

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 microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم ميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**La production de protéases à partir de la fermentation liquide
par *Aspergillus sp***

Présenté par : Aribi Ouissal

Le 20/06/2023

Hamada Raouane

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme ABDELAZIZ Ouided. (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Rapporteuse : Mme BENKAHOUL Malika. (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examinatrice : Mme MAZIANI Meriem. (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire
2022– 2023**

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude, Avant tous Allah le tout puissant Qui nous a toujours soutenu et fortifié dans notre parcours scolaire, Qui nous a donné le courage et la force pour mener ce modeste travail Jusqu'au bout.

Nous tenons à remercier chaleureusement Mme, benkahoulmalika, qui nous a permis de bénéficier de son encadrement, pour sa disponibilité et sa patience durant notre préparation de ce mémoire. Nous le remercions encore une fois de tout cœur pour la confiance Qu'elle nous a toujours accordé durant ces mois de travail.

Nous exprimons toutes notre gratitude aux membres de jury :

Prof : Mme Abdelaziz .W (M. C. B- UFM Constantine) Pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury

Mme Maziani .M (M. C. B- UFM Constantine). Pour avoir bien voulu examiner notre travail.

Nous remercions également à tous les professeurs et les enseignants qui ont veillé sur notre bonne formation durant le cursus Universitaire depuis notre premier cycle d'étude jusqu'à à la fin de l'année universitaire

Dédicace

Avant tous je remercie le bon dieu de m'avoir mis sur le bon chemin pour pouvoir
Réaliser ce travail.

Je dédie ce travail d'abord à moi-même, car malgré toutes les difficultés et les obstacles,
je me suis lancé un défi et j'ai atteint ce que je suis maintenant.

Au cristal de ma vie, la lune de mes nuits, le soleil de mes jours, et la source d'amour A
ma très chère mère «**MOUNIRA**».

, Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect merci pour ton amour A mon cher
papa «**MOUHEMAD**» mon soutien moral et source de joie et de bonheur.

A mes adorables sœurs : **NAHLA AGHADIR, MAROUA HADIL, ANFEL, RAHMA** qui
étaient toujours à mes côtés pour me soutenir et d'essayer de me remonter le moral que dieu
vous comble de bonheur, de santé, de succès.

A ma grand-mère chérie «**RBIHA**» (R7IMHO ALLH)

A mon grand-père YOUCEF

A mon oncle ABDELJALILE

A toute la famille **BERKAN** mes oncles et mes tantes maternelles : **SAIDA** et **KHADJA**

Je vous remercie pour votre bienveillance et votre générosité.

À mon binôme **ARIBI OUISSAL** Pour son entente et sa sympathie Je présente mes
sincères gratitude à toi ; je te souhaite plus de succès dans ta vie professionnelle plus tard.

À mes amis : **AMEL, AFEF, HIBA, DALIA**

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

A tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin.

RAOUANE

Dédicace

Grâce à **Allah** et avec sa faveur, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie À celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse et le courage A celle qui attend chaleureusement ce jour.

À Les deux personnes, les plus chères à mon cœur ;Au meilleur papa du monde « **HACEN**» , mon héros, l'homme qui s'est sacrifié pour me voir réussir dans ma vie, et pour me rendre heureuse, que Dieu le garde ,À mon paradis sur terre, ma femme unique, ma vie et la source de mon bonheur «**NADJIA**»

À mes sœurs **DARINE** et **IBTIHAL** et mes chers frères **HAMADA ISMAIL** ET **MOHAMED RAID**. Vous êtes la joie de chaque jour, que DIEU protège notre union et exauce vos espoirs. Que Dieu les préserve en bonne santé et leur accorde longue vie.

A mon grand - père **AMAR**, et ma grand - mère **MANEUBA** la miséricorde de dieu.

A toute la famille DERNOUN mes oncles et ma tante **FELLA** Je vous remercie pour votre bienveillance et votre générosité.

A ma familles paternelles et surtout mes oncles, je vous remercier infiniment d'avoir toujours avec moi.

Mes chères cousines **DJIHED, MALEK, IMEN, DJOUMANA et RANIA** Qu'Allah vous garde et vous procure tout le bonheur que vous méritez.

A mes chères amies de l'enfance **RAYEN et AMINA**. Je vous remercie d'être là pour le meilleur et pour le pire.

A mon binôme **HAMADA RAOUANE** qui m'a accompagné, et Avec qui j'ai passé ces dernières superbes années.

Je dédie cet accomplissement à mes amies **AMEL, IBTIHEL, DALIA et NEDJLA** pour leurs encouragements permanents et leurs aides précieuses dans le besoin.

Finalement et surtout je dédie ce travail à moi-même pour tout effort que j'avais fait.

OUISSAL

Table de matière

Liste des figures

Les abréviations

Liste des tableaux

***Introduction* 1**

Revue bibliographique

Chapitre I : protéases

1-Generlites 3

2-Définitiondes protéases 3

3-Source de protéase 3

3-1 protéase d'origine animal 4

3-2 protéase d'origine végétale 5

3-3 protéase d'origines microbiennes..... 5

4-Classification des protéases 6

5- Application de protéases 8

Chapitre II :Aspergillus

1-Généralités 13

2-Aspergillus niger 13

2-1taxonomie 14

2-2 les caractères macroscopiques 14

2-3 les caractères microscopiques 15

2-4 Reproduction..... 15

2-5 les enzymes produit par Aspergillus niger 17

2-6 Isolement et culture 19

3- Aspergillus oryzae 20

3.1. Taxonomie 20

| | |
|---|------------|
| 3.2. Les caractères macroscopiques | 21 |
| 3.3. Les caractères microscopiques | 22 |
| 3.4. La reproduction | 23 |
| 3.5. Les utilisations d' <i>Aspergillus oryzae</i> | 24 |
| 3.6. La production d'enzymes | 24 |
| Chapitre III : La fermentation..... | 28 |
| 1-Généralités | 28 |
| 2-Fermentation solide | 28 |
| 2-1 Définition | 28 |
| 2-2 Avantages..... | 29 |
| 2-3 Inconvénients | 29 |
| 3-fermentation liquide..... | 29 |
| 3-1 définition | 29 |
| 3-2 avantages..... | 30 |
| 3-3 inconvénients | 31 |
| 3-4 les substrasutilises dans la fermentation liquide | 31 |
| 3-5 application et comparaison | 32 |
| Partie II : Synthèse bibliographique | |
| 1-..... | Article 01 |
| | 33 |
| 1-1.le but | 33 |
| 1-2.principe..... | 33 |
| 1-3.méthode et matériel | 33 |
| 1-4.résultats | 34 |

| | |
|----------------------------------|-----------|
| 1-5. discussion | 35 |
| 1-6.conclusion | 36 |
| 2-article 2..... | 37 |
| 2-1 but..... | 37 |
| 2-2principe..... | 37 |
| 2-3 matériels et méthodes | 37 |
| 2-4 résultats | 38 |
| 2-5 conclusion | 41 |
| Conclusion générale | 42 |

Références bibliographiques

Résumés

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Structure du domaine mature. Représentation structurale de la cystéine protéase avec le domaine mature (orange) montrant les résidus du site actif | 07 |
| Figure 2 : Applications des enzymes..... | 09 |
| Figure 3 : <i>Aspergillusniger</i> sur milieu M2 | 15 |
| Figure 4 : <i>Aspergillus niger sur milieu M2S5</i> | 15 |
| Figure 5: Conidiophore..... | 16 |
| Figure 6 : Tête conidienne d' <i>A. niger</i> | 21 |
| Figure 7 : <i>aspergillusoryzae</i> | 21 |
| Figure 8 : <i>Aoryzae</i> cultive sur milieu PDA | 22 |
| Figure 9 : la structure des conidiophores d' <i>A oryza</i> | 23 |
| Figure 10 : observation microscopique d' <i>A oryzae</i> | 23 |
| Figure 11 : biomasse d' <i>A. niger</i> MH109542 dans les différents essais | 38 |
| Figure 12 :: Activités protéolytiques d' <i>A. niger</i> MH109542 dans les différents essais | 38 |

Les abréviations

A : *Aspergillus*.

Fig : Figure.

PDA : Potato dextrose agar.

pH : potentiel d'Hydrogène.

rpm : round per minute.

SmF: Submerged Fermentation.

SSF : Solid state fermentation.

T :temperature

Liste des Tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : La position systématique d' <i>Aspergillus niger</i> | 14 |
| Tableau 2 ::production des enzymes par <i>A.niger</i> | 17 |
| Tableau 3 : la position systématique d' <i>Aspergillus oryzae</i> | 21 |
| Tableau 4 : Enzymes présentes chez <i>Aspergillus oryzae</i> | 25 |
| Tableau 5 : Quelques exemples des enzymes produites par <i>A. oryzae</i> | 26 |
| Tableau 6 :Comparaison entre SSF et SmF | 32 |
| Tableau 7 :la matrice de Plackett et Burman | 34 |
| Tableau 8 : Effets des variables sur la production de la biomasse..... | 35 |
| Tableau 9 Effet des variables sur l'activité protéolytique | 36 |
| Tableau 10 : Effet des variables sur l'activité protéolytique | 40 |
| Tableau 10 :Effet des variables sur la production de la biomasse | 41 |

A red horizontal banner with a white border and a scroll effect at the top and bottom edges. The word "Introduction" is centered in the banner in a bold, black, sans-serif font.

Introduction

Introduction

Les protéases, appelées aussi les peptidases, les enzymes protéolytiques ou les protéinases font partie du groupe des hydrolases. Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques entre les résidus d'acides aminés des protéines (Anbuet *al.*, 2008). Durant les dernières décennies, l'utilisation des enzymes comme catalyseurs industriels joue un rôle très important, ces enzymes agissent pour accélérer les réactions chimiques. De nos jours, les enzymes ont une grande part sur le marché des produits fermentés. En 2018, la production mondiale d'enzymes atteint 53000 tonnes par ans (75% des enzymes industrielles sont hydrolytiques). Les protéases occupent une position centrale dans le commerce, représentant environ 60 % de l'ensemble du marché industriel des enzymes.(Al-Manhel, 2018).Elles sont largement utilisées dans les industries des détergents (80%), du cuir, de la pharmacie et de l'alimentation (Rao M.B. et *al.*, 1998). Les applications alimentaires des protéases incluent leur utilisation dans la fabrication du fromage, boulangerie, brasserie, tannerie, attendrissement des viandes, la clarification de la bière, la production d'hydrolysats de protéines, l'industrie de traitements des déchets et les industries pharmaceutiques et cosmétiques (Chande*letal.*, 2007). Aussi, les protéases sont utilisées dans les systèmes de traitement des eaux usées pour améliorer la déshydratation des boues (Anbuet *al.*, 2008). Les protéases peuvent être produites à partir de différentes sources, telles que les champignons, les plantes, les animaux et les micro-organismes. Ces derniers sont les principaux producteurs en raison de leurs avantages économiques et techniques, la simplicité des méthodes de production et la manipulation génétique, leur vitesse de croissance rapide et leur grande diversité biochimique (Singh R .,Kumar M., Miltal A., Mehta P.K. 2016).

La production de protéases à partir de micro-organismes est constitutive ou partiellement inductible dans la nature. En raison de leur capacité à se développer sur un substrat solide et à produire une large gamme d'enzymes extracellulaires et s'expriment directement dans le milieu de fermentation. Parmi les nombreux avantages offerts par la production d'enzymes par des champignons, citons le faible coût des matières premières associé à une productivité élevée, une production plus rapide et la facilité avec laquelle les enzymes peuvent être modifiées, une durée de conservation plus longue et peuvent être stockées dans des conditions moins qu'idéales pendant des semaines sans perte significative d'activité et facilement récupérables dans les milieux. (Mienda*etal.*, 2014).

Les protéases fongiques sont les composants les plus importants des préparations enzymatiques commerciales ; les *Aspergillus oryzae* et *niger* sont la source prédominante de la protéase neutre et alcaline. Ce sont des organismes de choix, car ils ont des caractères

Introduction

omniprésents, une exigence nutritionnelle non fastidieuse, adaptation aux cultures à base des substrats liquide peux couteux, facilitant ainsi l'extraction et la récupération des protéases extracellulaires à partir des milieux de fermentation avec des rendements élevés tout en réduisant les coûts d'exploitation (Castro *et al.*, 2015).

Pour la production de protéases à partir d'*Aspergillus niger* et *A.oryzae*, des techniques de fermentation à l'état liquide et immergée sont utilisées (Benazir *etal.*, 2011). Cependant, la fermentation à l'état liquide parmi les méthodes utilisée pour la production de protéases acides et alcalines par *Aspergillus*. La caractéristique essentielle de SmF est la récupération facile des métabolites, des mycéliums et fournie de bons rendements en enzymes (extraits enzymatiques plus stable), La possibilité de contrôler les paramètres en ligne tels que le pH, la température, la viscosité, l'oxygène dissous, la formation de mousse, la formation de biomasse. (Sun, S.Y. et Xu Y. 2009).

Les nouveaux procédés industriels qui nécessitent moins d'énergie et à moindre cout et sont basés sur des matières premières renouvelables. Ceci peut être atteint par l'utilisation des résidus agro-industriels disponibles et bon marché et par l'optimisation des conditions nutritionnelles et physicochimiques du milieu de culture (Singh *et al.*, 2009).

L'objectif de ce travail est de faire la synthèse de deux travaux de recherche qui ont étudié la production des protéases par fermentation sur milieu liquide à base de divers substrats : les déchets d'oranges et les déchets des dattes.

Le travail actuel est subdivisé en quatre parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique relatant des généralités sur les espèces appartenant au genre *Aspergillus* et leur importance dans la production de protéases appliqués dans plusieurs secteurs industriels.
- La deuxième partie met au clair la méthodologie utilisée pour la préparation des substrats de fermentation, la production des protéases sur les différents milieux enrichis selon une planification statistique
- Une synthèse des résultats encourageant est présentée afin de montrer l'importance de l'optimisation des conditions de culture dans l'augmentation du rendement aussi bien en enzyme qu'en biomasse
- Le manuscrit est clôturé par une conclusion générale

A decorative red scroll graphic with a white border and a white shadow. The scroll is unrolled in the middle, with the top and bottom edges curling upwards. The text is centered on the unrolled portion.

Chapitre 1 : les protéases

Chapitre 1

1. Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont des protéines très spécifiques qui catalysent les réactions chimiques. Cette spécificité présente un double aspect, soit une spécificité réactionnelle où l'enzyme ne peut catalyser qu'un type de réaction donné, comme l'hydrolyse de liaisons glucosidiques ou l'hydrolyse de liaisons esters, soit une spécificité quant au substrat puisque l'enzyme se fixe sur le substrat en des points bien précis de la protéine enzymatique. Cette fixation se fait par établissement de liaisons de type hydrogène, hydrophobes (Arnaud *et al.*, 1993).

La variété d'enzymes élaborée par un seul microorganisme est prodigieuse, donc un microorganisme donné peut fournir plusieurs enzymes différentes selon le milieu de culture utilisé. Par exemple, *Aspergillus oryza* produit plusieurs enzymes. (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

En effet, certaines enzymes sont excrétées à l'extérieur de la cellule même si toutes les enzymes sont d'abord produites à l'intérieur. Il y a donc deux types d'enzymes, soit les enzymes intracellulaires ou endoenzymes qui synthétisent les divers composants cellulaires et décomposent les nutriments pour les besoins énergétiques de la cellule. Et les enzymes extracellulaires ou exoenzymes sont sécrétées par les cellules et agissent à l'extérieur de celles-ci sur les diverses substances organiques telles que les protéines, les hydrates de carbone ou les lipides, formant des dérivés généralement solubles et susceptibles d'être absorbés à travers la membrane cellulaire. (Simon et Meunier, 1970).

Les enzymes industrielles peuvent avoir plusieurs origines dont la synthèse d'enzymes à partir des plantes et des animaux, cependant elle est limitée par de nombreux paramètres. Dès lors, la production d'enzymes à partir de la flore microbienne est l'avenue privilégiée par les producteurs puisqu'elle est plus facile à gérer et donne des résultats plus constants (Aviron-Violet *et al.*, 1982; Arnaud *et al.*, 1993).

Des milliers d'espèces de microorganismes connus sont capables de sécréter des enzymes et un petit nombre seulement de ceux-ci ont jusqu'à ce jour été utilisées à des fins industrielles (Simon et Meunier, 1970; Aviron-Violet *et al.*, 1982). De ces milliers de microorganismes, environ 20 seulement sont actuellement commercialisés sur une base qui a un impact significatif sur l'industrie des enzymes et sur les utilisateurs d'enzymes. Ainsi, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus licheniformis* produisent environ 50% de l'ensemble des enzymes de fermentation, alors que les moisissures du genre *Aspergillus* comme *A. Niger* et *A. oryzae*, en génèrent 30 % (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

Chapitre 1

Les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont : une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (Scriban, 1993).

Le marché des enzymes industrielles a connu un volume annuel de croissance de 10 à 15%. Parmi les enzymes industrielles, les enzymes de type hydrolytiques comme les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes, soit environ 60% (García-Gómez *et al.*, 2009; Rai et Mukherjee, 2010).

La culture des microorganismes producteurs d'enzyme est une tradition plus que millénaire dans les pays d'Orient. *Mucorales* et surtout *Aspergillus oryzae*, ont de tout temps été des auxiliaires dans la préparation par fermentation d'aliments et de boissons variées. Par exemple la fermentation du saké, une boisson alcoolisée (bières et vin et boissons fruitées..), détergents, produits laitiers, Graisses et huile...ect.(Aviron-Violet *et al.*, 1982)

2. Définition de la protéase

Les protéases (peptidases, protéinases ou enzymes protéolytiques) sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et peuvent être exocellulaire ou endocellulaire (Kumar *et al.*, 2008b).

Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux (Pelmont, 1995). Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulateurs plus spécifiques. (Kumar *et al.*, 2008a).

3. Sources des protéases

3.1. d'origine animale

Protéases

Les protéases les plus familières d'origine animale sont la chymotrypsine, la trypsine pancréatique, l'élastase, la pepsine, la rénine. Ceux-ci sont préparés sous forme pure en grandes quantités (Monteiro, 2015). Cependant, leur production dépend de la disponibilité du bétail pour l'abattage, qui est elle-même régie par les politiques agricoles (Mala B.1998).

Chapitre 1

- La trypsine : est la principale enzyme digestive de l'intestin responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires.
- La chymotrypsine : est préparée à partir d'extraits pancréatiques d'animaux sa préparation à l'état pur est coûteuse et elle est utilisée principalement dans les applications de diagnostiques et d'analyses.
- La pepsine : est une protéase acide que l'on trouve dans l'estomac de presque tous les vertébrés. La présure est une protéase similaire à la pepsine. Elle est biosynthétisée sous forme de précurseur inactif dans l'estomac de beaucoup de mammifères. Elle est convertie en rénine active par l'action de la pepsine. Elle est largement utilisée dans l'industrie laitière pour produire le caillé stable avec une bonne saveur. Mais, la production de ces enzymes dépend de la disponibilité de bétail, qui est gouverné par la politique et les bris d'agriculture (Monteiro, 2015).

3.2. d'origine végétale

Protestes

L'utilisation des plantes comme source de protéases est régie par plusieurs facteurs tels que la disponibilité de terres cultivables et l'adéquation des conditions climatiques pour la croissance. La papaïne, la bromélaïne, les kératinases et la ficine sont quelques-unes des protéases d'origine végétale les plus connues. (Rao et *al.*, 1998).

3.3. protéases d'origines microbiennes

Les

Les micro-organismes élaborent un large éventail de protéases. Les protéases intracellulaires sont importantes pour divers processus cellulaires et métaboliques, tels que la sporulation et la différenciation, le renouvellement des protéines.....ex. (Monteiro, 2015).

❖ Protéases bactérienne :

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

Chapitre 1

vie pour la génération de nouvelles enzymes recombinantes avec des propriétés modifiées. (Monteiro, 2015).

❖ **Protéases virale :**

Les protéases virales ont pris de l'importance en raison de leur implication fonctionnelle dans le traitement des protéines des virus qui causent certaines maladies mortelles telles que le SIDA et le cancer. On trouve des peptidases à sérine, aspartique et cystéine dans divers virus (236). Toutes les peptidases codées par les virus sont des endopeptidases ; il n'y a pas de métallopeptidases. (Monteiro, 2015).

❖ **Protéase fongique :**

Ces dernières années, des tentatives ont été faites pour produire différents types de protéases par SmF ou SSF, en utilisant plusieurs types de substrats différents. Un grand nombre de souches fongiques ont été utilisées pour produire des protéases appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, entre autres. Les paramètres physiques et chimiques des protéases de champignons ont été largement étudiés et décrits.

4. Classification des protéases

❖ **Selon leur site d'action**

Les protéases ne se conforment pas facilement au système général de nomenclature des enzymes en raison de leur grande diversité d'action et de structure. Actuellement, les protéases sont classées sur la base de trois critères principaux : (i) le type de réaction catalysée, (ii) la nature chimique du site catalytique et (iii) la relation évolutive par rapport à la structure.

- Endopeptidases

Les endopeptidases se caractérisent par leur action préférentielle sur les liaisons peptidiques dans les régions internes de la chaîne polypeptidique, loin des extrémités N et C. La présence d'un groupe amino ou carboxyle libre a une influence négative sur l'activité de l'enzyme. Les endopeptidases sont divisées en quatre sous-groupes en fonction de leur mécanisme catalytique :

Chapitre 1

- **Protéase à sérines** : Les sérine-protéases se caractérisent par la présence d'un groupe sérine dans leur site actif. Elles sont nombreuses et répandues parmi les virus, les bactéries et les eucaryotes, ce qui suggère qu'elles sont vitales pour les organismes. (Roa et *al.*, 1998) cette enzyme joue un rôle crucial dans la coagulation du sang, la fibrinolyse et le remodelage tissulaire. Dans le sang, ces protéases à sérine circulent sous formes inactives appelées zymogènes (Boulaftali Y, 2012).
- **Mettaloproteases** : Les métalloprotéases sont le types catalytique des protéases les plus divers. Elles se caractérisent par le fait qu'elles ont besoin d'un métal équivalent pour être actives. (Roa et *al.*, 1998).
- **Protéase cystéine** : Les protéases à cystéine contiennent une triade Cys-His-Asn dans le site actif. Un résidu histidine, présent dans le site actif, agit comme donneur de protons et renforce le caractère nucléophile du résidu cystéine (figure 1). Le résidu cystéine nucléophile attaque le carbone de la liaison peptidique réactive, produisant le premier intermédiaire thioester tétraédrique dans la réaction avec libération d'une amine ou d'un fragment d'extrémité aminé du substrat. (Rajnikant D., Kailash C. 2016).

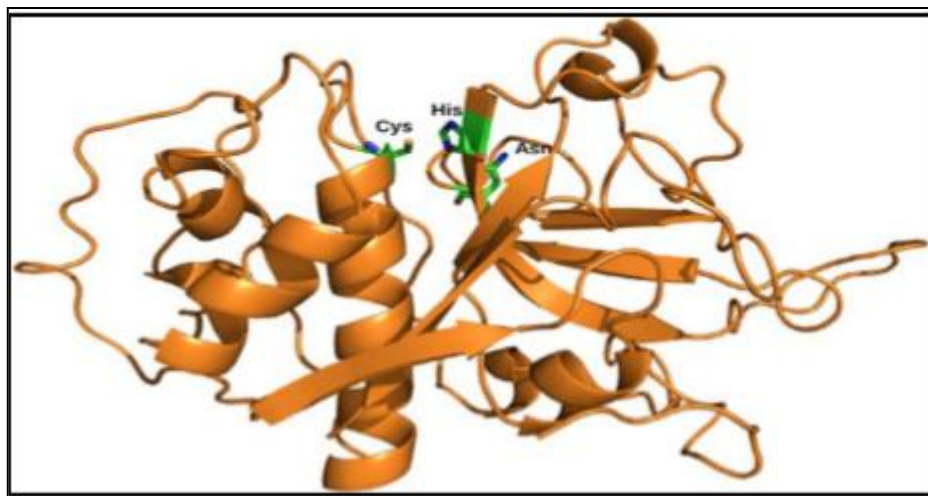


Figure 01:Structure du domaine mature. Représentation structurelle de la cystéine protéase avec le domaine mature (orange) montrant les résidus du site actif ; Cys, His, et Asn (bâton). (Rajnikant D., Kailash C. 2016)

- **Protéases acide aspartique** : Les protéases à acide aspartique, communément appelées protéases acides, sont des endopeptidases dont l'activité catalytique dépend des résidus d'acide aspartique. Les protéases aspartiques présentent une activité maximale à faible pH (pH 3 à 4) et leur point isoélectrique se situe entre pH 3 et 4,5 (Roa et *al.*, 1998).

- Exopeptidase :

Les exopeptidases agissent uniquement à l'extrémité des chaînes polypeptidiques. En fonction de leur site d'action à l'extrémité N ou C, elles sont classées comme amino- et carboxypeptidases, respectivement.

Les exopeptidases peuvent être classées en deux groupes en distinguant :

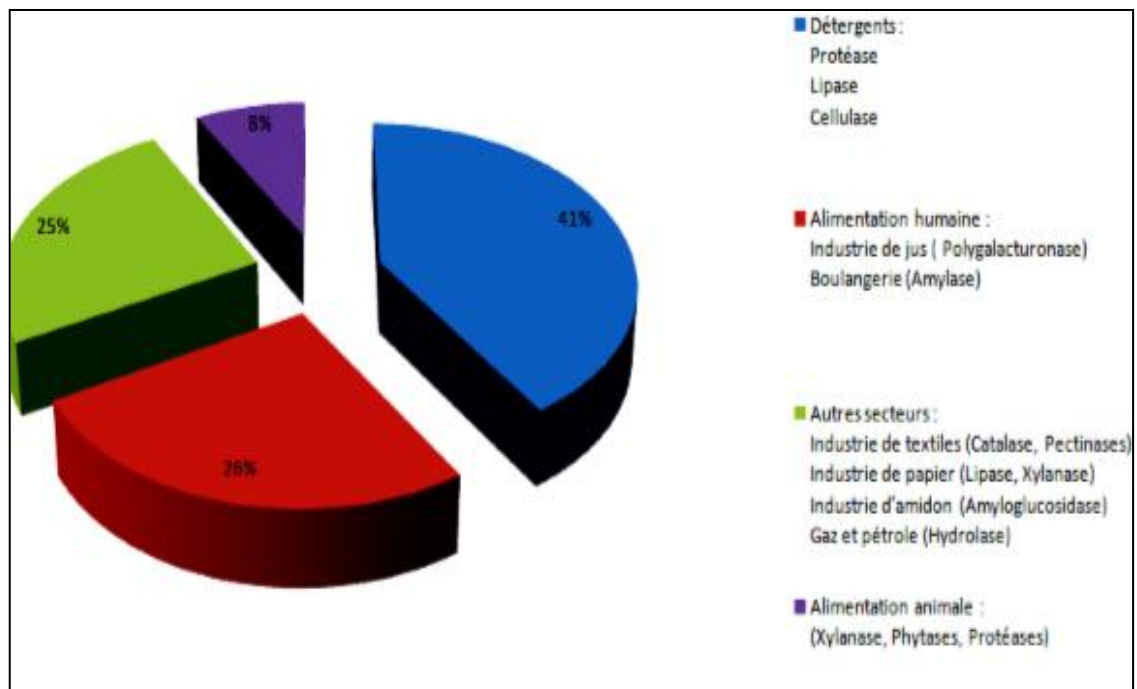
- **Amino-peptidases** : Les aminopeptidases agissent au niveau de l'extrémité N libre de la chaîne polypeptidique et libèrent un seul résidu d'acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide.
- **Carboxy-peptidases** : Les carboxypeptidases agissent au niveau des terminaisons C de la chaîne polypeptidique et libèrent un seul acide aminé ou un dipeptide. Les carboxypeptidases peuvent être divisées en trois groupes principaux, les sérine-carboxypeptidases, les métallo-carboxypeptidases et les cystéine-carboxypeptidases, en fonction de la nature des résidus d'acides aminés dans le site actif des enzymes. (Roa et al., 1998).

❖ Selon leur pH optimal

- Protéases acide : Les protéases acides sont plus performantes à un pH 2 et 6, il s'agit principalement de protéases aspartiques, mais aussi de certaines protéases à cystéine et de métalloprotéases. Sont principalement produites par des champignons.
- Protéase neutre : sont actives à un pH optimale est de l'ordre de 7, faiblement alcalin ou faiblement acide, comprennent les protéases à cystéine, les métalloprotéases et certaines protéases à sérine.
- Protéase alcaline : Les protéases alcalines sont actives dans la gamme de pH de 8 à 13, ont de nombreuses applications dans les industries alimentaires et plusieurs processus de bio-remédiation. (Mala B, 1998).

5. Applications des protéases

Les protéases sont principalement utilisées dans les industries détergentes, l'industrie alimentaire, et sont envisagées pour des applications étendues dans le traitement du cuir et de l'industrie pharmaceutique pour la préparation de médicaments.



- **l'industrie alimentaire**

L'utilisation des protéases dans l'industrie alimentaire remonte à antiquité. Elles ont été couramment utilisés à diverses fins comme la fromagerie, la boulangerie, la préparation d'hydrolysats de soja, et attendrissement de la viande (Loffler, 1986).

- **Fabrication de fromage**

Les protéases aspartiques acides sont utilisées comme enzymes de coagulation du lait dans la fabrication du fromage en raison de leur capacité caractéristique à coaguler les protéines du lait pour former des caillés avec libération associée de lactosérum. Il existe aujourd'hui trois types d'enzymes commerciales de coagulation du lait : les présures animales, les présures microbiennes et les présures de veau génétiquement modifiées (chymosine) (Cerning et al. 1984).

- **Boulangerie**

Les protéases sont utilisées en boulangerie pour modifier le gluten, une protéine du blé aux propriétés viscoélastiques qui a la capacité de s'étendre lorsque la pâte à pain monte au cours du processus de cuisson. Le processus de fabrication de la pâte peut être accéléré par l'ajout de protéases afin d'hydrolyser partiellement le gluten. Pour faciliter la manipulation.

Chapitre 1

Les protéases fongiques thermolabiles sont utilisées pour l'hydrolyse du gluten en boulangerie, de sorte que l'enzyme se dénature à mesure que la température augmente au cours des premières étapes de la boulangerie.

Les protéases neutres bactériennes peuvent être utilisées à cette fin, par exemple, dans la production de biscuits, de cookies (Ducroo,1982).

- **Produits à base de soja**

Les protéases sont utilisées depuis l'Antiquité pour préparer la sauce soja et autres produits à base de soja. L'alcalin et la neutre protéase d'origine fongique joue un rôle important dans la transformation de sauce soja. Modification protéolytique des protéines de soja par les protéases contribue à améliorer leurs propriétés fonctionnelles. Traitement du soja par la protéase alcaline à pH 8 donnent des hydrolysats solubles avec une solubilité élevée. Aussi, l'hydrolysat est utilisé dans les boissons gazeuses enrichies en protéines et dans les aliments diététiques (Rao et *al.*, 1998).

- **Détergents**

Les protéases sont l'un des ingrédients standard de toutes sortes de détergents, qu'il s'agisse de ceux utilisés pour la lessive ménagère aux réactifs utilisés pour le nettoyage des lentilles de contact ou des prothèses dentaires. La protéase détergente idéale doit posséder une large spécificité de substrat et la stabilité à un pH et une température élevés, ainsi que la compatibilité avec d'autres agents chélateurs et oxydants ajoutés l'utilisation des protéases dans les détergents représente environ 25 % des ventes mondiales totales d'enzymes (Rao et *al.*, 1998).

- **Production d'hydrolysats de protéines**

Les hydrolysats de protéines sont largement utilisés comme additifs dans l'alimentation humaine et animale, où ils présentent diverses caractéristiques de modification des propriétés des protéines.

De nombreux types de protéines, y compris les protéines de soja, la gélatine, les caséines et les protéines de lactosérum peuvent être modifiés à l'aide de protéases. Les hydrolysats de poisson et de viande sont préparés à l'aide de protéases, et les protéases peuvent également être utilisées pour l'attendrissement de la viande. En effet, l'attendrissement naturel est médié par des protéases endogènes dans le muscle après l'abattage de l'animal. Les protéases peuvent

Chapitre 1

être utilisées pour récupérer les protéines lors de l'équarrissage, qui peuvent ensuite être incorporées dans les soupes, les sauces et les viandes en conserve.

De nombreuses applications des protéases dans la transformation des aliments et des hydrolysats de protéines sont liées à la production d'arômes. La manipulation des conditions hydrolytiques pour l'hydrolyse des protéines de soja par la protéase alcaline peut entraîner le développement de propriétés fonctionnelles et aromatiques contrastées (Simon et Meunier, 1970).

- **Traitement des eaux usées industrielles**

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. En effet, les protéases peuvent traiter les rejets riches en protéines (Kumar et al. Sumantha et al.,).

- **Utilisation médicale**

Les protéases sont également utilisées pour le développement des produits d'importance médicale telle que les protéases d'*Aspergillus* s'appliquent pour soulager les troubles digestives gastro-intestinaux tels que la dyspepsie. Les protéases acides peuvent hydrolyser la fibrine et le fibrinogène. Elle est appliquée sur des patients en hémodialyse chronique avec des canules artério-coagulés (Hernández et al.)

- **Industrie pharmaceutique**

La grande diversité et la spécificité des protéases sont utilisées pour grand avantage dans le développement d'agents thérapeutiques efficaces. Administration orale de protéases d'*Aspergillus oryzae* a été utilisée comme aide digestive pour corriger certains syndromes de déficit en enzymes lytiques. Collagénase clostridiale ou la subtilisine est utilisée en combinaison avec un médicament à large spectre antibiotiques dans le traitement des brûlures et des plaies.

La protéase alcaline de *Conidiobolus coronatus* s'est avérée pouvoir remplacer la trypsine dans les cultures de cellules animale (Rao et *al.*, 1998).

- **Autres applications**

Les protéases ont également trouvé des applications plus spécialisées dans les procédés de purification de produits non protéiques d'origine animale ou végétale.

Chapitre 1

Les protéases peuvent être utilisées pour la solubilisation de la kératine matériaux pour convertir les déchets tels que les plumes en concentrés de protéines à utiliser comme aliments pour animaux.

Une protéase alcaline de L'espèce *Streptomyces* a également une forte activité kératinolytique.

Les protéases peuvent également être consommées par les humains et les animaux comme auxiliaires digestifs (Kumar et *al.*, 2008a).

Chapitre *II* : *Aspergillus*

Chapitre 02

1. Généralités

Les espèces appartenant au genre d'*Aspergillus* sont les plus diverses car ils peuvent coloniser différents substrats et peuvent vivre dans différentes conditions environnementales.

La biodiversité des espèces d'*Aspergillus* est fortement affectée par certaines conditions telles que le climat, la disponibilité du substrat, les interactions écologiques et l'activité de l'eau.

Aspergillus comprend environ plus de 340 espèces. Ces espèces peuvent être pathogènes ou bénéfiques pour les humains, les plantes et les animaux.

Les espèces d'*Aspergillus* sont parmi les champignons les plus abondants mondial, ils sont peu sélectifs vis-à-vis des abiotiques conditions de croissance. Par exemple, ils peuvent se développer sur une large plage de températures (6–55°C) et à une humidité relativement faible.

Le genre *Aspergillus* est considéré comme un groupe cosmopolite car il peut vivre dans un large éventail d'écosystèmes et de zones environnementales et climatiques, peut se trouver dans différents habitats de l'environnement comme épiphyte ou endophyte avec les plantes, le sol et l'air, et aussi dans les environnements glacés et marins. (Schuster et *al.*, 2002).

En raison de la biodiversité du genre *Aspergillus* et parce qu'il est largement répandu, il était d'un intérêt émergent pour maximiser l'utilisation et l'application d'*Aspergillus* dans de nombreux domaines biotechnologiques et industriels et l'industrie pharmaceutiques. Les *Aspergillus* sont considérés comme l'un des genres les plus importants pour la production à grande échelle d'acides organiques, d'enzymes qui occupent une grande part du marché mondial. (HalewynM-A.,Chevalier P, 2001).

2. *Aspergillus niger*

Il s'agit d'un champignon ascomycète filamenteux de couleur noire omniprésent dans l'environnement et a été impliqué dans l'infection opportuniste de l'homme. C'est l'un des plus importants micro-organismes utilisés en biotechnologie. Il a été utilisé déjà depuis de

Chapitre 02

nombreuses décennies pour produire d'acides et d'enzymes de valeur industrielle telle que : les cellulases, les amylases, les pectinase et les protéases (Mary A et al., 2019).

2.1. Taxonomie

Le genre *Aspergillus* (Tableau 01) comprend 185 espèces réparties en 18 groupes étroitement liés morpho physiologiquement et génétiquement. Parmi elles, une vingtaine est impliquée dans des pathologies humaines et animales. Les espèces du genre *Aspergillus* sont largement répandues géographiquement, souvent associées aux régions chaudes.

Les *Aspergillus* noirs font partie d'un groupe d'espèces appelé « section *Nigri* » et autrefois connu sous le nom de « *Aspergillus niger* groupe » : toutes les espèces de la section ont des têtes de conidies noires (Chi-Ching.T et al., 2018).

Tableau 01: La position systématique d'*Aspergillus niger*(Koji.K et al., 2001)

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

2.2. Les caractères macroscopiques

La description des *Aspergillus* est basée sur leur morphologie et en particulier la couleur des colonies, l'aspect des têtes aspergillaires, l'aspect des conidies, des conidiophores (figures : 5,6).

Les colonies sont à croissance rapide sur tous les milieux de culture classiques (gélouses au malt et Sabouraud Czapek Yeast Agar, YES agar et Malt salé). La température

Chapitre 02

optimale de croissance est entre 25 et 30°C, mais *Aspergillus niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Après l'incubation les colonies d'*Aspergillus niger* sont poudreuses granuleuses blanches au début, puis jaunâtres et à maturité elles deviennent noires (parfois bruns), à Revers généralement incolore ou jaune (Mary A et al., 2019).

Les colonies sur gélose pomme de terre et dextrose (PDA) à 25 °C sont d'abord blanches, devenant rapidement noires au moment de la production de conidies. Le revers de la colonie est jaune pâle et se plisse de façon radiale au cours de la croissance. Sur milieu gélosé de Czapek-Dox à 25 °C, les colonies atteignent un diamètre de 4-5 cm en 7 jours et de 6-7 cm après 21 jours. Les colonies se composent d'un feutre blanc ou jaune compact avec une couche dense de conidiophores de bruns à noirs; le revers de la colonie est de crème à jaune. Sur gélose à l'extrait de malt, les colonies sont plus clairsemées, mais elles sont fortement sporulées. On observe une croissance pauvre sur le milieu gélosé à la créatinine, additionné de décolorant et de sucrose (CREAD). (Halewyn M-A., Chevalier P, 2001).



Figure 03 : *Aspergillus niger* sur milieu M2 (Samson et al., 2004)

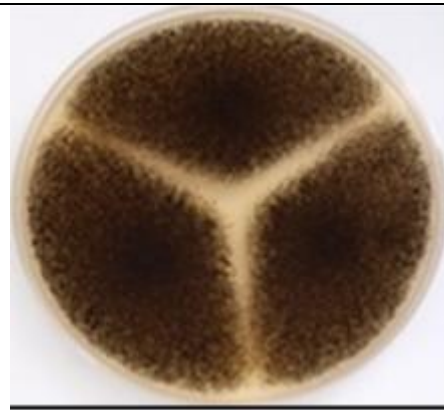


Figure 04 : *Aspergillus niger* sur milieu M2S5 (Samson et al., 2004)

2. 3. Les caractères microscopiques (figures 3, 4)

Les conidies : sont des spores asexuées unicellulaires produites par des phialides, elles sont typiquement globuleuses, mesurent 3.5-4 µm de diamètre, de couleur noir très sombre à brune foncée et de texture verruqueuse échinulée ou striée.

Les conidiophores : sont longs 400-3000 µm, lisses à stipe et non cloisonnés, hyalins et brunâtre dans leur moitié supérieure et se terminant en une vésicule.

Chapitre 02

Vésicule : de grande taille 25-75µm globuleuse et sous globuleuse de couleur brune supportant deux séries de sterigmates sur toutes ses surfaces.

Les phialides : très serrées, mesurent 7-9*3-4µm de diamètre portées sur des metules généralement teinte de brune, souvent septes.

Les hyphes : sont septes et hyalins, les tetesconidiennes sont larges, brune foncée a noire, de configurations globuleuse a radiale a l'Etat jeune puis se séparant en colonnes lâches, et pouvant atteindre un diamètre de 700 à 800µm. (HalewynM-A.,Chevalier P, 2021).



Figure 05 : Conidiophore (x100) (Samson, R.A et al., 2004).

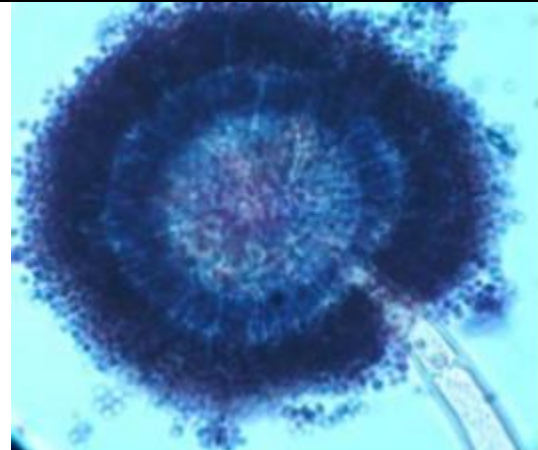


Figure 06 : Tête conidienne d'*A. niger* (x400) (Samson, R.A et al., 2004).

2.4. Reproduction

- La croissance végétative : Dans la nature, les aspergilles se développent à l'intérieur et sur des substrats solides. Une colonie peut résulter d'une seule spore sexuée ou asexuée, mais elle peut aussi apparaître après la fusion de conidies et/ou de germes qui se trouvent à proximité les uns des autres. La fusion est médiée par des ponts de fusion qui sont formés par les conidies ou les tubes germinatif, Ils sont généralement courts, minces et non ramifiés. La fusion des conidies et des germes a été décrite comme se produisant au sein des souches d'*Aspergillus*, entre les souches d'*Aspergillus* et même entre les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*. Cependant, la fusion entre souches et entre espèces entraîne souvent une incompatibilité entre hétérocaryons. avec formation d'un hyphe tubulaire (extension strictement apicale) donnant naissance à un réseau mycélien.
- La reproduction asexuée : Après une période de croissance végétative, la colonie exposée à l'air forment deux types d'hyphes. Un type est assez similaire aux hyphes

Chapitre 02

végétatifs a un diamètre d'environ 2-3 μm . Le second type d'hyphes aériens a un diamètre d'environ 4-5 et 6-7 μm . Lorsque le pédoncule a atteint sa hauteur maximale, l'extrémité se gonfle et forme une vésicule d'un diamètre de 10 μm . Chez l'espèce *A. niger*, la surface de la vésicule bourgeonne et donne naissance à une couche de stérigmates primaires appelés métules. Les métules bourgeonnent à leur tour deux fois. Il en résulte une deuxième couche de stérigmates appelés phialides. Les phialides donnent naissance à des chaînes de conidies principalement uninucléées. Ainsi, plus de 10 000 conidies peuvent être produites par conidiophore. (Herman J. P., Johannes H. W., Hein .S, 2007).

2.5. Les enzymes produites par *Aspergillus niger*

Aspergillus niger est l'un des micro-organismes les plus importants en biotechnologie. Il est utilisé pour produire des enzymes industriels. Il présente le pourcentage le plus élevé d'enzymes extracellulaires (les cellulases, hémicellulases, pectinases, amylases, insulinasés, lipases et protéases) qui sont utilisées dans toute une série d'applications industrielles. Nombre de ces produits ont obtenu le statut GRAS (generally regarded as safe). (Schuster et al., 2002).

En outre, *A. Niger* est utilisé pour les biotransformations et le traitement des déchets (tableau 2). Au cours des deux dernières décennies, *A. Niger* a été développé en tant qu'hôte de transformation important pour surexprimer les enzymes alimentaires, pour la production d'ingrédients alimentaires et de produits pharmaceutiques (Herman et al., 2007).

Tableau 02 : production des enzymes par *A.niger* (Bensmail , 2012)

| Enzymes | Microorganisme | Substrat/ milieu |
|-----------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Protéases | <i>Aspergillus niger</i> | Son de blé |
| | | Milieu défini |
| | <i>Aspergillus niger</i> ATCC 13496 | Bouillon Batco YM |
| | <i>Aspergillus niger</i> 91 | Grain de soja : son de riz (7:3 w/w) |
| | <i>Aspergillus niger</i> Z1 | Milieu Czapek-Dox |

Chapitre 02

| | | |
|-------------------|-------------------------------------|---|
| | <i>Aspergillus niger</i> UO-1 | Déchets de transformation de viande + déchets de brasserie + amidon |
| | <i>Aspergillus niger</i> | Confits, graines de coton en poudre |
| | <i>Aspergillus niger</i> AB100 | Écaille de poissons |
| Glucoamylase | <i>Aspergillus niger</i> ATCC 13496 | Bouillon Batco YM |
| | <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 | Maltose |
| | <i>Aspergillus niger</i> | Manioc, maïs, son de blé Son de blé+son de riz+cellulose Confits, graines de coton en poudre Les déchets alimentaires |
| α -amylase | <i>Aspergillus niger</i> UO-1 | Déchets de transformation de viande + déchets de brasserie + amidon |
| Xylanase | <i>Aspergillus niger</i> (mutant) | La paille de riz |
| | <i>Aspergillus niger</i> KK2 | La paille de riz+son de blé |
| | <i>Aspergillus niger</i> XY-1 | Son de blé |
| Cellulase | <i>Aspergillus niger</i> ATTC 6275 | Moulin à l'huile de palme effluent/gâteau palme |
| | <i>Aspergillus niger</i> KK2 | La paille de riz+son de blé |
| | <i>Aspergillus niger</i> NCIM 1207 | La poudre du cellulose-123 |
| | <i>Aspergillus niger</i> | Confits, graines de coton en poudre |
| Lipase | <i>Aspergillus niger</i> | L'huile d'olive + la gomme d'acacia (3%+1%) |

Chapitre 02

| | | |
|-------------------------|--|--|
| | | Son de blé + l'huile d'olive |
| Phytase | <i>Aspergillus niger</i> | Son de blé + farine de soja |
| Polygalaturonase | <i>Aspergillus niger</i> | Pectine + la bagasse de la canne à sucre |
| | | Son de blé |
| Pectinase | <i>Aspergillus niger DMF 27, DMF45</i> | Tête de tournesol égrainée |
| α -galactosidase | <i>Aspergillus niger MRSS 234</i> | Son de ble |
| Uréase | <i>Aspergillus niger PTCC 5011</i> | Milieu défini |

2.6. Isolement et culture

Aspergillus niger est une moisissure cosmopolite et d'occurrence très commune elle a la capacité de développer en aérobiose sur la matière organique. Elle peut être isolée à partir de différents substrats :

- Des substrats naturelles : (sol, l'air, bois, fruits frais et sec, noix, eau : douce, polluée, lits de rivière).
- Des produits manufacturés : (émulsion de cosmétique, plastiques, photographie, cuir, papiers composants électroniques, peinture murale ou artistique, textiles).

Cette moisissure se développe aussi bien en intérieur et en extérieur. C'est une des espèces les plus communes du sol. Elle se développe sur la matière végétale en décomposition, comme les composts. Elle peut contaminer la viande et les œufs, ou les fruits séchés au soleil. Elle peut aussi endommager les cuirs en surface et en épaisseur. (Meyer *et al.*, 2004).

Aspergillus niger est une espèce xérophile, pouvant vivre dans un milieu assez pauvre en eau avec une activité de l'eau égale à 0,88 à la température de 35 °C. C'est pourquoi elle est fréquemment isolée dans les fruits secs et les noix. Elle peut se développer dans un environnement très humide (humidité relative de 90 à 100 %). Peut croître dans une large gamme du pH : 1,4 à 9,8, elle a la capacité de supporter des pH bas (Pasqualotto A. C. 2010)

Aspergillus niger est une espèce mésophile avec la capacité de croître dans une large gamme de températures (11 et 42 °C). La température optimale est de 37 ° avec une bonne croissance, mais elle peut survivre à 60⁰. (Schuster *et al.*, 2002).

Chapitre 02

L'identification des *Aspergillus* se fait dans des boîtes pétri sur des milieux de culture classiques en se basant sur la coloration de la colonie, la pigmentation et la forme de la tête aspergillaire et l'aspect des spores.

Aspergillus niger forme des colonies atteignant 4 à 5 cm de diamètre en 7 jours sur milieu Czapek incubé à 25 °C, de couleur noire. La température optimale de croissance se situe entre 25 et 30 °C mais il peut croître à 47-48 °C. La colonie est d'abord blanche et translucide puis devient noire en sporulant. Le pH du milieu reste inchangé égale 5,5. (Ayesha et al., 2003).

3. *Aspergillus oryzae*

(*A. oryzae*) est un champignon filamenteux aérobie qui appartient au sous-genre *Aspergillus Circumdati* section *Flavi*, précédemment connu sous le nom de groupe *A. flavus*. Ce champignon est utilisé depuis des siècles dans la fermentation de différents aliments dans de nombreux pays du monde (Ghoba M et al., 2021) Il joue un rôle essentiel dans la fabrication des aliments asiatiques, tels que le saké, le shoyu (sauce soja) et la transformation des grains de soja pour la production de miso (pâte de soja). Depuis des milliers d'années, *A. oryzae* a été utilisé surtout pour la fabrication des boissons fermentées. Et actuellement dans la production d'enzymes industrielles car elle possède un système sécrétoire prestigieux qui lui permet de sécréter de fortes concentrations de protéines dans son milieu de culture, ce qui favorise son utilisation en tant qu'outil biotechnologique pour la production de certaines enzymes commerciales comme l'alpha-amylase, la glucoamylase, les protéases, les xylanases, la glutaminase, la lactase, la cutinase, la lipase. Il est reporté une activité de type production antibiotique contre *Candida albicans*. Et aussi dans le domaine pharmaceutique et industriel. (Bo Zhang et al., 2012)

3.1. Taxonomie (Tableau 03)

Aspergillus oryzae, également connu sous le nom de kōji, est un champignon microscopique (Figure 07), aérobie et filamenteux qui appartient aux moisissures "nobles". Cette espèce est utilisée depuis des millénaires en Chine, au Japon et dans d'autres pays d'Asie de l'Est, notamment pour la fermentation du soja et du riz (Barbesgaard et al., 1992).

Chapitre 02

Tableau 03 : la position systématique d'*Aspergillus oryzae* (Webster et Weber, 2007).

| | |
|-------------|---------------------------|
| Règne | Fungi |
| Division | Eumycota |
| Classe | Deuteromycetes |
| Sous classe | Eurotiomycetodae |
| Ordre | Moniliales |
| Famille | Moniliaceae |
| Genre | <i>Aspergillus</i> |
| Espèce | <i>Aspergillus oryzae</i> |



Figure 07 : *aspergillus oryzae*

3.2. Les caractères macroscopiques

En général, *A. oryzae* a une croissance optimale à une température de 32-36 °C (± 1 °C) et ne peut pas se développer au-dessus de 44 °C, à un pH compris entre 5,0 et 6,0 et peut germer à un pH de 2,0 à 8,0. *A. oryzae* peut se développer dans de la farine de maïs dont la teneur en eau est d'environ 16%. Et peut généralement se développer sur des milieux dont l'activité de l'eau (a_w) est supérieure à 0,8, mais se développe rarement en dessous de 0,8.

Chapitre 02

A. oryzae a la capacité de se développer sur de nombreux milieux, y compris la gélose dextrose de pomme de terre sur laquelle la croissance est rapide avec des colonies lourdes (figure 10)., sur la gélose de Czapek les colonies après 7 jours à 25 °C atteignent 7-8 cm de diamètre à revers incolore, têtes conidiennes uni ou bisériées (parfois pour une même souche), radiées rarement d'un vert franc, d'abord jaunâtres puis jaune verdâtre à vert olive, enfin dans les tons de brun similaire à la croissance obtenue sur la gélose à l'extrait de malt

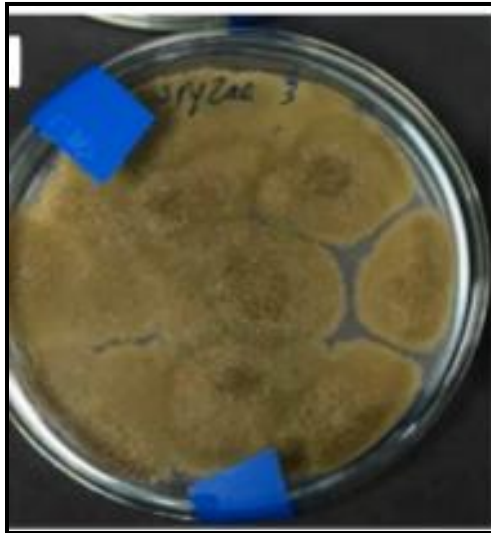


figure08 : *A. oryzae* cultivée sur milieu PDA

3.3. Les caractères microscopiques (figure9, 10)

- **des conidies** : d'abord piriformes à elliptiques puis sub-globuleuses à globuleuses, de taille très variable, 4,5 - 7(10) μm , lisses à finement verruqueuses.
- **Les conidiophores** : hyalins, souvent longs, 2,5 à 5 μm , plus ou moins verruqueux suivant les souches, sont longs, émergent du substrat, ont des parois rugueuses, la tête conidienne est grande, rayonnante.
- **Vésicule** : sub-globuleuses à paroi mince, 40-75 μm , métules 8-12 x 4-5 μm ou globuleuse avec des chaînes conidiennes allongées, qui ressemblent à des fils blancs duveteux sur le substrat inhibé par *A. oryzae*.
- **Phialides** : 8-15 x 3-5 μm . (Bottonet *al.*, 1990)

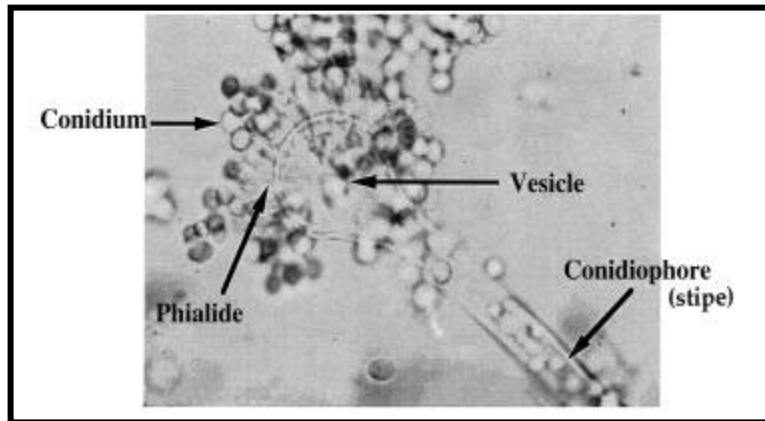


Figure 09 : la structure des conidiophores d'*A oryzae*

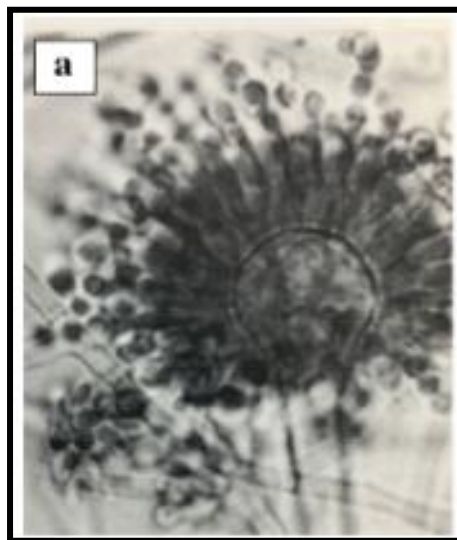


Figure 10 : observation microscopique d'*A oryzae*

3.4. La reproduction

- la croissance végétative : Comme la plupart des autres champignons, *A. oryzae* se développe végétativement sous forme de filaments multinucléés haploïdes, appelés hyphes ou mycéliums. Les hyphes d'*A. oryzae* s'étendent aux extrémités apicales et se multiplient par ramification, de sorte que la colonie couvre la surface du milieu gélosé solidifié après plusieurs jours d'incubation. La croissance des hyphes se poursuit en milieu liquide tant que les hyphes ne sont pas exposés à l'atmosphère. Les structures conidiophores, qui portent des spores reproductives asexuées appelées conidies, sont produites lorsque les hyphes sont transférés sur un milieu gélosé solidifié. Lorsqu'elle

Chapitre 02

est cultivée à la surface d'un milieu gélosé, la colonie est d'abord blanche en raison de la croissance des hyphes végétatifs, puis elle devient vert jaunâtre lorsqu'une grande quantité de conidies se forme. Dans la plupart des souches d'*A. oryzae*, la couleur de la culture fraîche ou des conidies est vert jaunâtre, mais celle de la culture ancienne est brune, parfois verte avec des nuances brunes. Les têtes conidiennes sont généralement globuleuses à rayonnantes, de 100 à 200 µm de diamètre.

- **La reproduction asexuée** : on n'a pas trouvé de cycle de vie sexuel comme chez d'autres champignons filamenteux importants pour l'industrie, tels qu'*A. niger*. Les conidies d'*A. oryzae* sont haploïdes, mais multinucléées (les conidies ont principalement deux à quatre noyaux ou plus), contrairement aux conidies non nucléées d'*A. niger*. Cela rend la manipulation génétique d'*A. oryzae* plus difficile que celle d'*A. niger*. Les conidies sont grandes, de 5 à 8 µm de diamètre, et sphériques à légèrement ovales. Les parois des conidies sont le plus souvent lisses ou finement rugueuses. La plupart des souches d'*A. oryzae* n'ont que des phialides sur les vésicules (stérigmates unisériés), mais certaines contiennent des métules et des phialides (stérigmates bisériés). Les stipes des conidiophores sont incolores et le plus souvent rugueux, parfois lisses et moins rugueux. Ils sont longs, de l'ordre de 1 à 5 mm.

3.5. Les utilisations d'*Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae a été utilisée pendant de nombreux siècles auparavant dans l'industrie de fermentation traditionnelle japonaise pour la production du sake (vin de riz) et pour transférer des grains de soja pour la production de *miso*, de *shōyu* (sauce de soja) ou de *tamari*. Dans une fermentation solide (Oda *et al.*, 2006; Kobayashiet *al.*, 2007; Khaldi et Wolfe, 2008).

Dans cette fermentation *A. oryzae* secrète des quantités importantes d'amylases et/ou des protéases pour briser les complexes d'amidons en sucres simples et les protéines en peptides/acides aminés, qui sont ensuite fermentés par des levures et des bactéries acidolactiques (Kobayashiet *al.*, 2007).

3.6. La production d'enzymes (Tableau 4, 5)

Aspergillus oryzae ou "kojimold" est une espèce largement utilisée dans l'industrie de la fermentation (Maedaet *al.*, 2004; Ward *et al.*, 2006), pour la production de certaines enzymes commerciales comme l'alpha-amylase, la glucoamylase, des protéases, les xylanases,

Chapitre 02

glutaminases, la lactase, la cutinase, la lipase. Et présente une activité de type production antibiotique contre *Candida albicans* (Ken Oda et al., 2002).

L'aminopeptidase est une enzyme catalysant le clivage d'acide aminé de la terminaison amine des protéines. L'aminopeptidase d'*A. oryzae* a attiré l'attention parce que la libération enzymatique d'acides aminés et de peptides est un moyen d'accroître la saveur des aliments fermentés. C'est aussi un agent hypotensif.

A. oryzae est capable de produire la glutaminase une enzyme de conversion de la glutamine en acide glutamique (ou glutamate), un des composants principaux de la saveur de la sauce soja.

Certaines personnes tolérant mal le sucre du lait (ou lactose), des programmes de fabrication de lait à faible teneur en lactose ont été développés. L'enzyme hydrolysant le lactose (ou lactase) peut être préparée à partir de *A. oryzae* qui est considérée comme une moisissure sans danger (Cristobal et al., 2008).

La première production industrielle d'enzyme par *A. oryzae* fut la lipase pour les détergents à lessives en 1988. En fromagerie, la lipase en hydrolysant les matières grasses, contribue à rehausser la saveur des crèmes et des fromages.

Tableau 04 :Enzymes présentes chez *Aspergillus oryzae*(Simon et Meunier, 1970)

o.-AmylasePhosphataseamidase

f3-Amylase PhosphomonoestéraseCytase

DipeptidasePectinasePectosanase

Lactase TannaseCatalase

Lipase Cellulase Sulfatase

Maltase PhophodiestérasRennin (présure)

Peptidase TréhalasePhytase

Protéinase Nucléase

Chapitre 02

Des études visent à produire des glucoamylases d'*Aspergillus oryzae* par fermentation en milieu solide sur des résidus agricoles bon marché, comme le son de blé, de riz, la bagasse de canne à sucre etc.

Aspergillus oryzae est aussi la source de protéases neutres (NPI & NPII) qui montrent une grande affinité pour les acides aminés hydrophobes et est donc capable d'enlever l'amertume des aliments. Plusieurs industries agroalimentaires utilisent les protéases, comme l'industrie laitière (pour l'affinage des fromages) ou la boulangerie pour modifier le gluten de blé par une protéolyse limitée. L'industrie pharmaceutique utilise aussi des protéases d'*A. oryzae* comme aide à la digestion.

A. oryzae est capable de produire la glutaminase une enzyme de conversion de la glutamine en acide glutamique (ou glutamate), un des composants principaux de la saveur de la sauce soja.

La lipase c'est La première production industrielle d'enzyme par *A. oryzae* utilise pour les détergents. En fromagerie, la lipase en hydrolysant les matières grasses, contribue à rehausser la saveur des crèmes et des fromages. (Tricarico, 2008).

Tableau 05 : Quelques exemples des enzymes produites par *A. oryzae*

| Enzyme | Application industrielle | Références |
|---------------|--|---|
| Protéase | Sauce de soja, Fromagerie, Panification, Tannerie. | (Neelakantan et al. 1999; Thammarongtham et al. 2001; Murphy et Horgan, 2005; Sumantha et al., 2005). |
| A amylase | Panification, Sirops de glucose | (Kavanagh, 2005). |
| Glucoamylases | Panification, Saké et shoyu | (Hata et Ishida, 2000; Oda et al., 2006; Ward et al., 2006). |
| Xylanases | Bioblanchiment, Panification. | (Ward et al., 2006). |

Chapitre 02

| | | |
|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Glutaminases | Sauce de soja, Traitement de leucémie | (Thammarongtham et <i>al.</i> ,2001). |
| Polygalacturonases | Sauce de soja | (Kobayashi et <i>al.</i> , 2007). |
| Lipases | Fromageries | (Neelakantan et <i>al.</i> , 1999). |
| Lactases | Hydrolyse du lactosérum acide | Neelakantan et <i>al.</i> , 1999). |
| Cutinases | Recyclage des plastiques | (Machida et <i>al.</i> , 2008). |

Chapitre III : la fermentation

1. Généralités

La fermentation est la conversion biologique de substrats complexes en composés simples par divers micro-organismes tels que les bactéries et les champignons. Au cours de cette décomposition, en plus des produits habituels de la fermentation, plusieurs composés supplémentaires sont libérés tels que le dioxyde de carbone et l'alcool. Ces composés supplémentaires sont appelés métabolites secondaires.

Les métabolites secondaires vont de plusieurs antibiotiques à des peptides, des enzymes et des facteurs de croissance. Ils sont également appelés "composés bioactifs" parce qu'ils possèdent une activité biologique. Ils sont importants d'un point de vue industriel et économique. Ils ont été utilisés dans une variété d'industries telles que Pharmaceutique et alimentaire. L'émergence de ces industries a conduit à l'amplification des techniques utilisées en laboratoire. Ces techniques ont été affinées en fonction de divers paramètres tels que les substrats utilisés, les paramètres environnementaux et les organismes utilisés pour la fermentation.

La fermentation a été classée en deux catégories, fermentation solide SSF et la fermentation liquide SmF, principalement en fonction du type de substrat utilisé pendant la fermentation.

La SSF utilise des substrats solides, tels que le son, la bagasse et la pâte à papier .La SmF utilise des substrats liquides qui s'écoulent librement, tels que la mélasse et les bouillons. (Subramaniyam et Vimala, 2012).

2. Fermentation solide

2.1. Définition

La fermentation à l'état solide (SSF) est une technique courante de production de métabolites microbiens. Le procédé SSF est mis en œuvre sur un substrat solide à faible teneur en humidité, avec une forte concentration de produit mais seulement relativement peu d'énergie étant nécessaire. La teneur en eau requise dans le SSF est absorbée par le substrat dans une matrice solide et offre plus d'avantages pour la croissance des microorganismes pour le transfert d'oxygène. Plusieurs déchets agricoles, tels que la paille de riz, la bagasse de canne à sucre, la paille de blé, les coques de riz et les épis de maïs, sont utilisés comme substrat pour le SSF (Durand A. 2003).

2.2. Avantages

- Cette technique est caractérisé par la simplicité et ne nécessitant pas d'équipement sophistiqué pour les contrôles permanents des paramètres environnementaux. avec un cout des équipements et des opérations faible.
- la plupart des procédés de fermentation solide mettent en œuvre des moisissures, ils ne nécessitent pas de stérilisation préalable du substrat. Ce qui réduit le cout énergétique nécessaire. (Assomi A et *al.*, 2009)
- SSF peut conduire à des rendements plus élevés avec une productivité importante et de qualité meilleure par rapport à la fermentation submergée (SMF) (Martins et *al.*, 2001).
- le processus d'aération et le traitement des effluents, la conception de bioréacteur sont assez simples.
- le peu d'eau disponible favorise la production de certains métabolites qui n'apparaissent pas ou peu en culture liquide.
- il n'y a pas de production de mousses lors des fermentations solides, contrairement aux FmS (Durand, 1998).

2.3. Inconvénients

- le contrôle en ligne des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration est difficile. (Bellon Maurel V et *al.*, 2003)
- la difficulté de séparation des microorganismes du substrat, l'accumulation des produits inhibiteurs lors de la fermentation et la difficulté d'extraction des enzymes lipophiles (Assamoiet *al.*, 2009).
- la croissance des microorganismes sur les milieux solides est faible.
- les micro-organismes ne se dissocient pas du substrat, donc l'estimation de la biomasse est difficile (Assomi et *al.*, 2009).

3. Fermentation liquide

3.1. Définition

La fermentation liquide est une culture de micro-organismes dans des milieux nutritifs liquides. Pour la production industrielle, cela implique de cultiver le micro-organisme sélectionné dans des récipients fermés, appelés bioréacteurs, qui contiennent des bouillons nutritifs. Les substrats sont utilisés rapidement par les microorganismes pour produire différentes molécules bioactives (Salihu*etal.*, 2012). Cette Technique est mieux adaptée pour

Chapitre 03

les microorganismes qui nécessitent une haute teneur en humidité tels que les bactéries (Subramaniyam et Vimala, 2012).

Les protéases de *Mucor*, et la majorité des espèces de *Bacillus* sont produites par les fermentations liquides (Sandhya*et al.*, 2005a). Plusieurs des composantes des milieux de fermentation sont des produits d'agriculture commun et peu coûteux.

La consommation des hydrates de carbone durant la fermentation est élevée, et il est courant d'en ajouter en quantités croissantes. Il n'y a pas de données sur une possible inhibition de la production de protéases en présence de grandes quantités d'hydrates de carbone mais il a été observé que l'utilisation des hydrates de carbone est meilleure lorsque ce principe d'alimentation est respecté. Les hydrates de carbone peuvent être utilisés sous forme de glucose, sucrose ou hydrolysats d'amidon.

Approximativement, les majorités des enzymes industrielles (90%) sont produites par la fermentation liquide, en utilisant des microorganismes génétiquement modifiés, spécifiquement optimisés (Hölker*et al.*, 2004). Cette méthode de culture permet un meilleur contrôle des facteurs environnementaux tels que la température et le pH. Cependant, les produits sont dilués et les extraits enzymatiques peuvent être moins stables (Sandhya et *al.*, 2005b).

En fait, l'objectif principal de la microbiologie industrielle n'est pas d'obtenir la plus grande concentration possible d'enzymes par unité de masse cellulaire ou la concentration la plus élevée d'enzymes dans le bouillon final, mais de minimiser les coûts totaux de production tout en maintenant une grande qualité au niveau du produit désiré (Aunstrup*et al.*, 1980).

3.2. Avantages

- Les substrats sont utilisés assez rapidement ; doivent donc être constamment remplacés/complétés en nutriment.
- la purification des produits de cette technique est plus facile.
- La SmF est principalement utilisée pour l'extraction de métabolites secondaires qui doivent être sous forme liquide. (Subramaniyam et Vimala, 2012).
- La conception du système des bioréacteurs SmF permet de fournir l'oxygène nécessaire aux micro-organismes aérobies et de surveiller et contrôler différents paramètres tels que le pH, la température, la viscosité, l'oxygène dissous, la formation de mousse, la formation de biomasse.

- la récupération facile des métabolites, des mycéliums ou des spores et fournies de bons rendements en enzymes (extraits enzymatiques plus stable). (Sun et Xu, 2009)
- La possibilité de contrôler les paramètres, la fermentation a lieu dans de grands fermenteurs dont les volumes varient de plusieurs milliers à plusieurs centaines de milliers de litres. Par exemple, 90 % des xylanases commerciales sont produites par fermentation submergée.

3.3. Inconvénients

- Risque des contaminations microbiennes
- une augmentation de la viscosité préjudiciable à la solubilisation de l'oxygène dans le milieu.
- Coûteux en raison du coût élevé des supports requis.
- Faible productivité volumétrique. Plus d'effluent est généré. La circulation de l'oxygène n'est pas si efficace (Sun et Xu, 2009).

3.4 Substrats utilisés dans la fermentation sur milieu liquide

Les techniques de fermentation doivent être optimisées pour chaque substrat. Cela est principalement dû au fait qu'un organisme réagit différemment à chaque substrat.

Les taux d'utilisation des différents nutriments diffèrent d'un substrat à l'autre, de même que la productivité. Certains des substrats couramment utilisés dans la fermentation en milieu liquide sont les suivants : les sucres solubles, les mélasses, les milieux liquides, les jus de fruits et de légumes et les eaux usées et les déchets (Subramaniam et Vimala, 2012).

3.5 Applications et comparaison

La fermentation liquide est une méthode bien établie pour la production de divers composés bioactifs tels que les antibiotiques, les pigments, les enzymes, les agents hypercholestérolémiques, les antioxydants, les antihypertenseurs, les agents antitumoraux, les Biosurfactants et les peptides bioactifs (Subramaniam et Vimala, 2012). Le tableau 6 résume les différences entre les cultures SSF et SmF.

Chapitre 03

Tableau 06 : Comparaison entre SSF et SmF (Raimbault, 1998; Assamoi et al. 2009).

| Facteurs | Fermentation solide (ssf) | Fermentation liquide |
|----------------------------|---|---|
| Substrat | Polymère insolubles (amidon, pectine, cellulose, lignine) | Substrats solubles (sucres) |
| Eau | Consommation limitée de l'eau; au faible | Des grands volumes d'eau sont consommés |
| Ph et température | Contrôle aléatoire et transfert difficile de la chaleur | Contrôle facile |
| Aération (O ₂) | Aération facile et diffusion rapide de l'oxygène | Faible solubilité de l'oxygène dans l'eau |
| Scale up | Nécessité de nouveaux équipements | Equipements industrielles disponibles |
| Fermentation | Fermentation en batch | Fermentation continue |
| Contamination | Risque de contamination fongique | Risque de contamination bactérienne |
| Demande d'énergie | Besoin énergétique faible | Consommation énergétique élevée |
| Biomasse | Inséparable de substrat | Facilement séparable |
| Produit | Concentre | Très dilue |
| Pollution | Pas d'effluents | Grands volumes d'effluents |

Synthèse de deux articles

Synthèse de deux articles

Une analyse de deux travaux a été réalisée dont le but est d'améliorer la production de protéases en utilisant différents substrats naturels comme source de Carbone dans les différents milieux de culture selon une planification statistique; Dans les deux exemples traités, différentes méthodes approuvées ont été utilisées avec une grande précision, et ont conduit à une augmentation du rendement de la production enzymatique.

1.Article 1 : Optimisation à l'aide d'un plan d'expériences de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels (Malika Benkahoul¹, Aicha Belmessikh¹, Hayet Boukhalfa¹, Aicha Mechakra-Maza¹)

1.1 But

Amélioration de la production de protéases par *d'Aspergillus oryzae*Ahlburg (Cohen) en cas de fermentation submergée (FML) sur milieux à base de déchets d'oranges.

1.2 Principe

La composition des déchets d'oranges indique leur richesse en sucres solubles, matière sèche et matière minérale, ce qui explique ce choix. Afin d'améliorer le rendement du produit (enzyme), Il était nécessaire de concevoir une optimisation selon le plan de Plackett et Burman(tableau7), pour enrichir le milieu de culture. Celle-ci s'est faite par la sélection des facteurs ayant un effet positif sur l'activité enzymatique et la biomasse.

Dans cette étude, les chercheurs ont eu recours à l'application de méthodes statistiques, grâce auxquelles l'optimisation des composants multimédias peut prendre en compte les interactions des variables dans la génération de réponses de processus.

1.3 Méthode et matériel

❖ La fermentation

D'abord, une préparation de spores est obtenue. Au départ la souche fongique *Aspergillus oryzae*Ahlburg (Cohen) 1042.72, conditionnée sous forme lyophilisée dans une ampoule en verre fournie par l'Institut Pasteur de Paris (France) a été réactivée sur gélose inclinée à l'extrait de malt à 30°C jusqu'à formation de mycélium. La sporulation est réalisée sur le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA). La préparation de la suspension sporale obtenue est utilisée comme inoculum, dans la fermentation sur déchets d'orange comme

Synthèse de deux articles

substrat de base ; les milieux de fermentation ont été préparés selon la matrice de Plackett et Burman.

Tableau 7: la matrice de Plackett et Burman

| | N° d'essai | | | Facteurs | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | X ₄ | X ₅ | X ₆ | X ₇ |
| 1 | + | + | + | - | + | - | - |
| 2 | - | + | + | + | - | + | - |
| 3 | - | - | + | + | + | - | + |
| 4 | + | - | - | + | + | + | - |
| 5 | - | + | - | - | + | + | + |
| 6 | + | - | + | - | - | + | + |
| 7 | + | + | - | + | - | - | + |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - |

Ensuite, le milieu de base est constitué de 20 g de déchets d'oranges secs qui sont dissous dans 500 ml d'eau distillée ; la suspension est centrifugée à 15000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est dilué à 50 % à l'aide du tampon phosphate 0,1 M à pH 5 ou 6.

Puis, le milieu est enrichi (selon le plan expérimental) et réparti dans des erlenmeyers de 250 ml à raison de 40 ml par erlenmeyer. Avant stérilisation à 115°C pendant 20 min le pH de chaque erlenmeyer est ajusté selon le plan statistique. Il est ensemencé avec 105 spores/ml, puis homogénéisé afin d'éviter l'agrégation et incubé à 30°C pendant 3 jours sous une agitation de 220 rpm.

Enfin, après fermentation le milieu exo-cellulaire est séparé de la biomasse par simple filtration et le milieu exo-cellulaire représente l'extrait enzymatique brut. La biomasse est pesée dans chaque Erlen et le milieu exo-cellulaire subit un dosage de l'activité protéolytique et les protéines. Les résultats obtenus sont ensuite analysés par le logiciel.

❖ L'optimisation

Afin de sélectionner les facteurs influençant la production de la métalloprotéase, l'effet de sept facteur sur la production de protéase ont été testés par le biais de Plackett-Burman (il s'agit de : lactosérum, déchets de dattes ou dattes déclassées, corn-steepliquor, sels minéraux

Synthèse de deux articles

et pH, et deux erreurs) à des niveaux bas et élevés, les activités sont mesurées et la signification de chaque variable à chaque niveau a été déterminée et analysée par un logiciel (Mini tab).

1.4 Résultats

D'après les dosages effectués dans chaque expérience, la meilleure croissance (21.78g/l) est obtenue dans l'essai n°6 contenant le corn-steepliquor, le lactosérum et les sels et à pH 5. Alors que la meilleure activité protéolytique (2016.80U) est observée dans l'essai n°7 contenant le corn-steepliquor, les dattes déclassées et les sels à pH. Par contre, l'activité la plus faible (17.30U) est obtenue dans le milieu de base l'essai n°8. Les résultats concernant la signification de chaque facteur sont résumés dans les deux tableaux ci-dessous.

Tableau 08 : Effets des variables sur la production de la biomasse

| Facteur | Estimation | Valeur de T | Signification |
|-----------------------------|------------|-------------|---------------|
| Corn-steepliquor | 7.632 | 1.319 | 70.00% |
| Pulpe des dattes déclassées | -0.732 | 0.131 | NS |
| Erreur | 7.861 | 1.409 | 80.00% |
| pH | -8.332 | 1.493 | 80.00% |
| Erreur | 0.637 | 0.144 | NS |
| Lactosérum | 2.112 | 0.378 | NS |
| Sels | 0.792 | 0.142 | NS |

Tableau 09: Effet des variables sur l'activité protéolytique

| Facteur | Estimation | Valeur de T | Signification |
|-----------------------------|------------|-------------|---------------|
| Corn-steepliquor | 865.525 | 1.621 | 80.00% |
| Pulpe des dattes déclassées | 151.575 | 0.283 | NS |
| Erreur | -752.125 | 1.408 | 80.00% |
| pH | 1024.675 | 1.919 | 90.00% |
| Erreur | -66.175 | 0.123 | NS |
| Lactosérum | 72.375 | 0.135 | NS |
| Sels | -42.275 | 0.0791 | NS |

Synthèse de deux articles

Les déchets d'orange utilisés comme milieu de base pour la production de protéases par *Aspergillus oryzae* Ahlburg présentent des résultats très encourageants. En effet, la production de la protéase neutre est principalement affectée par des facteurs tels que : lactosérum, déchets de dattes, corn-steepliquor, sels minéraux et pH.

1.5 Discussion

Dans cette étude, la présence du lactosérum dans le milieu de culture entraîne une augmentation de la production des protéases et de la croissance mais cette augmentation est non significative. En effet, le lactosérum seul est un milieu insuffisant pour la production des protéases (Mechakraet *al.*, 1999). Ceci est lié à l'absence des acides aminés nécessaires à la synthèse enzymatique (Lenoir *et al.*, 1973). Par contre, l'effet du corn-steepliquor est significatif aussi bien la production de la protéase et sur la croissance de la moisissure. En effet, la présence du corn-steepliquor entraîne une augmentation de de 865,5 U (80 %) et de 7,63 g/l (70 %) (tableau 8 et 9) respectivement (Sonawat *et al.*, 1981).

Par ailleurs parmi les 5 facteurs étudiés, le pH apparaît comme celui ayant l'effet positif le plus significatif sur la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* (90 %) (Tableau 9). Cette augmentation montre que le pH 6 du milieu figure parmi les conditions optimales de production de la protéase neutre (Fushimi *et al.*, 1999).

Sels minéraux et les dattes déclassées sont sans effet significatif sur la biomasse, et sur la production de la protéase neutre (tableau 8 et 9)

1.6 Conclusion

L'objectif de cette étude est la production de la protéase neutre à partir d'*Aspergillus oryzae*. Le processus de fermentation a été réalisé sous Smf dans le but d'optimiser la production à l'aide de divers déchets agricoles qui ont servi à l'enrichissement du milieu de base (déchets d'orange). Parmi les facteurs utilisés dans l'optimisation, seul le corn-steepliquor a montré une signification positive supérieure à 70 % ; le rôle capital du pH est retenu vis-à-vis de la production de la protéase neutre produite par *Aspergillus oryzae* qui a été aussi noté avec une signification positive égale à 90 %. La richesse des déchets d'orange a permis d'éviter l'utilisation d'autres substrats synthétiques plus coûteux et aussi de lutter contre la pollution par ces déchets agro-industriels.

Synthèse de deux articles

2 Article 2 : Statistical optimization of an acid protease production by a local *Aspergillus niger* MH109542 using a medium based on decommissioned dates. (Malika Benkahoula*, Amina Bramkib, Aicha Belmessikha, Aicha Mechakra-Mazaa)

2.1 But

Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* à partir une fermentation sur milieu liquide sur milieu à base de déchets de dattes.

2.2 Principe

La composition de déchets dattes permet leur utilisation pour la production de protéase acide par *Aspergillus niger*. Sept variables supposées affecter la production de protéase acide ont été évaluées par huit expériences selon le plan statistique de Plackett et Burmans. Ce modèle statistique est un modèle factoriel fractionnaire. Il a été utilisé pour évaluer l'effet de différents facteurs dans de nombreux processus de fermentation. Il est utilisé pour l'optimisation en sélectionnant les facteurs, 5 facteurs réels (lactosérum, corn-steepliquor, sels minéraux et extrait de levure et les pétales de la fleur de *Galactitestomentosa* et 2 erreurs).

Synthèse de deux articles

2.3 Matériel et méthode

❖ La fermentation

D'abord, *Aspergillus niger* a été isolé du sol thermique de la région de Teleghma (située dans le nord-est de l'Algérie). Après isolement et purification, la souche fongique a été testée pour sa capacité à produire des protéases exocellulaires sur gélose au lait et une suspension sporal a été préparée.

Ensuite, les dattes déclassées impropres à la consommation humaine sont d'abord séchées à l'ombre, puis broyées et tamisées. Le milieu de culture de base a été préparé à partir de 20 g de poudre de dattes déclassées dissoutes dans 500 ml d'eau distillée. La suspension a été centrifugée à 15 000 g pendant 20 minutes. Le surnageant a été dilué avec un tampon phosphate 0,1 à pH 5, afin d'obtenir deux concentrations différentes (2 % et 5 %), respectivement. Le milieu est enrichi selon le plan expérimental puis réparti dans des erlenmeyers de 250 ml à raison de 50 ml par erlenmeyer. Avant stérilisation à 115°C pendant 20 min, le pH de chaque erlenmeyer a été ajusté. Il a été inoculé avec 10^4 spores / ml, puis homogénéisé et incubé à 30°C pendant 3 jours sous l'agitation de 220 rpm par un agitateur orbital d'incubateur (Edison NJ. USA). La composition du milieu de production dans chaque Erlenmeyer varie en fonction du plan d'expérience de Plackett et Burman préalablement mentionné dans l'article n°1.

Finalement, après les trois jours d'incubation, la culture est filtrée et l'extrait brut (milieu exo-cellulaire) subit le dosage de l'activité protéasique, la biomasse est pesée dans chaque Erlen.

2.4 Résultats

Les résultats représentés dans les deux figures ci dessous montrent que l'activité protéasique maximale (650,20 U) est observée dans l'essai n°5, et la meilleure croissance dans l'essai n° 4 tandis que la croissance la plus faible est obtenue dans l'essai n°. 8 (milieu base).

La figure 13 et la figure 14 montrent les résultats concernant la biomasse et l'activité protéolytique

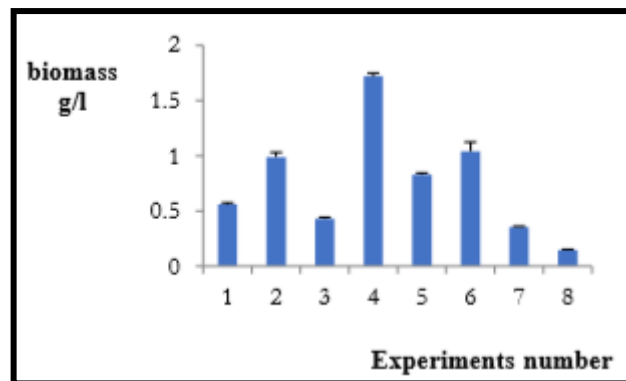


Figure 11 : biomasse d'*A. niger* MH109542 dans les différents essais

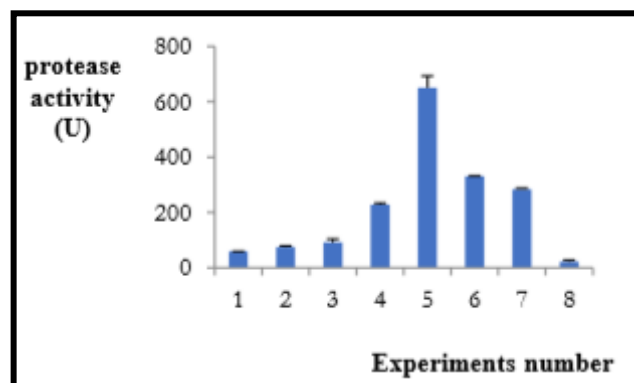


Figure 12 : Activités proteolytiques d'*A. niger* MH109542 dans les différents essais

Les variables les plus significatives qui affectent positivement la production de la protéase (650.20U) par *A. niger* sont les sels ($p = 0,190$), avec un niveau de confiance de 81% et l'extrait de levure ($p = 0,239$), avec un niveau de confiance de 76%.

Les probabilités mesurées en présence du corn-steep liquor et de pétales de fleurs ainsi que les dattes déclassées sont respectivement $p = 0,912$, $p = 0,510$ et $p = 0,523$. Ces facteurs n'ont donc pas d'effet significatif sur la production de protéase.

Les résultats statistiques dans les deux tableaux suivants montrent que la présence de du corn-steep liquor dans la composition du milieu de culture augmente la croissance d'*A. niger* ($p = 0,229$), c'est-à-dire une signification positive égale à 77,6%. D'autre part, l'extrait de levure est hautement significatif sur la biomasse ($p = 0,053$), soit 94,8%.

Synthèse de deux articles

Tableau 10 : Effet des variables sur l'activité protéolytique

| Facteur | Estimation | Test value | P value | Signification |
|--|------------|------------|---------|---------------|
| Corn-steepliquor | 7.8 | 0.13 | 0.912 | - |
| Galactitestomentosaflowerpetals | 49.50 | 0.79 | 0.510 | - |
| Error | -78.6 | -1.01 | 0.359 | - |
| Medium concentration in decommissioned dates | -47.9 | -0.77 | 0.523 | - |
| Error | 39.8 | 0.51 | 0.631 | - |
| Yeastextract | 103.7 | 1.66 | 0.239 | 76% |
| Salts | 121.68 | 1.95 | 0.190 | 81% |

La présence de dattes à une concentration de 5% dans le milieu de culture présente un effet positif mais non significatif sur la croissance mycélienne ($p = 0,330$) (Ait Kaki El-Hadef El-Okki et al., 2016), Malgré leur teneur élevée en protéines, la présence de pétales de fleurs de *Galactitestomentosa* présente un effet positif mais non significatif sur la biomasse ($p = 0,520$). Il en est de même pour les sels ($p = 0,396$) (tableau 10).

Les sels minéraux qui exercent un effet positif avec un seuil de 81%. Ces derniers favorisent la croissance microbienne et, par conséquent, augmentent les rendements de production de protéase acide (tableau 10 et 11).

Le du corn-steepliquor n'a pas d'effet significatif sur la production de protéase acide, alors que l'extrait de levure affecte significativement la production d'enzymes par *Aspergillus niger*. L'amélioration de la production de protéase acide est liée à la richesse de l'extrait de levure en protéines et en acides aminés (Scriban, 1993) et d'azote. Une forte activité protéasique est observée lorsque le milieu est supplémenté en extrait de levure (Hernandez et al., 2006).

Synthèse de deux articles

Tableau 11 :Effet des variables sur la production de la biomasse

| | Estimation | Test value | P value | Signification |
|--|------------|------------|---------|---------------|
| Corn-steepliquor | 0.157 | 1.71 | 0.229 | 77.6% |
| Galactitestomentosaflowerpetals | -0.0713 | -0.77 | 0.520 | - |
| Error | -0.006 | -0.03 | 0.976 | - |
| Medium concentration in decommissioned dates | 0.118 | 1.28 | 0.330 | - |
| Error | 0.130 | 0.65 | 0.546 | - |
| Yeastextract | 0.385 | 4.18 | 0.053 | 94.8% |
| Salts | -0.0987 | -1.07 | 0.396 | - |

L'analyse statistique des résultats de croissance d'*Aspergillus niger* MH109542 montre un effet significatif exercé à la fois par le corn-steep-liquor et l'extrait de levure, avec une signification 90%.

Les résultats des fermentations obtenus montrent que les dattes déclassées utilisées dans la composition du milieu de base constituent une bonne source de carbone et de minéraux pour la croissance d'*Aspergillus niger*

2.5 Conclusion

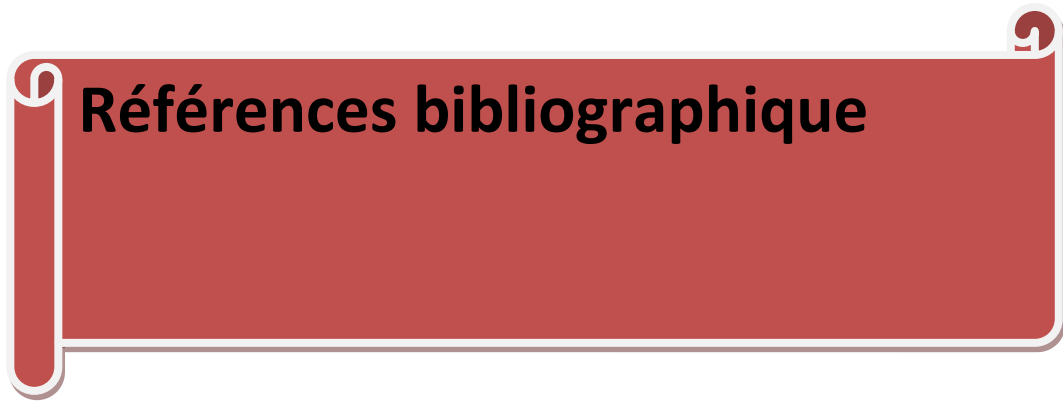
La présente étude a examiné l'optimisation de la production d'une protéase acide par une moisissure filamenteuse isolée localement dans un environnement extrême. Il s'agit d'*Aspergillus niger* utilisant comme milieu de base des dattes déclassées. Cette étude nous permet de conclure que le plan de Plackett et Burman est idéal pour le criblage des facteurs et a permis de sélectionner trois facteurs : le corn-steepliquor qui montre un effet positif sur la biomasse ($p = 0,229$), l'extrait de levure qui représente une source d'azote pour la croissance de la moisissure ($p = 0,053$) d'une part, et pour la production de la protéase ($p = 0,239$) d'autre part et les sels ($p = 0,190$) qui sont essentiels pour la stimulation de la production de la protéase.

Conclusion générale

Conclusion générale

Notre travail a pour objectif de produire des protéases par *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae* sur des milieux liquides et bon marché (SmF). Une valorisation des déchets agro-alimentaires a été possible par le biais de deux fermentations : la première réalisée sur milieu à base de déchets d'orange et la seconde sur déchets de dattes (dattes déclassées) ; l'enrichissement des deux milieux a été effectué grâce à l'utilisation d'une méthode statistique (plan de Plackett et Burman) qui permet de sélectionner les facteurs ayant des effets significativement positifs aussi bien sur la production d'enzyme que sur la biomasse.

Les résultats obtenus dans les deux articles analysés et exploités dans ce mémoire montrent que les déchets d'oranges et des dattes utilisés comme milieu de base constituent un substrat convenable pour la production de protéase à cause de leur richesse en sucres simples et en minéraux. Ils constituent donc une bonne source de Carbone ; un enrichissement selon les matrices statistiques a permis de sélectionner le corn steep liquor et l'extrait de levure pour l'apport de la source d'azote et des facteurs de croissance. Les deux études ont montré également l'efficacité des matrices de Plackett et Burman dans la sélection des variables qui interviennent lors de la fermentation pour augmenter le rendement et économiser le temps. En effet, Une grande différence a été notée entre l'activité protéolytique dans le milieu de base par rapport au milieu enrichi (optimisé).

A red banner with a white border and scroll-like ends. The text "Références bibliographique" is written in black, bold font.

Références bibliographique

Références bibliographique

- Al-Manhel, A.J.A. 2018. Application of microbial enzymes in dairy products: A review. *Basrah Journal of Agriculture Sciences*, 31(1), 20-30.
- Anbu P., Annadurai G., Lee J., Hur B. (2008). Optimization of alkaline protéase production from *Shewanellaoneidensis* MR-1 by response surface methodology. *J Chem Tech Biotechnol.* 84:54-62.
- Assamoi A.A., Destain J., Thonart P. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures: le cas de *Penicillium canes* cens. *Biotechnol Argon.02*: 281-294.
- Aunstrup, K., O. Anderseq E.A. Falchet T.K. Nielsen (1979). Economics of fermentation
- Aviron-Violet, P., J.L. Baret, C. Bertrand, B. Blazy, F. Bouvier, M. Comtat, P.R. Coulet P. Dupuy, J.F. Hervagault, A. Joyeau, J. Laurent, P. Monsaq D. Thomas, P. Sicard et G.M.A. Van Beynum (1982). Les enzymes. *Prùctionetutilistioninùstrielles.*
- Ayesha K., Ikram U.H., Waseem A.B., Sikander A. (2003). Isolation and screening of *Aspergillusniger* isolates for xylanase biosynthesis. *Biotechnology.02*:185-190.
- Battaglini R.A., Huergo M., Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B., 1991. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillusoryzae* in solid state fermentation. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 35; 292–296 micro
- Bellon-Maurel V., Orliac O., Christen P. (2003). Sensors and measurements in solid-state fermentation: a review. *Process Biochem.* 38: 881-896.
- Bellon-Maurel V., Orliac O., Christen P. (2003). Sensors and measurements in solid-state fermentation: a review. *Process Biochem.* 38: 881-896.
- Benazir J. F., Suganthi R., Anjana H., Ramesh K. V., Aswathi M.P., Niraimathi G., Mala M.K., Sukanya S., Santhi R. (2011). Bio utilization of agroindustrial waste in solid state fermentation by *Aspergillusniger* for the production of protease. *Asiatic Journal of BiotechnologyResources .04*: 422-435.
- Bensmail S. (2012). Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Thèse de magistère. Université M'hamed Bougara de Boumerdès. 41-46 p.
- Bo Zhang, Zheng-Bing Guan, Yu Cao, Guang-Fa Xie et Jian Lu, « *Secretome of Aspergillus oryzae in Shaoxing ricewinekoji* », *International Journal of Food Microbiology*, vol. 155, n° 3, 16 avril 2012, p. 113-119
- Boulaftali Y. (2012). La protéase nexine-1 : une serpine clé dans l'hémostase et la biologie vasculaire. *Hématologie .6* :318-324.
- Castro. R.J.S., Ohara A., Nishide T.G., Bagagli M.P., Gonçalves Dias F.F., Sat H.H. (2015). A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillusniger* under solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 04: 678-684.

Références bibliographique

Cerning J., GRIPON J.P. et DESMAZEAND M. (1984). Utilisation des enzymes dans l'industrie laitière. *la technique laitière*, 992 :9-24.

Chandel A.K., Rudravaram. R., Rao L.V., Ravindra .P.,Narasu M.L. (2007). Industrial enzymes in bioindustrial sector development,An Indian perspective. *J CommerBiotechnol* . 4:283-291.

Chi-Ching.T., James Y.M.T., Susanna K.P.L., Patrick C.Y.W.(2018).Taxonomy and evolution of Aspergillus, Penicillium and Talaromyces in the omics era – Past, present and future.*16:197-210.*

Cristobal Noe Aguilar, Gerardo Gutierrez-, PLilia A. rado-Barra, Raul Rodriguez-, Jose L. Martinez-H et Juan C. Contreras-, « *Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes* », *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, vol. 4, n° 4, 1^{er} avril 2008, p. 354-366

Durand A. (1998). La fermentation en milieu solide. *Biofutur*.1998 : 41-43.

Durand A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* .13: 113-125.

Durand G. et P. Monsan (eds), Bordas, Paris, France, 349 p.

Durand G.et Monson P. (1982).Production de la protéase neutre par Aspergillusoryzae sur déchet d'oranges .optimisation du milieu de culture, purification partielle et étude des propriétés physico-chimique de l'enzyme. thèse de magister :biochimies et microbiologie appliquées. Constantine :UniversitéMentouri Constantine,80p

Fushimi N., Ewe Ee C., Nakajima T., Ichishima E., (1999) Aspzincin, a family of Metalloendopeptidases with a New Zinc-binding Motif. *Journal of biological chemistry*, 274(34), p. 24195-24201.<https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.24195>

García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L.A., 2009. Advantages of a proteolytic extract by Aspergillusoryzae from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.*, 112; 604–608.

Ghoson M. Daba., Faten A., Mostafa et Wail A.(2021).The ancient koji mold (Aspergillusoryzae) as a modern biotechnological tool . *bioresources and bioprocessing*., 52 ;20-40

HalewynM-A.,Chevalier P.(2021). Aspergillus niger. [En ligne]. <https://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiches/aspergillus-niger>. (Consulté le : 26/06/2021).

HalewynM-A.,Chevalier P.(2021). Aspergillus niger. [En ligne]. <https://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiches/aspergillus-niger>. (Consulté le : 26/06/2021).

Hata Y., Ishida H., 2000. Glucoamylase-encoding genes of Aspergillusoryzae – Monograph –, *Seibutsu-kogaku*, 78; 120-127

Références bibliographique

- Herman J. P., Johannes H .W., Hein .S .(2007).Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillusniger* CBS 513.88. 25:221-23.
- Herman J. P., Johannes H .W., Hein .S .(2007).Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillusniger* CBS 513.88. 25:221-231.
- Hernández M.S., Marilú R., Nelson P.G. et Renato P.R. Amylase production by *Asprgillusniger*in submerged cultivation on two wastes from food industries. *J. FoodEng.*, 2006, 73: 93-100.
- Hernandez, M. S., Rodriguez, M. R., Guerra, N. P., &Rosés, R. P. 2006. Amylase production by *Aspergillusniger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering* 73: 93–100.
- Hölker U., Höfer M. and Lenz J. (2004). Biotechnological advantages of laboratoryscale solid-state fermentation with fungi. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 64: 175-186.
- Jisha V.N., et al.(2013). Versatility of microbial proteases. *J AdvEnzyme* . 3: 39-51.
- Kavanagh K., 2005. Fungal fermentation systems and products, in Kavanagh K., *Fungi : Biology and applications*; John Wiley & Sons Ltd, England. pp. 89–111 a-amylase
- Ken Oda, Dararat Kakizono, Osamu Yamada, HaruyukiIefuji, Osamu Akita et Kazuhiro Iwashita, « *Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillusoryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions* », *Applied and environmental microbiology*, vol. 72, n° 5, mai 2006, p. 3448-3457
- Kobayashi T., Abe K., Asai K., Gomi K., Juvvadi P.R., Kitamoto K., Takeuchi M., Machida M., 2007. Genomics of *Aspergillusoryzae*.*Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 71(3); 646–67
- Koji.Y.,Wang.L., Makoto. M., Kazuko.N.(2001).Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiology Letters* . 200:241-246.
- Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R. et Bhalla T.C. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.*, 2008, 3(12): 661–672.
- Lenoir J., Auberger B, (1977) Les caractères du système protéolytique de *Penicelliumcaseicolum*. II- Caractérisation d'une protéase neutre. *Le Lait*, 57(568), p. 471-491. <https://doi.org/10.1051/lait:197756819>.
- Loffler. A (1986).proteolyticenzymes : sources and applications .*food technology*.6070.
- Machida M., Yamada O., Gomi K., 2008. Genomics of *Aspergillusoryzae*: Learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Res.*, 15; 173–183.
- Mala.B. (1998).Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases.*Microbiol and Molecular Biology Reviews*.3:597-63.

Références bibliographique

- Martins, S., Mussatto, S.L., Martinez-Avila, G., Montanez-Saenz, J., Aguilar, C.N. et Teixeira, J.A. (2001). Bioactive phenolic compounds : production and extraction by solide-state fermentation biotech. Adv. 29 :365-373.
- Martins, S., Mussatto, S.L., Martinez-Avila, G., Montanez-Saenz, J., Aguilar, C.N. et Teixeira, J.A. (2001). Bioactive phenolic compounds : production and extraction by solide-state fermentation biotech. Adv. 29 :365-373.
- Mary A. S., Lima M Conceição F. de OliveiraAntônia T. Á. PimentaPaula K. S. Uchôa.(2019). Aspergillusniger: A Hundred Years of Contribution to the Natural Products Chemistry. 10: 2029-2059.
- Mechakra A, Auberger B, Remeuf F, Lenoir J., (1999) Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. Sciences des Aliments, 19(6), p. 663-675.
- Meyer A., Deiana J., Bernard A.(2004). Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés. 2ème Ed Doin.430 p.
- Mienda,B.S.,Galadima,I.,Yahya,A.,Shamsir.S.2014.Anoverviewofmicrobialproteases for industrial applications. Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.
- Murphy R.A., Horgan K.A., 2005. Antibiotics, enzymes and chemical commodities from fungi, in Kavanagh K., Fungi: Biology and applications, John Wiley & Sons Ltd, England. pp. 125; 134.
- Nakadai T., Nasuno S., Iguchi N., 1973. Purification and properties of neutral proteinase II from *Aspergillusoryzae*.Agric. Biol. Chem., 37; 2703-2708
- Neelakantan S., Mohanty A.K., Kaushik J.K., 1999. Production and use of microbial enzymes for dairy and industrial processing.Curr.Sci., 77; 143–148.
- Oda K., Kakizono D., Yamada O., Iefuji H., Akita O., Iwashita K., 2006. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillusoryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. Appl. Environ. Microbiol., 72(5); 3448–3457
- Pasqualotto A. C. (2010). Aspergillosis: from diagnosis to prevention. Edition Springer Science & Business Media, New York .1027p.
- Pelmont J., (1995). Enzymes : catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. pp. 7; 621; 652–654.
- process. Dans : MicrobialTechnolgt, Fermentation Technolgt, Vol. 2. Pepler H.J.
- Raimbault M., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, Elec. J. Biotech., 1(3); 1–15.
- Raimbault M., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, Elec. J. Biotech., 1(3); 1–15.

Références bibliographique

- Rajnikant D., Kailash C. P. (2016). Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. 07:107.
- Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biology Rev.* 3:597-635.
- Salihu, A., Alam, Md. Z., Abdulkarim, M. I. et Salleh, H. (2012). Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Res. Cons. Recy.* 58: 3644.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. (2004). Introduction to food- and airborne fungi Septième édition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. 389 p.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A., 2005b. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 40; 2689–2694.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A., 2005b. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 40; 2689–2694.
- Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C., Van Dijck P.W. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 426-435.
- Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C., Van Dijck P.W. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 426-435.
- Scriban, R. 1993. *Biotechnologie*, 4^eme édition. (pp. 90–717). Techniques et documentations. Lavoisier.
- Scriban, R. (1993). *Biotechnologie*. 4^eme édition. Techniques et Documentation. Paris. 133p.
- Simon, P. et R Meunier (1970). *Microbiologie industrielle et génie biochimique*. Masson et Cie, Paris, France, 567p.
- Simon, P. et R Meunier (1970). *Microbiologie industrielle et génie biochimique*. Masson et Cie, Paris, France, 567 page.
- Singh R., Kumar M., Mital A., Mehta P.K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century 3 *Biotech.* 2:174.
- Singh R., Suprabha G.N., Shashidhar S. (2009). Optimization of process parameters for the production of α -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation, *Afr. J. Microbiol. Res.* 3:498–503.
- Sonawat H. M., Agrawal A., Dutta S.M., (1981) Production of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. *Folia Microbiologica*, 26(5), p. 370-376.
<https://doi.org/10.1007/bf02927329>

Références bibliographique

Subramaniam, R. et Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int. J. Sci. Nature*. 3(3): 480486.

Sumantha A., Larroche C., Pandey A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food- grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*. 2: 211-220.

Sumantha A., Larroche C., Pandey A., 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol. Biotechnol.*, 244; 211–220.

Sun, S.Y. et Xu Y. (2009). Membrane-bound ‘synthetic lipase’ specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative.

Thammarongtham C., Turner G., Moir A.J., Tanticharoen M., Cheevadhanarak S., 2001. A New Class of Glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 3(4); 611-617.

Tricarico J.M., Johnston J.D., Dawson K.D., 2008. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 145; 136–150.

Ward O.P., Qin W.M., Dhanjoon J., Ye J., Singh A., 2006. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Adv. Appl. Microbiol.*, 58; 1-55.

Ward, W.M. Qin, J. Dhanjoon, J. Ye et A. Singh, « *Physiology and Biotechnology of Aspergillus* », dans Joan W. Bennett Allen I. Laskin (ed.), *Advances in Applied Microbiology*, vol. Volume 58, Academic Press, 2005.



Résumé

Résumé

La production des enzymes protéolytiques par les microorganismes est de jour en jour sollicitée par les industries. D'où le but des travaux de recherche qui ne cesse de chercher des solutions et de nouveaux procédés afin d'améliorer la capacité des microorganismes à produire des protéases stables et efficaces avec un moindre coût. L'optimisation des conditions de culture a longtemps été testée. Parmi ces travaux, deux dont les résultats montrent la capacité d'*Aspergillus niger* à produire une protéase acide avec l'utilisation des dattes déclassées comme milieu de base et l'extrait de levure a montré un effet positif sur la production. Aussi, la production d'une protéase neutre à partir d'*Aspergillus oryzae* sur des déchets d'oranges (milieu de base) a donné un bon rendement aussi bien en biomasse qu'en protéase, le corn-steep liquor a montré une signification positive sur cette production.

Mots clés: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, Protéases, Fermentation.

Abstract

Proteases, also known as proteinases or proteolytic enzymes, belong to a group of hydrolases. The aim of our work is to study the production of proteases by *Aspergillus* sp. a pair of liquid fermentation.

The results of previous experiments show that *Aspergillus niger* produces acid protease using declassified dates as a base medium and yeast extract has a positive effect on production, while neutral protease production from *Aspergillus oryzae* using orange waste (base medium) and corn-steep liquor has a positive effect on production.

Key words: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, Proteases, Fermentation

الملخص

تتبع البروتياز ، التي تسمى أيضًا بروتينات أو إنزيمات محللة للبروتين ، إلى مجموعة من الإنزيمات المائية. ويشكل إنتاجها أحد أهداف الاستخدام الصناعي للكائنات الدقيقة ، والهدف من عملنا هو دراسة إنتاج البروتياز بواسطة التخمير *Aspergillus sp*. السائل بعد

حسب نتائج التجارب السابقة تبين أن *Aspergillus niger* ينتج البروتياز الحمضي باستخدام التمور المجففة كوسيلة أساسية وخلصت الخميرة لها تأثير إيجابي على الإنتاج من ناحية أخرى ، فإن إنتاج البروتياز المحايد من طرف *Aspergillus oryzae* باستخدام مخلفات البرنقال (الوسط الأساسي) حيث ان le corn-steep liquor أظهر تأثير إيجابي على الإنتاج

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, البروتياز , التخمير

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

Filière : Microbiologie

Spécialité : Mycologie Biotechnologie Fongique.....

Titre

La production de protéase à partir de la fermentation liquide par aspergillus sp

Résumé

La production des enzymes protéolytiques par les microorganismes est de jour en jour sollicitée par les industries. D'où le but des travaux de recherche qui ne cesse de chercher des solutions et de nouveaux procédés afin d'améliorer la capacité des microorganismes à produire des protéases stables et efficaces avec un moindre coût. L'optimisation des conditions de culture a longtemps été testée. Parmi ces travaux, deux dont les résultats montrent la capacité d'*Aspergillus niger* à produire une protéase acide avec l'utilisation des dattes déclassées comme milieu de base et l'extrait de levure a montré un effet positif sur la production. Aussi, la production d'une protéase neutre à partir d'*Aspergillus oryzae* sur des déchets d'oranges (milieu de base) a donné un bon rendement aussi bien en biomasse qu'en protéase, le corn-steep liquor a montré une signification positive sur cette production.

Mot clés : *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, Protéases, Fermentation

Membre du jury :

Président du jury : Mme **ABDELAZIZ Ouided**. (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Rapporteuse : Mme **BENKAHOUL Malika**. (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examinatrice : Mme **MAZIANI Meriem**. (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Présentée par : Aribi Ouissal / Hamada Raouane

Année universitaire : 2022 -2023