

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
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم: الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Mycologie et Biotechnologie fongique

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

Modélisation de la production de la protéase par *Aspergillus flavus* sur milieu solide.

Présenté par : KOMIRI MANAL

Le 19/06/2022

MAKHLOUFI SAFA

DJAMA CHAIMA

Jury d'évaluation :

Encadreur: Dr. BENKAHOUL Malika (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1: Dr. ABD LAZIZ Ouided (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2: Dr. MEZIANI Meriem (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire
2021 - 2022**

Remerciement

On remercie dieu le tout puissante de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à notre encadreur, Mme .BENKAHOULM., pour ses précieux conseils et corrections, tout au long de ce travail.

Nous tenons à gratifier aussi les membres de jury pour l'intérêt porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail

On adresse aussi nos remerciements à Mme Abdelaziz W., chef du département de microbiologie et à nos enseignants.

Enfin, nos sincères sentiments de gratitude et de reconnaissances vont à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation et
de ses dévouements*

A ma chère mère HAYAT

*A celui qui s'est changé la nuit en jour pour m'assurer les bonnes
conditions*

A mon cher père CHERIF

Je dédie ce travail à :

Mes frères Walid, Sofiane et Mohammed el Amine .

A mes sœurs Malek et Amani .

A ma grand- mère Kamir .

A tout ma grande famille.

A toutes mes amies.

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

A mes camarades d'étude.

MANAL

Dédicace

Je dédie ce travail

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A mes très chers frères Imadé et Aymen et ma belle-sœur Rahma

A ma grande famille

A tous mes amis

A tous mes professeurs

Et à toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue de près ou de loin

Que dieu vous protège et vous bénisse tous

SAFA

Dédicace

*À celle qui m'a soutenu dans ses prières et ses supplications, à ceux qui
ont veillé la nuit pour éclairer mon chemin.*

*À celle qui a partagé mes joies et mes peines, à la source de bonté et de
tendresse, au plus beau sourire de ma vie,*

À la plus merveilleuse femme qui soit : ma chère maman

*À celui qui m'a appris que le monde est un combat et que son arme est
le savoir et la connaissance, à l'homme le plus grand et le plus cher de
l'univers : mon cher père*

*A ceux qui ont reçu un cadeau du destin qui connaissent le son de la
fraternité, à mes belles sœurs et mon frère*

*Je dédie ce travail aussi à mon marie qui m'a soutenu aussi dans mon
parcours*

*à chaque étudiant qui cherche à acquérir des connaissances et à
apporter ses connaissances scientifiques et culturelles à ceux qui ont
veillé la nuit pour éclairer mon chemin.*

CHAIMA

Table des matières

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Partie théorique :

Chapitre 1: Les protéases

1. Les protéases2

1.1. Définition2

1.2. Sources des protéases.....2

1.2.1. Protéases animales.....2

1.2.2. Protéases végétales.....2

1.2.3. Protéases microbiennes.....3

1.3. Classification des protéases.....4

1.3.1. Système EC.....4

1.3.2. Système MEROPS.....5

1.4. Applications des protéases.....5

1.4.1. Industrie alimentation.....5

1.4.2. Tannerie.....6

1.4.3. Industrie des détergents.....6

1.4.4. Industrie photographique.....6

1.4.5. Industrie chimique.....6

1.4.6. Domaine médical.....7

1.4.7. Autres applications.....7

Chapitre 2: *Aspergillus flavus*

1. *Aspergillus flavus*8

1.1. Généralités.....8

1.2. Taxonomie.....8

1.3. Caractérisation morphologique.....9

1.3.1 .Caractéristiques macroscopiques.....	9
1.3.2. Caractéristiques microscopiques.....	9
1.4. Habitat.....	10
1.5. Reproduction.....	11
1.6. Avantages des champignons du groupe <i>Aspergillus flavus</i>	11
1.6.1. Avantages industrielles.....	11
1.6.2. Avantages écologiques.....	11

Chapitre 3 : Substrats utilisés dans la fermentation

1. <i>Artocarpus heterophyllus</i>	12
1.1. Généralités.....	12
1.2. Composition	12
1.3. Utilisation de <i>Artocarpus heterophyllus</i> dans l'industrie.....	13
1.4. Effets bénéfiques du fruit de l' <i>Artocarpus heterophyllus</i>	13
2. Le son de blé.....	13
2.1. Généralités.....	13
2.2. Composition de son de blé.....	14
2.3. Le rôle de son de blé.....	14
2.3.1. Industrie fermentaire.....	14
3. Le sésame.....	15
3.1. Généralités.....	15
3.2. La composition chimique de sésame et leur utilisation.....	15

Chapitre 4 : Fermentation

1. Fermentation.....	16
1.1. Généralités	16
1.2. Substrats utilisés pour la fermentation.....	16
1.3. La fermentation liquide ou submergée (SMF).....	16
1.4. La fermentation solide (SSF).....	17
1.5. Microorganismes utilisés dans la fermentation à l'état solide.....	17
1.6. Avantages de la fermentation sur milieu solide.....	18

Avantages biologique.....	18
Avantages du traitement.....	18
Avantages environnementales.....	18
Avantages économiques.....	18
1.7. Applications industrielles de la fermentation sur milieu solide.....	19

Matériels et Méthodes

Partie 1

1.1. Préparation et développement de l'inoculum.....	20
1.2. Condition de fermentation.....	20
1.3. Dosage de l'activité enzymatique.....	20

Partie 2

1.1. Mise en évidence de l'activité protéasique.....	21
1.2. Production de la protéase alcaline	21
1.3. Dosage de la protéase.....	21
1.4. L'optimisation.....	22
1.4.1. Effets des différents substrats.....	22
1.4.2. Effets de la température et du pH.....	22
1.4.3. Action des activateurs et des inhibiteurs.....	22

Résultats& Discussion

Partie 1

1. Effet du niveau d'inoculum sur la production de la protéase.....	23
2. Effet de pH et température sur la production d'enzyme.....	23
3. Effets des sources de carbone et de nitrogène.....	24

4. Effet de la teneur d'humidité	24
5. Effet du temps d'incubation.....	25

Partie 2

1. Effet de différents substrats et leurs concentrations sur la production de l'enzyme.....	25
2. Effet du pH et de la température	26
3. Effet des inhibiteurs et des activateurs.....	28

Conclusion.....	29
------------------------	-----------

Références bibliographiques.....	30
---	-----------

Annexe

Résumés

Liste
Des Abréviations
Des Figures
Des Tableaux

EC : Enzyme Commission.

A : Aspergillus.

PDA : Potato dextrose agar.

pH : potentiel d'Hydrogène.

rpm : round per minute.

SmF : Submerged fermentation.

SSF : Solid state fermentation.

UI : Unité internationale.

PMSF : fluorure de phénylméthyl sulfonyle.

SDS : Dodécylsulfate de sodium.

EDTA : Ethylène diamine tétraacétique.

FC : Folin-ciocalteu.

TCA : acide trichloracétique.

°C : Degré Celsius.

g : gramme.

µg : microgramme.

nm : nanomètre.

ml : millimètre.

M : Molarité.

UI : Unité Internationale.

Figure 1 : Morphologie des colonies d'*Aspergillus flavus* sur la gélose au dextrose de pomme de terre (PDA); (A) : face, (B) : revers.

Figure 2 : Caractéristiques microscopiques d'*Aspergillus flavus* ; (A) : conidiophores et conidies sous objectif $\times 10$; (B) : conidiophore et conidies sous l'objectif $\times 100$; (C) : conidies sous l'objectif $\times 100$ du microscope stéréo-binoculaire.

Figure 3 : Fruit de *L'Artocarpus heterophylus*.

Figure 4 : Arbre de *l'Artocarpus heterophylus*.

Figure 5 : Effet du niveau d'inoculum sur la production de l'enzyme.

Figure 6 : Effet de pH sur la production d'enzyme.

Figure 7 : Effet de température sur la production d'enzyme

Figure 8 : Effet de source de carbone et nitrogène sur la production d'enzyme.

Figure 9 : Effet de la teneur en humidité sur la production d'enzyme.

Figure 10 : Effet de temps sur la production d'enzyme.

Figure 11 : Effet de différents substrats et leur concentration sur la production de protéases par *Aspergillus flavus*.

Figure 12 : Effet du pH sur la production de protéase par *Aspergillus flavus*.

Figure 13 : Effet de la température sur la production de protéase par *Aspergillus flavus*.

Figure 14 : Effet de l'activateur/ inhibiteur sur la production de protéase par *Aspergillus flavus*.

Tableau 1 : Exemples des protéases microbiennes.

Tableau 2 : Taxonomie de l'*Aspergillus flavus*.

Tableau 3 : la composition nutritive pour 100g de partie comestible de fruit de jacquier.

Introduction

Les protéases appelées également peptidases, ou protéinases (Rawlings *et al.*, 2014), représentent près de 60% du marché industriel et trouvent des applications dans de nombreux procédés biotechnologiques (industrie pharmaceutique, industrie du cuir, industrie des détergents..). De telles enzymes peuvent avoir une importance commerciale et par conséquent, aider dans la dégradation des protéines dans divers processus industriels (Suman Kumar *et al.*, 2021). Les protéases sont un groupe d'enzyme vaste et complexe qui joue un rôle vitale dans les activités nutritionnelles et régulatrices et sont essentielles pour les fonctions physiologiques des organismes vivants. Ces enzymes participent à la dégradation des protéiques en acides aminés que le corps peut utiliser pour l'énergie et jouent également un rôle vital dans les processus essentiels tel que la coagulation du sang, la division cellulaire. Les protéases se trouvent dans une grande diversité de sources telle que les plantes, les animaux et les micro-organismes bactéries et champignons) (Dasari, 2020).

Les protéases commerciales sont produits exclusivement à partir de moisissures des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Rhizopus*, car plusieurs espèces de ces genres sont généralement considérées comme sûres (Suman Kumar *et al.*, 2021).

Les protéases alcalines d'origine microbienne possèdent un potentiel industriel considérable en raison de leur diversité biochimique et de leurs larges applications dans les industries de la tannerie et de l'alimentation, les formulations médicinales, les détergents et les processus tels que le traitement des déchets, la récupération de l'argent et la résolution des mélanges d'acides aminés, elles trouvent leur utilisation la plus importante dans la lessive domestique avec une production annuelle mondiale de détergents d'environ 13 milliards de tonnes (Suman Kumar *et al.*, 2021).

Dans la présente étude, une analyse de travaux concernant la production de protéase a été réalisée, il s'agit d'optimiser la production de la protéase alcaline dans diverses conditions (Suman Kumar *et al.*, 2021 ; Dasari, 2020).

Le but étant d'optimiser les conditions de production de protéases par *Aspergillus flavus* en fermentation à l'état solide.

- D'abord, un isolement est réalisé depuis le sol est réalisé suivie de criblage des isolats producteurs de protéases.
- Ensuite, Préparation de l'inoculum suivie des conditions de culture
- Enfin, le dosage de l'activité enzymatique après optimisation des différentes conditions de fermentation

Revue
bibliographique:
Chapitre 1
Les protéases

1. Les protéases

1.1. Définition

Les protéases constituent un grand groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidique dans les protéines. Le clivage des liaisons peptidiques conduit à la dégradation des substrats protéiques en acides aminés constitutifs. Elle sont classées en (EC 3.4) (Gupta *et al.*, 2002 ; Rao *et al.* ,1998 ; Sabotic et Kos, 2012) cité par (Paula *et al.*, 2015) et elle présente une grande diversité dans leurs propriétés physico-chimiques et catalytiques et une abondante littérature est disponible sur leurs aspects biochimiques et biotechnologiques (Kumar *et al.*, 2008).

1.2. Sources de protéases

Étant donné que les protéases sont physiologiquement nécessaires aux organismes vivants, elles sont omniprésentes, chez les plantes, les animaux et les micro-organismes (Mala *et al.*, 1998) .

1.2.1. Protéases végétales

L'utilisation de plantes comme source de protéases est régie par plusieurs facteurs tels que la disponibilité de terres pour la culture et l'adéquation des conditions climatiques à la croissance. De plus, l'extraction des protéases à partir de plantes est un processus qui prend du temps. La papaine, la bromélaïne, les kératinases et la ficine représentent certaines des protéases d'origine végétale bien connues (Mala *et al.*, 1998). Certaines plantes tels que *Onoporduma canthium* et *Scolymus maculatus* ont fait l'objet de recherche pour tester la capacité de ces protéases végétales à coaguler le lait (Benkahoul *et al.*, 2016 ; Benchiheub *et al.*, 2014).

1.2.2. Protéases animales

Les protéases d'origine animale les plus connues sont la trypsine pancréatique, la chymotrypsine, la pepsine et les rennes (Boyer *et al.*, 1971 ; Hoffman, 1974). Ceux-ci sont préparés sous forme pure en grandes quantités. Cependant, leur production dépend de la disponibilité du bétail pour l'abattage (Mala *et al.*, 1998).

1.2.3. Protéases microbiennes

L'incapacité des protéases végétales et animales à répondre aux demandes mondiales actuelles a conduit à un intérêt accru pour les protéases microbiennes. Les micro-organismes représentent une excellente source d'enzymes en raison de leur grande diversité biochimique et de leur sensibilité aux manipulations génétiques. Les protéases microbiennes représentent environ 40 % des ventes mondiales totales d'enzymes (Goldberg et West, 1996). Les protéases d'origine microbienne sont représentés dans le tableau 1, ces enzymes sont préférées aux enzymes d'origine végétale et animale car elles possèdent la quasi-totalité des caractéristiques recherchées pour leurs applications biotechnologiques (Mala *et al.*, 1998).

Tableau 1: Exemples des protéases microbiennes (Belmessikh *et al.*, 2011).

Sources	Espèces	Références
<ul style="list-style-type: none"> • Moisissures 	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Bauveria felina</i> <i>Aspergillus clavatus ES1</i>	García-Gómez <i>et al.</i> , 2009 Sathya <i>et al.</i> , 2009 Laxman <i>et al.</i> , 2005 Germano <i>et al.</i> , 2003 Wu <i>et al.</i> , 2006 Agrawal <i>et al.</i> , 2005 Hajji <i>et al.</i> , 2007
<ul style="list-style-type: none"> • Levures 	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida lipolytica</i>	Chi <i>et al.</i> , 2007 Tobe <i>et al.</i> , 1976
<ul style="list-style-type: none"> • Bactéries 	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Virgibacillus sp.SK33</i> <i>Synergistes sp.</i>	Ferrero <i>et al.</i> , 1996 George <i>et al.</i> , 1995 Soares <i>et al.</i> , 2005 Patel <i>et al.</i> , 2005 Sinsuwan <i>et al.</i> , 2008 Kumar <i>et al.</i> , 2008a
<ul style="list-style-type: none"> • Actinomycètes 	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Nocardopsis alkaliphila sp.</i>	Mehta <i>et al.</i> , 2006 Hozzein <i>et al.</i> , 2004

1.3. Classification et nomenclature des protéases

Deux systèmes de classification et de nomenclature des protéases sont actuellement utilisés le système EC reconnu par le comité de nomenclature de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire, qui est basé sur les réactions catalysées par les protéases (Enzyme Nomenclature 1992) et le système MEROPS de clans et de familles de peptidases qui utilise une classification hiérarchique des protéases basés sur la structure (Rawlings et Barrett, 1993) cité par (Nelda *et al.*, 2016).

1.3.1. Système EC

Le système de classification EC (Enzyme Committee) est basé sur le type de réaction catalysée et la nature du site actif de la protéase.

Les protéases sont situées dans la classe hydrolases (EC3.), agissant sur les liaisons peptidiques (sous classe peptidase EC 3.4).

Toutes les peptidases catalysent la même réaction, elles peuvent être classés selon la position de la liaison peptidique à hydrolyser au sein de la chaîne peptidique, sur cette base, elles sont divisées en «exo-peptidases», qui n'agissent qu'à proximité d'une extrémité d'une chaîne polypeptidique et en «endo-peptidase» qui agissent de manière interne dans la chaînes polypeptidique (Enzyme Nomenclature, 1992).

Les protéases peuvent se divisés en cinq sous- groupes en fonctions de leurs mécanismes catalytique qui impliquent la présence de certains acides aminés dans le site actif de l'enzyme, il s'agit de :

- 1- les endopeptidases à sérines (EC3.4.21) : possèdent un résidu sérine dans le site actif.
- 2- les endopeptidase à cystéines (EC3.4.22) : ont un résidu cystéine dans leurs sites actif.
- 3- les endopeptidases à aspartate (EC3.4.23) ont souvent deux résidus aspartique, qui sont responsable de l'activité catalytique.
- 4- métallo-endo-peptidases (EC3.4.24) dépend de la présence d'un ion métallique divalent dans le site actif, généralement le zinc.
- 5- les endopeptidases thréonine (EC3.4.25) emploient un résidu thréonine au lieu d'un résidu sérine.

Les endopeptidases qui n'ont pas pu être attribuées à aucun de ces groupes sont répertoriées dans la sous –sous classe EC3.4.99.

1.3.2. Système MEROPS

Le système de classification MEROPS est le plus récent des systèmes et considère les structures primaires et tertiaires pour regrouper des ensembles de peptidases homologues en familles apparentées en clans (Rawlings et Barrett 1993).

Le système MEROPS utilise son propre code d'identification. Chaque famille est identifiée par une lettre représentant le type catalytique des enzymes protéolytiques qu'elle contient, soit A (Aspartique), C(Cystéines), G (Glutamique), M (Métallo), N (Asparagine), P (Mixte), S (Sérine), T (Thréonine) et U (inconnu), suivis d'un numéro attribué arbitrairement.

Le nom de chaque clan est identifié par deux lettres : la première représente le type catalytique des familles incluses dans le clan et la seconde est une lettre majuscule de l'alphabet attribuée séquentiellement.

La lettre « P » est utilisée pour un clan contenant des familles avec plus d'un type catalytique (par exemple : sérine, thréonine et cystéine).

Cette classification est constamment révisée ([https:// mereops.sanger.ac.uk/index.shtml](https://mereops.sanger.ac.uk/index.shtml)).

1.4. Les applications des protéases

En industrie, les protéases d'origine microbienne sont considérées comme les enzymes hydrolytiques les plus importantes. En effet, les protéases alcalines sont les mieux classées sur le marché des enzymes (Mukesh *et al.*, 2012 ; Mahajan *et al.*, 2016). L'intérêt pour l'étude des protéases a augmenté non seulement en raison de la régulation de différents processus métaboliques, mais également en raison de l'utilisation importante dans la communauté industrielle. Les protéases microbiennes ont de nombreuses applications dans différentes industries énumérées ci-dessous. cité dans (Abdul *et al.*, 2019).

1.4.1. Industrie alimentaire

Les protéases sont utilisées en fromagerie pour la coagulation du lait et dans l'industrie boulangère, pour une préparation plus rapide de la pâte, le gluten est partiellement hydrolysé par une protéase fongique thermolabile en raison de son inactivation précoce lors de la cuisson ultérieure (Rao *et al.*, 1998 ; Sumantha *et al.*, 2006).

1.4.2. Tannerie

L'utilisation des protéases alcalines dans les industries de transformation du cuir est due à l'activité kératinolytique de ces enzymes. Les utilisations particulières de la protéase s'avèrent pertinentes dans la phase de trempage, de confitage et d'épilation de la préparation de la peau et des cuirs. L'extermination des pigments indésirables par des mesures enzymatiques aide à la production de peaux propres. En effet, les protéases alcalines microbiennes sont devenues très populaires dans les industries du cuir (Takami *et al.*, 1992 ; Brandelli *et al.*, 2010).

1.4.3. Industrie des détergents

Les protéases ont été largement utilisées à l'échelle commerciale dans l'industrie des détergents. Les divers produits de l'industrie des détergents contenant des protéases en tant que composant ou ingrédient essentiel ont été utilisés pour le nettoyage du linge domestique, des prothèses dentaires ou des lentilles de contact. Sur la vente totale d'enzymes, l'utilisation de protéases dans l'industrie des détergents représente environ 20%. Les protéases ont été utilisées non seulement comme détergent à lessive, mais aussi comme détergents pour la vaisselle et le nettoyage dans les secteurs institutionnel et industriel (Estell *et al.*, 1985; Shanlin *et al.*, 1997 ; Bornscheuer *et al.*, 2012).

1.4.4. Industrie photographique

Il a été rapporté avec succès que les protéases alcalines produites par *B.subtilis*, *Streptomyces avermectinus* et *Conidiobolus coronatus* récupèrent l'argent des films radiographiques, garantissant que le processus est plus respectueux de l'environnement que l'utilisation de produits chimiques (Godfrey et West, 1996b ; Wolff *et al.*, 1996 ; Yang *et al.*, 2000).

1.4.5. Industrie chimique

Les protéases alcalines microbiennes, tels que *Bacillus pseudofirius* SVB1, *Aspergillus flavus* et *Pseudomonas aeruginosa* ont montrés de bon résultats dans la synthèse des peptides en raison de leur stabilité dans les solvants organiques (Nakiboglu *et al.*, 2001 ; Ahmed *et al.*,

2008 ; Shankar *et al.*,2010). Certaines espèces de Bacillus et de Streptomyces produisant des protéases alcalines dans le système aquatique sont des candidats actifs pour la synthèse peptidique et organique (Masui *et al.*, 2004 ; Jadhav et Hocheng, 2012 ; Yadav *et al.*, 2015).

1.4.6. Domaine médical

En médecine, différentes formules, telles que la gaze, les tissus non tissés et la composition de pommade contenant des protéases alcalines produites par *B. subtilis* présentent des propriétés thérapeutiques prometteuses (Sen *et al.*, 2011 ; Anbu, 2013 ; Awad *et al.*,2013). Certains syndromes de déficit en enzymes lytiques sont diagnostiqués comme aidés par une administration orale de protéases alcalines (Gupta et Khare, 2007 ; Joshi et Satyanarayana, 2013). Il a été rapporté que la dégradation de la fibrine a été réalisée par des protéases fibrinolytiques alcalines. L'utilisation de cette enzyme fibrinolytique laisse entrevoir sa future application comme médicament anticancéreux et dans la thérapie thrombolytique (Jaouadi *et al.*, 2012). Pour le traitement de diverses maladies, telles que les brûlures, les anthrax, les furoncles et les plaies, une préparation d'élastotérase immobilisée sur un bandage est utilisée (Davidenko, 1999 ; Palanivel *et al.*, 2013).

1.4.7. Autres applications

Les protéases ont également trouvées des applications plus spécialisées dans les procédés de purification de produits non protéiques d'origines animale ou végétale. Extraits notamment de gommés glucidiques et de mucopolysaccharides. Les protéases peuvent être utilisées pour la solubilisation de la kératine pour convertir les déchets tels que les plumes en concentrés de protéines à utiliser comme aliments pour animaux. Les protéases végétales telles que la papaïne et la bromélaïne sont efficaces dans l'attendrissement des viandes, tout comme la protéase neutre de *B.subtilis* (Ward, 2011).

Chapitre 2

Aspergillus flavus

1. *Aspergillus flavus*

1.1. Généralités

Les champignons du genre *Aspergillus*, dont la première description date de 1729 (Micheli), sont des moisissures saprophytes à filaments hyalins, cloisonnés, et sont haploïdes (Desoubeaux et Chandener, 2010).

Aspergillus flavus est l'espèce la plus connue du genre *Aspergillus* qui est connue comme une espèce en 1809 et signalée pour la première fois comme pathogène des plantes en 1920. Comme les autres espèces d'*Aspergillus*, ce champignon a une distribution mondiale en raison de sa production de nombreuses conidies, qui se dispersent facilement par les mouvements de l'air et éventuellement par les insectes (Tantio, 2011). *Aspergillus flavus* est cosmopolite et passe la majeure partie de sa vie comme saprophyte dans le sol (Hedayati *et al.*, 2007 ; Wright *et al.*, 2003).

1.2. Taxonomie

Aspergillus flavus appartient au sous-genre *circumdati* sections *Flavi* et la taxonomie de cette espèce est trouver dans le tableau 2 (Tantio, 2011).

Domaine	Eucaryote
Règne	Champignons
Phylum	Ascomycota
Classe	Eurotiomycetes
Ordre	Eurotiales
Famille	<i>Trichocomaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>Aspergillus flavus</i> .

1.3. Caractérisation morphologique

1.3.1. Caractéristiques macroscopiques

La morphologie des colonies d'*Aspergillus flavus* sur PDA est présentée par la figure 1. Au départ, la couleur du mycélium est blanche. Après 3 jours d'incubation, la colonie forme des conidies vert olive qui dominent l'apparence de la colonie. Généralement, les colonies sont plates à leurs bords tout en étant surélevées au milieu. Sur PDA, tous les isolats d'*Aspergillus flavus* ont produit des exsudats (gouttelettes) de couleur brune ou incolore. Dans certains isolats, une masse compacte de mycélium fongique a été produite, qui était brun foncé. De plus, le diamètre de la colonie vari de 65 à 75 mm, entouré d'un cercle blanc. Le revers des colonies est de couleur pâle (Khan *et al.*, 2020).

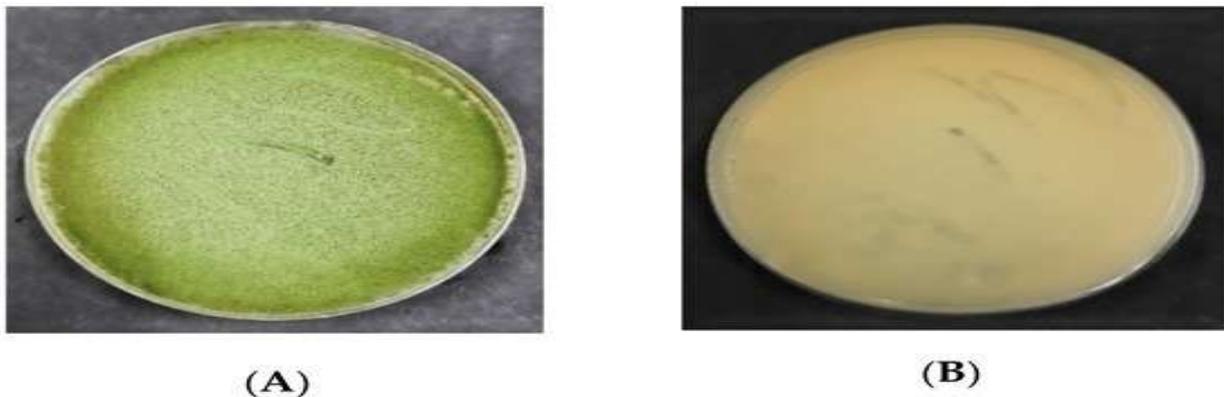


Figure 1 : Morphologie des colonies d'*Aspergillus flavus* sur la gélose au dextrose de pomme de terre (PDA);
(A) : face, (B) : revers (Khan *et al.*, 2020).

1.3.2. Caractéristiques microscopiques

Les caractéristiques microscopiques d'*Aspergillus flavus* sont présentées dans la figure 2. Au microscope, les conidiophores des isolats apparaissent incolores, à parois épaisses, rugueuses et portant des vésicules. Le diamètre des conidiophores varient de 800 à 1200 μm . La forme des vésicules des isolats d'*Aspergillus flavus* sont globuleuse à subglobuleuse. Le diamètre des vésicules est de 1800 à 2000 μm . Les cellules sont unisériées ou bisériées. Dans les cellules bisériées, les phialides se sont développées sur les métules alors que, dans les cellules unisériées, elles se sont développées sur les vésicules. Les métules entourant la surface des

vésicules et émettent dans toutes les directions. Les conidies étaient globuleuses, à parois minces, légèrement rugueuses et variaient de 250 à 450 μm de diamètre (Khan *et al.*, 2020).

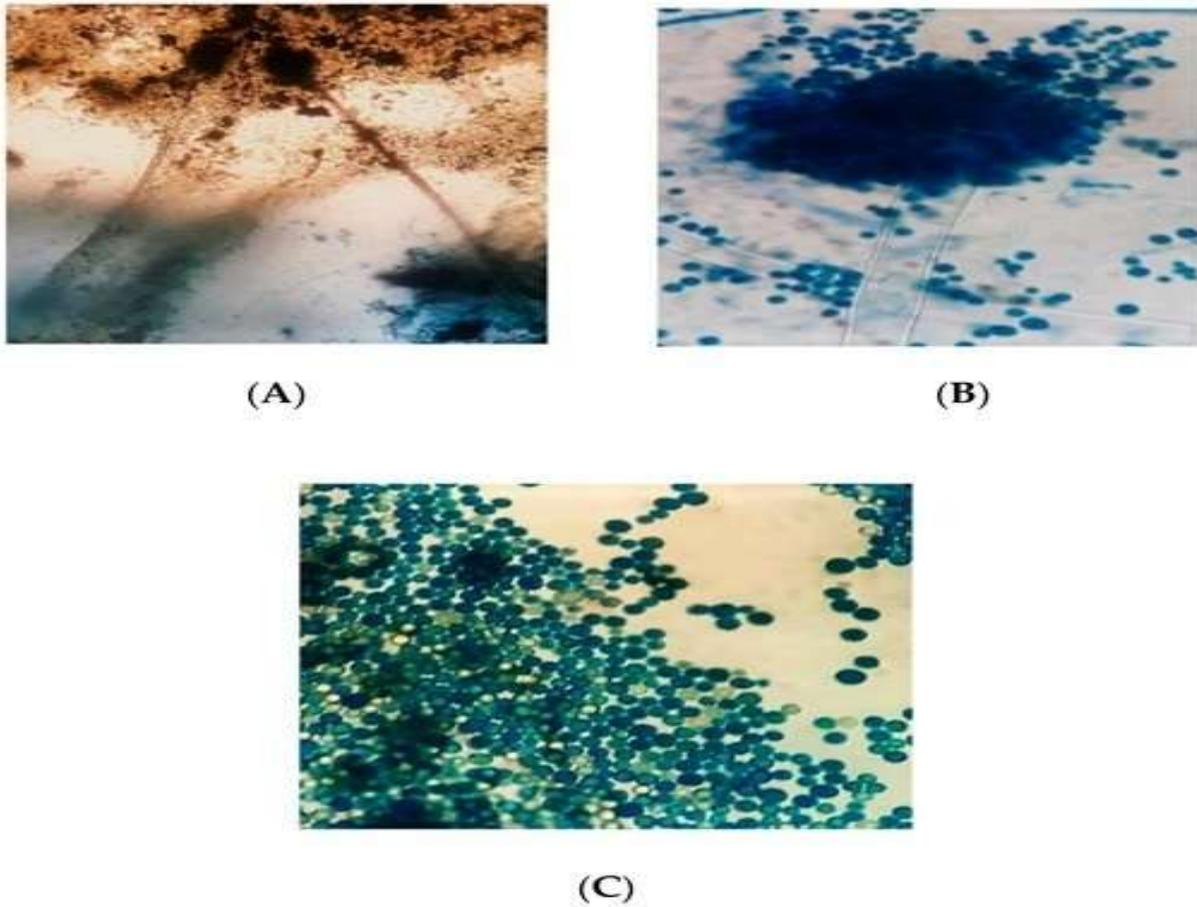


Figure 2 : Caractéristiques microscopiques d'*Aspergillus flavus* ; (A) : conidiophores et conidies sous objectif $\times 10$; (B) : conidiophore et conidies sous l'objectif $\times 100$; (C) : conidies sous l'objectif $\times 100$ du microscope stéréo-binoculaire (Khan *et al.*, 2020).

1.4. Habitat

Aspergillus flavus est un champignon commun, poussant sur les tissus végétaux morts dans le sol. L'espèce est également un parasite facultatif sur un large éventail de plantes et colonise souvent les graines riches en huile, telles que le maïs, les arachides, les graines de coton et les noix (amande et pistache), ainsi que d'autres cultures telles que l'orge, le blé et riz. *Aspergillus flavus* est un agent pathogène opportuniste des animaux et des humains, en particulier chez les personnes immunodéprimées. *Aspergillus flavus* a été isolé d'une grande variété d'aliments, y compris les baies de vigne séchées, la chaux aigre, les fèves de cacao, les produits de viande séchée fumée, le jambon cru, le poisson salé séché et les épices (Chang *et al.*, 2014).

1.5. Reproduction

La grande diversité génétique des populations d'*Aspergillus flavus* est largement due à la reproduction sexuée caractérisée par la formation d'ascocarpes porteurs d'ascospores intégrés dans les sclérotés. En effet, des croisements en laboratoire entre des souches de type d'accouplement opposé produisent une descendance présentant une recombinaison génétique. Les sclérotés formés dans les cultures sont dispersés à la surface du sol lors de la récolte et sont principalement produits par des souches uniques d'un type d'accouplement. Moins fréquemment, les sclérotés peuvent être fécondés lors de la co-infection de cultures avec des souches sexuellement compatibles (Horn *et al.*, 2016).

1.6. Avantages d'*Aspergillus flavus*

1.6.1. Avantages industrielles

Aspergillus flavus est utilisée pour produire des enzymes pour la transformation des aliments. En effet, une variété de produits alimentaires fermentés traditionnels ont été fabriqués avec des champignons du groupe *Aspergillus flavus* pendant des siècles, cette souche est également utilisée dans la production des produits thérapeutiques tels que l'urate oxydase et la lactoferrine.

1.6.2. Avantages écologiques

Aspergillus flavus est omniprésent et considéré comme membre dominant de la microflore dans certaines circonstances et exerce de multiples influences sur le biote et l'environnement. Ces champignons sont d'importants dégradeurs des débris de culture et peuvent jouer un rôle dans la solubilisation et le recyclage des éléments nutritifs des cultures et du sol.

Aspergillus flavus peut même dégrader la lignine. Ces champignons peuvent servir à limiter les populations de ravageurs et ont même été considérés comme des agents potentiels pour remplacer les insecticides chimiques. cité dans (Keith *et al.*, 2013).

Chapitre 3

Substrats utilisés dans

la fermentation

1. *Artocarpus heterophyllus*

1.1. Généralités

Artocarpus heterophyllus, communément appelé jacquier, est un fruit climatérique tropical, appartenant à la famille des moracées, originaire des chats occidentaux de l'Inde et commun en Asie, en Afrique et dans certaines régions d'Amérique du sud, il est connu plus gros fruit comestible au monde (Ranasinghe *et al.*, 2019).



Figure 3: Fruit de *L'Artocarpus heterophyllus*
(Elvitch, et Manner, 2006)



Figure 4 : Arbre d' *Artocarpus heterophyllus*
(Elvitch, et Manner, 2006)

1.2. Composition

Le tableau 3 représente la composition nutritive pour 100g de partie comestible de fruit du jacquier (Godwin, 2016).

Energy	- 93.7 Kcal
Protein	- 1.45 g
Carbohydrate (C)	- 22.2 g
Dietary Fibre	- 1.5 g
Vit. C	- 12.9 mg
Vit. A	- 40 µg
Vit. B1	- 0.03 mg
Vit. B2	- 0.12 mg
Niacin	- 0.4 mg
Vit. B6	- 0.107
Folates	- 13.6 µg
Vit. E	- 0.16 mg
Calcium	- 36.8 mg
Phosphorus	- 35.4 mg
Magnesium	- 36.6 mg
Iron (Fe)	- 0.61 mg
Potassium	- 303 mg
Zinc	- 0.43 mg
Total Fat	- 0.33 g
Saturated Fat	- 0.066 g
Cholesterol	- 0.00
Sodium	- 3.1 mg

1.3. Utilisation d'*Artocarpus heterophyllus* dans l'industrie

Ces dernières années l'intérêt pour l'utilisation de sources alternatives d'amidon dans les applications industrielles a bien augmentée. En effet, de nombreux chercheurs ont porté leur attention sur les graines du fruit d'*Artocarpus heterophyllus* comme source intéressante d'amidon (Mahanta et kalita, 2015). Ces graines séchées contiennent une quantité considérable d'amidon, estimée à environ 20 % (Tulyathan *et al.*, 2002). Un rendement de 77% d'amidon est obtenu lors de l'extraction de l'amidon depuis ces graines. Ceci encourage leur utilisation comme source d'amidon intéressante pour les industries alimentaires et pharmaceutiques (kittipong patana *et al.*, 2011), même si peu d'études récentes ont mis l'accent sur les propriétés et l'utilisation de l'amidon de graines de jacquier (kittipong patana, 2011) . cité dans (Ranasinghe *et al.*, 2019).

Les graines de jacquier contiennent également une quantité importante de sucre non réducteur, les rendant aptes à être utilisées comme prébiotique (Bhornmithikum *et al.*, 2010) Aussi la poudre de ces graines est utilisée comme substrat pour la production d'acide L-lactique à l'aide de *Streptococcus equinus*, dans le but de valoriser un déchet agricole par une intervention biotechnologique (Nair *et al.*, 2016). les gaines ont également été testées pour leur intérêt en tant que matière première pour la production d'éthanol, ce dernier est considéré comme une source d'énergie renouvelable (Nuriana et Wuryantoro, 2015). Ces graines peuvent également considérée comme source de protéines dans l'industrie alimentaire en raison de leur composition (Resendiz *et al.*, 2017) . cité dans (Ranasinghe *et al.*, 2019).

1.4. Effets bénéfiques du fruit de l'*Artocarpus heterophyllus*

Etant riche en plusieurs composés de grande valeur nutritive avec des activités physiologiques bénéfiques, le fruit est bien connu pour son activité antibactérienne, antifongique, antidiabétique, anti-inflammatoire et antioxydante. cité dans (Ranasinghe *et al.*, 2019).

2. Le son de blé

2.1. Généralités

Le blé (*Triticum aestivum*) est une céréale de premier plan qui est principalement utilisé pour la consommation humaine et l'alimentation du bétail, le son de blé est un sous-produit de l'industrie de blé, c'est la couche la plus externe du grain de blé, la production de son de blé pour la consommation humaines est estimé à environ 90million de tonnes par ans, il est une source bon marché et abondante de fibres alimentaires qui a été associée à une meilleure santé

intestinale et à la prévention possible de certaines maladies telles que le cancer du côlon (Oluwatoyin *et al.*, 2015).

Ses applications sont relativement diversifiée dans les industries de l'alimentation, humaine et animale, de la médecine et de la fermentation en raison de sa richesse en glucides (principalement des fibre), des protéines et des graisses, ce qui en fait un élément alimentaire important , dans l'industrie de la fermentation, le son de blé peut être utilisé comme substrat pour la production d'une gamme de produits tels que la biomasse, les enzymes, les biocarburants et la production d'autre métabolites (kaprelyants *et al*, 2019).

2.2. Composition de son de blé

La graine de blé est composée de trois parties principales: Tégument ou péricarpe (son), endosperme et germe (Hosney, 1994). La graine de blé contient environ de 68 à 80 % d'endosperme, 14 à 19 % de son et 2 à 3 % de germe (Safdar, 2005). Le son de blé est riche en glucides (60 %), en protéines (12 %), en lipides (0.5%), minéraux (2%), composé bioactifs et vitamines (Slavin, 2003), avec des plusieurs composé importants tels que les acides phénoliques, caroténoïdes, lignanes, phytostéroles, flavonoïdes, et acides phytique qui sont répartis de manière inégale dans les déférents tissus de son de blé, la teneur en amidon est plus élevé par rapport à d'autre déchets agro-indistriels tels que le riz. Cité dans (Javed *et al.*, 2012).

2.3. Le rôle de son de blé

2.3.1 Industrie fermentaire

De nombreux sous -produits agro-industriels remplacent les substrats synthétiques pour la production de produits biotechnologiques, parmi ces sous -produits, le son de blé qui est l'une des alternatives les plus intéressantes dans les procédés de fermentation (Penday, 1992). La variété grossière de son de blé est un substrat efficace en raison de sa dissipation thermique, une meilleur circulation de l'air, fixation des particules et pénétration efficace par les mycéliums et est moins cher que le son fin donc c'est une meilleure perspective économiquement dans l'industrie de la fermentation (Malathi et Chakraborty, 1991). Presque tous les types d'enzymes peuvent être produits par fermentation par le son de blé à la fois en utilisant fermentation submergée et solide, il capacité de conserve une teneur élevée en humidité dans SSF, cette capacité favorise la croissance fongique tout comme dans les conditions environnementales naturelles cité dans (Javed *et al.* (2012).

3. Le sésame

3.1. Généralités

Le sésame (*sesamum indicum*) c'est une culture oléagineuse majeure et est largement cultivée dans le monde, avec d'excellentes caractéristiques telles qu'une teneur élevée en huile (~55%), une forte résistance à la sécheresse, une courte saison de croissance (~90 d), un grand coefficient de propagation (3000-10 000 graines par plante) et un petit génome diploïde (~350 Mb), le sésame est considéré comme un modèle attractif pour la recherche génétique des oléagineux (Sisson, 2021).

3.2. La composition chimique de sésame et leur utilisation

Le sésame joue un rôle important dans la nutrition humaine, dans l'utilisation médicinale, pharmaceutique, industrielle et agricole. La graine de sésames a de nombreuses applications culinaires dans de nombreux produits de boulangerie et pour la production d'huile. L'huile de graine de sésame est très riche en acides gras polyinsaturés utilisés dans la production de margarine et les huiles de cuisson. Le sésame contient des quantités importantes de sésamines et de sésamoline, des lignanes, ces composés ont des effets bénéfiques sur les taux de lipides sériques et la fonction hépatique et confèrent à l'huile de graines de sésame une activité antioxydante marquée. Les lignanes sont également responsables de la grande stabilité de l'huile de graines de sésame à l'oxydation (Crews *et al.*, 2006). Les graines de sésame sont une excellente source de cuivre et de calcium. Il est également riche en phosphore, fer, magnésium, manganèse, zinc et vitamine B1 (Garby *et al.*, 2017).

Chapitre 4
Fermentation

1. Fermentation

1.1. Généralités

La fermentation est la technique de conversion biologique de substrats complexes en composés simples par divers micro-organismes tels que les bactéries et les champignons. La fermentation a été largement utilisée pour la production d'une grande variété de substances qui sont très bénéfiques pour les particuliers et l'industrie. Au fil des ans, les techniques de fermentation ont acquis une immense importance en raison de leurs avantages économiques et environnementaux. Les techniques anciennes ont été encore modifiées et raffinées pour maximiser la productivité. Cela a également impliqué le développement de nouvelles machines et de nouveaux procédés. Deux grandes techniques de fermentation ont émergé à la suite de ce développement rapide : la fermentation submergée (SMF) et la fermentation à l'état solide (SSF) (Subramaniyam et Vimala, 2012).

1.2. Substrats utilisés pour la fermentation

Le résultat de la fermentation varie fortement par rapport au substrat utilisé ; il est donc extrêmement important de choisir le bon substrat. Les techniques de fermentation doivent être optimisées pour chaque substrat. Ceci est principalement dû au fait qu'un organisme réagit différemment à chaque substrat. Les taux d'utilisation des divers nutriments diffèrent dans chaque substrat, tout comme la productivité. Certains des substrats couramment utilisés dans la fermentation à l'état solide sont le son de blé, le riz et la paille de riz, le foin, les déchets de fruits et légumes, la pâte à papier, la bagasse, la fibre de coco et les milieux synthétiques (Pandey *et al.*, 1999). Certains substrats courants utilisés dans la fermentation submergée sont les sucres solubles, la mélasse, les milieux liquides, les jus de fruits et de légumes et les eaux usées (Subramaniyam et Vimala, 2012).

1.3. La fermentation liquide ou submergée (SMF)

La fermentation submergée est une méthode de culture de micro-organismes dans un milieu nutritif liquide. Pour la production industrielle, cela implique de cultiver le micro-organisme sélectionné dans des récipients fermés, appelés bioréacteurs, qui contiennent des bouillons nutritifs. La conception du système pour les bioréacteurs permet l'approvisionnement en

oxygène selon les besoins des micro-organismes aérobies et la capacité de surveiller et de contrôler différents paramètres tels que le pH, la température, la viscosité, l'oxygène dissous, la formation de mousse, la formation de biomasse, l'utilisation du substrat et la formation du produit souhaité. La capacité de contrôler les paramètres en ligne a facilité l'utilisation de la fermentation submergée où la fermentation a lieu dans de grands fermenteurs avec des volumes variant de milliers à cent mille litres. cité dans (Ouedraogo et Tsang, 2021).

1.4. La fermentation solide (SSF)

Est un processus de fermentation où les micro-organismes sont capables de se développer dans un environnement à faible teneur en eau (Dey *et al.*, 2016). Ce processus est réalisé à l'aide de micro-organismes se développant sur des substrats humides et solides qui sont utilisés depuis des milliers d'années pour produire des aliments tels que le pain et le fromage (Soccol *et al.*, 2017). cité dans (Ramón et Janet, 2020).

1.5. Microorganismes utilisés dans la fermentation à l'état solide

Les microorganismes notamment utilisés dans la fermentation à l'état solide sont principalement des champignons filamenteux des genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* et *Trichoderma*. Des levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Candida* sp) et des espèces d'actinobactéries (*Streptomyces thermonitrificans*, *Streptomyces chattanoogensis*) sont également utilisées dans la fermentation à l'état solide (Orozco *et al.*, 2008 ; Hu *et al.*, 2012 ; Munishamanna *et al.*, 2017). Les bactéries, en particulier *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides* et *Lactobacillus spp* telles que *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* et *L. coryniformis*, sont également utilisées dans la fermentation à l'état solide (Oboh, 2006 ; Hongzhang *et al.*, 2011 ; Hsu *et al.*, 2013 ; Andriani *et al.*, 2015 ; Saanu et Oladiti, 2018). Les champignons filamenteux et les levures digèrent les substrats organiques solides dans un environnement à faible teneur en humidité, ce qui les rend idéaux pour une utilisation en fermentation à l'état solide (Yazid *et al.*, 2017). Les *Streptomyces spp.* qui sont des bactéries mycéliennes à Gram positif, sont utilisées dans la fermentation à l'état solide car elles peuvent coloniser efficacement les matières organiques solides, produire une pléthore d'enzymes dégradantes et tolérer des conditions environnementales difficiles (Orozco *et al.*, 2008). cité dans (Yafetto, 2022).

1.6. Avantages de la fermentation sur milieu solide

Elle permet le recyclage des déchets alimentaires et agro-industriels et la conservation de la biomasse. De plus, le SSF est une technologie prometteuse et fiable pour le développement de divers produits biotechnologiques. Les différents avantages qui ont été identifiés à travers la littérature peuvent être décrits en fonction de différents critères :

Avantages biologiques

- Produits fabriqués en grande quantité.
- Niveau de productivité et stabilité des produits plus élevé.
- Tolérance à une concentration élevée en substrat.
- Aération plus facile.
- Absence de production de mousse.

Avantages du traitement

- Les bioréacteurs sont généralement de petit volume et sont compacts.
- Le volume de chargement du substrat est beaucoup plus élevé.
- Les substrats de croissance proviennent de ressources naturelles proportionnellement simples et non raffinées.
- Le traitement en aval peut être simple car les produits sont concentrés.
- L'extraction des produits nécessite beaucoup moins de solvant (si nécessaire).
- Le processus n'implique pas de produits anti-mousse.

Avantages environnementales

- Produire moins de déchets liquides.
- Résoudre le problème des déchets en tant que détoxification.
- Substrats généralement des matériaux naturels - Source de carbone naturelle inutilisable extrêmement bon marché, variable et abondante dans l'agro-industrie et les déchets alimentaires.

Avantages économiques

- Les bioréacteurs modifiés sont simples, bon marché et conviviaux.
- Faible coût de récupération dans le traitement en aval.
- Le procédé SSF est très attractif d'un point de vue économique et s'est avéré économiquement faisable. cité par (Mussalbakri et Colin, 2017).

1.7. Applications industrielles de la fermentation sur milieu solide

Elle est récemment devenue un processus très pertinent pour la production de produits pharmaceutiques, biochimiques et alimentaires, ainsi que pour la production de bioénergie. Les produits obtenus permettent une plus grande productivité enzymatique pour de nombreuses enzymes car ils sont moins sujets à l'inhibition du substrat (Yazid *et al.*, 2017). D'autres applications de SSF incluent : pigments, arôme et /ou production de composés phénoliques, compostage, bio blanchiment, etc. (Soccol *et al.*, 2017). Les restes de SSF (qui ont un niveau de biodégradabilité différent) peuvent être utilisés pour le compostage, la digestion anaérobie ou pour produire du biogaz (Yazid *et al.*, 2017). cité dans (Ramón et Janet, 2020).

Matériel et Méthodes

Le premier travail porte sur l'optimisation de la production de protéase en utilisant les graines d'*Artocarpus heterophyllus* comme substrat dans le milieu de culture. Les graines collectés sont séchées naturellement et réduit en poudre, emballé et stocké jusqu'à leur utilisation.

Dans cette fermentation *Aspergillus flavus* est cultivée sur PDA (gélosé au dextrose de pomme de terre) (Dasari, 2020).

1.1. Préparation et développement de l'inoculum

L'ensemencement en stries est effectué à partir de cultures anciennes d'*Aspergillus flavus* sur des géloses dextroses de pomme de terre (PDA) qui sont incubées à 30°C pendant 3 jours, puis 10ml d'eau distillée stérile sont ajoutés aux cellules, ensuite 1ml de suspension contenant environ 10^5 - 10^6 spores/ml a été utilisé comme inoculum dans chaque flacon.

1.2. Conditions de fermentation

La fermentation en milieu solide a été réalisée dans des fioles de 250ml contenant 10g de substrat avec 10ml de milieu de production (voir annexe 1). Après la stérilisation, les flacons sont inoculés avec 1ml de solution sporale (10^6 spores/ml) et incubés à 30°C pendant six jours dans un incubateur avec agitation à 100rpm.

A la fin de la fermentation, les cultures sont extraites avec 100ml d'eau distillée en agitant pendant 1h. Le filtrat obtenu a été centrifugé à 8000rpm pendant 10min à température ambiante. Le surnageant obtenu est l'extrait enzymatique brut.

1.3. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité de l'enzyme est déterminée selon la méthode d'Anson modifiée. Des échantillons blancs ont été préparés en ajoutant la solution d'acide trichloracétique avant l'addition du substrat.

L'effet de divers facteurs comme le temps d'incubation, la température, la taille de l'inoculum, le pH, la teneur en humidité, la source de carbone (voir annexe 3) et les sources d'azote sur la production de la protéase ont été testés au cours de la fermentation afin de déterminer leur impact sur la production enzymatique.

Le second travail porte sur l'amélioration de la production de la protéase alcaline en testant différents paramètres lors de la fermentation solide par *Aspergillus flavus* (Suman Kumar *et al.*, 2021)

Des échantillons de sol ont été prélevés depuis 3 sites différents de la zone côtière de Kothakoduru, Nellore dist, AP. Ces échantillons ont été prélevés au hasard à une profondeur d'un pied. Des dilutions en série ont été préparées. Ensuite, étalés sur les plaques PDA et incubées pendant 72 heures à température ambiante. Les colonies isolées et purifiées sont repiquées sur les pentes pour être utilisées par la suite.

1.1. Mise en évidence de l'activité protéasique

La gélose au lait écrémé a été utilisée pour le dépistage qualitatif de la production de la protéase alcaline (Sharma *et al.*, 2006). Le milieu comprend 100 g du lait écrémé en poudre, 5 g de peptone et 20 g de la gélose par litre et le pH ajusté à 8,0. Les champignons isolés des pentes purs ont été inoculés sur les plaques de gélose au lait écrémé et incubées à température ambiante pendant 72 heures. Après incubation, l'apparition de la zone claire autour de la colonie permet de sélectionner les moisissures productrices de l'enzyme recherchée, celles-ci sont par la suite transférées sur des géloses inclinées au dextrose de pomme de terre et maintenues à 4°C. La souche ayant présenté la plus grande zone d'hydrolyse a été identifiée comme, il s'agit d'*Aspergillus flavus*.

1.2. Production de la protéase alcaline

Dans des fioles de 250 ml, 10 g de son de blé avec 15 ml d'agent humidifiant ont été déposés et stérilisés à 121°C. Après refroidissement, les fioles sont inoculées avec la moisissure préalablement sélectionnée. L'incubation se fait à 30 °C pendant 72 heures. Après l'incubation, 80 ml d'eau distillée ont été ajoutés au flacon et secoués sur un agitateur pendant 14 heures à 200 rpm. Le contenu de la fiole a été filtré et le filtrat représentant l'extrait brut a subi le dosage de l'activité enzymatique.

1.3. Dosage de la protéase

L'activité de la protéase dans l'extrait enzymatique brut a été testée en utilisant 1% de caséine dans un tampon citrate (pH 7). Le mélange réactionnel contenait 1 ml de caséine et 1 ml d'extrait enzymatique brut, l'incubation s'est faite pendant 1 heure à température ambiante. Après 1 heure, 5 ml d'acide trichloracétique (TCA) ont été ajoutés pour arrêter la réaction enzymatique.

Après l'addition du TCA, les tubes ont été secoués et le contenu a été centrifugé à 10000 rpm pendant 15 min. Au surnageant, 5ml de solution de Na OH ont été ajoutés et laissé reposer pendant 15 min supplémentaires. Enfin, 0,5 ml de réactif de Folin-ciocalteu (réactif FC) a été

ajouté et l'intensité de la couleur bleue développée a été mesurée. L'absorbance est mesurée à 700 nm. L'activité enzymatique est calculée en utilisant la courbe d'étalonnage de la tyrosine. Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité de l'enzyme qui libère 1µg de tyrosine par ml par heure.

1.4. L'optimisation

La production de protéase à partir d'*Aspergillus flavus* a été optimisée en contrôlant différents paramètres physico-chimiques comme le pH, la température, les ions métalliques et divers substrats pour un meilleur rendement de l'enzyme.

Ces études d'optimisation ont été réalisées à différents temps d'incubation, à savoir : 24, 48 et 72 heure.

1.4.1. Effets des différents substrats

Des graines de sésame, d'arachide, de coton et le son de blé, ont été utilisés comme substrat dans cette étude. La composition du milieu minéral ajouté se trouve dans l'annexe 2 .Parmi les quatre substrats, la concentration efficace a été identifiée pour le substrat le mieux éprouvé en testant la production d'enzymes à différentes concentrations (2,5 à 12,5 %) du substrat.

1.4.2. Effets de la température et du pH

La production d'enzyme à différentes températures allant de 20 à 45°C a été estimée. De même, pour l'optimisation du pH, la production d'enzymes à différents pH allant de 6,5 à 8,5 a été estimée à trois temps d'incubation préalablement citées.

1.4.3. Action des activateurs et des inhibiteurs

Divers produits chimiques ont été testés à une concentration de 0,1 M comme activateurs et inhibiteurs lors du dosage de l'activité protéasique. Les activateurs utilisés étaient des ions métalliques comme le sulfate de zinc (ZnSO₄), le chlorure de Calcium (CaCl₂) et le sulfate ferreux (FeSO₄) et les inhibiteurs comprenaient le PMSF (fluorure de phénylméthyl sulfonyle), SDS et EDTA.

*Résultats
et discussions*

Résultats et discussions de la première partie

1. Effet du niveau d'inoculum sur la production de la protéase

Dasari (2020) a utilisé *Artocarpus heterophyllus* comme substrat principal pour produire la protéase, et a trouvé une productivité maximale quand l'inoculum est 20% (v/w) (figure 5).

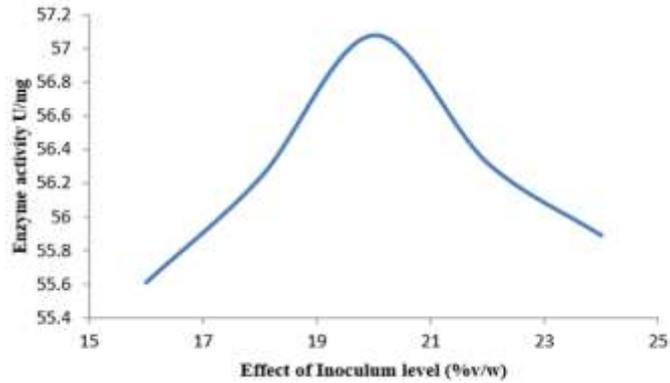
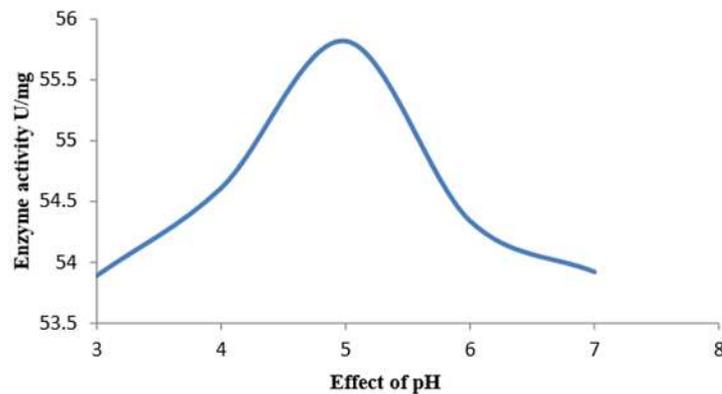


Figure 5 : Effet du niveau d'inoculum sur la production de l'enzyme

2. Effet du pH et de la température sur la production d'enzyme

La production maximale de la protéase a été notée à pH 5 (figure 6)



Quant à l'effet de la température sur la production de la protéase, l'optimum a été observé à 38°C (figure 7).

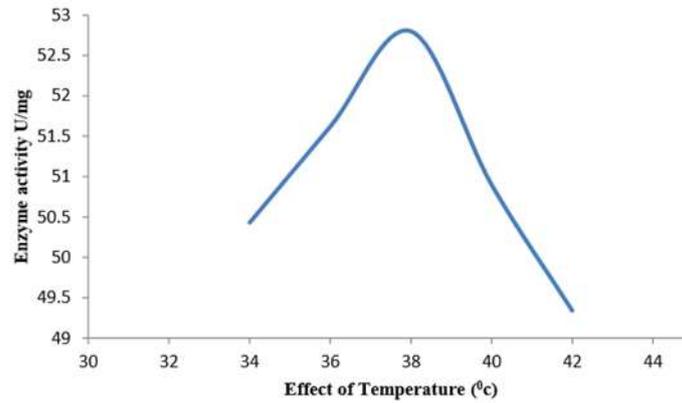


Figure 7 : Effet de température sur la production d'enzyme.

3. Effets des sources de carbone et de nitrogène

Les résultats indiquent que la production maximale a été observée à 4% de saccharose comme source de carbone et 0,4 % w/w de nitrate de potassium comme source d'azote (figure 8).

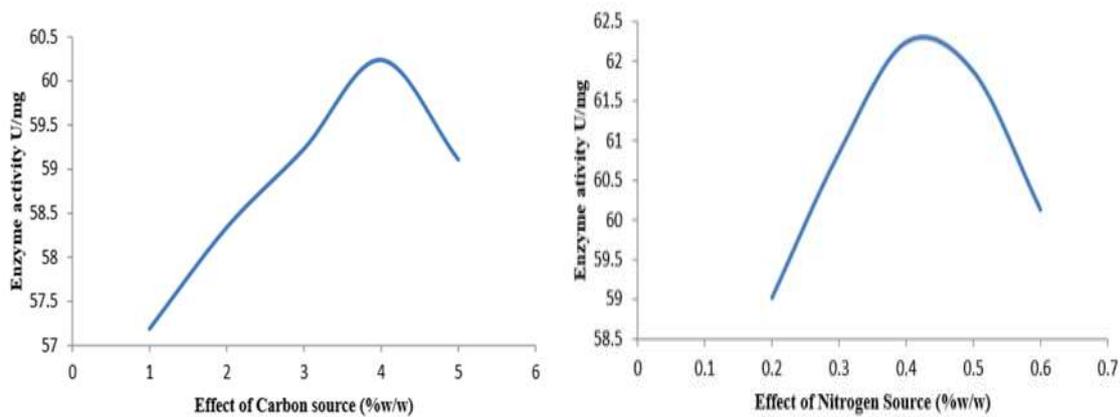


Figure 8 : Effet de source de carbone et nitrogène sur la production d'enzyme.

4. Effet de la teneur d'humidité

La teneur en humidité est un paramètre important pour la production d'enzymes dans le SSF. Une humidité élevée entraîne une diminution de la porosité du substrat, qui à son tour empêche la pénétration de l'oxygène. Ceci peut aider à la contamination bactérienne. Des résultats concernant les différentes teneurs en humidité (40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80

%, 90 %, et 100 % v/w) ont été notés dans chaque fiole conique. L'activité maximale a été observée à 70 % v/w du taux d'humidité (figure 9).

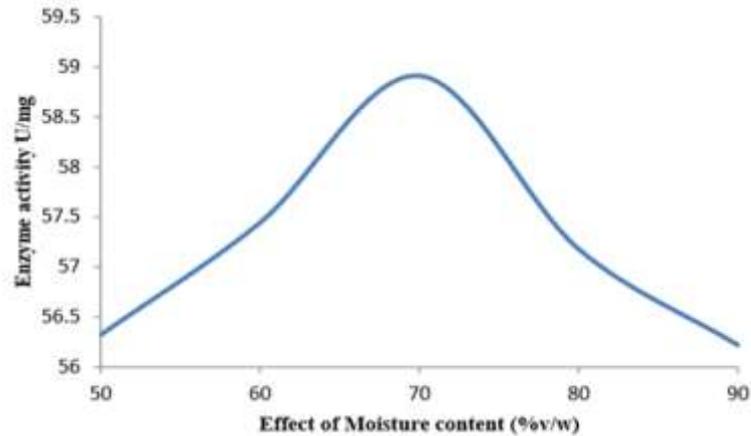


Figure 9 : Effet de la teneur en humidité sur la production d'enzyme.

5. Effet du temps d'incubation

L'activité maximale de la protéase a été observée à 72 heures. Après les quelles, elle diminue en raison de l'épuisement des éléments nutritifs (figure 10). Des résultats similaires ont été notés par Sankeerthana et al. (2013).

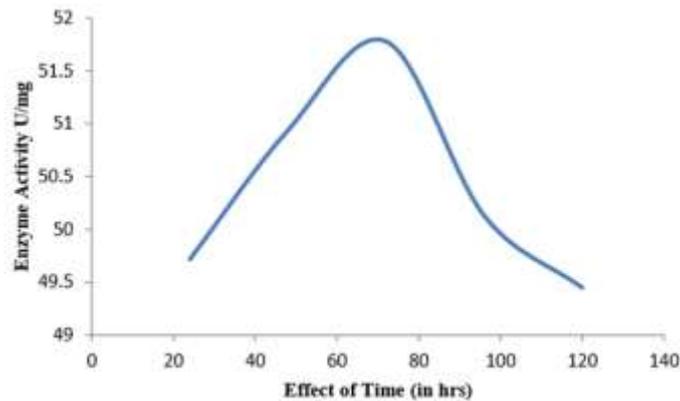


Figure 10 : Effet de temps sur la production d'enzyme.

Résultats et discussions de la seconde partie

1. Effets des différents substrats et leurs concentrations sur la production de l'enzyme

L'utilisation de substrats naturels et bon marché dans la production d'enzymes a été étudiée à l'aide de divers produits agro-industriels. Le son de blé est un substrat important parmi divers sous-produits agricoles utilisés dans différents systèmes de croissance (SSF, SMF et systèmes à deux phases) par plusieurs chercheurs (Kaur *et al.*, 2001 ; Sumantha *et al.*, 2005 ; Naidu et Devi, 2005). Suman Kumar *et al.* (2021). Ces chercheurs ont enregistré une production maximale de protéase après 72 h d'incubation lorsqu'ils ont utilisés 10 % de son de blé (figure 11).

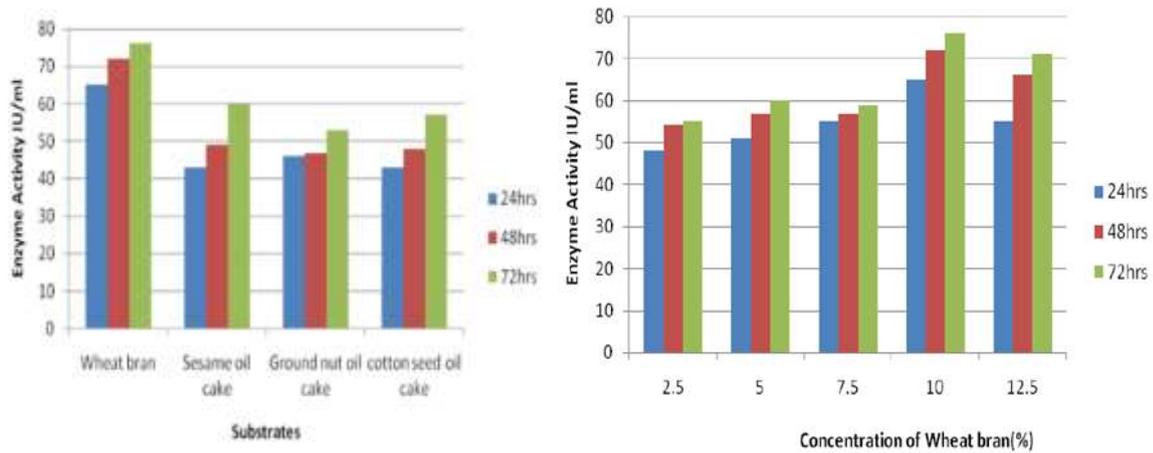


Figure 11: Effet de différents substrats et leur concentration sur la production de la protéase par *Aspergillus flavus*.

Des résultats similaires ont été rapportés par Kranthi *et al.*, (2012) et Mulimani et Patil (1999). Muthulakshmi (2011) a rapporté que la production de la protéase est maximale lorsque 3 % de son de blé ont été utilisés.

Les graines de sésame est un substrat efficace car il a présenté une production maximale de protéases, en fournissant des sources de carbone et d'azote dans le milieu nutritif (Ramchandra *et al.*, 2007).

2. Effet du pH et de la température

Le pH et la température sont des facteurs déterminant dans la productivité de la protéase, celle-ci dépend fortement du pH du milieu. Suman Kumar et al. (2021) trouvent que l'activité enzymatique est maximale (76 UI) à pH 8,5 (figure 12).

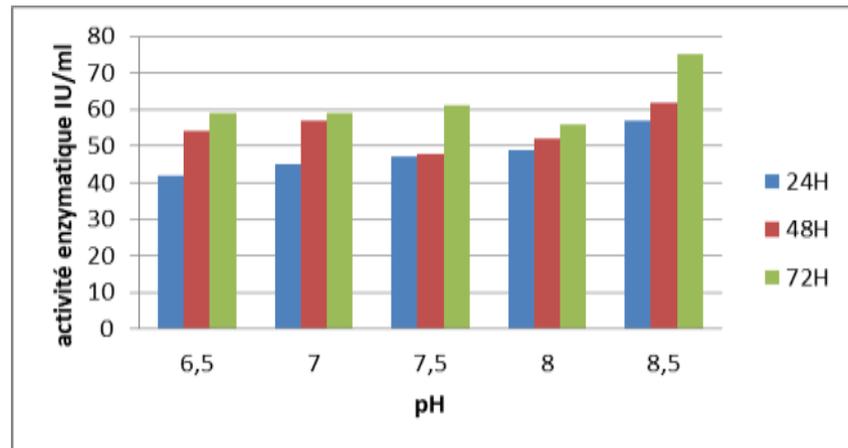


Figure 12 : Effet du pH sur la production de protéase par *Aspergillus flavus*.

Malathi et Chakraborty (1991) montrent une production protéolytique maximale à pH 7.5 et à pH 9.25. En comparant entre la productivité protéolytique par *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*, Sankeerthana et al. (2013) rapportent une production maximale à pH 9 et à pH 7 respectivement.

Suman Kumar *et al.* (2021) ont observés une augmentation progressive de la production de la protéase par *Aspergillus flavus* avec l'augmentation de la température jusqu'à 30°C où le pic de la production jusqu'à 76 UI est atteint. Ensuite, il diminue (figure 13).

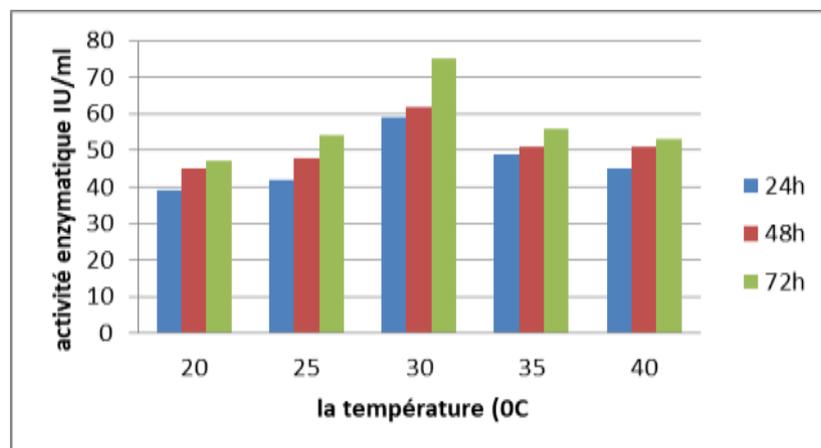


Figure 13: Effet de la température sur la production de protéase par *Aspergillus flavus*.

Oyeleke et al. (2010) et Muthulakshmi (2011) ont montré des résultats similaires.

Kranthi et al. (2012) ont rapporté qu'*Aspergillus flavus* est un bon producteur de protéase à la température de 45°C. Roshnichoubey et al. (2016) ont enregistré que chez *Aspergillus flavus*, la production de protéase alcaline s'est avérée plus élevée à 28°C.

3. Effet des inhibiteurs et des activateurs

Lors de l'étude de l'effet des activateurs, Suman Kumar *et al.* (2021) observent que le $ZnSO_4$ augmentait l'activité de la protéase jusqu'à 82 UI suivi de $FeSO_4$ et $CaCl_2$ (figure 14).

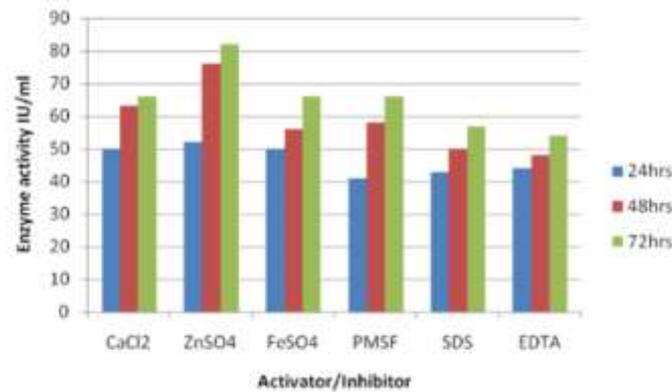


Figure 14 : Effet de l'activateur/ inhibiteur sur la production de protéase par *Aspergillus flavus*.

Un résultat similaire a été rapporté par Kranthi *et al.* (2012). Muthulakshmi (2011) a étudié l'effet de divers ions métalliques sur l'activité de la protéase d'*Aspergillus flavus* et a montré que les ions métalliques Zn^{++} et Cu^{++} soutenaient l'activité enzymatique maximale où Na^+ , Ca^{++} inhibe l'activité de la protéase en particulier Mg^{++} s'est avéré être un puissant inhibiteur de la protéase. Dans la présente étude, l'EDTA s'est avéré être un inhibiteur efficace pour la production. Roshnichoubey *et al.* (2016) ont enregistré que chez *Aspergillus flavus*, la production de protéase alcaline s'est avérée la plus élevée avec l'ion Mn^{++} . Niyonzima et More (2015) ont rapportés que Fe^{2+} affecte la production de protéases par *Aspergillus terreus*. Sumantha *et al.* (2005) ont rapportés que la protéase était activée par Ca^{2+} , Fe^{2+} et Mg^{2+} . Oludumila *et al.* (2015) ont rapporté que l'EDTA, Cu^{++} , Fe^{++} , Mg^{++} et Ca^{++} inhibent et le Na^+ amélioré l'activité protéase alcaline produite par *Aspergillus niger*.

Conclusion

Le but de cette étude est l'optimisation de la production de protéase par *Aspergillus flavus* sur milieu solide (SSF). Les résultats obtenus montrent qu'*Aspergillus flavus* est un puissant champignon producteur de cet enzyme.

La meilleure production de la protéase alcaline est trouvée lorsque le son de blé est utilisé comme substrat à 10%, à une température de 30°C, à pH 8.5, et pendant un temps d'incubation de 72 heures. En plus, le sol du bord de mer peut être utilisé comme source potentielle pour isoler les champignons producteurs de l'enzyme.

A. flavus est un agent prometteur pour une application industrielle puisqu'il a donné une activité protéasique significative (62.24 U/mg) par rapport à *Artocarpus heterophyllus* en utilisant la fermentation solide. Ce substrat peu coûteux, une matière première facilement disponible et un produit adapté à la culture en milieu solide. L'étude à l'échelle du laboratoire sur la production de protéase pourrait donner les informations de base pour le développement de la production de protéase à grande échelle.

*Références
bibliographiques*

- **Abdul, R., Sadia, S., Arfan, A., Qurban, A., Muhammad, S., Arif, M., and Muhammad, A. (2019).** Microbial Proteases Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol* [en ligne], (page consulté 12 June 2019). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>.
- **Ahmed, S. A., Al-Domany, R. A., El-Shayeb, N. M., Radwan, H. H., and Saleh, S. A. (2008).** Optimization, immobilization of extracellular alkaline protease and characterization of its enzymatic properties. *Res. J. Agric. Biol. Sci*, 4, 434–446.
- **Anbu, P. (2013).** Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). *Int. J. Biol. Macromol*, 56, 162–168. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.02.014.
- **Andriani, Y., and Safitri R. (2015).** Abun Improvement protein quality of cassava peels by solid- state fermentation using cellulolytic microbial consortium *Sci. Pap. - Anim. Sci. Ser*, 63, pp. 250-253.
- **Awad, H. M., Mostafa, E.-S. E., Saad, M. M., Selim, M. H., and Hassan, H. M. (2013).** Partial purification and characterization of extracellular protease from a halophilic and thermotolerant strain *Streptomyces pseudogrisiolus* NRC-15. *Indian. J. Biochem. Biophys*, 50, 305–311.
- **Belmessikh, A., (2011).** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Thèse de Majister. Université Frère Mentouri Constantine. Algérie.
- **Benchiheb, M., Benkahoul, M., Bellil, I., Mechakra, A. (2014).** Milk-clotting properties and specific hydrolysis of caseins of the acid protease extracted from *Scolymus maculatus* flowers. *International Journal of Advanced Research* [en ligne], 2(1):357-365 (page consulté January 2014) www.journalijar.com.
- **Benkahoul, M., Benchiheb, M., Bellil, I., Khelifi, D., Mechakra Maza, A. (2016).** Physical and chemical properties of the acid protease from *Onopordum acanthium*: Comparison between electrophoresis and HPLC of degradation casein profiles. *African Journal of Biotechnology* [en ligne], 15(9) ,331-340 (page consulté 2016/3/29). DOI: 10.5897/AJB2015.14810
- **Bhornsmithikun, V., Chetpattananondh, P., Yamsaengsung, R., and Prasertsit, K. (2010).** Continuous extraction of prebiotics from jackfruit seeds, *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 32(6), 635–642. Viewat: Google Scholar.

- **Bornscheuer, U., Huisman, G., Kazlauskas, R., Lutz, S., Moore, J., and Robins, K. (2012).** Engineering the thirdwave of biocatalysis. *Nature* 485:185. doi: 10.1038/nature11117.
- **Boyer, P.D. (1971).** The enzymes. 3rd ed. New York, N.Y: Academic Press, Inc. [Google Scholar].
- **Brandelli, A., Daroit, D.J., and Riffel, A. (2010).** Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 85, 1735–1750. doi: 10.1007/s00253-009-2398-5.
- **Chang, P.K., Horn, B.W., Abe, K., Gomi, K. (2014).** *Aspergillus flavus*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp: 77-82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00010-0>.
- **Choubey, R., Verma, R.K., Mishra, R. P., and Sharma, P. (2016).** Study on Isolation, Optimization and Immobilization of Alkaline Protease produced by *Aspergillus Flavus*. *Research & Reviews: Research Journal of Biology*.
- **Colin, W., Musa Albakri, A.M. (2017).** Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 4(1), 511-532. (page published 17 October, 2017) DOI: 10.15406/jabb.2017.04.00094.
- **Crews, C. Hough, P. Godward, J. Brereton, P. Lees, M. Guiet, S. winkelmann, W. (2006).** Quantitation of the main constituents of some a ubenticgrape-seedoils of differentorigin. *J. Agric. Food Chem.*54, 6261- 6265.
- **Dasari, P.K. (2020).** Optimization of Production of Protease using *Aspergillus Flavus* by Solid State Fermentation. *American Journal of PharmTechResearch* [en ligne], 10(4) (page Accepted 29 July 2020) <http://www.ajptr.com/>.
- **Davidenko, T. (1999).** Immobilization of alkaline protease on polysaccharides of microbialorigin. *Pharma. Chem. J*, 33, 487–489. doi: 10.1007/BF02510074.
- **Desoubeaux, G., Chandener, J., (2010).** *Aspergillus* et maladie aspergillaires. *Mycologie /Parasitologie Aspergillus*, VOL LI N° 293, 1.
- **Dey, T.B., Chakraborty, S., Jain, K.K., Sharma, A., Kuhad, R.C. (2016).** Antioxidant phenolics and theirmicrobial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends Food Sci. Technol*, 53, 60–74. [Google Scholar].

- **Elevitch, C.R., Manner, H. (2006).** Artocarpus heterophyllus (jackfruit). in species profiles for pacific island agroforestry, 10, 1-25, <https://scholar.google.co.za>.
- **Estell, D.A., Graycar, T. P., and Wells, J. A. (1985).** Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to beresistant to chemical oxidation. J. Biol. Chem, 260(11), 6518–6521.
- **Gharby, S., Harhar, H., Bouzoubaa, Z., Asdadi, A., El Yadini, A., and Charrouf, Z. (2017).** Chemical characterization and oxidative stability of seeds and oil of sesame grown in Morocco. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 16(2), 105-111. (page publisher april2017. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.03.004>).
- **Godfrey, T., et West, S. (1996b).** Introduction to industrial enzymology. in Industrial Enzymology, eds T. Godfrey and S. West (London: Mac. MillanPress).
- **Godfrey, T., West, S., (1996).** Industrial enzymology. 2nd ed. New York, N.Y: Macmillan Publishers Inc. p. 3. [Google Scholar].
- **Godwin, M. U. (2016).** Mineral and nutrient (proximate) composition of jackfruit per 100 g of raw edible portion of fruit. in ResearchGate. Disponible sur www.researchgate.com.
- **Gupta, A., and Khare, S. (2007).** Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant Pseudomonas aeruginosa PseA. Enzyme Microb. Technol, 42, 11–16. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.07.019.
- **Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. (2002).** Bacterial alkaline proteases. Molecular approaches and industrial applications. ApplMicrobiolBiotechnol, 59(1), 15–32.
- **Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., and Denning, D. W. (2007).** Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology, 153 (6), 1677-1692.
- **Hoffman, T. (1974).** Food related enzymes. AdvChemSer. 136, 146–185. [Google Scholar].
- **Hongzhang, C., Yumei, W., Shuhua, D. (2011).** Production of protein feed from sweets orghumstalk by the two-step solid state fermentation J. Biofert. Biopestic, 3 p. 112.
- **Horn, B.W., Gell, R.M., Singh, R, Sorensen, R.B., Carbone, I. (2016).** Sexual Reproduction in Aspergillus flavus Sclerotia: Acquisition of Novel Alleles from Soil Populations and Uniparental Mitochondrial Inheritance. PLoS ONE 11(1): e0146169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146169>.

- **Hoseney, R.C., (1994).** Principles of cereal science and technology. 2nd ed. Am. Assoc. CerealChem. St. Paul, MN.
- **Hsu, P.K., Liu, C.P., Liu, L.Y., Chang, C.H., Yang, S.S.(2013).** Protein enrichment and digestion improvement of napiergrass and pangolagrass with solid-state fermentation J. Microbiol. Immunol. Infect, 46 (3) pp. 171-179. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>.
- **Hu, C.C., Liu, L.Y., Yang, S.S. (2012).** Protein enrichment, cellulase production and in vitro digestion improvement of pangolagrass with solid state fermentation J. Microbiol. Immunol. Infect., 45 (1), pp. 7-14.
- **Jadhav, U., and Hocheng, H. (2012).** A review of recovery of metals from industrial waste. J. Achiev. Mater. Manufac. Eng, 54, 159–167.
- **Jaouadi, B., Abdelmalek, B., and JaouadiZaraï, B. N. (2011).** The bioengineering and industrial applications of bacteri alkaline proteases: the case of SAPB and KERAB. in Progress in Molecular and Environmental Bioengineering—From Analysis and Modeling to Technology Applications, ed A. Carpi (InTechOpen) 445–466. doi: 10.5772/23850.
- **Jaouadi, N. Z., Jaouadi, B., Aghajari, N., and Bejar, S. (2012).** The over expression of the SAPB of Bacillus pumilus CBS and mutated sapB-L31I/T33S/N99Y alkaline proteases in Bacillus subtilis DB430: new attractive properties for the mutant enzyme. Bioresour. Technol, 105, 142–151. doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.115.
- **Javed, M. M., Zahoor., S. Shafaat, S., Mehmooda, I., Ambreen, G., Huma, R., Bukhari, I. Aftab, M.N., and ul-Haq, I. (2012).** wheat bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications. African Journal of Microbiology Research, 6(4), 724-733. (page published 30 january 2012). 10.5897/AJMRX11.035.
- **Joshi, S., and Satyanarayana, T. (2013).** Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium Bacillus lehensis. Bioresour. Technol, 131, 76–85. doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.124.
- **Kaprelyants, L. Pozhitkova, L. Buzhylov, M. (2019).** APPLICATION OF CO-BIOPROCESSING TECHNIQUES (ENZYMATIC HYDROLYSIS AND FERMANTATION) FOR IMPROVING THE NUTRITIONAL VALUE OF WHEAT BRAN AS FOOD FUNCTIONAL INGREDIENS. EUREKA: Life Sciences, (5), 31-45. (page published 2019-09-17). <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2019.00992>.

- **Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., and Hoondal, G.S. (2001).** Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(2): 125-129.
- **Keith A. Powell, Annabel Renwick, John F. Peberdy (2013).** *The Genus Aspergillus: From Taxonomy and Genetics to Industrial Application*. United Kingdom. pp 3.
- **Khan, R., Mohamad Ghazali, F., Mahyudin, N.A., Samsudin, N.I.P. (2020).** Morphological Characterization and Determination of Aflatoxigenic and Non-Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* Isolated from Sweet Corn Kernels and Soil in Malaysia. *Agriculture*, 10(10):450. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100450>.
- **Kittipong patana, O.S., and Kittipong patana, N (2011).** Preparation and physicochemical properties of modified jackfruit starches. *LWT - Food Science and Technology*, 44(8), 1766–1773, View at: Publisher Site | Google Scholar.
- **Kranthi, V.S., Rao, D.M., and 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.
- **Kumar, D., Savitri, N., Thakur, R., Verma., and Bhalla, T.C. (2008).** Microbial Proteases and Application as Laundry Detergent Additive. *Research Journal of Microbiology*. [en ligne], 3(12), 661-672. <https://scialert.net/abstract/?doi=jm.2008.661.672>.
- **Mahajan, R., Chaudhari, G., and Chopadaa, M. (2016).** Report on Biotechnological applications of proteolytic enzymes from lattices of euphorbian plants. *J. Appl. Biotechnol. Rep*, 2, 333–337. doi: 10.21276/ijlssr.2016.2.4.7.
- **Mahanta, C.L., and Kalita, D. (2015).** Processing and utilization of jackfruit seeds, Processing and Impact on Active Components in Food, pp. 395–400. View at: Google Scholar.
- **Mala, B., Rao Aparna, M., Tanksale, Mohini, S., Ghatge., and Vasanti, V., Deshpande (1998).** Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(3), 597–635.
- **Malathi, S. Chakraborti, R. (1991).** Productions of alkaline protéase by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid substrat fermentation conditions for use as a depilation agent *Appl Microbiom*, 57, 712-716.

- **Malathi, S., Chakraborty, R. (1991).** Production of alkaline protease by a New *Aspergillus Flavus* isolate under solid state fermentation for use as a depilation agent, *Appl. Environ. Microbiol*, 57: 712- 716.
- **Masui, A., Yasuda, M., Fujiwara, N., and Ishikawa, H. (2004).** Enzymatic hydrolysis of gelatinlayers on usedlith film using thermostable alkaline protease for recovery of silver and PET film. *Biotechnol. Prog*, 20, 1267–1269. doi: 10.1021/bp030058s.
- **Micheli PUN (1729).** *Nova Genres plantaires. Florentiae.*
- **Mukesh, D., Rajan, R., Lawrence, L., Priyadarshini, S., Chittybabu, S., and Kalaichelvan, P. (2012).** Distaining and de-hairing capability of partially purified *Bacillus subtilis* protease from optimized fermentation medium. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 3, 613–620.
- **Mulimani, V.H., Patil, G.N. (1999).** Production of proteases by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. *Indian J. Exp. Biol*, 37, 12481250.
- **Munishamanna, K.B., Suresha, K.B., Veena, R.S. (2017).** Subramanya Solid state fermentation of mango peel and mangoseed waste by different yeasts and bacteria for nutritional improvement *Int. J. Food Ferment. Technol.*, 7 (1) p. 111.
- **Muthulakshmi, C., Gomathi, D., Kumar, D.G., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M. and Uma, C. (2011).** Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. *Jordan J. Biol. Sci*, 4(3), pp.137-148.
- **Naidu, K.S.B., and Devi, K.L. (2005).** Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. *African Journal of Biotechnology*, 4 (7),724-726.
- **Nair, N. R., Nampoothiri, K.M., Banarjee, R. and Reddy, G. (2016).** Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of jackfruitseedpowder (JFSP) to L-lacticacid and to polylactidepolymer, *BioresourceTechnology*, 213, 283–288. Viewat: Publisher Site | Google Scholar.
- **Nakiboglu, N., Toscali, D., and Yaşa, I. (2001).** Silver recovery from waste photographic films by using enzymatic method. *Turk. J. Chem*, 25, 349–353.
- **Nelda, L.O et Diego, L. (2016).** Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms. National university of Comahue Argentina. 170-171.
- **Niyonzima, F.N., and More, S.S. (2015).** Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* Gr.3, *Biotech.*, 5(1), 6170.

- **Nuriana, W., and Wuryantoro. (2015).** Ethanol Synthesis from Jackfruit (*Artocarpus Heterophyllus* Lam.) Stone Waste as Renewable Energy Source, *Energy Procedia*, 65, 372–377. Viewat: Google Scholar.
- **Oboh, G. (2006).** Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus spp* solid media fermentation techniques *Electron. J. Biotechnol*, 9 (1) pp. 46-49.
- **Oludumila, O.R., Abu Temitope, F.A., Enujiugha, V.N., Sanni, D.M. (2015).** Extraction, Purification and Characterization of Protease from *Aspergillus Niger* Isolated from Yam Peels, *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 4(2), 125-131 (page published 16 feb 2015). doi: 10.11648/j.ijnfs.20150402.11.
- **Oluwatoyin, O.O., Afam, I.O., Jideani, Daniso, B. (2015).** Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. *Department of Food Science and Technology*. 50, 2509–2518. <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.12935>.
- **Orozco, A.L., Pérez, M.I., Guevara, O., Rodríguez, J., Hernández, M., González-Vila, F.J., Polvillo O. (2008).** Aries Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py-GC/MS analysis. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 81 (2) pp. 247-252.
- **Ouedraogo, Jean-Paul & Tsang, Adrian. (2021).** Production of Native and Recombinant Enzymes by Fungi for Industrial Applications. 10.1016/B978-0-12-819990-9.00046-9.
- **Oyeleke, S.B., Egwim, E.C., Auta, S.H. (2010).** Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *J. Microbiol. Antimicrob*, 2, 83-87.
- **Palanivel, P., Ashokkumar, L., and Balagurunathan, R. (2013).** Production, purification and fibrinolytic characterization of alkaline protease from extremophilic oil fungi. *Int. J. Pharm. Bio. Sci*, 4, 101–110.
- **Pandey, A. (1992).** Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochem*, 27, 109–117. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)80017-W](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)80017-W).
- **Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Singh - NeeNigam, and Poonam. (1999)** Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, 77 (1), 149-162.

- **Paula, M.S., Pérola, O.M. et al. (2015).** A biotechnology perspective of fungal proteases. Review Braz. J. Microbiol [en ligne], 46 (2), (page consulté Apr-Jun 2015)
- **Ramchandra, S., Singh, S., Larroche, C., Soccol, C., Pandey, A. (2007).** Oil cakes and their Biotechnological applications - A review, Biores. Technol, 98: 2000-2009.
- **Ranasinghe, R.A.S.N., Maduwanthi, S.D.T., and Marapana, R.A.U.J. (2019).** Nutritional and Health Benefits of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*Lam.). A Review. International Journal of Food Science (page Publisher 06 Jan 2019) <https://doi.org/10.1155/2019/4327183>.
- **Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S et al. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol BiolRev, 62(3), 597–635.
- **Rawling, A.N.D., Barrett, A.J., (1993).** Evolutionary families of peptidases. Biochem J 290, 205-218.
- **Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A. (2014).** MEROPS : the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res, 42,503-509.
- **Resendiz Vazquez, J.A., Ulloa, J.A., Urías-Silvas, J.E., et al. (2017).** Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate, Ultrasonics Sono chemistry, 37, 436–444. Viewat: Publisher Site | Google Scholar.
- **Saanu, A.B., Olanditi, O. (2018).** Oladiti Starter culture for improved nutritional value of linamarase treated cassava peels J. Biomater, 2 (1), pp. 1-6.
- **Sabotic, J et Kos, J. (2012).** Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. ApplMicrobiolBiotechnol, 93(4), 1351–1375.
- **Safdar, M.N., (2005).** Composition of wheat grain. Wheat Milling News.
- **Sankeerthana, C., Pinjar, S., Jambagi, R.T., Bhavini, S., Anupama, S., Sarovar, B., and Shashikala, R. (2013).** Inamdar, Production and Partial Characterization of Protease from *Aspergillus Flavus* using Rice Mill Waste as a Substrate and its Comparison with *Aspergillus Niger* Protease. International Journal of Current Engineering and Technology. ISSN 2277 – 4106.
- **Sen, S., Dasu, V., Dutta, K., and Mandal, B. (2011).** Characterization of a novel surfactant and organics olvent stable high-alkaline protease from new *Bacillus pseudofirmus* SVB1. Res. J. Microbiol, 6, 769–783. doi: 10.3923/jm.2011.769.783

- **Shankar, S., More, S., and Laxman, R. S. (2010).** Recovery of silver from waste X-ray film by alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Kathmandu Univ. J. Sci. Eng. Technol.* 6, 60–69. doi: 10.3126/kuset.v6i1.3311.
- **Shanlin, F., Stocker, R., and Davies, M. J. (1997).** Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324, 1–18. doi: 10.1042/bj3240001.
- **Shanmugapriya, K., Saravana, P.S., Payal, H., Peer Mohammed, S and Binnie, W. (2011).** Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of *Artocarpus heterophyllus* and *Manilkarazapotaseeds* and its reduction potential, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, no. 5, pp. 256–260. Viewat: Google Scholar.
- **Sissons, B. (2021).** Everything to know about sesame seeds. *Medical News Today* (page publisher 9 mars 2021). www.medicalnewstoday.com.
- **Slavin, J. (2003).** Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.*, 62, 129–134.
- **Socol, C.R., Scopel, E., Alberto, L., Letti, J., Karp, S.G., Woiciechowski, A.L., Porto, L., Vandenberghe, D.S. (2017).** Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol. Res. Innov.* 1, 52–71. [Google Scholar] [CrossRef].
- **Subramaniyam, R., and Vimala, R. (2012).** SOLID STATE AND SUBMERGED FERMENTATION FOR THE PRODUCTION OF BIOACTIVE SUBSTANCES: A COMPARATIVE STUDY. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENCE AND NATURE*, 3(3), 480-486. (published March 2020).
- **Suman Kumar, Y., Madhavi Jattavathu, Amrutha Audipudi, V., Bhagya Lakshmi, L., Shaheda Niloufer (2021).** Optimization Studies of Alkaline Protease From *Aspergillus Flavus* isolated From seashore Soil of Bay of Bengal. *International Journal of Modern Agriculture*[en ligne], 10(3), <http://www.modern-journals.com/>.
- **Sumantha, A., Sandhya, C., Szakacs, G., Socol, C.R., Pandey, A. (2005).** Production and partial purification of a neutral metallo protease by fungal mixed substrate fermentation, *Food Technol Biotechnol*, 43: 313-319.
- **Sumantha, A., Larroche, C., and Pandey, A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 211–220.

- **Takami, H., Nakamura, S., Aono, R., and Horikoshi, K. (1992).** Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. no. AH-101. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 56, 1667–1669. doi: 10.1271/bbb.56.1667.
- **Tantio, L. N., (2011).** A study on *Aspergillus flavus*: Biochemical characterization of *Aspergillus flavus*. The University of Mysore. pp 1.
- **Tulyathan, V., Tananuwong, K., Songjinda, P., and Jaiboon, N. (2002).** Some physicochemical properties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) seed flour and starch, *Science Asia*, 28, 37–41. Viewat: Publisher Site | Google Scholar.
- **Verduzco-Oliva, R., Gutierrez-Urbe, J.A. (2020).** Beyond Enzyme Production: Solid State Fermentation (SSF) as an Alternative Approach to Produce Antioxidant Polysaccharides, 12, 495. <https://doi.org/10.3390/su12020495>.
- **Ward, O.P., (2011).** *Proteases*. Elsevier B.V. All rights reserved.
- **Wolff, A., Showell, M., Venegas, M., Barnett, B., and Wertz, W. (1996).** Laundry performance of subtilisin proteases. in *Subtilisin Enzymes. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 379, eds R. Bott, and C. Betzel (Boston, MA: Springer), 113–120. doi: 10.1007/978-1-4613-0319-0_12.
- **Wright, A.D., Osterhage, C., and König, G. M. (2003).** Epicoccamide, a novel secondary metabolite from a jellyfish-derived culture of *Epicoccum purpurascens*. *Org Biomol.Chem*, 1(3), 507-510.
- **Yadav, S. K., Bisht, D., Tiwari, S., and Darmwal, N. S. (2015).** Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. *Biocatal. Agric. Biotechnol*, 4, 667–677. doi: 10.1016/j.bcab.2015.08.007.
- **Yafetto, L. (2022).** Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*, 8(3), (page consulté 24 Mar2022) doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09173.
- **Yang, Y., Jiang, L., Zhu, L., Wu, Y., and Yang, S. (2000).** Thermal stable and oxidation-resistant variant of subtilisin E. *J. Biotechnol*, 81, 113–118. doi: 10.1016/S0168-1656(00)00272-8.
- **Yazid, N.A., Barrena, R., Komilis, D., Sánchez, A. (2017).** Solid state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: areview [en ligne], 9(2), 1-28. [Google scholar].

Annexes

ANNEXE 1

Composition de milieu de production.

KNO_3 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, K_2HPO_4 1, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.437, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.116,
 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.203, pH 5.

Il été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.

ANNEXE 2

Composition de l'agent humidifiant (milieu minéral).

0,5% de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3).

0,2% de dihydrogénophosphate de Potassium (KH_2PO_4).

0,2% de sulfate de magnésium (MgSO_4).

0,1% de chlorure de sodium (Na Cl).

Ces composés sont préparés dans l'eau.

ANNEXE 3

L'effet de carbone et nitrogène sur la production de protéase

Il préparé le milieu de production avec différentes concentrations de nitrate de potassium comme 0,2%. 0,4%. 0,5%. 0,6 % et 0,7 % en poids / poids ont été dispersés dans 250 ml conique flacons.

ملخص

البروتياز قادر على تحفيز تفاعلات التحلل المائي التي تحلل جزيئات البروتين وصولاً إلى الببتيدات وفي النهاية الأحماض الأمينية الحرة ، فهي تشكل الإنزيمات الأكثر أهمية بسبب تنوع وظائفها ولها تطبيقات هائلة في مختلف الصناعات. لذلك تركز هذه الدراسة على تحسين وإنتاج البروتياز بواسطة *Aspergillus flavus* الذي تم عزله من التربة في حالة التخمر الصلبة ، واستخدمت ركائز مختلفة وتتحكم في العوامل الفيزيائية والكيميائية المختلفة. عند استخدام *Artocarpus heterophyllus* كركيزة ، تم العثور على أقصى نشاط للبروتياز بعد 72 ساعة عند درجة حرارة 38 درجة مئوية ، ودرجة الحموضة 5 ، ومستوى لقاح 20٪ حجم / وزن ومحتوى رطوبة 70٪ وزن / وزن ، 0.4٪ وزن نترات البوتاسيوم كمصدر للنيتروجين والسكر كمصدر للكربون. وعند استخدام نخالة القمح بنسبة 10٪ كركيزة ، تم العثور على أقصى إنتاج للبروتياز بعد 72 ساعة من التخمر ، عند درجة حرارة 30 درجة مئوية ، درجة حموضة 8.5. يعتبر $ZnSO_4$ منشطاً و EDTA مثبّطاً لنشاط الإنزيم. مع العلم أن بذور السمسم أثبتت أنها ركيزة مناسبة بعد نخالة القمح لإنتاج البروتياز القاعدي بواسطة *A. flavus*.

الكلمات المفتاحية: بروتياز ، *Aspergillus flavus* ، *Artocarpus heterophyllus* ، نخالة القمح ، بذور السمسم ، التخمر الصلب ، النمذجة.

Résumé

Les protéases sont capable de catalyser des réactions hydrolytiques qui dégradent les molécules de protéines jusqu'aux peptides et éventuellement aux acides aminés libres, elle constitue les enzymes les plus essentielles en raison de leur grande variété de fonctions et ont d'immenses applications dans diverses industries, par conséquent, cette étude porte sur la modélisation de la production de protéase par *Aspergillus flavus* qui a été isolé à partir de sol dans une fermentation à l'état solide, ont utilisé divers substrats et elles contrôlent différents paramètres physiques et chimiques. Lorsqu' on utilise *Artocarpus heterophyllus* comme substrat, l'activité protéasique maximale a été trouvée après 72h à une température de 38°C, pH 5, un niveau d'inoculum de 20% v/w et une teneur en humidité de 70% v/w, 0,4% p/p de nitrate de potassium comme source d'azote et le saccharose comme source de carbone. Et lorsqu' on utilise 10% de son de blé comme substrat, la production maximale de la protéase a été trouvée après 72h de fermentation, à la température 30°C, à un pH 8,5. Le $ZnSO_4$ était un activateur et l'EDTA était un inhibiteur de l'activité enzymatique. Sachant que les graines de sésame s'est avéré être un substrat approprié après son de blé pour la production de protéase alcaline par *A.flavus*.

Mots- clés : Protéase, *Aspergillus flavus*, *Artocarpus heterophyllus*, Son de blé, graines de sésame, Fermentation solide, Modélisation.

Abstract

Proteases are able to catalyze hydrolytic reactions that degrade protein molecules down to peptides and eventually free amino acids, they constitute the most essential enzymes due to their wide variety of functions and have immense applications in various industries. therefore, this study focuses on the modeling protease production by *Aspergillus flavus* which was isolated from soil in solid state fermentation, used various substrates and they control different physical and chemical parameters. When using *Artocarpus heterophyllus* as a substrate, maximum protease activity was found after 72h at a temperature of 38°C, pH 5, an inoculum level of 20% v/w and a moisture content of 70% v /w, 0.4% w/w potassium nitrate as nitrogen source and sucrose as carbon source. And when using 10% wheat bran as a substrate, the maximum production of protease was found after 72 hours of fermentation, at a temperature of 30°C, at a pH of 8.5. ZnSO₄ was an activator and EDTA was an inhibitor of enzyme activity. Knowing that sesame seed proved to be a suitable substrate after wheat bran for the production of alkaline protease by *A. flavus*.

Keywords: Protease, *Aspergillus flavus*, *Artocarpus heterophyllus*, Wheat bran, Sesame seed, Solid fermentation, Modelization.

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : KOMIRI MANAL
MAKHLOUFI SAFA
DJAMA CHAIMA

Modélisation de la production de protéase par *Aspergillus flavus* sur milieu solide.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie fongique

Résumé

Les protéases sont capables de catalyser des réactions hydrolytiques qui dégradent les molécules de protéines jusqu'aux peptides et éventuellement aux acides aminés libres, elle constitue les enzymes les plus essentielles en raison de leur grande variété de fonctions et ont d'immenses applications dans diverses industries, par conséquent, cette étude porte sur la modélisation de la production de protéase par *Aspergillus flavus* qui a été isolé à partir de sol dans une fermentation à l'état solide, ont utilisé divers substrats et ont contrôlé différents paramètres physiques et chimiques. Lorsqu'on utilise *Artocarpus heterophyllus* comme substrat, l'activité protéasique maximale a été trouvée après 72h à une température de 38°C, pH 5, un niveau d'inoculum de 20% v/w et une teneur en humidité de 70% v/w, 0,4% p/p de nitrate de potassium comme source d'azote et le saccharose comme source de carbone. Et lorsqu'on utilise 10% de son de blé comme substrat, la production maximale de la protéase a été trouvée après 72h de fermentation, à la température 30°C, à un pH 8,5. Le ZnSO₄ était un activateur et l'EDTA était un inhibiteur de l'activité enzymatique. Sachant que les graines de sésame s'est avéré être un substrat approprié après son de blé pour la production de protéase alcaline par *A.flavus*.

Mots-clés : Protéase, *Aspergillus flavus*, *Artocarpus heterophyllus*, Son de blé, graines de sésame, Fermentation solide, Modélisation.

Encadreur : Dr. BENKAHOUL Malika (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Dr. ABD LAZIZ Ouided (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : Dr. MEZIANI Meriem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).