 254nm donc aucune différence marquée.

-Dans deux longueurs d'onde 365nm et 254 nm chez le distillat traité notre chromatogramme détecte un seul pique dans la même minute, chaque pique correspond à une molécule. Cette molécule apparaît dans les deux longueurs d'onde. Donc le chromatogramme ne détecte aucune différence (présence ou l'absence des molécules) dans les deux longueurs d'onde différentes.

Dans la longueur d'onde 254 nm le chromatogramme a laissé apparaître deux pics (A et B) dans le cas du distillat non traité correspondant à deux molécules et un seul pic (D) chez le distillat traité correspondant à une molécule. Les pics (A et B) étaient absents chez le distillat traité donc la disparition des molécules et l'apparition d'un nouveau pic (D) peut être expliquée par l'action de la préparation enzymatique sur les molécules responsables des pics A et B.

Dans la longueur d'onde 365 nm le chromatogramme montre un pic (C) chez le distillat non traité qui correspond a une molécule inconnue et un seul pic (D) dans le cas du distillat traité mais pas au même moment ce qui laisse apparaitre un temps de rétention différent laissant penser à une molécule nouvelle.

D'après les résultats, chaque pic correspondent à l'apparition d'une molécule, l'augmentation de la hauteur de pique est directement proportionnelle à l'augmentation de la concentration de la molécule, après l'identification de cette molécule par la comparaison des résultats avec la bibliographie : les molécules qui ont à obtenu sont des acrylamides.

Conclusion

Conclusion

Aspergillus tubingensis est parmi les espèces les plus utilisées dans différents domaines principalement le domaine biotechnologique grâce à leur capacité de production de biomasse et la production des nouvelles molécules lorsque nous lui fournissons les conditions favorables, principalement l'utilisation d'un milieu de culture basé sur lactosérum contient la suspension des spores de la souche fongique *Aspergillus tubingensis* après leur revivification, isolement, purification et récolte.

La fermentation du milieu de culture permet de obtenir un milieu bien fermenté et après leur filtration on obtient vraiment une biomasse et un extrait brut ce dernier subit à une distillation non traitée et traitée par un complexe enzymatique et afin d'observer l'effet de ce complexe sur les distillats obtenus on réalise une séparation par l'HPLC dans deux longueurs d'onde 254 nm et 365 nm, on remarque une apparition des nouveaux pics différents par leur hauteur et leur temps de rétention correspondent à des nouvelles molécules et pour les identifier on compare ces résultats à ceux d'une bibliographie d'HPLC et on conclut que ces molécules ce sont des Acrylamides varient par leur concentration qui est selon la hauteur de pic élevée plus la concentration de ces molécules élevée et par leur temps de rétention.

Ces résultats qui ont été obtenus à la fin de notre étude sur *Aspergillus tubingensis* nous permettent de confirmer que cette espèce a vraiment la capacité de production de biomasse et des nouvelles molécules (Acrylamides) à partir de sa culture dans un milieu de culture basé sur lactosérum.

Références bibliographique

Références bibliographiques

- **Abdelaziz W. (2006).** Isolement des mycètes producteurs des substances antibactériennes à partir des sols sahariens. Mémoire de Magistère En Microbiologie et Biochimie Appliquées. Université Mentouri. Constantine.
- **Adjovi, Y., Bailly, S., Gnonlonfin, B.J.G., Tadriss, S., Querin, A., Sanni, A., Oswald, I.P., Puel, O. & Bailly, J.D. (2014).** Contrast between natural occurrence of toxigenic *Aspergillus* of the Flavi section and Aflatoxin B1 in cassava: possible explanation. *Food Microbiol.* 38:151-15
- **Balajee, S. A., D. Nickle, J. Varga, and K. A. Marr. (2006).** Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell* 5:1705-12
- **Benaouida K., (2008).** Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Mém. Microb. Appliquée, Univ. Mentouri Constantine. 104p.
- **Benkakouz, M. (2002).** production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur déchets d'orange. Optimisation du milieu de culture, purification partielle et étude des propriétés physico-chimique de l'enzyme. Thème de magistère
- **Benlounissi A, Mechakra-Maza A, Gherib Z, Mahfouz M, Blum LJ, Marquette CA, Tareen MJ (2012)** Milk-clotting fungus enzymes production: a sustainable development approach based on whey recycling. *Afr J Biotechnol* 11:1997–2005
- **Bennett, J. (2010).** An Overview of the Genus *Aspergillus*. In M. Machida and K. Gomi (ed.), *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*
- **Benserradi O, (2022).** cour de Mycologie, Algologie et Virologie. L3 Microbiologie Centre universitaire de mila 2022.
- **Botana, L; Sainz, M (2015).** Climate change and mycotoxins. Berlin, Boston: Walter de Gruyter
- **Berry D., (2000).** Ingredients foods. *Dairy Foods.* 101 (4) : 32
- **Boiron P. (1996).** Organisation et Biologie des champignons. Edition Nathan, pp.149
- **Botofonjagina K. (1994).** Etude de l'activité acidifiante de *Streptococcus salivarius* ssp.
- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1990).** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En

Références bibliographiques

Microbiologie Appliquée, Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine Université Mentouri Constantine, 102p

- **Bouaouine.O,(2015).**Traitement des lixiviats de décharge par coagulation-floculation conséquence. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la « Section midi Pyrénées » à Toulouse, le 18 septembre 1987. Consumes. Céréales. F.Chem. p : 53-57
- **Boudra, H.,(2009).** Les mycotoxines dans les fourrages : un facteur limitant insidieusement la qualité des fourrages et les performances des ruminants. Fourrages, 199, 265-280.
- **Bourgeois C.M., Mescle J.F.et Zucca J. (1989).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P.
- **Bouix, M; Leveau, Jy. (1999).** production des enzymes. in scriban r (ed biotechnologie).editionlavoisier. p: 344-400
- **BoutaghaneN . (2020).**Les techniques Chromatographiques cour Techniques d'Analysesuniversité des frèresMentouriconstantine 1.
- **BroschureMarienfeld. (2019).**Countingchambers. Repéré à https://is.muni.cz/el/sci/jaro2019/Bi8180c/um/Counting_Chambers_en.pdf
- **Carvajal-Campos,A.,Ma)nizan,A.L.,Tadrist,S.,Koffi-Akaki,D.,Koffi-Nevry,R.,Moore,G.G.,Fapohunda,S.O., Bailly, S., Montet, D., Oswald, I.P., Lorber, S., Brabet, C. &Puel, O. (2017).** Aspergillus korhogoensis, a novel aflatoxinproducing species from the Côte d'Ivoire. Toxins 9,353,doi:10.3390/toxins9110353
- **Chabasse D., Bouchara JP., De Gentile L., Cimon B., Brun S., Penn P.** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de Formation Biologie Médicale, (2002), n°25, EGOPRIM éd., Paris, 189 p
- **Champion, R. (1997)** Identifier les champignons transmis par les semences. Ed. Editions Quae, France, 398 p.
- **ChenA.J., HubkaV., Frisvad J.C., Visagie C.M., Houbraken J., Meijer M., Varga J., Demirel R., JurjevicZ., Kuba- tova A., Sklenar F., Zhou Y.G., Samson R.A. (2017).**Polyphasictaxonomy of Aspergillus section Aspergillus (formerlyEurotium)
- **CICILE, (2001)** « Distillation –Absorption », technique de l'ingénieur, J-2610, J-2611, J-2621 J2622 J-2623, Edition Tech
- **Dahmani I. (2020).**comptage des cellules .université des frèresMentouriconstantine 1.

Références bibliographiques

- **Dragomir, M. J. R. M** "Conceptual Design of Reactive Distillation Columns with Non-reactive Sections," Manchester. (2004)
- **Duran, R., Cary, J. W., & Calvo, A. M. (2010).** Role of the osmotic stress regulatory pathway in mor
- **Dupont B. Candidoses, Cryptococcoses, Aspergilloses. (1981),** CEPRIME éd., Paris, 96p
- **Dryer J. (2001).** La grande diversité du lactosérum. Dairyfoods .102(5) : 35
- **DINNAT E.P** « la détermination de la salinité de surface des océanes à partir de mesures radiométrique hyperfréquences en bande L », (2003)
- **El Mahgubi A., Puel O., Bailly S., Tadriss S., Querin A., Ouadia A., Oswald I.P., Bailly J.D. (2013)** Distribution and toxigenicity of *Aspergillus section Flavi* in spices marketed in Morocco. Food Contr. 32:143–148
- **Francis Rouessac, Amnick Rouessac ;** « Méthodes et techniques instrumentales modernes- 6^{ème} édition »; Paris (2014)
- **François Gambier.** Influence des finitions poudres sur l'impact environnemental du MDF. Sciences de l'ingénieur [physics].(2011).
- **Gaillet .B ; Garnier.A ; (2013)** GCH-2100: Éléments de bioprocédés Séparation et purification des produits d'origine biologique. faculté des sciences et de génie, Université LAVAL
- **Gaucheron F, (2004).** Minéraux et produits laitiers, Tec et Doc, Lavoisier : 783- 922.
- **Gibson A.M., Baranyi J., Pitt J.I., Eyles M.J. et Roberts T.A., (1994).** Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. Food Microbiology 23 (1994) 419-431
- **G.Ardit,** « Technologie chimique industrielle », Edition Eyrolles, paris, (1972)
- **Gelinas P., (1995).** Répertoire des micro-organismes pathogènes transmis par les aliments, Edisem, St Hyacinthe, Québec
- **Gherras S, El himer N. (2017).** Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Toxicologie industrielle et environnemental :7-20
- **Giraud J.(1998).** Microbiologie alimentaire .p 8-101.p 330 Edition Donod, Paris
- **Guidini M., Papillon D., Raphalen D et Bariore B. (1984).** Contribution à la valorisation du lactosérum. |. Utilisation actuelle et potentielles. Bul. Soc. Sci. Bretagne Vol 56. p77-88

Références bibliographiques

- **Harold, Ph., Eddleman, D. (February(1998)).** "MakingBacteria Media fromPotato". Indiana Biolab. disknet.com. Retrieved2011-03-04.
- **Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F., (2007).** A higherlevelphylogenetic classification of the Fungi. MycolRes 111:509-47.
- **Hoyme, C. A., "A ParametricReactive Distillation Study: EconomicFeasibility and Design Heuristics" (2004).**
- **Jean-Louis Cuq.** Cours chromatographie liquide, Université Montpellier (2001), p4
- **Kaya-Celiker, H., Mallikarjunan, P.K., Kaaya, A. (2015).** Mid-infraredspectroscopy for discrimination and clas- sification of Aspergillus spp. contamination in peanuts. Food Control 52:103–111
- **Kiss A.A., (2013),** Advanced distillation technologies - Design, control and applications, Wiley-Blackwell, Chichester, UK : VOL 69,2018 :p. 1
- **Lakhdar Aggoune M,** « Détection de défauts dans les procédés industriels par l'utilisation Des méthodes d'identification paramétrique », Thèse de doctorat, université de Stif, (2015).
- **Lecellier, A. ;(2013).** Détection, caractérisation et identification des moisissures par spectroscopie vibrationnelle infrarouge et Raman. Thèse de doctorat d'état, Reims
- **Lclerc, H; Meyer, A &Deianu, J.(1955).**Cours de microbiologie générale (nouveau programme). Ed Doin. P: 77. N.
- **Lenoir J., Glenza A., Bergere J.L., Cerf O., Choisy C., Desmazeaud M., Hermier J., Auberger B., Michèle Schmidt., (1973)** Les facteurs de production du système protéolytique de Penicillium caseicolum. Le Lait, 53(525-526), p. 246-279.<https://doi.org/10.1051/lait:1973525-52612>
- **Linden G., Lorient D.- (1994).** Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole. Edition Masson, Paris,
- **Lowisfert S., (1994).**Recyclage du lactosérum issu de la transformation fromagèredansl'alimentationanimale.Belletin technique UC AAB.2 : 11-17
- **Luquet F. M. &Boudier J. F., (1990).** Utilisation des lactosérums en alimentation humaineetanimale. Apria.21 : 1-7pMallea M., Renard M., Charpin J., (1982). La flore fongique des habitations. Rev Fr Mal Respir. 10: 121-130
- **Mallea M., Renard M., Charpin J., (1982).** La flore fongique des habitations. Rev Fr Mal Respir. 10: 121-130

Références bibliographiques

- **MARWAHA S-S.,KENNED J-F.,(1988)**Whey pollution problem and potentialutilization. International Journal of Food Science and Technology.Vol (23) : 323 – 336p
- **Masimango, N.T., (1978).** Contribution à l'étude de la production de l'aflatoxine B1 par *Aspergillus flavus* Link-Lutte contre la présence de cette toxine dans certaines denrées, Thèse de doctorat, Faculté des Sciences Agronomiques de l'État, Gembloux, 222 p
- **McIntoch G.H.,(1998).**Wheyproteins as functionalfoodingredients. Dairy J. 8: 425-434p
- **Mechakra A., Auberger B., Remeuf F. & Lenoir J. (1999).** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium*
- **Meghnous O. (2020).** Etude de l'aptitude des souches fongiques, isolées de la rhizosphère de deux plantes steppiques de la région minière d'Ain-Babouche, à la remédiation des sols métallifères. Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3ème cycle : Biotechnologie et Bioprocédés, Applications Mycologiques, Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine1, 192 p
- **Mosseray, R (1934).** "Les *Aspergillus* de la section Niger Thom et Church". La Cellule. 43: 203–285.
- **Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. (2000).** L'essentiel en microbiologie. Édition BERTI, Paris
- **Oisewacz, Heinz (2002).** Industrial Applications. New york: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 264–265
- **Olarte. (2015)** phogenesis and secondarymetabolism in filamentousfungi. Toxins, 2(4), 367-381
- **Perrone, G; Susca,A; Cozzi, G; Ehrlich, J; Varga, J; Frisvad, JC; Meijer, M; Noonim, P; Mahakarnchanakul, W; Samson, RA (2007).** "Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2275197>). Studies in Mycology. 59: 53–66. doi:10.3114/sim.2007.59.07 (<https://doi.org/10.3114%2Fsim.2007.59.07>).
- **Peterson, S.W. (2000).**In: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), Integration of Modern TaxonomicMethods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification, HarwoodAcademic, and the Netherlands pp. 163–178
- **Philippe Silar et Fabienne Malagnac, Les champignonsredécouverts, [Belin](#), (2013)**

Références bibliographiques

- **Pierre Schuck**, « Séchage des lactosérums et dérivés : rôle du lactose et de la dynamique de l'eau », *Le Lait*, vol. 84, n° 3, (2004), p. 243-268 .
- **Pitt J.I., Lange L., Lacey A.E., Vuong D., Midgley D.J., Greenfield P., Bradbury M.I., Lacey E., Busk P.K., Pilgaard B., Choo Y.H., Piggott, A.M. (2017).** *Aspergillus hancockii* sp. nov., a biosynthetically talented fungus endemic to southeastern Australian soils. *PLoS One* 12:e0170254.
- **Pfohl-Leszowicks A, (1999).** les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque. Lavoisier, Paris, pp. 478.
- **P. Wuithier**, « Raffinage et génie chimique », Tome 1 ; Edit. Technip : Paris, (1972)
- **Raper K., Fennel D. J., (1965).** The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore
- **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.
- **ater activity on *Aspergillus flavus* and related species. *Food Microbiology* 23 (1994) 419-431**
- **Regnault j.p. (1990).** Microbiologie générale, Ed .vigot , paris ,143-164
- **Roquebert M.F. (1998).** Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification", in "Moisissures des aliments peu hydratés", Ed. Tec & Doc, 39-95.
- **Samson et al., 2006) Samson R.A., Hong S.B. et Frisvad J.C. (2006).** Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*.44:133–148
- **Sparsi, Ornati, Warcupi et Zonati**
- **Samson, R. A., & Varga, J. (Eds.). (2010).** An overview of the genus *Aspergillus*. Wymondham, Norfolk, UK: Caister Academic.;
- **Samson R.A., Visagie C.M., Houbraken J., Hong S.B., Hubka V., Klaassen A.C., Perrone G., Seifert K.A., Susca A., Tanney J.B., Varga J., Kocsubé S., Szigeti G., Yaguchi T. et Frisvad J.C. (2014).** Phylogénie, identification et nomenclature du genre *Aspergillus*. *Études en mycologie*, 78, 141–173. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004
- **S. Belazreg**, « Etude de section de débutanisation du complexe GNL1/Z », Mémoire de l'IAP, (2012).
- **Stankovic K., Sève P., Hot A., Magy N., Durieu I., Broussolle C., (2006).** Aspergilloses au cours de maladies systémiques traitées par corticoïdes et/ou

Références bibliographiques

immunosuppresseurs : analyse de neuf cas et revue de la littérature. La Revue de médecine interne. 27 : 813–827

- **Traoré k. A. (2012).** Aspects épidémiologiques et caractérisation moléculaire des souches du virus de l'hépatite E (VHE) au Burkina Faso .thèse de doctoratenmicrobiologi/thérapeutiques antiinfectieuses
- **yang s-y., jones j-h., olsen f- j., petersonj.,(1980)** Soil as a medium for dairyliquidwastedisposal. Journal of EnvironmentalQuality. (9) : 370 – 372p.
- www.aquaportail.com : Structure de l'*Aspergillus* .
- www.blueberriesconsulting.com: Structure d'*Aspergillus Tubingensis*.
- [WWW .DirectIndustry.fr](http://WWW.DirectIndustry.fr): Centrifugeuse
- www.mycologie.adelaide.edu.au: Représentation schématique d'une tête Aspergillaire.
- [WWW.physique.buil \(at\)orange.fr](http://WWW.physique.buil (at)orange.fr) : Schéma d'un montage de filtration
- www.researchgate.net/figure/Hybrid-reactive-distillation-column-for-ethersynthesis
- [www.researchgate.net:Malalanirina:SylviaRakotonirainy ;\(2018\).structuredu](http://www.researchgate.net:Malalanirina:SylviaRakotonirainy ;(2018).structuredu)
Mycélium et mode de reproduction des moisissures

Annexe

Annexe 1

1/ L'eau physiologie

a- Composition :

- NaCl..... 9g
- L'eau distillé 1000ml

b-Préparation :

- Mettre les deux compositions dans un flacon ISO
- Homogénéisé grâce Vortex Génie 2
- Et stériliser par l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes
- Conservé dans la chambre froide à (-4°C°)

Annexe 2

2/ Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

a- Composition du milieu PDA

- Pomme de terre200g
- Dextrose (Glucose) 20g
- Agar 20g
- L'eau distillée Compléter jusqu'à 1000ml (1L)

b- Préparation de l'extrait de pomme de terre

- 200g de pomme de terre non pelés et non vieilles
- Sont lavés et coupés en petits dés (morceaux)
- Ensuite mis dans un b cher de 500ml + ajouter la quantité d'eau distillé
- Chauffer le milieu avec agitation
- Puis portés à l'ébullition pendant 30 minutes à 1 heure
- Ils sont enfin écrasés, filtrés à travers un coton de fromage ou bien par une passoire
- Et le volume final est complété à un litre d'eau distillée

c- Préparation du milieu

- Dissoudre l'agar à chaud dans l'extrait de pomme de terre
- Puis ajouter dextrose (glucose)
- Compléter le volume à un litre d'eau distillée
- Agitation par un barreau magnétique pour bien mélanger
- Retirer le barreau magnétique
- Passer le milieu dans flacon ISO
- Et stériliser par l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes
- Conservé dans la chambre froide à (-4°c)

Annexe 3

3/ Milieu Sabouraud : -SDA- (Sabouraud Dextrose Agar)

a-Composition du milieu

- Peptone.....10g
- Agar..... 15g
- Dextrose (glucose).....40g
- L'eau distillée..... compléter jusqu'à 1000ml (1L)

b-Préparation du milieu

- Mettre tous les ingrédients (compositions) à une fiole erlenmeyer
- Ajouter la quantité d'eau distillée
- Donne la couleur marron clair
- Chauffer le milieu avec une agitation (sur la plaque d'agitation) par le barreau magnétique
- jusqu'à ce que la couleur devienne transparente
- Retirer le barreau magnétique
- Passe le milieu dans un flacon ISO
- Et stériliser par l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes
- Conservé dans la chambre froide à (-4°C)

Annexe 4

4/ lactosérum (Petit lait)

a. Composition

- Lait..... 1 litre
- Présure..... Quelques grammes

b. Préparation Lactosérum

- Dans un erlemayer de 1000ml
- Ajouter un litre de lait
- Après on a ajoute quelques grammes de présure (coagulant enzymatique).
- Faire une agitation manuelle pendant quelques minutes.
- Ensuite maitre l' erlenmayer dans un cristallisoir qui contient d'eau et placer sur la plaque chauffant et laisser chauffer (comme un Bain-marie) jusqu'à bouillant de à 40°C pendant 20 minutes
- refroidissement (température ambiante au laboratoire) jusqu'àl'avoir les deux phases sont séparées
- Acidification à pH 6
- Filtration sur papier filtre
- Ajustement de pH et dilution par addition de tampon phosphate **0.1** à PH **6.0**
- Le lactosérum obtenu met dans une bouteille, et conservé dans la chambre froide à 4°C.

Annexe 5

5/Milieu de culture

a. Composition de milieu

- Lactosérum..... 50%
- Tampon..... 50%
- Peptone..... 18.73
- Extrait de levure (source de sucre)..... 16.71
- FeSo4 (source de sel)..... 1.81

-MgSO₄ 16.28

b. Préparation du milieu

- Mettre tous les ingrédients (compositions) à une fiole erlenmeyer
- Sous agitation manuelle
- Et stériliser par l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes
- Conservé dans la chambre froide à (-4°C)

Résumés

Résumé

Dans ce mémoire la souche *Aspergillus Tubingensis* lyophilisée, utilisée, a été revivifiée afin d'être cultivée sur milieu liquide à base de déchet agroalimentaire « le lactosérum ». Après culture le filtrat obtenu a subi une distillation sans et après traitement enzymatique par utilisation d'une préparation enzymatique composée de lipase, cellulase et protéase. Les hydrolats obtenus ont fait l'objet de chromatographie liquide à haute performance afin d'essayer d'identifier les molécules obtenues. Les résultats des hydrolats chromatographiés, ont laissé apparaître des pics différents avec des temps de rétention et des intensités différentes avant et après traitement enzymatiques.

Mots-clés : *Aspergillus tubingensis*, distillation, **HPLC**, traitement enzymatique

Abstract

In this document, the used freeze-dried *Aspergillus Tubingensis* strain has been revived in order to be cultured on a liquid medium based on agri-food waste "whey". After culture, the filtrate obtained underwent distillation without and after enzymatic treatment using an enzymatic preparation composed of lipase, cellulase and protease. The hydrolats obtained were subjected to high performance liquid chromatography in an attempt to identify the molecules obtained. The results of the chromatographed hydrolats revealed different peaks with different retention times and intensities before and after enzymatic treatment.

Keywords: *Aspergillus tubingensis*, distillation, HPLC, enzymatic treatment

الملخص

في هذه الأطروحة، تم إحياء سلالة *Aspergillus Tubingensis* المجففة بالتجميد من أجل زراعتها على وسط سائل يعتمد على نفايات الأغذية الزراعية "مصل اللبن". بعد التخمير ، خضع المرشح الذي تم الحصول عليه للتقطير بدون وبعد المعالجة الأنزيمية باستخدام مستحضر إنزيمي يتكون من الليباز والسليولاز والبروتياز. و بعدها إلى تحليل كروماتوجرافي سائل عالي الأداء في محاولة لتحديد الجزيئات التي تم الحصول عليها. أظهرت نتائج الهيدروسولات الكروماتوجرافية قممًا مختلفة مع أوقات احتباس وشدة مختلفة قبل وبعد العلاج الأنزيمي.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus tubingensis*، التقطير ، HPLC ، المعالجة الأنزيمية.

Année universitaire : 2022-2023

**Présenté par : BOUSNANE HALIMA
DOULA AYA**

Thème : Séparation d'un mélange issu d'une culture de la souche *Aspergillus tubingensis* par catalyse enzymatique suivi d'une distillation.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Résumé

Dans ce mémoire la souche *Aspergillus Tubingensis* lyophilisée, utilisée, a été revivifiée afin d'être cultivée sur milieu liquide à base de déchet agroalimentaire « le lactosérum ». Après culture le filtrat obtenu a subi une distillation sans et après traitement enzymatique par utilisation d'une préparation enzymatique composée de lipase, cellulase et protéase. Les hydrolats obtenus ont fait l'objet de chromatographie liquide à haute performance afin d'essayer d'identifier les molécules obtenues. Les résultats des hydrolats chromatographiés, ont laissé apparaître des pics différents avec des temps de rétention et des intensités différentes avant et après traitement enzymatiques.

Mots-clés : *Aspergillus tubingensis*, distillation, **HPLC**, traitement enzymatique

Encadreur : Mme Benlounissi Aïcha (M.C.A- ENSB, Constantine)

Présidente de jury : Mme kassalaouarMounia (M.C.B - Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Examinatrice : Mme Benouchenne Djamila (M.A.B -ENSB, Constantine)