



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université des frères Mentouri Canstantine

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الميكروبيولوجيا

Département de Microbiologie

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

Domaine : Sciences de la Nature et de Vie

Filière : Science biologiques

Spécialité : Biotechnologie fongique / fermentation et production de substances fongiques

**Intitulé**

**Etude des paramètres physico-chimiques de la production de protéase par le  
champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae***

Présenté et soutenu par : LOUDJANI Houyem  
BELMERABET Kamilia

Le : 26/06/2016.

**Jury de soutenance :**

Présidente du jury : Mme. MIHOUBI I.

Pr.UFM.Constantine.

Encadreur : Mme. Benserradj O.

Dr Centre universitaire de Mila.

Examinatrice : Mlle. Bataiche I.

Dr. UFM.Constantine.

Année Universitaire  
2015-2016

## *Remerciements*

À « **Allah** », le tout puissant, qui nous a accordés le courage et la patience pour élaborer ce modeste travail.

Nous tenons tout particulièrement à remercier Mme **BENSERRADJ OUAFI** pour nous avoir proposé ce thème et d'avoir accepté de le diriger avec beaucoup d'attention et de soin.

Nos sincères remerciements vont également à Mme **MIHOUBI ILHEM** pour avoir accepté de présider ce jury. Nous lui sommes reconnaissantes pour ses enseignements, ses précieux conseils, ainsi que sa disponibilité à tout moment

Nos plus vifs remerciements s'adressent à Melle **BATAICHE INSAF** pour avoir accepté de juger ce travail.

En fin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidé et ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A mes très chers parents mon père Abdessamia et ma mère Leila*

*Quoi que je fasse je ne pourrais pas leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je  
suis arrivée là c'est bien grâce a eux*

*Que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.*

*A ma sœur Djoumana et son mari Soumel*

*A mon adorable nièce Mayar*

*A mon petit neveu Haydar*

*A toutes mes amies*

*A tous ceux que j'aime.*

***Houyem***

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A mes très chers parents mon père Mohyeddin et ma mère Fatima*

*Quoi que je fasse je ne pourrais pas leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je  
suis arrivée là c'est bien grâce a eux*

*Que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.*

*A mes grands parents Ali et Mbarka*

*A mon mari Mehdi celui qui ma aidé beaucoup*

*Ames beaux parents Ali et Rabiaa*

*A ma tante Samia, Khroufa et Mouni*

*A mes sœurs Chahinez, Radja, Ilhem, Batoule*

*A mes frères Billel, Badiss, Soulaymane*

*A toutes mes amies Nesrine Mhidabe, Fatima Rakik, Fatima Massali*

*A tous ceux que j'aime.*

***Kamilia***

# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Revue Bibliographique</b> .....	2
1. Les protéases.....	2
1.1. Généralités sur les enzymes.....	2
1.1.1. Définition.....	2
1.1.2. Marché des enzymes.....	2
1.2. Les enzymes protéolytiques.....	3
1.2.1. Définition.....	3
1.2.2. Sources des protéases.....	3
1.2.2.1. Protéases d'origine végétale.....	3
1.2.2.2. Protéases d'origine animale.....	4
1.2.2.3. Protéases d'origine microbienne.....	4
1.2.3. Classification des protéases.....	5
1.2.4. Les protéases et l'industrie.....	6
1.2.4.1. Industrie alimentaire.....	6
1.2.4.2. Industrie pharmaceutique et médicale.....	7
1.2.4.3. Détergents.....	8
1.2.4.4. Tanneries.....	8
1.2.4.5. Autres applications.....	8
2. Les moisissures.....	9
2.1. Généralités.....	9
2.1.1. Organisation des moisissures.....	9
2.1.2. Organes de reproduction.....	9
2.1.3. Conditions de croissance des moisissures.....	10
2.2. Le champignon entomopathogène <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	10
2.2.1. Taxonomie et Classification.....	11
2.2.2. Morphologie.....	12
2.2.3. Applications technologiques du champignon entomopathogène <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	13
2.2.3.1. Production des toxines.....	13
2.2.3.2. Production des enzymes.....	14

<b>Matériel et Méthodes</b> .....	15
1. La souche fongique .....	16
1.1. Repiquage de la souche.....	16
2. Mise en évidence de l'activité protéolytique .....	16
3. Production de la protéase .....	16
3.1. Milieux de fermentation.....	16
3.1.1. Son de blé.....	16
3.1.2. Peptone de caséine .....	16
3.2. Ensemencement des milieux de la fermentation.....	17
4. Etude de l'activité protéolytique produite.....	17
4.1. Préparation des extraits enzymatiques .....	17
4.2. Méthode de dosage de l'activité protéolytique .....	17
4.2.1. Principe .....	17
4.2.2. Réaction enzymatique.....	18
4.2.3. Protocole de dosage .....	18
4.2.4. Préparation de la courbe d'étalonnage de tyrosine .....	18
4.3. Etude des propriétés de l'enzyme .....	19
4.3.1. Effet du pH.....	19
4.3.2. Effet de la température.....	20
5. Modélisation de la production de la protéase .....	20
5.1. Sélection des variables par le plan d'expérience de Plackett-Burman .....	20
<b>Résultats</b> .....	22
1. Mise en évidence de l'activité protéolytique .....	23
2. Production de la protéase .....	24
2.1. Courbe d'étalonnage de la tyrosine.....	24
2.2. Cinétique de production.....	25
2.3. Effet du pH sur l'activité protéolytique .....	28
2.3.1. Le milieu peptone de caséine.....	28
2.3.2. Milieu son de blé.....	29
2.4. Effet de la température.....	30
2.4.1. Milieu peptone de caséine.....	30
2.4.2. Milieu son de blé.....	31

3. Modélisation de la production de la protéase .....	31
<b>Discussion</b> .....	33
<b>Conclusion Et Perspectives</b> .....	37
<b>References bibliographiques</b> .....	39
<b>Annexe</b> .....	44
<b>Abstract</b> .....	45
<b>ملخص</b> .....	46

## Liste Des Abréviations

**KDa** : Kilo dalton.

**Rmp** : Rotation par minute.

**SmF** : Liquid state fermentation.

**TCA** : Tri Chloroacetic Acid.

**UI**: unité international.



## Liste Des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Spécificité des protéases .....	3
<b>Tableau 2</b> : Classification des protéases .....	6
<b>Tableau 3</b> : Préparation de la courbe d'étalonnage de tyrosine. ....	19
<b>Tableau 4</b> : Lignes génératrices d'un plan de Plackett et Burman.....	20
<b>Tableau 5</b> : structure du plan PLACKETT et BURMAN pour 3 facteurs.....	21
<b>Tableau 6</b> : Les niveaux des facteurs analysés. ....	21
<b>Tableau 7</b> : Mise en évidence de l'activité protéolytique sur milieu lait gélosé.....	24
<b>Tableau 8</b> : Réponses (mg de tyrosine libéré/min/ml de solution enzymatique) obtenues pour les quatre essais. ....	32

# Liste Des Figures

<b>Figure 1</b> : Distribution des ventes des enzymes.....	2
<b>Figure 2</b> : (A) Observation en microscope électronique des conidiophores et des hyphes de <i>Metarhizium anisopliae</i> (B) Culture de <i>M. anisopliae</i> sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25 °C,(C)Aspect microscopique des Conidies de <i>M. flavoviride</i> (X100) (D) Culture de <i>M. flavoviride</i> sur Sauboraud dextrose agar (SDA) .....	12
<b>Figure 3</b> : Aspect morphologique de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	13
<b>Figure 4</b> : Aspect microscopique de <i>Metarhizium anisopliae</i> , G x (a.1600; b.2800; c.7000) .....	13
<b>Figure 5</b> : La croissance de la souche <i>Metarhizium anisopliae</i> sur lait gélosé. ....	23
<b>Figure 6</b> : Courbe d'étalonnage de la tyrosine. ....	24
<b>Figure 7</b> : Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche <i>Metarhizium anisopliae</i> dans le milieu de fermentation liquide (peptone de caséine). ....	25
<b>Figure 8</b> : Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche <i>Metarhizium anisopliae</i> dans le milieu de fermentation liquide (son de blé). ....	26
<b>Figure 9</b> : Effet de la concentration du son de blé sur la production de la protéase. ....	27
<b>Figure 10</b> : Effet du pH sur l'activité protéolytique (milieu peptone de caséine).....	28
<b>Figure 11</b> : Effet du pH sur l'activité protéolytique.....	29
<b>Figure 12</b> : Effet de la température sur l'activité protéolytique.....	30
<b>Figure 13</b> : Effet de la température sur l'activité protéolytique.....	31

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines. Par la diversité de leurs applications, elles représentent l'un des plus grands groupes d'enzymes industrielles. De plus, les protéases sont ubiquistes ; elles se retrouvent aussi bien chez les plantes que chez les animaux et les microorganismes. Cependant, grâce à leur diversité biochimique extensive, les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases. En effet, quarante pourcent des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes parmi lesquels, des souches fongiques (García-Gómez et al., 2009). Celles ci possèdent plusieurs avantages comme leur qualité *GRAS* (*Generally Regarded As Safe*) et leur aptitude à produire une large gamme d'enzymes extracellulaires.

La production d'enzymes industrielles exige la préparation de milieux à moindre coût sachant que l'estimation du coût du milieu de croissance représente 30-40% du coût de production des enzymes industrielles (Srinubabu et al., 2007). Ceci peut être atteint par l'utilisation des résidus agroindustriels disponibles et bon marché et par l'optimisation des conditions nutritionnelles et physicochimiques du milieu de culture. C'est ainsi que plusieurs déchets et sous-produits agroindustriels sont appliqués pour la production d'enzymes.

Dans cette optique, notre objectif porte essentiellement sur l'étude des trois points principaux:

- ✓ La 1<sup>ère</sup> étape est la production de protéase par fermentation sur milieu liquide (SmF), en utilisant deux milieux différents, l'un synthétique et l'autre naturel;
- ✓ La 2<sup>ème</sup> étape consiste à l'étude de la cinétique de production d'enzyme et l'influence du pH et de la température sur l'activité protéolytique;
- ✓ La 3<sup>ème</sup> étape porte sur l'application des plans d'expériences à l'optimisation afin d'évaluer l'influence des facteurs étudiés et de modéliser la production.

# **Revue Bibliographique**

## 1. Les protéases

### 1.1. Généralités sur les enzymes

#### 1.1.1. Définition

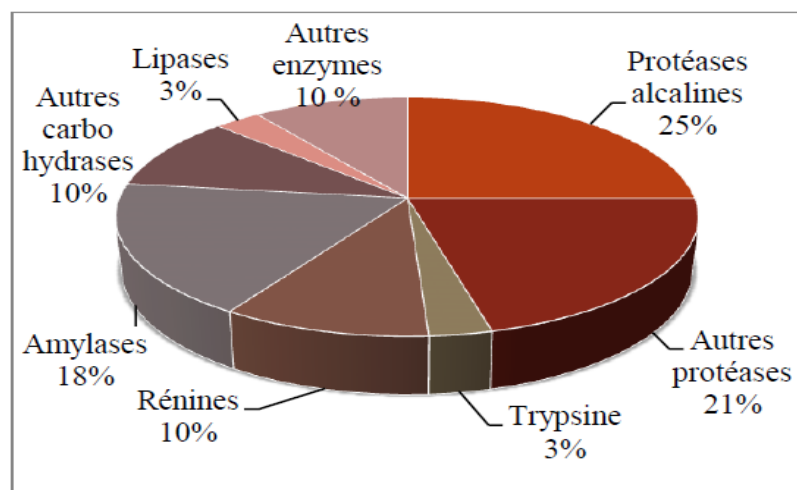
Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (Bergmeyer et al., 1979; Pelmont, 1995; Drouin, 2005).

En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (Patel et al., 2005) ; la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (Leisola et al., 2001).

Les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés (Sandhya et al., 2005a).

#### 1.1.2. Marché des enzymes

Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité conserve une forte croissance. Estimé à plus de 1,5 milliards US\$ en l'an 2000. Il est prévu qu'en 2011, il atteindra 6 milliards de dollars (Kumar et al., 2008b). Parmi les enzymes industrielles, les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes, soit environ 60% (García-Gómez et al., 2009; Rai et Mukherjee, 2010) (Fig. 1). Les ventes industrielles des protéases sont estimées à plus de 350 millions US\$ annuellement (Kumar et al., 2008b).



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

## 1.2. Les enzymes protéolytiques

### 1.2.1. Définition

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x). En effet, ce 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 (Tableau 1) et sont produites extracellulairement comme intracellulairement (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).

**Tableau 1** : Spécificité des protéases (Rao et al., 1998).

Enzyme	Liaison peptidique à clivée
Trypsine .....	-Lys (ou Arg)↓-----
Chymotrypsine, subtilisine.....	-Trp (ou Tyr, Phe, Leu)↓-----
<i>Staphylococcus</i> V8 protéase .....	-Asp (ou Glu)↓-----
Papaïne .....	-Phe (ou Val, Leu)-Xaa↓-----
Thermolysine.....	---↓Leu (ou Phe) -----
Pepsine.....	-Phe (ou Tyr, Leu)↓ Trp (ou Phe, Tyr)

La flèche indique le site d'action des protéases, Xaa, n'importe quel acide aminé

### 1.2.2. Sources des protéases

Les protéases sont extraites aussi bien des plantes que des animaux ou des microorganismes (Rao et al., 1998).

#### 1.2.2.1. Protéases d'origine végétale

Les protéases sont présentes chez toutes les espèces vivantes. Les végétaux ont, avant les microorganismes, été l'objet de recherche en vue d'isoler des enzymes protéolytiques, c'est le cas de la bromélaïne extraite de tige de l'ananas (*Ananas comosus Merr*), la ficine issue du figuier (*Ficus glabrata*) (Alais, 1975 ; Scriban, 1993 ; Moodie, 2001) ces deux enzymes sont proches de la papaïne ; extraite du latex d'une plante équatoriale et tropicale (*Carica papaya*), qui, à elle seule, peut rompre des liaisons peptidiques que la trypsine et la pepsine rompent

séparément. Il en est probablement de même pour les préparations enzymatiques provenant de chardons, d'artichauts, de gaillets, de courges, etc (Alais, 1975).

La kératinase, une autre protéase qui dégrade les cheveux et les laines est produite par quelques groupes de plantes (Rao et *al.*, 1998).

#### **1.2.2.2. Protéases d'origine animale**

Seules les protéases sécrétées par l'estomac des ruminants présentent un intérêt industriel ; la présure préparée à partir du quatrième estomac des veaux est la plus répandue et la plus ancienne ainsi que les pepsines bovines et porcines. L'activité non spécifique des enzymes pancréatiques, trypsine et chymotrypsine, les rendent moins importantes que les enzymes gastriques (McKenzie, 1971; Alais, 1975; Scriban, 1999). Des études récentes permettent aussi l'identification des protéases chez les helminthes : *Schistosoma* sp; *Fasciola* sp; *Taenia* sp et *Haemonchus* sp, où elles apparaissent comme cibles potentielles majeure enthérapie et vaccination antiparasitaire (Trap et Boireau, 2000).

#### **1.2.2.3. Protéases d'origine microbienne**

Les protéases peuvent êtres produites par les moisissures, les levures et les bactéries.

##### **❖ Protéases des moisissures**

Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondial des enzymes industrielles. Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent êtres produites par plusieurs genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc. Ce groupe d'enzymes dispose de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement elles sont de plus en plus utilisées en boulangerie, dans l'industrie alimentaire humaine et animale, dans les détergents pour lessives, dans l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique (Frazier, 1967; Ul-haq et *al.*, 2003).

##### **❖ Protéases des levures**

Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, produit trois types de protéases; une aspartyl protéase, une sérine protéase et une Métallo protéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (Kresze, 1991; Boiron, 1996).

### ❖ Protéases des bactéries

Il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et résiste bien à l'action des détergents. Par ailleurs, elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa purification (Calk et al., 2000; Frazier, 1967). Les bactéries psychrotrophes du lait et en particulier, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* produisent des métallo protéases thermorésistantes utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage des fromages. Ces bactéries sont détruites par la pasteurisation mais les protéases extracellulaires qu'elles produisent ne sont que partiellement inactivées (Cousin et al., 1982). Les protéases extracellulaires de *Streptococcus lactis* jouent un rôle très important dans l'affinage des fromages (Desmazeaud, 1978).

### 1.2.3. Classification des protéases

Les protéases sont classées selon la gamme du pH dans laquelle leur activité est optimale, en protéases acides, neutres et alcalines (Kumar et al., 2008b). Elles se différencient également selon leur site d'action en deux groupes; les exopeptidases et les endopeptidases (Tableau 2). Les exopeptidases agissent seulement sur les liens peptidiques près des extrémités de la chaîne peptidique. En se basant sur la nature de l'extrémité N ou C terminale, elles sont classées en amino et carboxypeptidases, respectivement. Par contre, les endopeptidases sont caractérisées par leur action spécifique à l'intérieur de la chaîne peptidique (Rao et al., 1998).

La plupart des enzymes utilisées industriellement sont des endopeptidases. Celles-ci sont divisées en quatre familles en se basant sur le mécanisme catalytique; les protéases sérines (EC 3.4.21.x), les protéases cystéines (EC 3.4.22.x), les protéases aspartiques (EC 3.4.23.x), et les métalloprotéases (EC 3.4.24.x). Ces dernières forment le groupe de protéases le plus varié (Kumar et al., 2008b).

Les métalloprotéases sont caractérisées par l'exigence en un cation divalent pour leur activité; la stabilité thermique de ces protéases augmente si les ions Ca<sup>++</sup> sont ajoutés au milieu. Les métalloprotéases neutres montrent une haute spécificité vers les acides aminés hydrophobes. La plupart des métalloprotéases contient le motif His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH) (Rao et al., 1998). Ces protéases sont inactivées en présence d'agent chélateurs forts [ex : EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetate*)] ou phenanthroline (Beynon et Oliver, 2004). La thermolysine est une métalloprotéase neutre thermostable produite par *Bacillus stearothermophilus*. La collagénase



est une autre métalloprotéases très spécifique, elle réagit seulement sur le collagène et la gélatine, elle est produite par *Achromobacter iophagus* et autres microorganismes y compris les moisissures (Rao et *al.*, 1998).

**Tableau 2** : Classification des protéases (Rao et *al.*, 1998).

Type de protéase	Classes et sous-classes
Exopeptidases	Aminopeptidases <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptidyle peptidases</li> <li>• Dipeptidyle peptidases</li> <li>• Tripeptidyle peptidases</li> </ul> Carboxypeptidases <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sérine carboxypeptidases</li> <li>• Metallocoxypeptidases</li> <li>• Cystéine carboxypeptidases</li> </ul>
Endopeptidases	Protéases sérines Protéases cystéines ou protéases thiols Protéases aspartiques ou protéases acides Métalloprotéases

#### 1.2.4. Les protéases et l'industrie

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Les principaux secteurs industriels employant des protéases sont :

##### 1.2.4.1. Industrie alimentaire

Mis à part le cas de la protéase alcaline dans les détergents, les industries alimentaires constituent aujourd'hui encore le principal domaine d'application des technologies enzymatiques, qui à partir d'un nombre limité de types de réactions catalysées donnent lieu à une grande diversité d'application (Aviron-Violet et *al.*, 1982). Les principales industries alimentaires utilisant les protéases sont :

##### ❖ Fromageries

L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages (Rao et *al.*, 1998). La présure a été l'enzyme utilisée à cette fin depuis longtemps. Cependant, les fluctuations du prix de caillotte et leur pénurie épisodique fait qu'elle est de

moins en moins utilisée et tend à être remplacée par des protéases microbiennes (Aviron-Violet et al., 1982). Les protéases utilisées à cette fin sont produites par des microorganismes GRAS tels que *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* et *Endothia parasitica*. (Aguilar et al., 2008).

#### ❖ **Boulangeries**

Les endo et les exoprotéinases sont utilisées pour modifier le gluten de blé par une protéolyse limitée selon les caractéristiques désirées de la pâte ; un tel traitement enzymatique permet de réduire le temps de pétrissage (Aviron-Violet et al., 1982; Aguilar et al., 2008). Des protéases bactériennes sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (Rao et al., 1998).

#### ❖ **Préparation de produits à base de soja**

Les protéases neutres ou alcalines d'origine fongiques sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce de soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Le traitement de ces protéines par la protéase alcaline "*alcalase*" à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats solubles utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans la formulation des aliments diététiques (Rao et al., 1998). Kojizyme™ est un complexe d'exopeptidases et d'endopeptidases dérivées d'*A. oryzae* utilisé dans la fermentation du sauce du soja (Sumantha et al., 2006).

#### ❖ **Synthèse de l'aspartam**

Bien que les protéases soient des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse. Sous certaines conditions cinétiquement contrôlées, une préparation de thermolysine provenant de *Bacillus thermoprotolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartam (un édulcorant à basse calorie) à partir de l'acide *L*-aspartique et de la *L*-phénylalanine méthyle ester. Il est produit industriellement par Toya Soda (Japon) (Rao et al., 1998; Leisola et al., 2001).

#### **1.2.4.2. Industrie pharmaceutique et médicale**

La grande diversité et spécificité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement des agents thérapeutiques efficaces. Par exemple, des protéases d'*A. oryzae* (Luizim et Nortase) sont utilisées comme aide à la digestion ; des collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des brûlés, plaies et des ulcères dermiques (Rao et al.,

1998) ; la « Brinase » (une protéase acide *plasmin-like*) permet l'hydrolyse de la fibrine et la fibrinogène chez les patients souffrant d'une hémodialyse (Sumantha et *al.*, 2006) ; une élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes (Kudrya et Simenenko, 1994) ; etc.

#### **1.2.4.3. Détergents**

A l'heure actuelle, les protéases sont ajoutées comme des ingrédients clé dans la formulation des détergents pour usage domestiques (détergents à lessive, détergents à vaisselles), les produits de nettoyage pour usage industriels et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le marché le plus important au niveau de détergents est de loin celui des détergents à lessive (Kumar et *al.*, 2008b). Une protéase détergente idéal doit avoir une large spécificité de substrat et stable dans l'environnement hostile de la machine à laver (température élevée et pH alcalin) (Rao et *al.*, 1998). Bien que la pepsine soit utilisée depuis 1913 (Hajji et *al.*, 2007), la plupart des protéases ajoutées dans les détergents sont produites par des souches de *Bacillus* (Gupta et *al.*, 2002).

Clear-lens Pro®, une marque de Novozyme Denmark est utilisée pour enlever les dépôts à base de protéines ainsi que les films protéiniques présentent dans les lentilles cornéennes (Sumantha et *al.*, 2006).

#### **1.2.4.4. Tanneries**

Les protéases sont utilisées en tannerie depuis le début du siècle dernier pour leurs capacités à libérer les poils et la laine (Laxman et *al.*, 2005). Les trois traitements de la peau à tanner (le reverdissage, le délainage et le confitage) sont susceptibles de solutions enzymatiques de protéases produites par *B. licheniformis*, *A. oryzae*, *B. amyloliquefasciens*. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients (Rao et *al.*, 1998; Gupta et *al.*, 2002).

#### **1.2.4.5. Autres applications**

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines (Dalev, 1994 ; Ichida et *al.*, 2001). La protéase neutre de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la

matière végétale servant pour l'alimentation animale (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir des films photographiques par hydrolyse de la gélatine (Sumantha *et al.*, 2006).

## **2. Les moisissures**

### **2.1. Généralités**

Les moisissures sont largement répandues dans la nature et sont communément observées sur le pain rassis, le fromage ou les fruits. Elles constituent avec les levures les deux groupes de champignons microscopiques ou mycètes. Ce sont des champignons pluricellulaires (filamenteux), alors que les levures sont des champignons unicellulaires (Madigan et Martinko, 2007).

#### **2.1.1. Organisation des moisissures**

Les moisissures sont des eucaryotes non photosynthétiques et immobiles (à cause de la rigidité de leur paroi). Elles possèdent un appareil végétatif dépourvu de tiges, de racines et de feuilles appelé thalle (Botton *et al.*, 1990).

Les cellules de moisissures forment des filaments (hyphes) où chacun montre une croissance apicale. La ramification des hyphes au cours de leur croissance sur un substrat donne le mycélium; un mycélium et ses spores forment le thalle, détectable à l'œil nu (Guiraud, 1998; Perry *et al.*, 2004; Walker et White, 2005). Dans la majorité des cas, la cellule végétative d'une hyphe contient plus d'un noyau, parfois de centaines. La paroi de la plupart des moisissures est chitineuse; la chitine est un polymère formé d'unités de N-acétyl glucosamine (Madigan et Martinko, 2007).

Durant la croissance, la division des noyaux peut être accompagnée par la formation de septa délimitant une cellule. Toutefois, la formation des septa est d'ordinaire incomplète laissant un pore central permettant la libre circulation du cytoplasme et des noyaux. Parfois celle-ci n'existe pas; l'hyphe correspond alors à un tuyau contenant du cytoplasme où baignent les noyaux, le thalle est donc d'organisation coenocytique (Scriban, 1993; Perry *et al.*, 2004; Madigan et Martinko, 2007).

### **2.1.2. Organes de reproduction**

La reproduction et la dissémination des moisissures s'effectuent grâce aux spores et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative (Guiraud, 1998). Les conidies sont des spores asexuées, elles peuvent être noires, bleues, vertes, rouges, jaunes ou brunes; leur présence donne au mycélium un aspect poussiéreux (Madigan et Martinko, 2007).

Les spores d'origine végétative assurent la reproduction et la dissémination de l'espèce chez les formes imparfaites (Deutéromycètes); mais on les trouve également chez les autres groupes où elles coexistent à côté des formes de reproduction sexuée (Guiraud, 1998).

### **2.1.3. Conditions de croissance des moisissures**

Ces microorganismes sont chimioorganotrophes, se caractérisant par des besoins nutritionnels élémentaires (Madigan et Martinko, 2007). Leur tolérance à l'égard du pH est souvent étendue mais avec généralement une préférence pour les pH légèrement acides (Botton *et al.*, 1990); beaucoup d'espèces supportent des pH très acides (Delarras, 2007). Elles se développent dans une gamme de température allant de 0 à 40°C ou plus; la plupart se développe bien aux températures comprises entre 20 et 25°C. La température optimale pour la croissance de *Metarhizium anisopliae* est de 35°C, mais la production optimale de protéases se situe à 30°C (Botton *et al.*, 1990). La plupart des moisissures sont aérobies strictes et se développent bien en l'absence de lumière. Elles tolèrent des teneurs en eau très faibles. De surcroît, elles ont un métabolisme très actif, lié à leur production enzymatique variée et intense (Delarras, 2007). De nombreuses moisissures sont utilisées par l'homme depuis fort longtemps dans la fabrication de certains produits alimentaires. Certaines synthèses sont effectuées à l'échelle industrielle et sont de premières importances telles celles d'enzymes et d'antibiotiques (Scriban, 1993).

## **2.2. Le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae***

Les agents pathogènes sont des organismes vivants pouvant engendrer une maladie à leur hôte. Les pathogènes des insectes appelés entomopathogènes comprennent : les bactéries (ex : *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus*), les protozoaires (ex : *Amoebidea*), les virus (ex : Entomopox virus).

*Metarhizium anisopliae* était le premier pathogène utilisé délibérément pour le contrôle des insectes ravageurs par le Russe Eli Metchinnicoff (le père de la lutte microbiologique) dans les

années 80. Il a été isolé et identifié sur la paille de céréale près d'Odessa en Ukraine sous le nom *Anisopliae austriaca* ou il l'a nommé *Entomophthora anisopliae*. En 1883 Sorokin assigna ce champignon à la muscardine verte au genre *Metarhizium*. Depuis il est connu sous le nom de *Metarhizium anisopliae*.

### **2.2.1. Taxonomie et Classification**

La classification de *Metarhizium anisopliae* a été sujette à plusieurs révisions au cours des dernières années. Par le passé, l'espèce a été classée principalement sous la division des Deutéromycètes, dans la classe des Hyphomycètes. Les membres de cette sous-division ayant comme spécificité le fait de ne jamais produire, ou très rarement, des spores sexuées.

Cette classe est en fait caractérisée par la présence de formes mycéliennes portant des spores asexuées, appelées conidies, engendrées sur des cellules conidiogènes spécialisées.

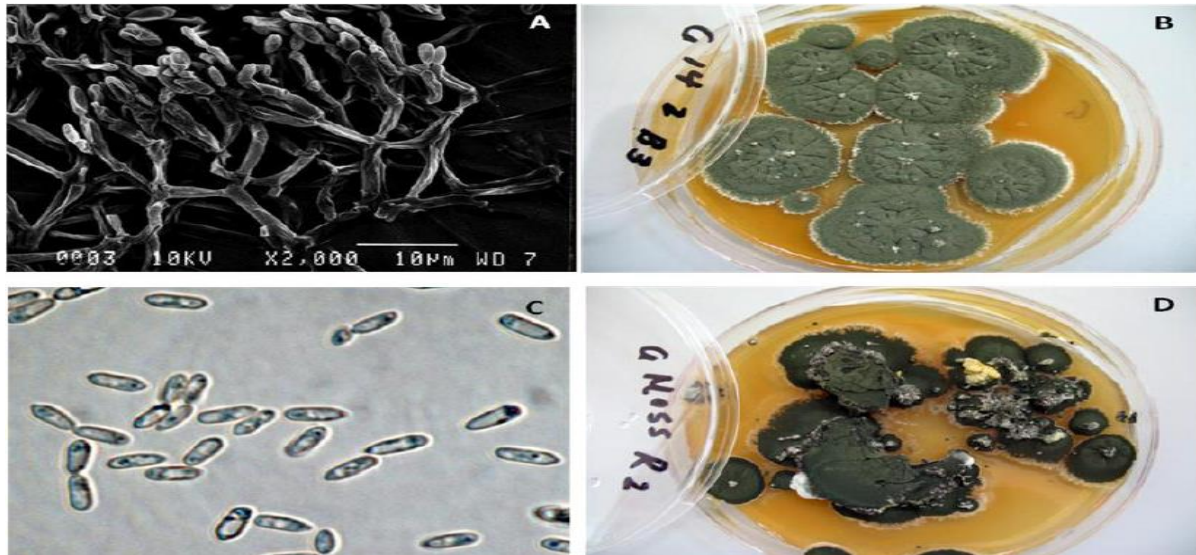
Par contre, à l'heure actuelle, la plupart des mycologistes n'acceptent plus les *Deuteromycota* et ses sous-classes comme formant un assemblage taxonomique. Plusieurs espèces de champignons ont été associées avec des membres de la division des *Ascomycota* sur une base d'homologie d'ADN, dont l'espèce *M. anisopliae* (Inglis *et al.*, 2001).

Cette espèce fait dès lors partie du règne des *Mycota*, de la division des *Ascomycota* et de l'ordre des *Hypocreales*.

La classification de ce genre a été basée sur des caractères morphologiques des cellules et des conidies, et comme ces caractéristiques sont assez limitées elles ont compliqué la taxonomie. (Bidochka et Small, 2005).

- ❖ **Règne :** *Fungi*
- ❖ **Embranchement :** Dikarya
- ❖ **Sous-embranchement :** *Ascomycota*
- ❖ **Classe :** Pezizomycotina
- ❖ **Ordre :** *Hypocreales*
- ❖ **Famille :** *Clavicipitaceae*
- ❖ **Genre :** *Metarhizium*
- ❖ **Espèce :** *Metarhizium anisopliae*

La première révision de ce genre a été faite par Tulloch (1976), où il a utilisé les caractéristiques morphologiques des conidies pour distinguer entre deux formes de *Metarhizium* ; à savoir *Metarhizium flavoviride* et *Metarhizium anisopliae* (Figure 2). Ce dernier a été subdivisé en deux variétés ; *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* et *Metarhizium anisopliae* var *majus*.



**Figure 2 :** (A) Observation en microscope électronique des conidiophores et des hyphes de *Metarhizium anisopliae* (B) Culture de *M. anisopliae* sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25 °C, (C) Aspect microscopique des Conidies de *M. flavoviride* (X100) (D) Culture de *M. flavoviride* sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25°C. Photo Credits: (A) Fumio Ihara, National Institute of Fruit Tree Science, Japan. (B, D) T. Goble, Rhodes University, South Africa. (C) Dan Johnson, University of Lethbridge, Canada.

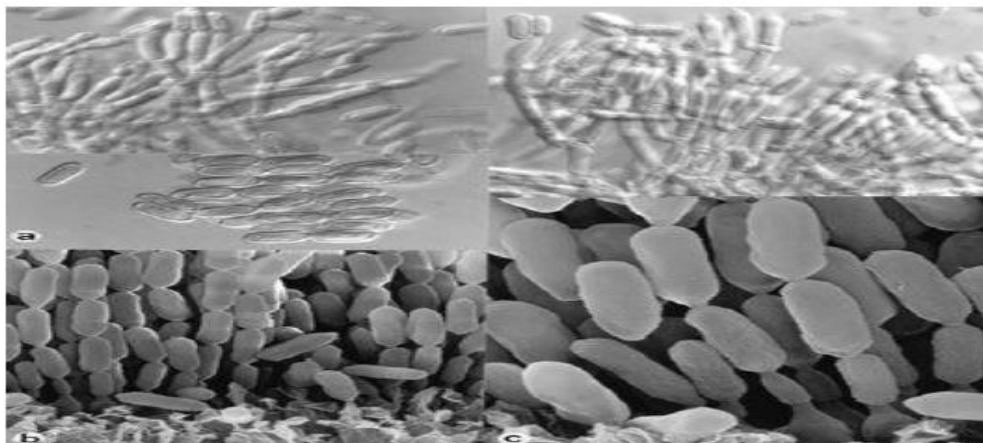
### 2.2.2. Morphologie

Les caractéristiques taxonomiques dominantes sont les traits morphologiques des structures de sporulation. Le genre *Metarhizium* est défini par l'agencement des chaînes porteuses de phialides, des colonies de conidies cylindriques ou légèrement ovotides, sèches et généralement de couleur verte. Les colonies sont formées d'une agrégation de ces chaînes conidiennes (Zimmerman, 2007). *Metarhizium anisopliae* apparaît blanc lorsqu'il est jeune et il devient vert foncé après la maturation des spores (Figure 3).



**Figure 3** : Aspect morphologique de *Metarhizium anisopliae* (Ihara *et al.*, 2001)

Cette espèce est caractérisée par des conidiophores de longueur variable, sont relativement courts, irrégulièrement ramifiés ou non et arrangés en groupes compacts formant une masse de spores (Figure 4), les spores étant allongées avec des cotés parallèles (Bischoff *et al.*, 2009).



**Figure 4** : Aspect microscopique de *Metarhizium anisopliae*, G x (a.1600; b.2800; c.7000) (Bischoff *et al.*, 2009).

### **2.2.3. Applications technologiques du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae***

#### **2.2.3.1. Production des toxines**

Chez certains champignons entomopathogènes incluant *Metarhizium anisopliae* il y a Production de mycotoxines pendant la pénétration des hyphes dans l'insecte, Les toxines sont souvent supposées être des armes chimiques, soit pour la défense des micro-organismes, soit pour l'attaque de l'hôte. Ces métabolites secondaires jouent un rôle important lors de l'invasion de l'insecte par le pathogène, puisqu'ils accélèrent la mort de l'hôte et permettent au champignon



de proliférer plus rapidement (Vey *et al.*,1986; Ignoffo,1988). Des protéases, des cytochalasines ainsi que la prodestruxine sont tous des métabolites élaborés par *Metarhizium anisopliae*.

#### **2.2.3.2. Production des enzymes**

Plusieurs enzymes de champignons peuvent être d'intérêt considérable dans la pathologie des insectes. En effet, une enzyme lipolytique a été purifiée à partir de *Metarhizium anisopliae*, une enzyme protéolytique à partir de *Cordyceps militaris* (Burges et Hussey, 1971). De plus, des protéases A et B ont été isolées à partir de *Beauveria bassiana* et de *M. anisopliae* (Vey, 1989).

Toutes ces enzymes semblent être toxiques pour les insectes et endommagent avec une grande vitesse et spécifiquement quelques fonctions physiologiques par l'hydrolyse de certaines protéines (Burges et Hussey, 1971).

## **Matériel et Méthodes**

## **1. La souche fongique**

### **1.1. Repiquage de la souche**

Dans ce travail la souche utilisée est la moisissure *Metarhizium anisopliae* qui nous a été fournie par le laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) Constantine.

La sporulation de *Metarhizium anisopliae* a été réalisée sur le lait gélosé (voir annexe) dans des boîtes de pétri à 30°C pendant 1 semaine. Les cultures pures ont été alors stockées à 4°C (UI-Haq *et al.*, 2003). Ces boîtes ont été utilisées pour l'inoculation des différents milieux destinés à la fermentation fongique.

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

La souche protéolytique a été sélectionnée sur milieu gélosé à base de lait par la méthode des disques. L'incubation a lieu à 30°C. À partir du sixième jour, des mesures sur le diamètre de chaque colonie et sa zone d'hydrolyse ont été effectuées.

## **3. Production de la protéase**

### **3.1. Milieux de fermentation**

#### **3.1.1. Son de blé**

Le milieu de culture de base a été préparé à partir du son de blé fourni par le moulin d'ELKHROUB, à Constantine. Le son de blé a été réduit en poudre à l'aide d'un broyeur et d'un tamis (diamètre 0.5 mm), il a été mis en solution dans de l'eau distillée tiède ( sous une agitation continue) pendant 30 min à différentes concentrations ( 2% ,3% ,4% ,5% ,6% ) afin de déterminer la concentration optimale pour la production de la protéase ,ensuite, le mélange subit une filtration. Le filtrat obtenu constitue alors le milieu de culture de base.

#### **3.1.2. Peptone de caséine**

Cette fermentation a été réalisée sur milieu Saboureaud liquide. Le substrat testé est le Peptone de Caséine (voir annexe). Les flacons ont été mis en incubation avec agitation orbitale (150 rpm) à 30° C, pendant 240 heures (10 jours). Des échantillons ont été prélevés toutes les 24 heures.

### **3.2. Ensemencement des milieux de la fermentation**

Après stérilisation, les flacons ont été inoculés par la méthode des disques et incubées à 30°C dans un bain Marie agité. Des prélèvements du milieu de fermentation ont été effectués chaque 24 h afin d'établir la cinétique de production de protéase de la souche sélectionnée.

## **4. Etude de l'activité protéolytique produite**

### **4.1. Préparation des extraits enzymatiques**

Après la fermentation, le milieu a été alors filtré à l'aide d'une passoire pour éliminer les solides (Tunga *et al.*, 2003). Le filtrat a été, lui-même, clarifié par une autre filtration sur papier filtre (Whatman n° 1) pour obtenir l'extrait enzymatique brut. Ce dernier, a été conservé au congélateur pour le dosage de l'activité enzymatique.

### **4.2. Méthode de dosage de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique a été déterminée à partir de l'effet de l'enzyme sur la caséine. Ainsi, lorsque la caséine a été hydrolysée par la protéase, une quantité de tyrosine a été libérée avec d'autres acides aminés (Mathieu, 2005). Cette quantité de tyrosine libérée, peut être mesurée directement par la méthode colorimétrique, décrite par Tsouchida *et al.*, (1986).

#### **4.2.1. Principe**

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

#### 4.2.2. Réaction enzymatique

L'activité protéolytique est déterminée par l'utilisation de la caséine comme substrat. Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

- 1 ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage dilué au 1/10<sup>ème</sup>.
- 1 ml de substrat (solution de caséine à 2 % dans le citrate de sodium (0,02 M) à pH 7,0).

Après agitation, et incubation pendant 30 min au bain marie à 40°C, la réaction a été arrêtée par addition de 2 ml de TCA froid à 4%. Le mélange a été agité et laissé reposer pendant 15 min à 4°C (Tsuchida *et al.*, 1986) ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées (Sandhya *et al.*, 2005). Le produit obtenu a été ensuite filtré sur papier Whatman N°01.

#### 4.2.3. Protocole de dosage

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode de Tsuchida *et al.*, (1986).

- 1 ml du filtrat.
- 5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.4M).
- 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 10%. Les mélanges ont été bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 20 min. L'absorbance de la coloration bleue développée a été lue à 750 nm) ; l'activité a été calculée par référence à une courbe étalon de la tyrosine comme standard. Une unité (UI) de protéase est l'équivalent de 1µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml de la solution d'enzyme. Le blanc a été préparé de la manière suivante, 1 ml de caséine a été ajouté à 2 ml TCA est rajouté avant le substrat.

Chaque dosage est effectué en trois répétitions.

#### 4.2.4. Préparation de la courbe d'étalonnage de tyrosine

La gamme-étalon est à partir d'une solution mère de tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 100 µg/ml, comme l'indique le tableau suivant :

**Tableau 3** : Préparation de la courbe d'étalonnage de tyrosine.

Concentration en tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ )	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>
Solution mère de tyrosine (ml)	<b>0</b>	<b>0.1</b>	<b>0.2</b>	<b>0.3</b>	<b>0.4</b>	<b>0.5</b>
TCA (ml)	<b>0.5</b>	<b>0.4</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>	<b>0.1</b>	<b>0</b>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (ml)	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>

Agitation et incubation pendant 10 min à température ambiante.

Folin-Ciocalteu dilué à 1/4 <sup>ème</sup> (ml)	<b>0.25</b>	<b>0.25</b>	<b>0.25</b>	<b>0.25</b>	<b>0.25</b>	<b>0.25</b>
---	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

Après une agitation au VORTEX, laisser reposer 30 min à température ambiante. L'absorbance lue à 750 nm permet de tracer la courbe étalon.

### 4.3. Etude des propriétés physico-chimiques de l'enzyme

#### 4.3.1. Effet du pH

L'influence du pH sur l'activité enzymatique a été estimée par l'addition (au mélange réactionnel) de tampons afin d'obtenir différentes valeurs de pH (Prakash et Padmaja., 2012).

C'est-à-dire des pH compris dans l'intervalle [5-10]. Pour cela, on a ajouté les systèmes tampons suivants :

- Pour l'intervalle [5 –6] : Citrate de sodium (0,1 M) / phosphate monosodique (0,2M)
- Pour l'intervalle [7 –8] : Phosphate monosodique (0,2 M) / phosphate disodique (0,2M)
- Pour l'intervalle [8 –9] : Phosphate disodique (0,2M) /NaOH (1N).
- Pour l'intervalle [9-10] : Phosphate monosodique (0,2 M)

### 4.3.2. Effet de la température

L'effet de la température d'incubation a été déterminé par mesure de l'activité protéasique de l'extrait brut, incubé pendant 1 heure dans de différentes températures (30°C, 50°C et 60°C), à pH optimal (7) (Prakash et Padmaja., 2012).

## 5. Modélisation de la production de la protéase

L'utilisation de la méthodologie de la recherche expérimentale (plans d'expérimentations) permet de réaliser le criblage d'un grand nombre de facteurs, de déterminer l'influence des paramètres retenus et leurs interactions, et optimiser une ou plusieurs réponses expérimentales.

### 5.1. Sélection des variables par le plan d'expérience de Plackett-Burman

Nous avons utilisé les matrices de PLACKET et BURMAN (1946) afin de sélectionner les facteurs influençant la production de la protéase.

Celles-ci permettent d'évaluer l'influence de k facteurs à deux niveaux sur la réponse étudiée avec un nombre d'expériences N.

Telle que  $N = k + 1$ , donc avec un minimum d'essais (N est un multiple de 4 et peut être compris entre 4 et 100). Ce sont construites par permutation circulaire à partir d'un générateur de base (tableau 4).

**Tableau 4** : Lignes génératrices d'un plan de Plackett et Burman.

<b>N=4</b>	+	+	-																				
<b>N=8</b>	+	+	+	-	+	-	-																
<b>N=12</b>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-												
<b>N=16</b>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-								
<b>N=20</b>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-				
<b>N=24</b>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-

Ce sont des matrices carrées (dites matrices d'HADAMARD), ne contenant que des éléments égaux à +1 ou -1, les facteurs de la dernière combinaison étant toujours pris au niveau -1 (tableau 5).

**Tableau 5** : structure du plan PLACKETT et BURMAN pour 3 facteurs.

Essais	X1	X2	X3	Réponses (activité protéolytique)
1	+	+	-	Y1
2	-	+	+	Y2
3	+	-	+	Y3
4	-	-	-	Y4

Dans notre travail 3 facteurs ont été analysés (tableau 06).

**Tableau 6** : Les niveaux des facteurs analysés.

Facteurs	Niveau supérieur	Niveau inférieur
Température (°C)	50	40
pH	10	7
Substrat	6	3

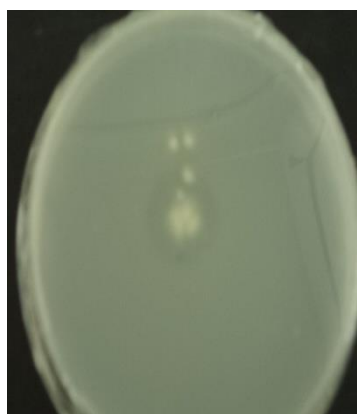
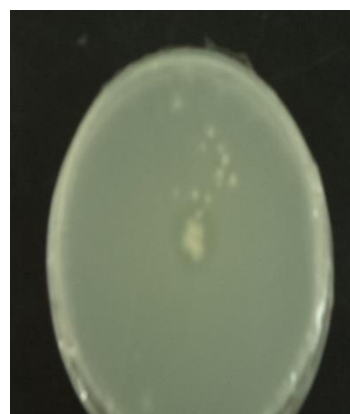


# Résultats

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

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

Les résultats obtenus après l'ensemencement des laits gélosés donnent des zones d'hydrolyses permettant la mise en évidence de l'activité protéolytique.

1<sup>er</sup> jour3<sup>ème</sup> jour5<sup>ème</sup> jour6<sup>ème</sup> jour

**Figure 5** : La croissance de la souche *Metarhizium anisopliae* sur lait gélosé.

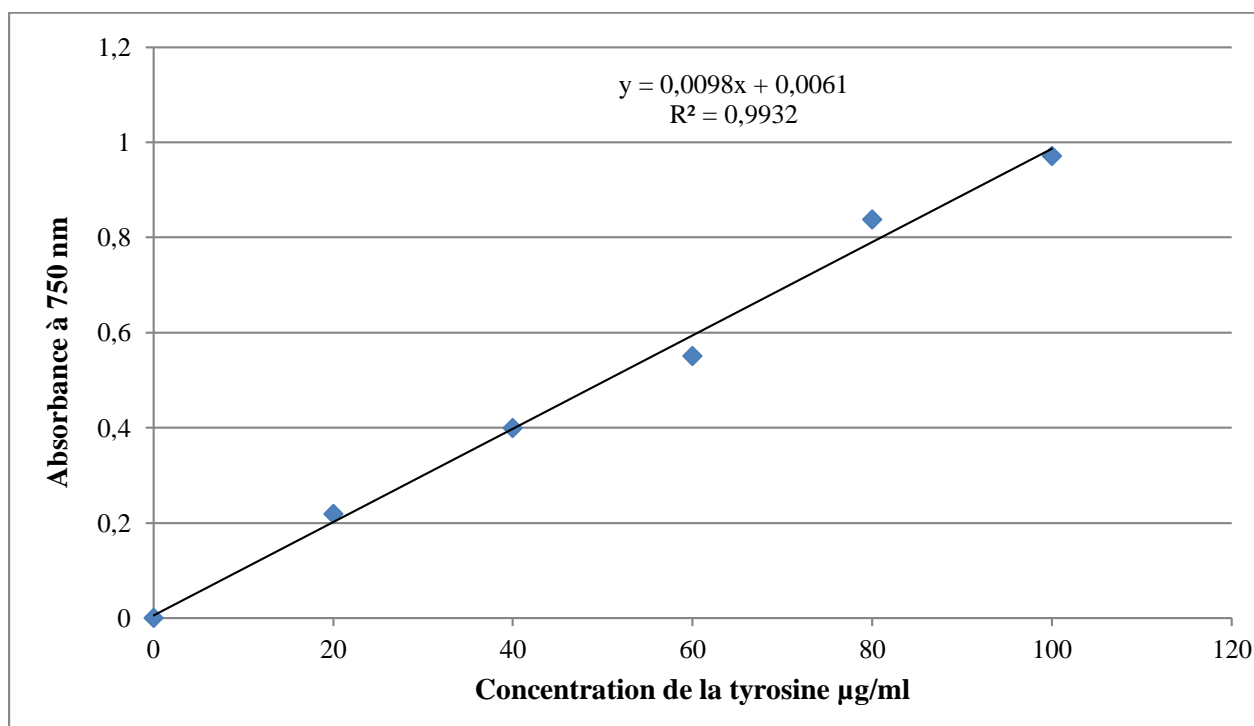
**Tableau 7** : Mise en évidence de l'activité protéolytique sur milieu lait gélosé.

Les jours	1	2	3	4	5	6
Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm)	3	8	15	22	25	30

## 2. Production de la protéase

### 2.1. Courbe d'étalonnage de la tyrosine

Une unité de protéolyse correspond à la libération de 1µg de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans un ml d'échantillon (1µg/h/ml). La concentration déduite de la courbe d'étalonnage correspond à 0,25 ml d'échantillon dilué par les réactifs ajoutés au cours de la première étape.



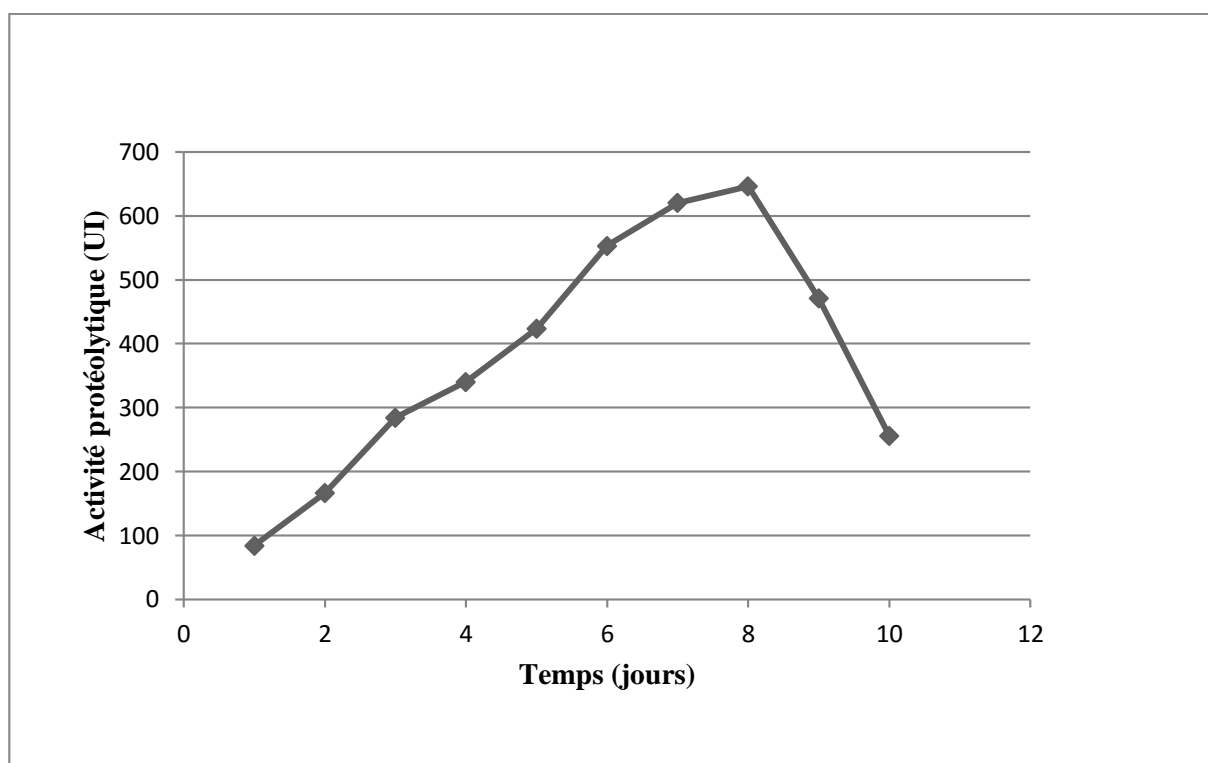
**Figure 6** : Courbe d'étalonnage de la tyrosine.

**Activité protéolytique (µg/h/ml)** = concentration déduite de la courbe d'étalonnage x dilution x 4 (pour ramener le volume de l'échantillon à 1ml) x 2 (pour ramener le temps à 1h).

## 2.2. Cinétique de production

### ➤ Milieu peptone de caséine

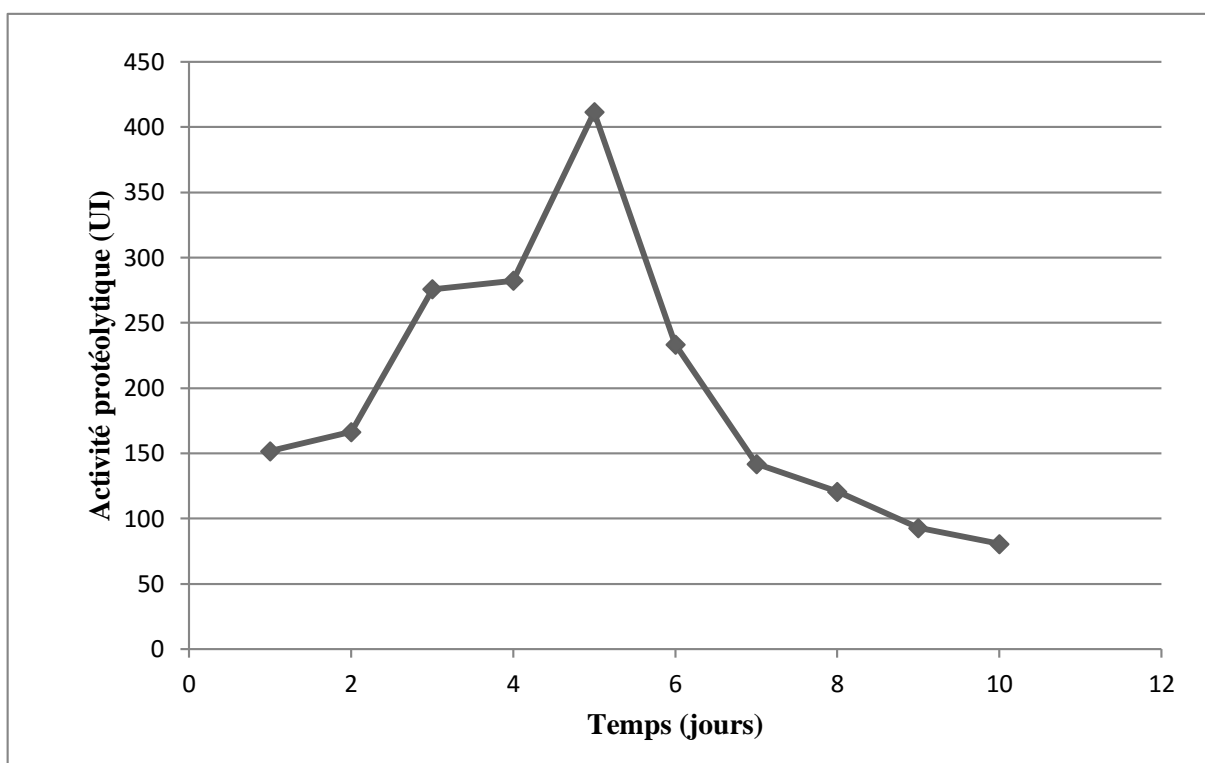
L'activité protéolytique testée dans le milieu de fermentation liquide (peptone de caséine) a montré que cette dernière a été détectée dans le filtrat de la culture dès le premier jour, durant cette période l'activité est très faible. La production maximale de l'enzyme est obtenue après huit jours de fermentation (620UI), au delà de 8 jours, la production montre un déclin du rendement en enzyme dans le milieu de culture (figure 7).



**Figure 7** : Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche *Metarhizium anisopliae* dans le milieu de fermentation liquide (peptone de caséine).

➤ **Milieu son de blé**

L'activité protéolytique testée dans le milieu de fermentation liquide (son de blé) a montré que cette dernière a été détectée dans le filtrat de la culture dès le premier jour, durant cette période l'activité est très faible. La production maximale de l'enzyme est obtenue après cinq jours de fermentation (411 UI), au delà de 5 jours, la production montre un déclin du rendement en enzyme dans le milieu de culture (figure 8).

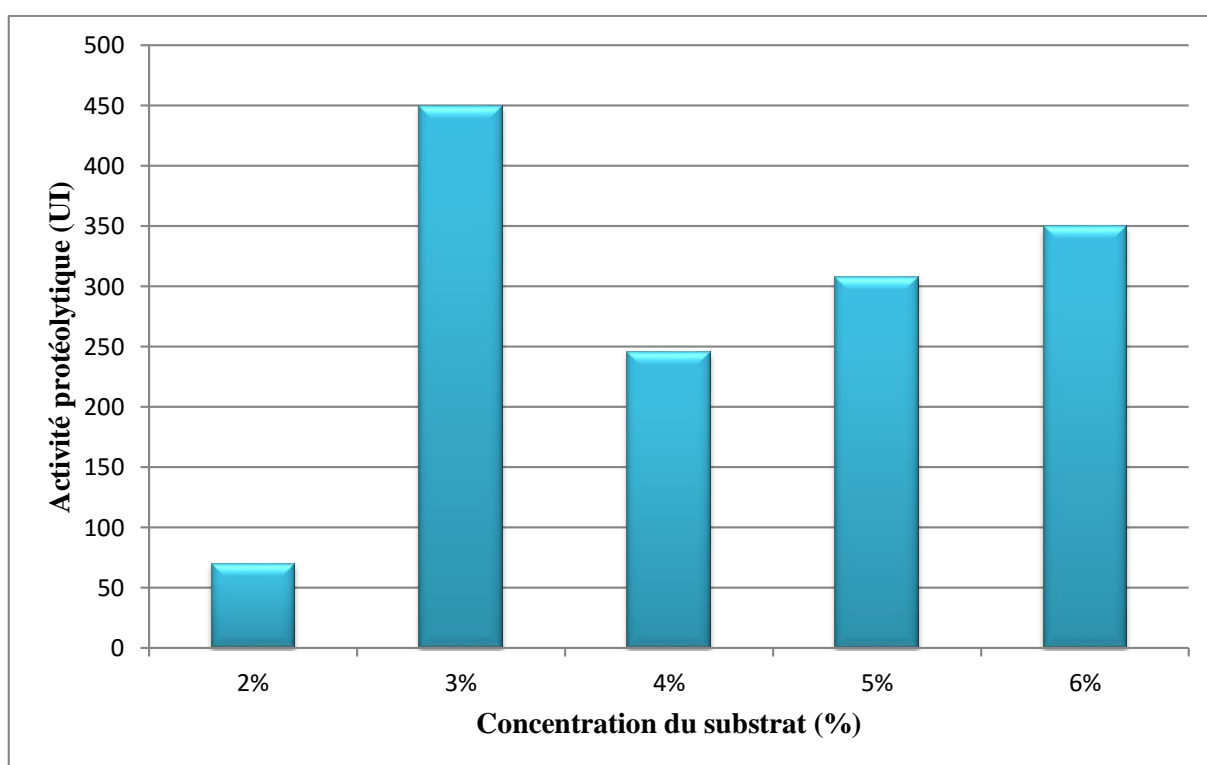


**Figure 8 :** Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche *Metarhizium anisopliae* dans le milieu de fermentation liquide (son de blé).

### ➤ Effet de la concentration du son de blé sur la production de la protéase

La principale étape sur laquelle devrait reposer l'amélioration de la sécrétion des enzymes est l'optimisation du milieu de culture pour la fermentation. Pour la mise en évidence de l'activité protéolytique chez *Metarhizium anisopliae*, nous avons testé différentes concentrations du son de blé (2% ,3%,4%, 5% et 6%) sur la production de l'enzyme ciblée.

Les résultats montrent que l'activité protéolytique la plus élevée (449 UI) est produite dans le milieu à 3% de son de blé (figure 9).

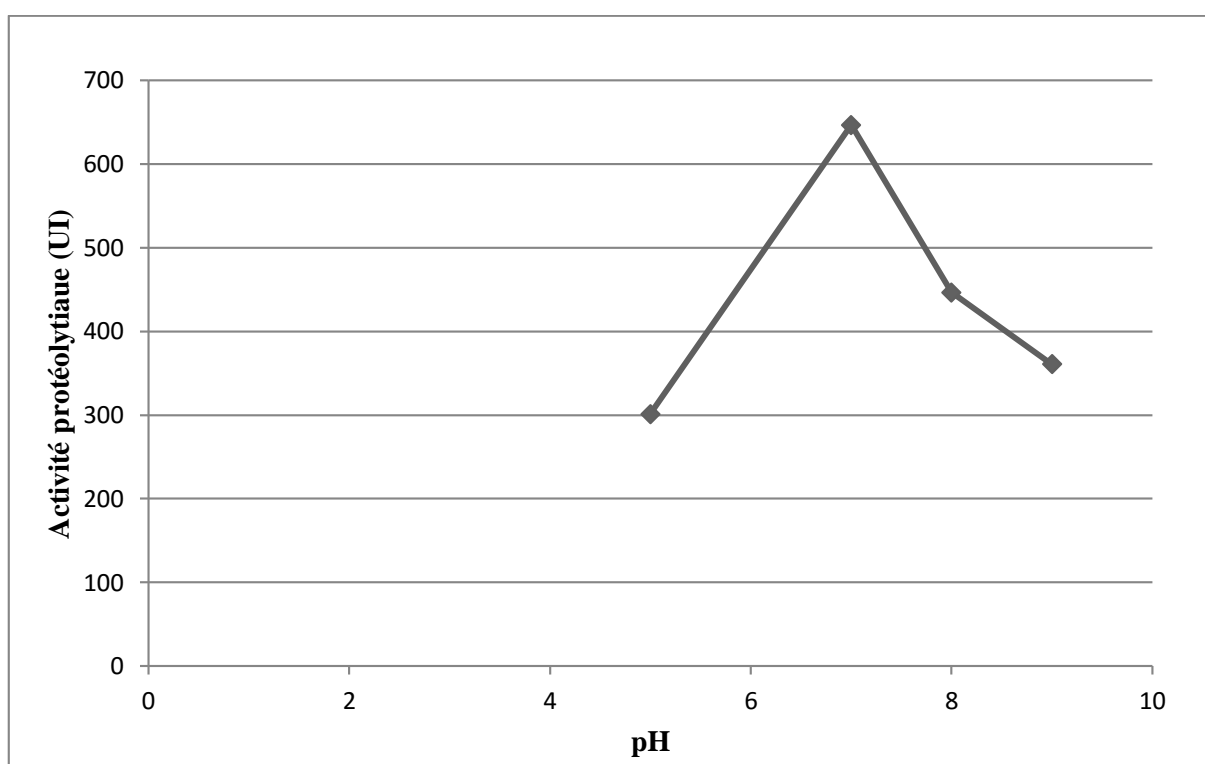


**Figure 9** : Effet de la concentration du son de blé sur la production de la protéase.

### 2.3. Effet du pH sur l'activité protéolytique

#### 2.3.1. Le milieu peptone de caséine

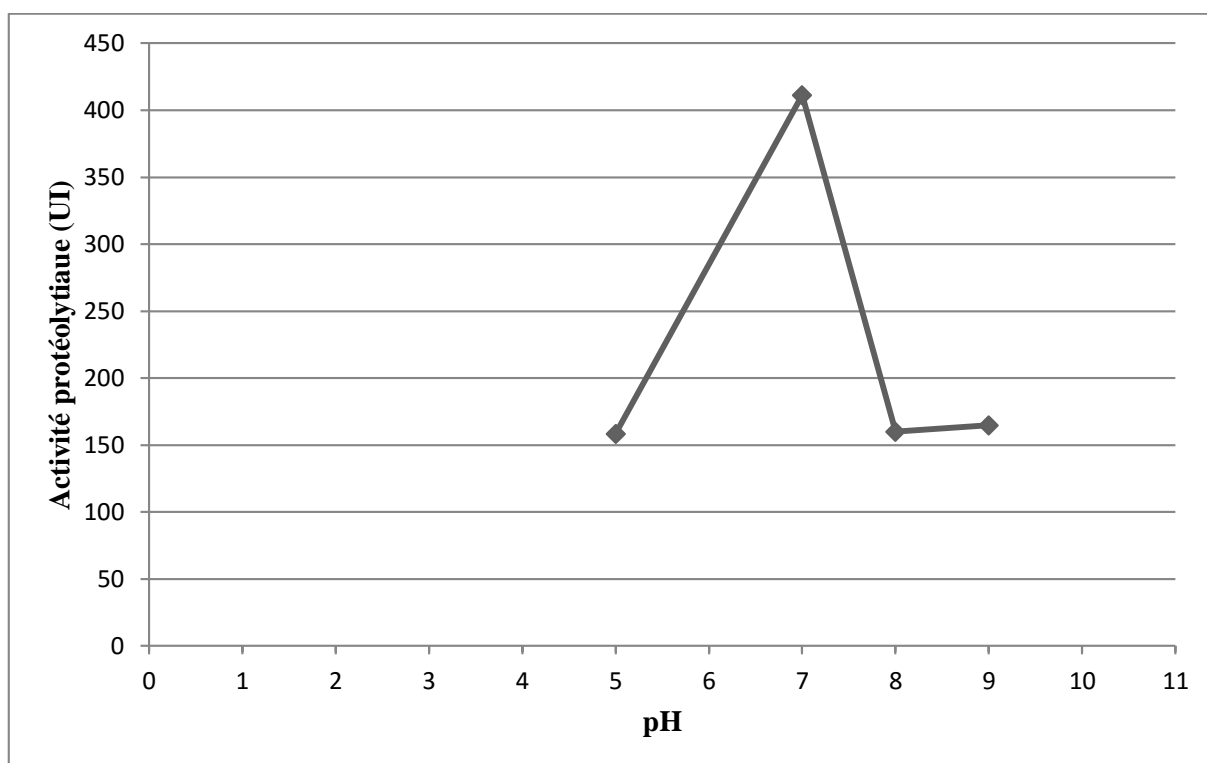
La figure (10) ci-dessous, montre l'effet du pH sur l'activité protéolytique testée dans le milieu peptone de caséine; cette étude a été faite dans une gamme de pH de 5 à 10. D'après cette figure on remarque dans l'intervalle allant de 5 jusqu'à 7, une augmentation progressive de l'activité protéolytique avec l'augmentation du pH réactionnel ; une meilleure activité a été observée à pH 7 désignant le pH optimal de la protéase étudiée, Au delà de ce pH, on observe une diminution graduelle de l'activité protéolytique.



**Figure 10** : Effet du pH sur l'activité protéolytique (milieu peptone de caséine).

### 2.3.2. Milieu son de blé

La figure (11) ci-dessous, montre l'effet du pH sur l'activité protéolytique testée dans le milieu son de blé; cette étude a été faite dans une gamme de pH de 5 à 10. D'après cette figure on remarque dans l'intervalle allant de 5 jusqu'à 7, une augmentation progressive de l'activité protéolytique avec l'augmentation du pH réactionnel ; une meilleure activité a été observée à pH 7 désignant le pH optimal de la protéase étudiée, Au delà de ce pH, on observe une diminution graduelle de l'activité protéolytique.



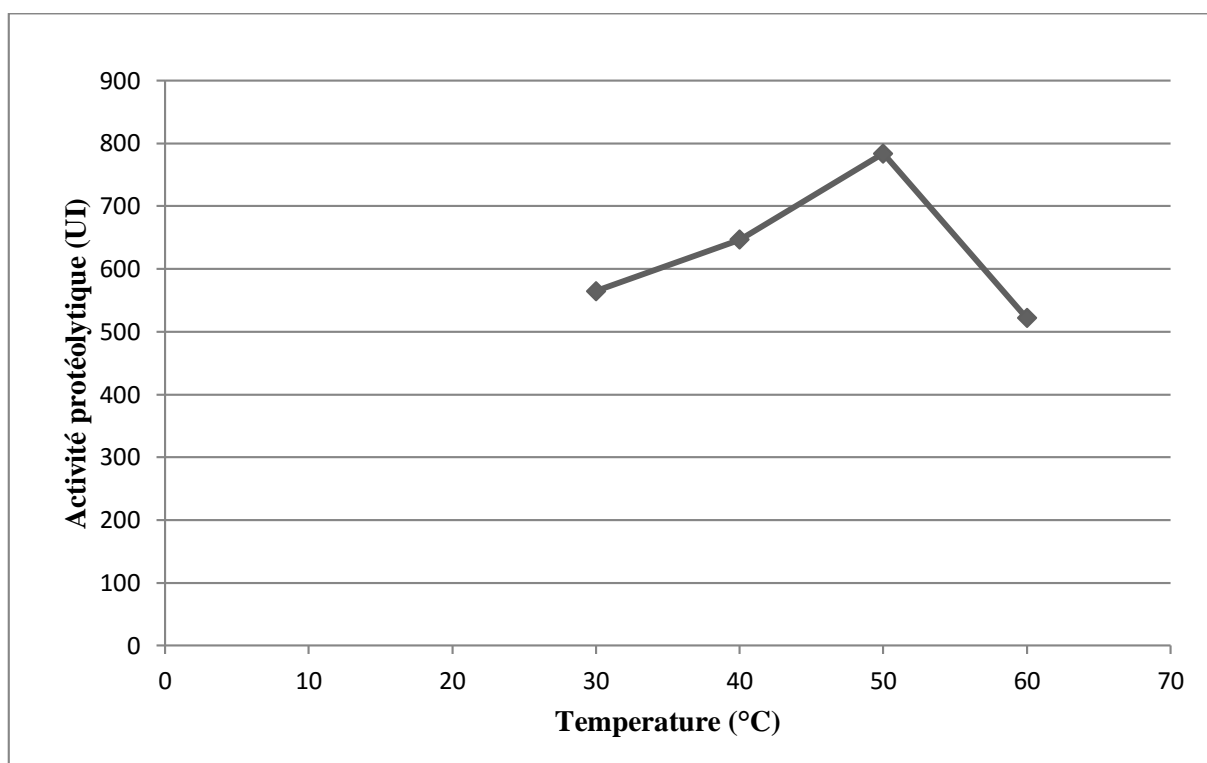
**Figure 11** : Effet du pH sur l'activité protéolytique.



## 2.4. Effet de la température

### 2.4.1. Milieu peptone de caséine

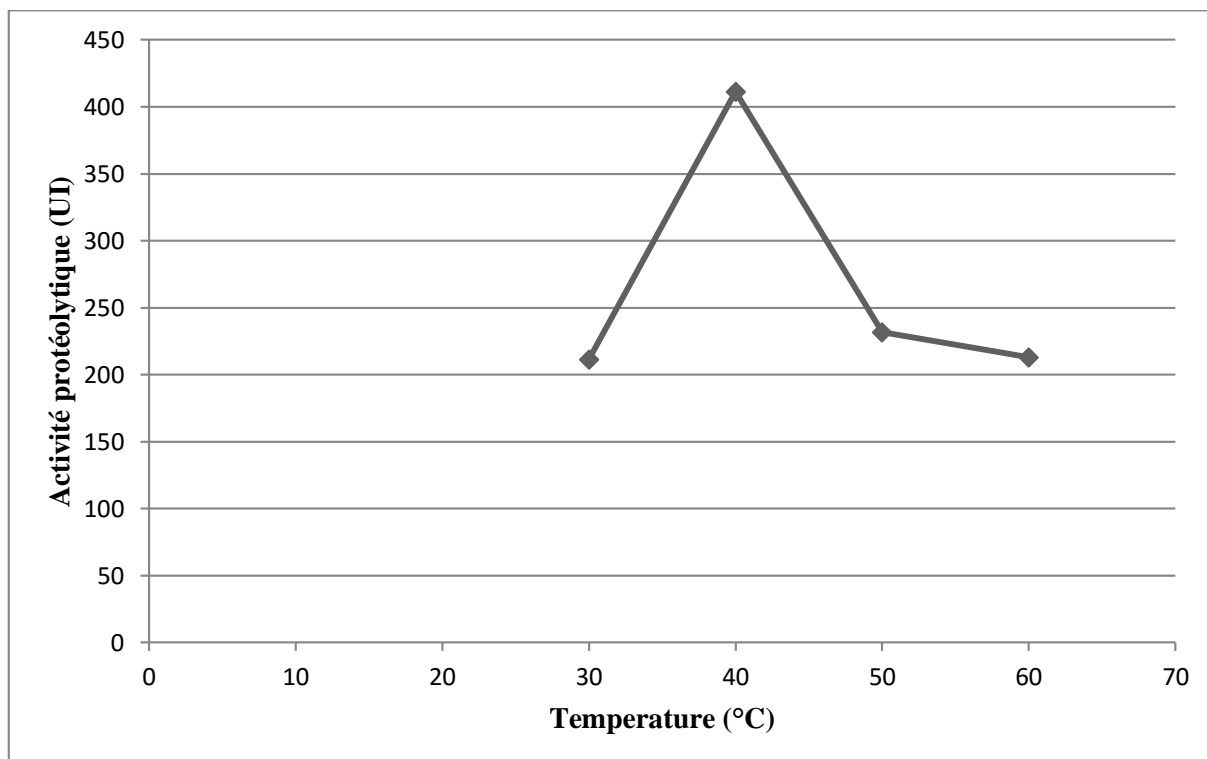
La figure 12 représente l'effet de la température sur l'activité protéolytique testée dans le milieu peptone de caséine ; elle montre une augmentation de l'activité protéolytique dans une gamme de température allant de 30°C jusqu'à 50°C. Une meilleure activité a été observée à une température 50°C. Après cette température, on observe une diminution de l'activité protéolytique.



**Figure 12** : Effet de la température sur l'activité protéolytique.

### 2.4.2. Milieu son de blé

La figure 13 représente l'effet de la température sur l'activité protéolytique testée dans le milieu son de blé; elle montre une augmentation de l'activité protéolytique dans une gamme de température allant de 30°C jusqu'à 40°C. Une meilleure activité a été observée à une température 40°C. Après cette température, on observe une diminution de l'activité protéolytique.



**Figure 13** : Effet de la température sur l'activité protéolytique.

## 3. Modélisation de la production de la protéase

L'activité protéolytique varie de 124 UI à 311,34 UI avec une moyenne de 233,28 UI (tableau 08). La plus faible activité correspond à l'essai N°4 où le pH du milieu est ajusté à 7, la concentration de son de blé est 3%. Par contre, l'activité la plus importante a été enregistrée dans l'essai N°3 où le pH est ajusté à 7, la concentration de son de blé est 6%.

**Tableau 8** : Réponses (mg de tyrosine libéré/min/ml de solution enzymatique) obtenues pour les quatre essais.

Essai	T (°C)	pH	Substrat	Réponses (activité protéolytique)
1	50	10	3	241,55
2	40	10	6	256,24
3	50	7	6	311.34
4	40	7	3	124

La réponse moyenne ( $Y_i$ ) de l'expérimentation est donnée sous la forme :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_kX_k$$

Avec :

- $b_0$  = Valeur moyenne de toutes les réponses =  $\Sigma Y_i/N = 233.28$
- $X_i$  = Valeur de la variable explicative (valeur du facteur étudié)
- $b_i$  = Constante à calculer à partir des réponses en affectant chacune du signe (+ ou -) qui lui correspond dans la colonne du facteur pour lequel on veut calculer ce coefficient en faisant la somme algébrique et en divisant par le nombre d'expériences par exemple :

$$b_3 = (-Y_1 + Y_2 + Y_3 - Y_4) / 4 = 50.50$$

En appliquant la formule, nous avons obtenu les résultats suivants :

$$b_1 = 43.16$$

$$b_2 = 15.61$$

$$b_3 = 50.50$$

Donc  $Y = 233.28 + 43.16$  (température) +  $15.61$  (pH) +  $50.50$  (substrat)

## **Discussion**

Les protéases sont des enzymes essentielle dans les différentes applications industrielle, biotechnologique, médicinale et dans les domaines de recherche (Coral *et al.*, 2003; Sandhya *et al.*, 2005). Elles sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (Gupta *et al.*, 2002; Sandhya *et al.*, 2005). Cependant, les protéases microbiennes sont plus intéressantes que celles provenant des sources végétales ou animales depuis qu'elles présentent les caractéristiques les plus recherchées dans les applications biotechnologiques.

Le présent travail porte sur la production de protéases par la souche fongique *Metarhizium anisopliae* et la caractérisation de l'enzyme qu'elle produit

Les différents résultats obtenus de la production protéolytique montrent que le maximum de la production d'enzyme a été observé après cinquième jour de la fermentation pour le milieu son de blé et après le huitième jour pour le milieu peptone de caséine. Le même temps est rapporté aussi bien pour la production de protéase par *Metarhizium anisopliae* (Prakash et Padmaja., 2012).

Durant les premières 24 h, l'activité est très faible, cela indique que les spores sont métaboliquement dormantes et que la dégradation du substrat ne peut s'installer qu'après la germination (Assamoi *et al.*, 2009).

Une diminution progressive de l'activité protéolytique a été signalée avec l'augmentation du temps d'incubation, suggérant clairement le rôle d'enzyme en tant qu'un métabolite primaire, produit pendant la phase logarithmique de la croissance du champignon afin d'utiliser les nutriments (protéines) présents dans le substrat solide. L'incubation au-delà de cette période optimale a montré un déclin rapide dans le rendement d'enzyme. Cette diminution était probablement due à l'épuisement des éléments nutritifs, l'inactivation d'enzyme par d'autres métabolites toxiques libérés dans le milieu et les variations du pH de milieu (Sumantha *et al.*, 2006 ; Paranthman *et al.*, 2009).

La deuxième partie consistant à la détermination des conditions physicochimiques (pH et température) optimales de l'activité de l'enzyme produite par la souche *Metarhizium anisopliae* a montré que le pH optimal se situe à pH 7 pour les deux milieux, le même que celui rapporté par (Prakash et Padmaja., 2012). Ce résultat est très proche du pH optimal de la protéase neutre produite par plusieurs moisissures.

Chaque enzyme possède un pH optimal auquel la vitesse de la réaction catalysée est maximale. Des légères variations du pH autour de cette valeur entraînent une diminution de l'activité enzymatique, en raison des modifications de l'ionisation des groupements compris dans le site actif de l'enzyme. Des déviations plus importantes du pH, conduisent à dénaturer l'enzyme en modifiant l'ionisation des acides aminés et en rompant les interactions non covalentes maintenant sa structure tridimensionnelle (Hames *et al.*, 2006).

En ce qui concerne l'effet de température sur l'activité protéolytique, la température optimale est de 40°C pour le milieu son de blé et de 50°C pour la peptone de caséine, elle est similaire à celle obtenue par (Prakash et Padmaja., 2012). Par ailleurs, quelques protéases fongiques présentent des optima de température de 60°C (Singh *et al.*, 1994; Chellappan *et al.*, 2006).

Dans un autre volet, L'étude de l'effet de la concertation du son de blé pour la production de protéase par *Metarhizium anisopliae* a montré à une production maximale en activité enzymatique en présence de 3 % du son de blé. Par contre, une diminution de l'activité protéolytique, est observée dans les concentrations 2% 4% et 6%, ceci s'explique par une répression catabolique exercée par le glucose (Kole *et al.*, 1988 ; Frankena *et al.*, 1986 ; Gessesse *et al.*, 2003 ; Patel *et al.*, 2005).

Les résultats obtenus lors de notre travail affirment comme pour le cas de certains auteurs (Burgess et Hussey, 1971 ; Pais, 1981 ; Vey, 1989) la production de la protéase par l'espèce *Metarhizium anisopliae*. Les résultats positifs de la production protéolytique sont influencés par différents facteurs (Température, pH et Substrat).

La plus grande réponse obtenue concerne l'essai (3) où les facteurs choisis prennent les valeurs suivantes : température 50°C, pH =7 et le substrat 6%.

En comparant les résultats de l'essai 1, 2 et 4 avec ceux de 3 nous pouvons observer le rôle majeur joué par la température, le pH et la concentration du substrat car le changement de l'un d'eux fait basculer la réponse de l'activité enzymatique à son bas niveau, donc nous pouvons dire que ces trois facteurs sont des facteurs agiraient dans la production de la protéase comme cela a été noté par Prakash et Padmaja (2012).

De manière générale, nous notons que les fermentations menées dans le but d'une production protéolytique exigent des plans d'expériences plus puissants statistiquement qui se basent sur un nombre de facteurs encore plus importants (tels que les sels), une souche génétiquement améliorée pour un rendement meilleur. Ces paramètres doivent être choisis de manière précoce et justifiable en fonction de la place systématique de la souche employée.

Le but de ce travail est la production de la protéase neutre à partir *Metarhizium anisopliae* ainsi, de sélectionner les différents facteurs qui ont une influence sur la production de l'enzyme ciblée.

De façon globale, ce travail s'inscrit dans une approche qui consiste à l'exploitation des sous produits de blé et de peptone de caséine pour réduire l'utilisation des produits chimiques en favorisant l'émergence d'une nouvelle industrie de produits biologiques économiquement plus abordables.

Le dosage de l'activité protéolytique a montré que la peptone de caséine est un milieu favorable à la production des protéases par la souche *Metarhizium anisopliae*, en effet elle produit une activité importante en protéase neutre (620 UI).

Un prétraitement réalisé consiste à utiliser plusieurs concentrations du son de blé (2%, 3%, 4%, 5% et 6%) afin d'obtenir la meilleure production de la protéase neutre. L'activité protéolytique maximale (449 UI) est observée dans le flacon à 3 % de concentration du son de blé. Ce résultat montre que la concentration en son de blé présente une grande influence sur les performances du procédé.

L'étude cinétique ainsi que l'étude des propriétés physicochimiques de la protéase neutre produite par *Metarhizium anisopliae* a pour but d'établir les conditions et le mécanisme d'action de l'enzyme ce qui permet de montrer ses aptitudes technologiques. Le pH optimal de 7, la température optimale de 40°C pour le milieu son de blé et 50°C pour le milieu peptone de caséine, ces résultats indiquent que cette enzyme peut servir dans les applications technologiques telles que la boulangerie et biotechnologiques telles que la biologie moléculaire.

La principale étape sur laquelle devrait reposer l'amélioration de la sécrétion des protéases est l'optimisation du milieu de culture pour la fermentation. Pour cela, une matrice de Plackett-Burman a été employée afin d'accroître de façon substantielle l'activité protéolytique obtenue dans les milieux contenant que le son de blé en analysant l'effet d'un



ensemble de facteurs (température, pH, substrat) sur la croissance fongique, production enzymatique et de protéines.

L'analyse statistique des résultats révèle que la production de la protéase est influencée par la présence des facteurs suivants : température, pH, substrat.

Par ailleurs, le plan du Plackett-Burman nous a permis de sélectionner la température, pH, substrat, comme facteurs favorisant la production de l'enzyme protéolytique.

Cependant, il reste plusieurs travaux à mener afin de répondre aux questions soulevées lors de cette étude et afin de poursuivre l'optimisation du procédé. Les recommandations pour des travaux ultérieurs sont les suivantes :

- Détermination des optima des facteurs sélectionnés suivant un autre plan statistique composite centré, du Box-Wilson par exemple.
- Il serait souhaitable d'entreprendre la caractérisation des protéases produites.
- Une étude d'extraction et de purification des protéases devra aussi être entreprise afin d'en vérifier la faisabilité.
- Pour une exploitation industrielle, il est nécessaire de réaliser des cinétiques en « Scall Up » (en fermenteur de 20 L, en fermenteur de 50 L et en fermenteur de 100 L), pour s'assurer de la stabilité de l'enzyme en conditions industrielles.

**Aguilar C.N., Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán P.A., Rodríguez-Herrera R., Martínez-Hernandez J.L., Contreras-Esquivel J.C., 2008.** Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American J. Biochem. Biotechnol.*, **4**(4); 354-366.

**Alais C. (1975).** Sciences du lait. Principes et techniques laitières. Masson. Paris. P. 108-645.

**Assamoi A. A., Destain J., Thonart P., 2009.** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13**(2) : 281–294.

**Aviron-Violet P., Baret J.L., Bertrand C., Blazy B., Bouvier F., 1982.** Les enzymes : Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. pp. 23; 123; 140–153.

**Bergmeyer H.U., Gawekn K., et al., 1979.** Principes de l'analyse enzymatique. Tech. Et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 17.

**Bidochka M.J et Small C., 2005.** Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: F.E. Vega & M. Blackwell (Eds.) *Insect-Fungal Associations*. 28-49. Oxford University Press Inc., New York.

**Bischoff J.F., Rehner S.A et Humber R.A., 2009.** A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage, *Mycologia*, **101** : 512-530.

**Boiron P., 1996.** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.

**Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. 2<sup>ème</sup> édition. Masson. Paris. pp. 16-41; 110; 364.

**BURGES, H.D. et HUSSEY, N.W., 1971.** Microbial Control of Insects and Mites. Academic Press, New York, 861 p.

**Calk P., Takaç S., Calk G. & Ozdamar T. H., 2000.** Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enz. Microbiol. Technol.* **26** (1): 45-60.

**Chellappan S., Jasmin C., Soorej Basheer M., Elyas K. K., Sarita Bhat G. and Chandrnasekaran M., 2006.** Production, purification and partial characterization of a novel

protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41: 956-961.

**Clarke P. H. et Steel K. J., 1966.** Rapide and simple biochemical tests for bacterial identification. Academic press. London. P.111.

**Coral G., Arikan B., Ünalı M.N. etGüvenmez H., 2003.** Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of Microbiology*, 53 (4): 491-498.

**Cousin D., Matagne A., Laemmli U. K. & Stewart D. J., 1982.** The purification of neutral bacterial proteases *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **34**: 1157-1166.

**Dalev P.G., 1994.** Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresour. Technol.*, **48**; 265–267.

**Delarras C., 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Lavoisier, pp. 318-319.

**Desmazeaud M., 1978.** Enzymes des microorganismes intervenant dans l'affinage des fromages. XXème Cong. Intern. Lait. Paris.

**Drouin M., 2005.** Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de *Maître ès sciences* (M.Sc.). Canada.

**Frankena J., Koningstein G.M., Van Verseveld H.W., Stouthamer A.H., 1986.** Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24; 106-112.

**Frazier W.C., 1967.** Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429.

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

**Gessesse A., Hatti-Kaul R., Berhanu A.G., Mattiasson B., 2003.** Novel alkaline proteases from alkalophilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme Microb. Technol.*, 32; 519- 524.

**Guiraud J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. pp. 79.

- Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P., 2002.** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**; 15–32.
- Hames B. D., Hooper N. M. et Houghton J. D., 2006.** L'essentiel en biochimie. Ed BERTI Editions, Paris, P.413.
- Hajji M., Kanoun S., Nasri M., Gharsallah N., 2007.** Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Proc. Biochem.*, **42**; 791–797.
- Ichida J.M., Krizova L., Lefebvre C.A., Keener H.M., Elwell D.L., Burt Jr E.H., 2001.** Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. Microbiol. Methods.*, **47**; 199–208.
- IGNOFFO, C.M., 1988.** CRC Handbook of Natural Pesticides volume V Microbial Insecticides Part A Entomogenous Protozoa and Fungi. CRC Press, Inc. Florida, 272p.
- Ihara F., Yaginuma K., Kobayashi N., Mishiro K et Sato T., 2001.** Screening of entomopathogenic fungi against the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). *Appl. Entomol. Zool.* **36** (4): 495-500.
- Inglis G.D., Goettel M.S, Butt T.M et Strasser H., 2001.** Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI Publishing, Wallingford, UK, 23–55.
- Kresze G. B., 1991.** Proteases during purification. *Bioprocess-technol.* **12** : 85-120.
- Kole M., Draper I., Donald F.G., 1988.** Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen-controlled, glucose fed-batch fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**; 404-408.
- Kudrya V.A., Simonenko I.A., 1994.** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**; 505–509.
- Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G., 2008a.** Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresour. Technol.*, **99**; 2364–2372.
- Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R., Bhalla T.C., 2008b.** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.*, **3**(12); 661–672.

**Laxman R.S., Sonawane A.P., More S.V., Rao B.S., Rele M.V., Jogdand V.V., Deshpande V.V., Rao M.B., 2005.** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidibolus coronatus*. *Proc. Biochem.*, **40**; 3152–3158.

**Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O., 2001.** Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc.Eng.*, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.

**McKenzie H.A., 1971.** Milk proteins chemistry and molecular biology. (Ed) Berkeley square. London. P. 246-249.

**Moodie P., 2001.** Traditional baking enzymes-proteases. *Enzyme Development Corporation*.**212** :736-1580.

**PAIS, M., DAS, B.C. et FERRON, P. 1981.** Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry*, 20: 715-723.

**Parakash B et Padmaja., 2012.**Substrate effects and abiotic factors influencing protease enzyme production in the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *African.J.Biotechnol.*

**Paranthman R., Alagusundaram k. et Indhumathi J., 2009.** Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*.5 (3).308-312.

**Patel R., Dodia M., Singh S.P., 2005.** Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.*: Production and optimization. *Proc. Biochem.*, **40**; 3569–3575.

**Pelmont J., 1995.** Enzymes : catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. pp. 7; 621; 652–654.

**Perry J.J., Staley J.T., Lory S., 2004.** Microbiologie. Sinauer associates. Paris. pp. 575–576.

**Rai S.K., Mukherjee A.K., 2010.** Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04.*Biochem.Eng. J.*, **48**; 173–180.

**Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.*Microbiol.Mol. Biol. Rev.*, **62**; 597–635.

**Sandhya C., Nampoothiri K.M., Pandey A., 2005a.** Microbial proteases. *Methods Biotechnol.*, **17**; 165–179.

**Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G. and Pandey A., 2005.** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation *Process Biochemistry*. **40**. 2689-2694.

**Scriban R., 1993.** Biotechnologie. 4eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P. 30-695.

**Singh A., Ghosh V. K and Ghosh P., 1994.** Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters in Applied Microbiology*, **18**: 177-180.

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

**Trap C. &Boireau P., 2000.** Les protéases chez les helminthes. *Vet. Res.* **31** : 461-471.

**Tsuchida O.Y., Yamagata T., Ishizuka T., Aria J., Yamada-Takeuchi M., Ichishima E., 1998.** An alkaline protease of an alkalophilic *Bacillus sp.* *Curr. Microbiol.* **14**: 7-12.

**Tunga R., Shrivastava B., Banerjee R., 2003.** Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Proc. Biochem.* **38**. 1553-1558.

**Ul-Haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A. &Quadeer M. A., 2003.** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology* **2** (1): 30-36.

**VEY, A. 1989.** Toxines de champignons pathogènes d'insectes et d'acariens. Conférence à l'U.Q.T.R.

**Walker G.M., White N.A., 2005.** Introduction to Fungal Physiology in Kavanagh K., *Fungi: Biology and applications*. John Wiley & Sons Ltd. England. pp; 2.

**Zimmermann G., 2007.** Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontr. Sci. Technol.* **17** :879-920.

## Milieux de culture

- **Lait gélosé**

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

La composition chimique de ce milieu en 950 d'eau distillé est

Lait.....10,5g

Agar.....13,5g

pH = 7

- **Sabouraud Peptone de caseine**

La composition du milieu de fermentation par litre est :

Peptone de Caséine.....20g

Glucose.....10g

pH = 6.8

This work articulates himself around the production of fungal protease, an enzyme of industrial interest, to wit: Human and animal feeding, pharmaceutical and medical industry and on everything the industry of the detergents.

The study of the proteolytic activity produced on skim milk Agar that the strain *Metarhizium anisopliae* gave weak zones of hydrolysis in the first days, go in 4th and the 6th gave diameters varying between 22 and 30 mm. The production of proteases was realised on two different middles, the sound of wheat and the peptone of casein. The production of the enzyme is estimated by the measuring-out of the proteolytic activity. The results obtained revealed that the strain *Metarhizium anisopliae*, gave an excellent activity reaching 620UI tipped of the eighth day in fermentation for the middle peptone casein tipped and 411 UI of the fifth day for the middle sound of wheat. The proteolytic activity was studied concentration at different; 2% 3%; 4%; 5% and 3% the results gave one better activity 449 UI is produced in the middle at 6%.The study of the optima of pH and of temperature of incubation showed that protease produces by *Metarhizium anisopliae* Has optimum equal pH at 7 and one optimal temperature of 50°C for the middle peptone of casein and has optimum equal to 7 pH and an optimal temperature of 40°C argument for sound of wheat.

Experimental answer writes temperature, pH, and substrate with three mailmans selection under the shape of an equation of the first degree.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae*, fermentation, protease, proteolytic activity.



إن هذا العمل يدور حول إنتاج إنزيم البروتياز الفطري، و الذي يعتبر إنزيم ذو أهمية صناعية سواء في تغذية الإنسان و الحيوان أو في الصناعة الصيدلانية و الطبية و خاصة صناعة المنظفات..

أظهرت دراسة النشاط الإنزيمي " بروتوليتيك " التي تنتجها في وسط الحليب الجيلوزي أن سلالة *Metarhizium anisopliae* أعطى مناطق التحلل البروتيني المنخفض في الأيام الأولى، بين الرابع والسادس أعطت أقطار تتراوح من 22 إلى 30 ملم. إنتاج إنزيم البروتياز أجري على وسطين مختلفين نخالة القمح وبيتون الكازين. ويقدر إنتاج الإنزيم بالمعايرة للنشاط بروتوليتيكي. وكشفت النتائج أن سلالة *Metarhizium anisopliae* يعطي نشاط ممتاز التوصل إلى UI 620 في نهاية اليوم الثامن للتخمير للوسط بيتون الكازين وأعطت UI411 في نهاية اليوم الخامس للوسط نخالة القمح. تمت دراسة النشاط بروتوليتيكي بتركيزات مختلفة من نخالة القمح 2%، 3%، 4%، 5% و 6% وأعطى نتائج أفضل في الوسط ذو التركيز 3% (UI 449). كما أن دراسة درجة الحموضة ودرجة الحرارة المناسبين للحضن أظهرت أن إنزيم البروتياز ينتج من طرف *Metarhizium anisopliae* في درجة حموضة مثلى من 7 ودرجة حرارة قصوى من 50 درجة مئوية في الوسط بيتون الكازين ودرجة حموضة مثلى من 7 وأقصى درجة حرارة 40 درجة مئوية لنخاله القمح. الرد التجريبي مكتوب في شكل معادلة من الدرجة الأولى باختيار ثلاثة عوامل و هي درجة الحرارة ودرجة الحموضة والمادة الاساسية.

الكلمات المفتاحية : بروتياز، *Metarhizium anisopliae* ، نشاط إنزيمي " protéolytique " ، تخمر.

**Thème:**

**Etude des paramètres physico-chimiques de la production de protéase par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*.**

**Résumé:**

Ce travail s'articule autour de la production d'une protéase fongique, une enzyme d'intérêt industriel, à savoir : alimentation humaine et animale, industrie pharmaceutique et médicale et sur tout l'industrie des détergents.

L'étude de l'activité protéolytique produite sur le lait gélosé a montré que la souche *Metarhizium anisopliae* a donné des zones d'hydrolyse faibles dans les premiers jours, entre le 4ème et le 6ème a donnée des diamètres variant entre 22 et 30 mm. La production de protéases a été réalisée sur deux milieux différents, le son de blé et la peptone de caséine. La production de l'enzyme est estimée par le dosage de l'activité protéolytique. Les résultats obtenus ont révélé que la souche *Metarhizium anisopliae* a donné une excellente activité atteignant 620UI au bout du huitième jour de fermentation pour le milieu peptone de caséine et 411 UI au bout du cinquième jour pour le milieu son de blé. L'activité protéolytique a été étudiée à des différentes concentrations du son de blé 2%, 3%, 4%, 5% et 6%. Les résultats ont donné une meilleur activité (449 UI) est produite dans le milieu à 3%.L'étude des optima du pH et de température d'incubation a montré que la protéase produite par *Metarhizium anisopliae* a un pH optimum égal à 7 et une température optimale de 50°C pour le milieu peptone de caséine et a un pH optimum égal à 7 et une température optimale de 40°C pour le son de blé.

La réponse expérimentale s'écrit sous la forme d'une équation du premier degré avec la sélection de trois facteurs température, pH, substrat.

**Mots clés:** *Metarhizium anisopliae*, Protéase, fermentation, Matrices de PLACKETT et Burman.

**Laboratoire de recherche** Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie, et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université des frères Mentouri de Constantine.

**Jury d'évaluation:**

Présidente du jury : Mme. MIHOUBI I.

Pr.UFM.Constantine.

Encadreur : Mme. Benserradj O.

Dr Centre universitaire de Mila.

Examinatrice : Melle. Bataiche I.

Dr. UFM.Constantine.

**Date de soutenance: 26/06/2016**