



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 Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département : Microbiologie**

**قسم : ميكروبيولوجيا**

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

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biotechnologie des Mycètes / Fermentation et production de substances fongiques.**

## **Intitulé:**

---

**Optimisation d'un milieu de culture à base de dattes déclassées pour la production d'une protéase acide par *Aspergillus niger***

---

**Présenté et soutenu par : HABIBATNI Amina**

*Le : 19/06/2017*

**SAMAI Meriem**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury:** Mme LEGHLIMI Hind. Maître de conférences B. Université Constantine 1.

**Rapporteur :** Mme BENKAHOUL Malika. Maître de conférences B. Université Constantine 1.

**Examineurs :** Mme ABD LAZIZ Ouided. Maître assistant A. Université Constantine 1.

*Année universitaire  
2016 - 2017*

# Remerciement

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie et Environnement au biopôle de Chaab-Ersass, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri Constantine.*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer toute nos reconnaissances et notre profond respect à notre Directrice de mémoire, Mme. BENKAHOUL M., Maître de conférences à l'université Mentouri Constantine, pour sa patience, ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont on a pu bénéficier.*

*Nous tenons à exprimer notre grande considération et nos sentiments de reconnaissance à Mme LEGHLIMI Hind Maître de conférences à l'université Mentouri Constantine, qui nous fait l'honneur de présider ce jury.*

*C'est avec un très grand plaisir que nous remercions infiniment Mme. ABD Laziz OUIDED Maître assistant à l'université Mentouri Constantine, d'avoir bien voulu juger ce modeste travail, qu'elle trouve ici notre profonde gratitude.*

*Nous adressons nos chaleureux remerciements à Mme. GHORI SANA, pour ses précieux conseils, ses encouragements, aussi à Mme BEL MASSIKH et Mme ALMI pour leur aide et leur gentillesse.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à l'encontre de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# *Dédicace*

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

*Je dédie ce travail à :*

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

*A mon frère Ayoub.*

*A ma sœur Malek.*

*A ma grande mère Massaouda.*

*A toute ma grande famille.*

*A toutes mes amies.*

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

*A tous mes camarades d'études.*

*Meriem*

# *Dédicace*

*Avant toute personne, je remercie ALLAH de m'avoir donné le courage, la patiente, et la volonté pour réaliser ce travail.*

*Je dédie ce travail à :*

*Ma chère mère Habiba.*

*Mon père Lazher.*

*A ma sœur Hadjer.*

*A mes frères Salah el dinne et Taki el dinne.*

*A ma grande mère Fatima*

*A tous mes amies.*

*A toute promotion.*

*A tous ceux que j'aime.*

*Amina*

# Table des matières

## *Les abréviations*

## *Liste des figures*

## *Liste des tableaux*

## *Introduction*.....1

## *Revue bibliographique*

### *Chapitre I : Les moisissures*

|  |   |
|--|---|
| 1. Généralité.....                               | 3 |
| 2. Conditions de croissance des moisissures..... | 5 |
| 3. Applications des moisissures.....             | 5 |
| 3.1 Production industrielle des enzymes.....     | 5 |

### *Chapitre II : Aspergillus*

|  |    |
|--|----|
| 1. Le genre <i>Aspergillus</i> .....                       | 7  |
| 2. <i>Aspergillus niger</i> .....                          | 8  |
| 2.1 Taxonomie.....   | 8  |
| 2.2 Morphologie.....                                       | 9  |
| 2.2.1 Aspect macroscopique.....                            | 9  |
| 2.2.2 Aspect microscopique.....                            | 9  |
| 2.3 Habitas .....  | 10 |
| 2.4 Métabolites.....                                       | 10 |
| 2.4.1 Diverses enzymes produites par <i>A. niger</i> ..... | 11 |

### *Chapitre III : Les enzymes protéolytiques*

|  |    |
|--|----|
| 1. Généralité.....   | 12 |
| 2. Définition.....   | 12 |
| 3. Protéases microbiennes.....                               | 12 |
| 4. Classification.....                                       | 13 |
| 4.1 Selon longueur de la chaîne polypeptidique.....          | 13 |
| 4.2 Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique..... | 13 |

|   |    |
|---|----|
| 4.3 Selon la nature du site catalytique .....     | 15 |
| 4.4 Selon le pH d'activité .....                  | 16 |
| 5. Mode d'action.....                             | 16 |
| 6. Applications des protéases.....                | 16 |
| 6.1 Alimentaire.....                              | 16 |
| 6.2 Médicale et pharmaceutique.....               | 17 |
| 6.3 Détergents.....                               | 17 |
| 6.4 Autres applications.....                      | 17 |
| 7. Production des protéases par fermentation..... | 18 |
| 7.1 Fermentation sur milieu liquide.....          | 18 |
| 7.2 Fermentation sur milieu solide.....           | 18 |

### ***Chapitre IV: Les dattes***

|  |    |
|--|----|
| 1. Généralité.....                         | 19 |
| 1.1 Palmiers dattiers.....                 | 19 |
| 1.2 Répartition des palmiers dattiers..... | 19 |
| 2.La datte.....                            | 20 |
| 2.1 Définition.....                        | 20 |
| 2.2 Développement .....                    | 20 |
| 2.3 Composition de la datte .....          | 21 |
| 2.4 Valorisation des dattes.....           | 22 |
| 2.5 Les déchets de dattes.....             | 23 |
| 3. Méthodes d'optimisation.....            | 23 |
| 3.1 Modèle Plackett-Burman.....            | 24 |

### ***Matériel et méthodes***

|  |    |
|--|----|
| 1. Matériels biologiques.....                        | 25 |
| 1.1 Mise en évidence des souches protéolytiques..... | 25 |
| 1.2 La fermentation .....                            | 25 |
| 1.2.1 L'inoculum.....                                | 25 |
| 1.2.2 Dénombrement des spores.....                   | 26 |

|   |    |
|---|----|
| 1.2.3 Préparation des milieux de fermentation .....   | 26 |
| 2. Méthode statistique .....                          | 28 |
| 2.1 Plan expérimental (Plackett et Burman, 1946)..... | 28 |
| 3. Conduite de la fermentation.....                   | 31 |
| 3.1 Détermination de la biomasse.....                 | 31 |
| 3.2 Dosage de l'activité protéolytique.....           | 31 |
| 3.3 Dosage des protéines.....                         | 33 |

### ***Résultats & Discussion***

|  |    |
|--|----|
| 1. Réactivations des souches.....  | 35 |
| 2. Mise en évidence de l'activité protéolytique.....   | 36 |
| 2.1 Sélection de la souche.....  | 36 |
| 3. L'optimisation de la production de la protéase acide par la méthode de Plackett et<br>Burman..... | 38 |
| 3.1. Les résultats de biomasse .....   | 38 |
| 3.2. Résultats du pH.....  | 39 |
| 4. L'effet des facteurs .....  | 40 |
| 4.1 Effet sur la biomasse.....   | 44 |
| 4.2 Effet sur la protéase acide.....   | 46 |
| 4.3 Effet sur les protéines.....   | 48 |
| 5. Expression des réponses sous forme d'équation.....  | 50 |

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| <b><i>Conclusion</i></b> ..... | 51 |
|--------------------------------|----|

|   |    |
|---|----|
| <b><i>Références bibliographiques</i></b> ..... | 52 |
|---|----|

### ***Annexes***

### ***Résumés***

***Liste***  
***Des Figures***  
***Des Tableaux***  
***Des Abréviations***



**A** : *Aspergillus*.

**aw** : Activity of Water.

**B.I.E** : blocs incomplets équilibrés.

**BSA** : Bovine Serum Albumin.

**CEA** : Champignons Endomycorhiziens à Arbuscules.

**CSL** : Corn Steep Liquor.

**E.C** : Enzyme Commission.

**Fig** : Figure.

**PDA** : Potato dextrose agar.

**pH** : potentiel d'Hydrogène.

**rpm** : round per minute.

**SmF** : Submerged Fermentation.

**SSF** : Solid state fermentation.

**TCA**: TriChloroacetic Acid.

**UI** : Unité internationale.

**Φ** : diamètre.

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Principales classes des moisissures.....                                 | 4  |
| <b>Figure 2</b> : Cycle de développement des champignons du genre <i>Aspergillus</i> ..... | 7  |
| <b>Figure 3</b> : .Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i> .....       | 10 |
| <b>Figure 4</b> : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....                          | 14 |
| <b>Figure 5</b> : Formation et maturation de la datte.....                                 | 20 |
| <b>Figure 6</b> : possibilités de valorisation industrielle des dattes.....                | 22 |
| <b>Figure 7</b> : Préparation de milieu de base.....                                       | 28 |
| <b>Figure 8</b> : Réactivation de la souche <i>Aspergillus niger</i> .....                 | 36 |
| <b>Figure 9</b> : Réactivation de la souche <i>Rhizopus sp</i> .....                       | 36 |
| <b>Figure 10</b> : Réactivation de la souche <i>Paecilomyces sp</i> .....                  | 36 |
| <b>Figure 11</b> : Réactivation de la souche <i>Trichoderma sp</i> .....                   | 36 |
| <b>Figure 12</b> : Aspect d' <i>Aspergillus niger</i> sur culture liquide.....             | 39 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1</b> : Quelques exemples d'enzymes industrielles et de microorganismes producteurs.....                              | 6  |
| <b>Tableau 2</b> : Classification des protéases.....   | 15 |
| <b>Tableau 3</b> : Le teneur en eau de quelques variétés de dattes de la région fliache (biskra). .....                          | 21 |
| <b>Tableau 4</b> : structure de plan de Plackett et Burman pour l'étude des 7 facteurs.....                                      | 29 |
| <b>Tableau 5</b> : Générateur des matrices pour N=8, 12,16 et 20 essais selon Plachet et Burman 1946.....                        | 29 |
| <b>Tableau 6</b> : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs.....                                       | 30 |
| <b>Tableau 7</b> : Mise en évidence de l'activité protéolytique sur le lait gélosé des quatre souches.....                       | 37 |
| <b>Tableau 8</b> : Les variations de pH .....  | 39 |
| <b>Tableau 9</b> (a,b,c) : biomasse sèche, activité protéolytique et protéines produites selon le plan de Plackett etBurman..... | 41 |
| <b>Tableau 10a</b> : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de la biomasse.....                      | 43 |
| <b>Tableau 10b</b> : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de la protéase acide.....                | 45 |
| <b>Tableau 10c</b> : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production des protéines.....                       | 49 |

# *Introduction*

La palmeraie algérienne représente le pivot de l'écosystème oasien à travers l'importance de sa production. En effet, selon les statistiques du Ministère de l'agriculture, la production nationale a atteint 387 313 tonnes en 1998 dont 116.000 tonnes de déchets qui peuvent être récupérées et transformées (Bessah et Touzi, 2001).

Ces dattes sont très riches en sucres allant de 60 à 80% du poids de la pulpe fraîche (Siboukeur, 1997 a) et une teneur en eau qui varie entre 15 et 20% selon les variétés (Noui, 2007). Elles sont en revanche pauvres en protéines et en matières grasses (0,43 et 1,9% du poids frais) (Djouab, 2007). Le fruit des dattes contient pratiquement la plupart des éléments minéraux (potassium, calcium, phosphore, magnésium, fer, soufre etc.). Il est riche en fibres (8,1 à 12,7% du poids sec) (Al-Shahib et Marshall, 2002).

Afin de trouver un débouché des dattes déclassées, il est nécessaire de les valoriser pour la production d'autres substances à fortes valeurs ajoutées. En effet, plusieurs produits ont été obtenus à partir de ces déchets tel que l'acide citrique (Roukas et Kotzekidou, 1991) l'alcool et la production enzymes (Mehaia et Cheryan, 1991).

La production d'enzymes industrielles exige l'utilisation de milieux de cultures pas chère 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 obtenu aussi bien par l'utilisation des résidus agro-industriels disponibles et bon marché que par l'optimisation des conditions nutritionnelles et physicochimiques de la culture.

Les possibilités de développement des micro-organismes sont liées à leur équipement enzymatique et au substrat à transformer. Le mode d'accès à l'énergie (source de carbone) diffère selon les espèces (Godon, 1996.). Il est à rappeler que le genre *Aspergillus* en particulier *Aspergillus niger* est très utilisé dans la production de grandes variétés d'enzymes dans différentes industries entre autre l'industrie alimentaire (Gregory et *al.*, 1993).

*Aspergillus niger* représente le microorganisme de choix à l'échelle industrielle pour sa facilité de culture, sa stabilité génétique, ses rendements élevés, sa capacité d'utilisation de matériel à bon marché et l'absence de métabolites indésirables (Zergat, 1996). L'optimisation de la production d'enzyme est un objectif très important dont le but est d'améliorer davantage le processus de production. De ce fait, l'application d'une méthode

statistique expérimentale s'avère indispensable. ( Djekrif-Dakhmouche et *al.* 2006)

Dans notre cas, ces déchets ont été testés comme milieu de production de la protéase acide par *Aspergillus niger* et l'optimisation de la production de cette enzyme par fermentation sur milieu liquide avec l'application des plans d'expériences à l'optimisation afin d'évaluer l'influence des facteurs étudiés et de modéliser la production.

Notre travail consiste en premier lieu à identifier la meilleure activité protéolytique présentée par quelques souches disponibles au niveau de nos laboratoires de recherche en particulier, celui de la mycologie. Ensuite la souche la plus performante est retenue pour la suite des manipulations qui consiste à optimiser le milieu de base constitué à partir de déchets de dattes. L'optimisation est réalisée par l'utilisation du plan statistique de Plackett et Burman 1946, afin de sélectionner les facteurs à effets positif et significatif aussi bien sur la production de la protéase que sur la biomasse.

*Chapitre I*  
*Les moisissures*

## **1-Généralités**

Les moisissures désignent tous les champignons microscopiques eucaryotes, filamenteux et pluricellulaires du règne des mycètes. Dépourvus de chlorophylle, les moisissures sont hétérotrophes et doivent tirer leur énergie des composés organiques (Regnault, 1990).

Les moisissures possèdent un appareil végétatif constitué par un thalle filamenteux, le mycélium, dont les filaments s'appellent des hyphes. Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores (Bourgeois, 1989).

La reproduction s'effectue par germination de spores. Les spores mures sont libérées des appareils sporifères et disséminées. Une spore germe et émet un filament, ou hyphe, qui croît, s'allonge par l'extrémité apicale et se ramifie pour donner un nouveau mycélium. Il existe deux types de reproduction : sexuées et asexuées.

Le mode de vie des moisissures est généralement saprophytique, celles-ci se développent aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois, 1996).

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (Davet, 1996). Les Eumycètes (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures (Bourgeois, 1989), à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (Figure 1).



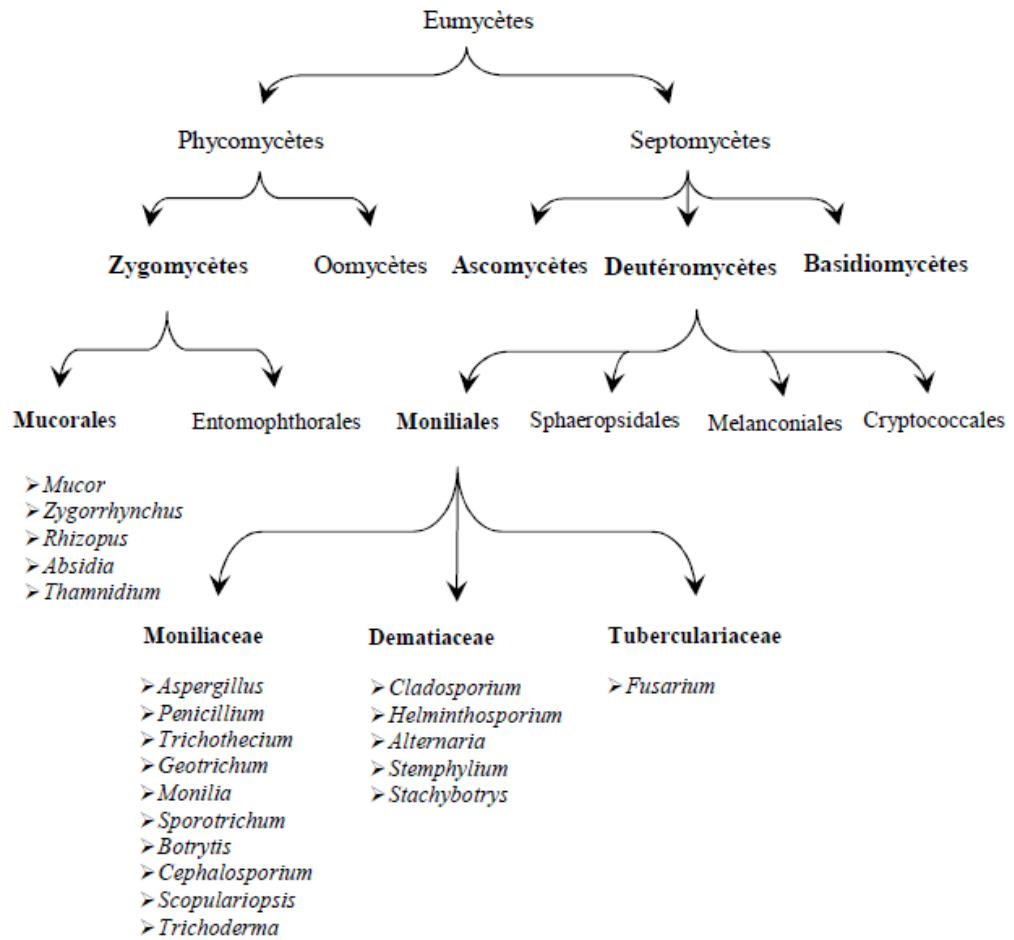


Figure 1 : Principales classes des moisissures (Frazier, 1967)

## 2-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 majorité des moisissures sont aérobies strictes et se développent bien en l'absence de lumière. Elles tolèrent des teneurs en eaux très faibles. Elles ont un métabolisme très actif, lié à leur production enzymatique variée et intense (Delarras, 2007).

Beaucoup de moisissures sont utilisées par l'homme 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).

## 3-Applications des moisissures

### 3.1- Production industrielle des enzymes

Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondial des enzymes industrielles (tableau1). Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, *etc.* (Frazier, 1967 ; Ul-haq *et al.*, 2003).

**Tableau1 :** Quelques exemples d'enzymes industrielles et de microorganismes producteurs. (Aviron-Violette *et al.*, 1982).

| Type d'enzyme | Microorganismes utilisés  | Utilisations  |
|---------------|---|---|
| Amylase       | <i>Aspergillus oryzae</i><br><i>Aspergillus flavus</i> ,<br><i>Aspergillus roqueforti</i> ,<br><i>Aspergillus niger</i><br><i>Rhizopus spp.</i><br><i>Bacillus subtilis</i>   | -Saccharification de l'amidon.<br>-Boulangerie, conserve de fruits, textiles, papeterie<br>-Industries alimentaires.<br>-Industries alimentaires. |
| Invertase     | <i>Saccharomyces carlbergensis</i>  | -Confiserie.  |
| Protéases     | <i>Aspergillus oryzae</i> ,<br><i>Aspergillus flavus</i> ,<br><i>Aspergillus mucor</i><br><i>Bacillus subtilis</i><br><i>Pseudomonas Putida</i><br><i>Clostridium spp.</i><br><i>Bacillus licheniformis</i> ,<br><i>Bacillus subtilis</i> | - Hydrolyse de protéines.<br>-Clarification de la bière.<br>-Tannerie.<br>-Blanchisserie.<br>-Détergents.   |
| Cellulases    | <i>Trichoderma kanungi</i> ,<br><i>Myrothecium verrocarium</i>  | -Dégradation des aliments cellulosiques et textiles.  |

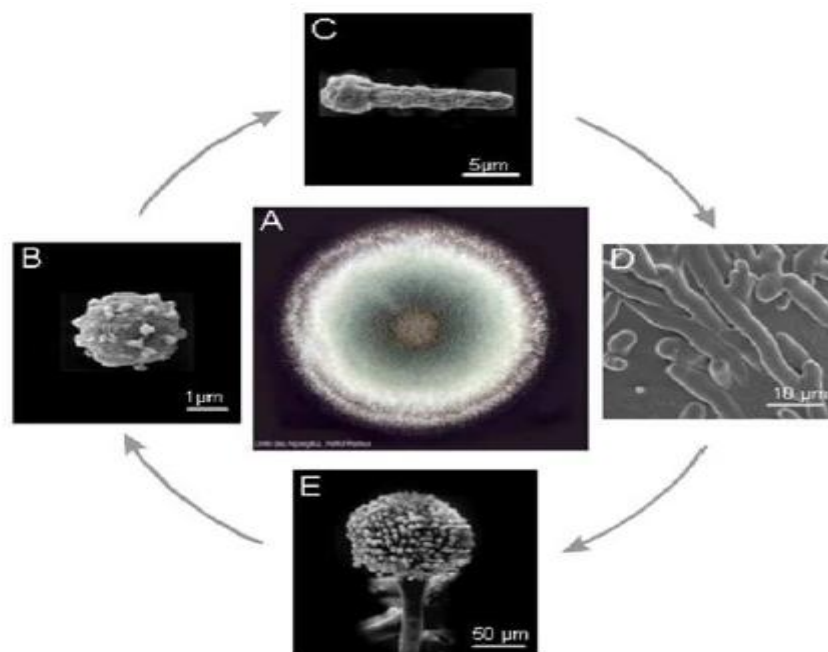
*Chapitre II*  
*Aspergillus*

## 1-Le genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des ascomycètes. Près de 150 espèces d'*Aspergillus* sont connus et réunis en 18 groupes par Raper et Fennel, (1965).

Ces moisissures sont très répandues et se développent sur toute sorte de substrat, certains acceptent de vivre dans des conditions de sécheresse particulièrement sévères. (Moreau ,1978).

La majorité des *Aspergillus* sont à croissance rapide sur milieu de culture classique (Sabouraud, CEA, PDA, Gélose au MALT ...) à 20-25 °C, les espèces thermophiles (*A.fumigatus*) se développent à 37-40° C et parfois jusqu'à 57°C(Badillet *et al.* , 1987).



**Figure 2 :** Cycle de développement des champignons du genre *Aspergillus* (adapte de Desoutter, 2008).

Dans l'environnement, les *Aspergillus* se multiplient presque exclusivement sur un mode asexué. Dans les conditions optimales de développement et de multiplication, les conidies germent (C) et le mycélium ainsi obtenu (D) se couvre de têtes aspergillaires (E) qui produisent des milliers de conidies microscopiques (B) (Figure 2) (Adams, 1994 ; Adams *et al.*, 1998).

Le genre *Aspergillus* est caractérisé morphologiquement par la présence de filaments conidiospores renflés à leur sommet par une vésicule partiellement couverte de phialides fixées ou non à des métules, le tout formant une entité spécifique appelée ((tête aspergillaire)) (Chermette et Bussieras, 1993).

Les espèces d'*Aspergillus* servent à la production à grande échelle d'enzymes industriellement précieuses telles que les cellulases, les pectinases, les xylanases, les amylases, les glucoamylases et les protéases (Murphy et Horgan, 2005; Ward et al., 2006). Les protéases sont également produites par plusieurs espèces d'*Aspergillus*; *A. oryzae* (Sandhya et al., 2005b); *A. fumigatus* (Wang et al., 2005b), *A. terreus* (Wu et al., 2006), *A. parasiticus* (Tunga et al., 2003), *A. niger* (Singh et al., 1994; Paranthaman et al., 2009).

## **2-*Aspergillus niger***

### **2.1-Taxonomie**

La position systématique d'*A. niger* est résumée comme suit (Chabasse et al., 1999; Meyer et al., 2004) :

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Phylum :                  | <i>Tallophyta</i> (utilise le times)      |
| Sous-phylum :             | <i>Fungi (Mycota)</i>                     |
| Division de sous-phylum : | <i>Eumycota</i>                           |
| Subdivision :             | <i>Deuteromycotina</i> (Fungi imperfecti) |
| Classe :                  | <i>Hyphomycètes</i> (forme filamenteuse)  |
| Ordre :                   | <i>Moniliales</i>                         |
| Famille :                 | <i>Moniliaceae</i>                        |
| Sous-famille :            | <i>Hyalosporae</i>                        |
| Tribu :                   | <i>Aspergilleae</i>                       |
| Genre :                   | <i>Aspergillus</i>                        |
| Espèce :                  | <i>Aspergillus niger</i>                  |

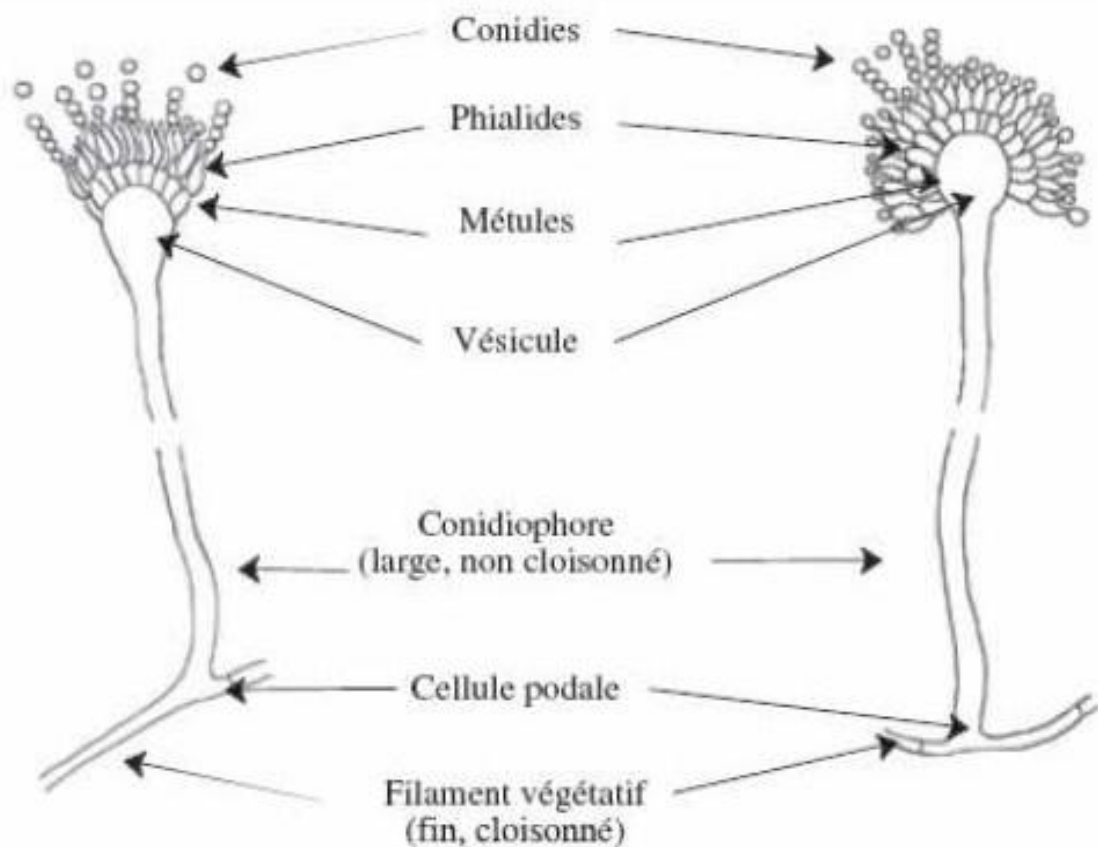
## 2.2-Morphologie

### 2.2.1-Aspect macroscopique

Les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunâtres et à maturité elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle montrant parfois des zones concentriques. (Guillaume, 2006).

### 2.2.2-Aspect microscopique

Les têtes conidiennes, bisériées et radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres à noires. Les conidiophores sont longs atteignant 1,5-3 mm, lisses à stipes non cloisonnés, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure, formés d'une cellule courte appelée cellule podale (*footcell*) avec un hyphe fertile. Les vésicules (50-70µm) sont globuleuses avec des têtes aspergillaires hémisphériques volumineuses, à panache radié. Les phialides (7-10 x 3-3,5 µm) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables (10-15µm). Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties de couleur brunâtre et qui mesurent 3,5 à 4,5 µm ; parfois jusqu'à 6 µm de diamètre (Figure 3) (Abraca *et al.*, 2004; Pasqualotto, 2010).



**Figure 3** .Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (Tabuc, 2007).

### 2.3-Habitas :

Il est très réparti dans les zones sombres et humides, les sols, le compost, pousse à la surface des matières organiques en décomposition, des denrées alimentaires, des sous-produits agricoles surtout les céréales et ses dérivés (son de blé, son de riz, bagasse...) (Guillaume, 2006 ; Leyral et Vierling, 2007; Pasqualotto, 2010).

### 2.4-Métabolites :

*L'Aspergillus niger* est l'un des microorganismes les plus importants utilisés en biotechnologie à cause de la variété des métabolites qu'il produit tel que l'acide citrique, l'acide oxalique, certains composés organique volatils (le 3-methyl-1-butanol) et des enzymes.



### **2.4.1-Diverses enzymes produites par *A. niger***

*Aspergillus niger* est très largement utilisé dans la production des enzymes commerciales vues les hautes productivités enzymatiques qui peuvent être atteintes (Iwashita, 2002 ; Bakhtiari *et al.*, 2006 ; Aftab *et al.*, 2007 ; Mhetras *et al.*, 2009). Les principales activités protéolytiques d'*A. niger* semblent être dues à des protéases extracellulaires acides, ce qui reflète l'adaptation de ce dernier aux milieux de croissance à pH acide. Grâce aux capacités hydrolytiques importantes d'*A. niger* et sa tolérance à l'acidité (pH<3).L'acidité permet d'éviter les contaminations bactériennes au cours des processus biotechnologiques (Jarai et Bouxton, 1994 ; Dekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006).

*Chapitre III*  
*Les enzymes*  
*protéolytiques*

## 1-Généralité

Les enzymes peuvent être classés selon leur mode d'action spécifique. En industrie, la classe d'enzyme la plus exploitée est celle des hydrolases. Parmi ces dernières, les protéases qui représentent le groupe le plus commercialisé dans le marché mondial des enzymes et le plus utilisées en biotechnologie industrielle. (Jaouadi *al.*, 2010).

## 2-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 hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites de façon extracellulaire ou intracellulaire (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 de régulation plus spécifiques (Kumar *et al.*, 2008a).

Ces enzymes peuvent être d'origines végétale (papaïne et bromeline), animal (chymosine, pepsine, trypsine et chymotrypsine) ou microbienne. Cependant la majorité des protéases commercialisées sont d'origine microbienne ( Jaouadi *et al.*, 2010).

## 3-Protéases microbiennes

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toute les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (Sandhya *et al.*, 2005b). Elles sont produites par une grande variété de bactéries dont, les actinomycètes, de moisissures et de levures (Devi *et al.*, 2008). Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial (Sandhya *et al.*, 2005b). Le grand succès des protéases microbiennes dans les systèmes biotechnologiques est attribué à la diversité biochimique très large, à la faisabilité de la culture de masse et à la facilité des manipulations génétiques (Ferrero, 2000; Wu *et al.*, 2006).

## **4-Classification**

D'une manière générale, les protéases sont classées selon plusieurs critères majeurs tout en se basant sur la localisation cellulaire, la nature du site catalytique, et selon l'activité de pH (Mathieu, 2005).

### **4.1-Selon longueur de la chaîne polypeptidique**

C'est le premier critère de classification des enzymes protéolytiques. Il existe deux catégories; les protéases, qui scindent la molécule protéique en fragments polypeptidiques et les peptidases qui hydrolysent les polypeptides et les transforment en acides aminés libres. (Frazier, 1967 ; Colwell et Grigorova, 1989).

### **4.2-Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique**

En fonction de leur mode d'attaque, les peptidases sont subdivisés en deux classes ; les endopeptidases et les exopeptidases (Scriban, 1999 ; Moodie, 2001). Ces dernières sont elles mêmes subdivisées en deux sous-classes les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Les aminopeptidases commencent leur action par l'extrémité NH<sub>2</sub> libre du polypeptide et leur activité dépend souvent de la présence d'ion métallique ; les carboxypeptidases attaquent l'extrémité COOH libre du polypeptide.) (Scriban, 1999 ; Trap et Boireau, 2000) ( Figure 4).

L'activation de ces différentes enzymes conduit à la libération de di et tri peptides qui sont ensuite hydrolysés en acides aminés (Scriban, 1999).

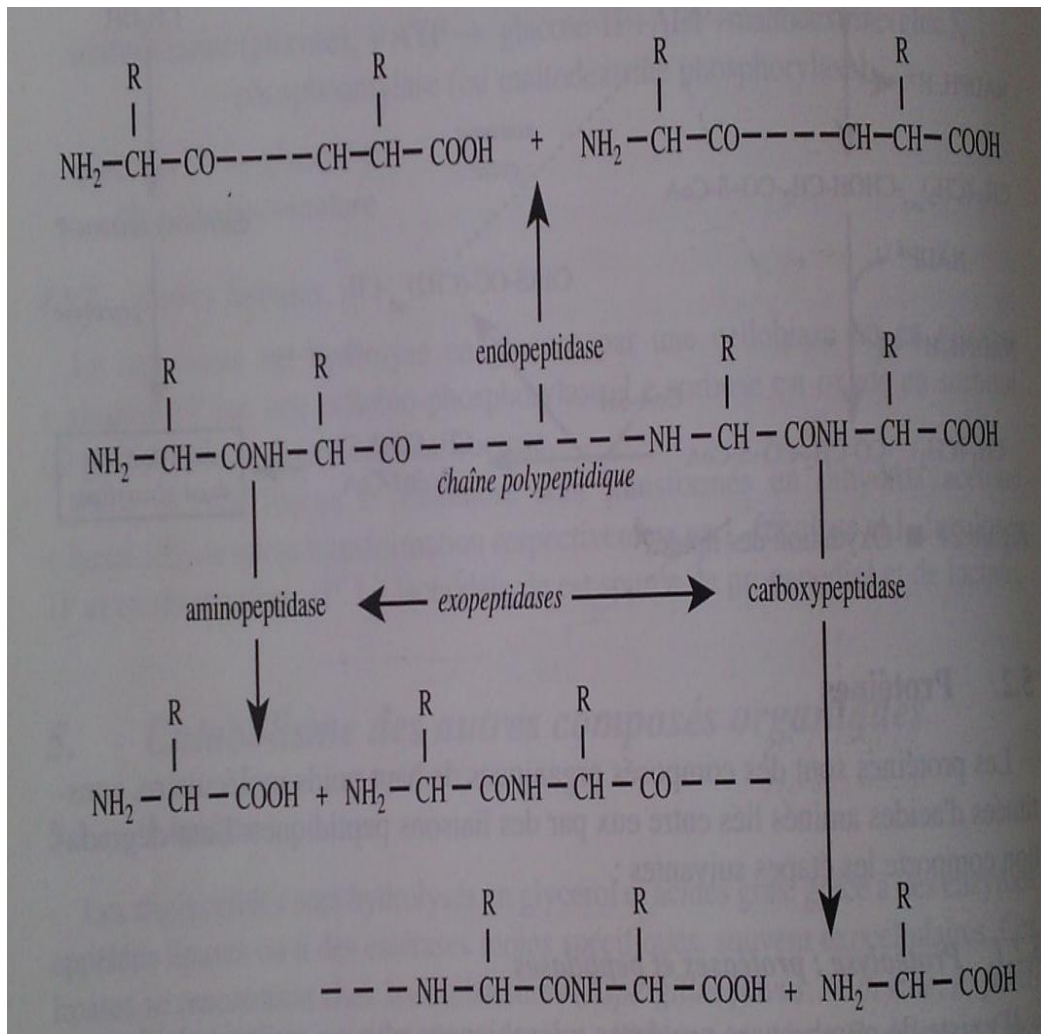


Figure 4 : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (Scriban, 1999).

### 4.3-Selon la nature du site catalytique

Les protéases se différencient également selon leur mode d'action (Tableau2).

**Tableau2** : Classification des protéases (Mala et al. 1998).

| <b>Types de protéases</b> | <b>Classes et sous-classes</b>   |
|---------------------------|--|
| <b>Exopeptidases</b>      | <p><b>Aminopeptidases</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptidyle peptidases</li> <li>• Dipeptidyle peptidases</li> <li>• Tripeptidyle peptidases</li> </ul> <p><b>Carboxypeptidases</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sérine carboxypeptidases</li> <li>• Métallocarboxypeptidases</li> <li>• Cystéine Carboxypeptidases</li> </ul> |
| <b>Endopeptidases</b>     | <p><b>Protéases à sérine</b></p> <p><b>Protéases cystéine ou protéases à thiols</b></p> <p><b>Protéases aspartique ou protéases acides</b></p> <p><b>Protéases thréonique</b></p> <p><b>Protéases glutamique</b></p> <p><b>Métallo protéases</b></p>   |

#### 4.4-Selon le pH d'activité :

Selon ce paramètre, les enzymes protéolytiques de différentes origines sont classées en trois groupes : des protéases acides, neutre et alcalines (Hartely, 1960 ; Martinelli et Kinghorn, 1994).

#### 5-Mode d'action

Le mode d'action des protéases diffère d'une enzyme à l'autre par la nature de leur site actif, bien qu'elles aient toutes le même principe de base. Ce processus catalytique est résumé dans trois étapes :

Dans les deux premières étapes, l'enzyme déforme la liaison peptidique et renforce-la polarité du carbonyle, qui facilite son attaque nucléophile conduisant à la formation d'une liaison covalente transitoire entre le morceau portant le carbonyle du substrat et l'enzyme avec la libération de l'autre morceau (le premier produit) protoné par un proton cédé d'un résidu enzymatique.

Dans la troisième étape, une nouvelle substitution nucléophile est exercée par le OH- d'une molécule d'eau et libère le deuxième produit de la réaction, où le site actif de l'enzyme se trouve régénérer par un proton de l'H<sub>2</sub>O (Pelmont, 1995).

#### 6-Applications des protéases

##### 6.1-Alimentaire

Les protéases alcalines, neutres et acides d'*Aspergillus* jouent aujourd'hui un rôle très important dans l'hydrolyse des protéines en peptides simples et en acide aminés, en particulier en acide glutamique qui caractérise la saveur des fermentations orientales (Loffler, 1986).

Les protéines industrielles jouent un rôle essentiel entre autre la maturation du fromage par le développement des propriétés organoleptiques (Loffler, 1986). L'addition des protéases exogènes permet de raccourcir le temps d'affinage des fromages (Cerning et al. 1984).

Les protéines fongiques sont quelque fois utilisées lorsque le gluten de la farine manque d'élasticité et s'oppose au développement du pain au cours de la fermentation panair. Les protéases fongiques ont une action beaucoup plus douce que les protéases bactériennes. En effet, ces dernières conduisent à une attaque trop importante du réseau

glutenique, celui –ci ne serait plus alors en mesure de retenir le gaz carbonique produit par la fermentation panaière (Durcrou, 1982).

### **6.2-Médicale et pharmaceutique**

Les protéases sont impliquées dans de nombreuses fonctions des cellules eucaryotes.

De plus, elles jouent un rôle critique dans la virulence des agents pathogènes (Colwell et Grigorova, 1989) et plus particulièrement des parasites.

L'ensemble des rôles clés protéolytiques dans la virulence parasitaires en font des cibles potentielles en thérapie et vaccination antiparasitaire.

Les protéases trouvent des utilisations illimitées dans les laboratoires de recherche. elles englobent l'hydrolyse des protéines pour isoler le matériel cellulaire, les analyses peptidiques et les peptides synthétisés (Germino et Bastia, 1984 ; Neu *et al.*, 1984).

### **6.3-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).

### **6.4-Autres applications**

Les protéases fongiques sont utilisées également en tannerie pour le confitage des peaux. Cette opération consiste à hydrolyser spécifiquement l'élastine, fibre protéique présente dans le derme dont l'hydrolyse conduit à des peaux plus souples ayant du prêtant (Durcrou, 1982).

Les protéases peuvent servir en alimentation animale soit pour améliorer directement la digestibilité des aliments, soit pour favoriser les fermentations anaérobies qui contribuent à augmenter la valeur alimentaire des ensilages (Durand et Monson, 1982).



## **7-Production des protéases par fermentation**

### **7.1-Fermentation sur milieu liquide**

La fermentation sur milieu liquide (en anglais : *submerged fermentation*, SmF) peut être considérée comme une violation de l'habitat naturel des microorganismes, en particulier les champignons. Elle consiste à faire croître les microorganismes sur un substrat nutritif liquide. Ce type de fermentation a été traditionnellement utilisé pour la production industrielle des enzymes, en raison de la facilité de contrôle des différents paramètres comme le pH, la température, l'aération, l'oxygène dissous et l'humidité. La fermentation submergée est généralement plus facile à exploiter de manière aseptique par rapport à la fermentation solide et peut être appliquée plus facilement à l'échelle industrielle (Singhania *et al.*, 2009).

### **7.2-Fermentation sur milieu solide**

La fermentation solide (fermentation de substrat solide, culture solide, en anglais : *Solid-State Fermentation*, SSF) est généralement définie comme la croissance microbienne sur des particules solides et humides en absence totale ou presque d'eau libre; une condition qui assure aux microorganismes, surtout les champignons filamenteux, un milieu pareil à leur environnement naturel. De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci (Hölker *et al.*, 2004; Hölker et Jürgen, 2005; Singh et Pandey, 2009). Le substrat solide peut être soit la source de nutriments et/ou un support imprégné par les nutriments appropriés, permettant le développement des micro-organismes et la production des métabolites recherchés (Singhania *et al.*, 2009).

# *Chapitre IV*

## *Les dattes*

## 1-Généralité

### 1.1-palmiers dattiers

Le palmier dattier est l'arbre des zones arides et semi-arides, il est originaire des pays chauds et humides, mais il a de larges possibilités d'adaptation.

Le genre Phoenix (*Coryphoideae Phoeniceae*) comporte au moins douze espèces, la plus connue est le *phoenix dactylifera L.*, dont les fruits « datte » font l'objet d'un commerce international important (Espiard, 2002).

La classification du dattier est comme suit (Djerbi, 1994). :

Groupe : Spadiciflora

Ordre : Palmae

Famille : Palmaceae

Sous-famille : Coryphoideae

Tribu : Phoeniceae

Genre : *Phoenix*

Espèce : *Dactylifera L.*

### 1.2-Répartition des palmiers dattiers

Le palmier dattier était primitivement cultivé dans les régions arides et semi-arides chaudes. Il fut propagé par la suite, en dehors de son axe d'extension et de culture, non seulement comme arbre fruitier mais aussi comme essence ornementale (Munier, 1973).

Le palmier est très exploité dans l'Afrique méditerranéenne, le Moyen-Orient, l'Asie de l'ouest et les états unis. Le patrimoine Algérien est estimé à plus de 8 millions de palmiers dattiers.

Le potentiel productif en 1987 a été estimé à 183 600 tonnes et en 2006 à 500 000 tonnes. Les palmiers sont essentiellement localisés dans les zones de la partie Sud-Est et Centre sud du pays. Près de 58,14% de la production nationale des dattes est réalisée par les deux wilayas, El-Oued (29,54%) et Biskra (28,6%).

La variété Deglet-Nour, occupe la première place et représente 52,87% de la production totale des dattes (Amellal, 2008).

## 2-La datte

### 2.2-Définition

La datte, fruit du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, Elle est composée d'un noyau ayant une consistance dure, entouré de chair La partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe, et constituée de :

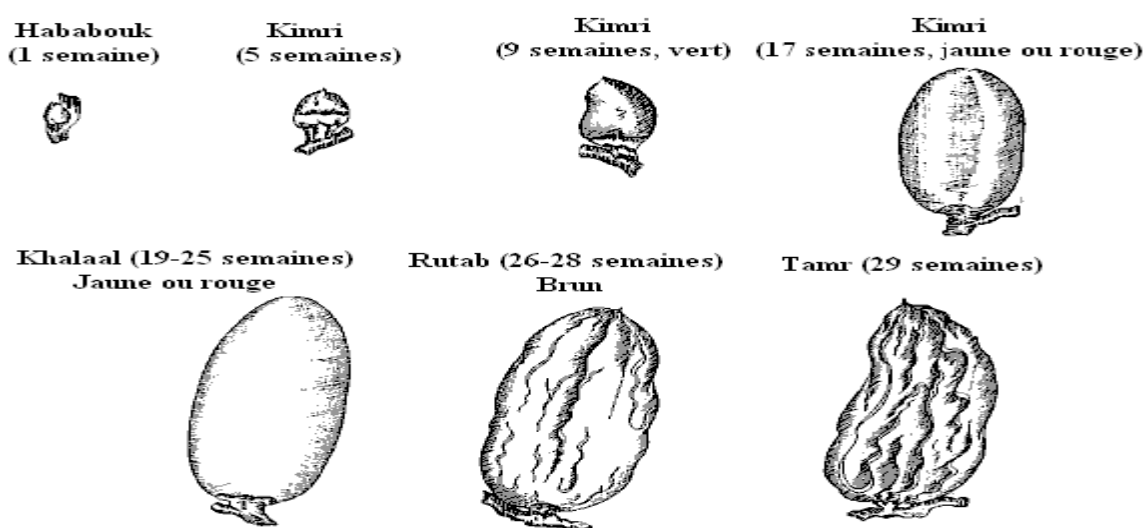
Un péricarpe ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau.

Un mésocarpe généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre et de couleur soutenue.

Un endocarpe de teinte plus clair et de texture fibreuse, parfois réduite à une membrane parcheminée entourant le noyon (Espiard, 2002).

### 2.3-Développement

Il faut environ 200 jours à partir de la pollinisation pour atteindre une maturation complète (stade tamr ). Au cours de sa formation et de sa maturation, le fruit passe à travers plusieurs phases distinctes, chacune d'entre elles se distinguant par une ou plusieurs caractéristiques particulières, physiquement et chimiquement, qui sont représentées sous forme généralisée aux figures, (Barreveld, 1993).



**Figure 5.** Formation et maturation de la datte (Bousdira, 2007).

### 2.3-Composition de la datte

La teneur en eau de la datte est liée à la variété, au stade de maturation et au climat. Elle est entre 8 % et 30 % du poids de la chair fraîche avec une moyenne d'environ 19 % (Matallah, 1970).

La teneur en eau de quelques variétés de dattes de la région fliache (biskra), en % (Khenfar, 2004) est mentionnée dans le Tableau 3.

**Tableau 3 :** Le teneur en eau de quelques variétés de dattes de la région fliache (biskra).

| Variétés    | Consistance | teneur en eau (%) |
|-------------|-------------|-------------------|
| Deglet-nour | Demi-molle  | 22,60             |
| Mech-Degla  | Sèche       | 13,70             |
| Ghars       | Molle       | 25,40             |

La datte est l'un des fruits riche en sucres qui existent sous deux forme saccharose (dattes sèches) et sucres réducteurs fructose et glucose (dattes molles), les dattes demi molles contenant les deux forme des sucres comme Deglet Nour Pour la majorité des dattes connues, la teneur en sucres totaux ne varie pas largement. Elle est située dans une moyenne de 74 à 87 kg par 100 kg de matière sèche (Barrevald W.H., 1993).

Les dattes sont caractérisées par une faible teneur en protéines. Cette teneur varie entre 0,38 et 2,5% du poids sec (Razi,1993).

La teneur en lipides dans la datte est évaluée à 0,27%, soit 0,32 % de matière sèche .Cette teneur est légèrement supérieure à celles trouvées par Al-hooti et al. (1997), qui estiment la teneur en lipide dans les dattes emiratiennes entre 0,1 et 0,2 % de matière sèche. Cette différence peut être due à la variété de la datte. (Noui , 2007).

La datte ne constitue pas une source importante de vitamines. La fraction vitaminique se caractérise par des teneurs appréciables de vitamines du groupe B, des précurseurs immédiats des coenzymes indispensables à toutes les cellules vivantes et jouent un rôle primordial (Vilkas, 1993).

La datte est l'un des fruits les plus riches en éléments minéraux essentiellement le potassium, le magnésium, le phosphore et le calcium (Siboukeur, 1997).

## 2.4-Valorisation des dattes

Aujourd'hui, grâce aux procédés biotechnologiques, il est possible de mettre sur le marché local et même international, une nouvelle génération de produits (Figure 6). Effectivement, les produits et sous-produits du palmier dattier, riche en sucres fermentescibles (65 %), constituent des substrats de choix pour la production de nombreuses substances à forte valeur ajoutée dont l'impact socio-économique est considérable tant du point de vue de la création d'emplois que de la mise à la disposition des consommateurs de substances stratégiques fortement prisées et souvent importées à coup de devise forte. De nombreux micro-organismes, bactéries, champignons filamenteux et levures sont susceptibles d'être produits en masse à partir de différents substrats carbonés (Touzi, 2001).

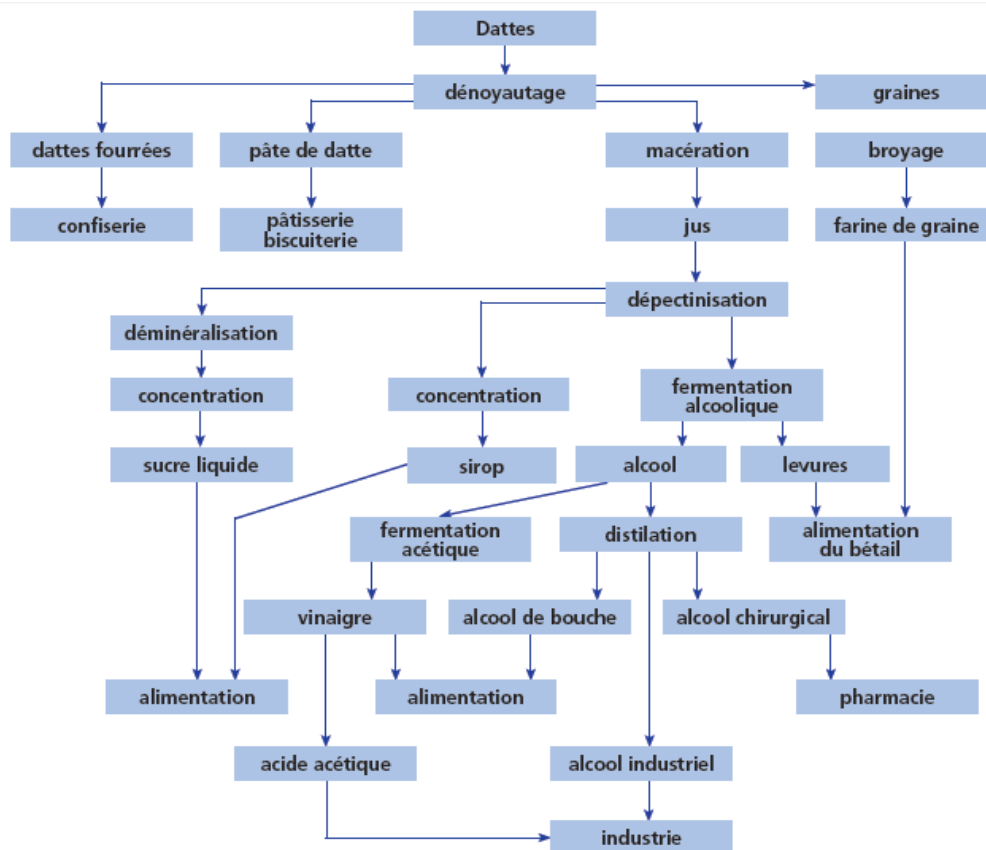


Figure 6 . possibilités de valorisation industrielle des dattes (Estanove,1987 ).

## 2.5-Les déchets de dattes

Les déchets de dattes qualifiées de « perdues » sont des dattes qui ne sont pas consommées par les humains, soit du fait de leurs faibles qualités gustatives, soit du fait de leurs textures « rébarbatives » (trop dures), soit tout simplement parce qu'elles sont négligées au profit d'aliments plus attractifs (Estanove, 1990).

## 3-Méthodes d'optimisation :

La planification expérimentale est utilisée dans la biotechnologie actuelle grâce à son applicabilité facilitée par l'informatique (Reddy et *al.*, 2008). Ces plans sont particulièrement appliqués dans les processus d'optimisation de la fermentation des cultures.

La démarche expérimentale traditionnelle (*one variable at a time*) qui consiste à faire varier successivement un seul facteur en maintenant les autres constants, est long et coûteuse. De plus, lorsque un grand nombre de variables est considéré, elle est incapable de détecter l'optimum réel et ne prend pas en compte les interactions entre les facteurs (Hajji et *al.*, 2008; Kammoun et *al.*, 2008). Les limites d'une telle méthode sont évitées par l'utilisation des plans statistiques (les plans expérimentaux factoriels) qui permettent de mesurer l'effet de plusieurs facteurs ainsi que les interactions entre ces facteurs (Kammoun et *al.*, 2008).

Les modèles statistiques pour optimiser les composants et les conditions des milieux de cultures sont de plus en plus utilisés pour les bactéries (Tari et *al.*, 2006; Oskouie et *al.*, 2008; Reddy et *al.*, 2008; Rai et Mukherjee, 2010), les cellules animales (Castro et *al.*, 1992) et les moisissures (Hajji et *al.*, 2008; Kammoun et *al.*, 2008).

Les plans d'expériences les plus utilisés sont les plans factoriels fractionnaires type matrice de Plackett et Burman (1946) et le plan composite centré type plan de Box et Wilson (1951).

### 3.1-Modèle Plackett-Burman

En réalité, plusieurs facteurs peuvent influencer un processus donné, mais cela ne signifie pas que tous ces facteurs ont des effets significatifs entre elles. Les facteurs qui ont plus d'effet sur le processus sont plus considérés que ceux qui influent légèrement, car les premiers sont essentiels au bon fonctionnement du processus. La première étape pour optimiser un procédé consiste à identifier les facteurs qui ont des effets significatifs sur le processus. Le modèle Plackett-Burman 1946, qui est un modèle factoriel fractionnaire à deux niveaux a été largement utilisé pour l'évaluation de l'effet des différents facteurs dans de nombreux processus de fermentation (Kennedy et *al.*, 1999). Le modèle est utilisé pour démarrer l'optimisation par un dépistage d'un grand nombre de facteurs  $X_i$  qui peuvent être susceptibles d'influencer la réponse  $Y$  (Lewis et *al.*, 1999). Chaque facteur peut prendre deux niveaux (-1 ou +1) pour la concentration minimale et maximale respectivement (Deming et Morgan, 1988).

Afin de déterminer si les facteurs ont un effet significatif ou non; une simple forme polynomiale du premier degré est proposée:  $Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i$ .

Il est nécessaire de déterminer si elles sont statistiquement significatives. L'effet  $\beta_i$  ayant la plus grande valeur absolue correspond à l'élément le plus significatif  $X_i$  (Taguchi et Konishi, 1987).



*Matériel  
et Méthodes*

## **1-Matériels biologiques**

La mise en évidence de la production de protéases par différentes souches a été testé sur milieu gélose au lait, il s'agit de *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp* , *Trichoderma sp* et *Paecilomyces sp*.

La réactivation des souches préalablement citées est réalisée du PDA (voir annexe 1) coulé dans des boîtes de Pétri sous les conditions d'asepsie par repiquage au centre. La culture fongique est incubée à  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 5-7 jours.

### **1.1- Mise en évidences des souches protéolytiques**

La présence d'une activité protéolytique a été réalisée sur le milieu au lait gélosé. Les colonies appartenant aux champignons filamenteux sontensemencés sur le milieu sélectif : lait gélosé (voir annexe 2). Un lait écrémé (liquide) est utilisé à cause de sa composition riche en protéines. Les moisissures sont repiqués au centre ; l'incubation à lieu à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 3jours. Le diamètre des zones d'hydrolyse de chaque colonie des quatre souches testées et la comparaison entre elles, nous a permis de sélectionner la plus protéolytique.

Ce milieu (la gélose au lait) présente plusieurs avantages tels que la simplicité dans la préparation, la variété et la richesse en protéines et le faible coût (Smith, Gordon et Clark,1952). L'utilisation de ce milieu permet la mise en évidence de l'activité protéolytique par l'apparence d'une zone d'hydrolyse claire autour de la colonie productrice (Anagnostakis et Hankin, 1975; Harrigan et McCance, 1976).

### **1.2-La fermentation**

#### **1.2.1-L'inoculum**

L'inoculum correspond à la suspension sporale de la souche fongique sélectionnée, présentant une activité protéolytique importante et une croissance rapide. L'inoculum est préparé par addition de 10 ml d'eau physiologique stérile aux souches cultivées pendant 7 jours sur milieu PDA en Erlenmeyer. Les spores sont récupérées superficiellement en utilisant une agitation rigoureuse à l'aide d'un barreau magnétique sous des conditions aseptiques.

### **1.2.2-Dénombrement des spores**

Le nombre de spores ensemencé est déduit à l'aide d'une courbe d'étalonnage. (Voir annexe 3).

### **1.2.3-Préparation des milieux de fermentation**

Le milieu de culture est préparé à partir de déchets de datte préalablement séchés à l'air libre (25 – 30°C) puis broyés à l'aide d'un moulin électrique ménagé de manière à obtenir une farine avec des particules de : 1mm. Cette dernière est stockée à 4 C° dans des flacons pour minimiser les réactions hydrolytiques. La farine de dattes est suspendue dans de l'eau distillée. L'extrait soluble utilisé dans la préparation du milieu de culture, est préparé à partir de poudre de déchets de datte mis en solution dans 500 ml d'eau distillée. Deux concentrations ont été testées (2%) et (5%).

La préparation du milieu de culture de base est préparée comme le montre le schéma suivant (Figure 7) :

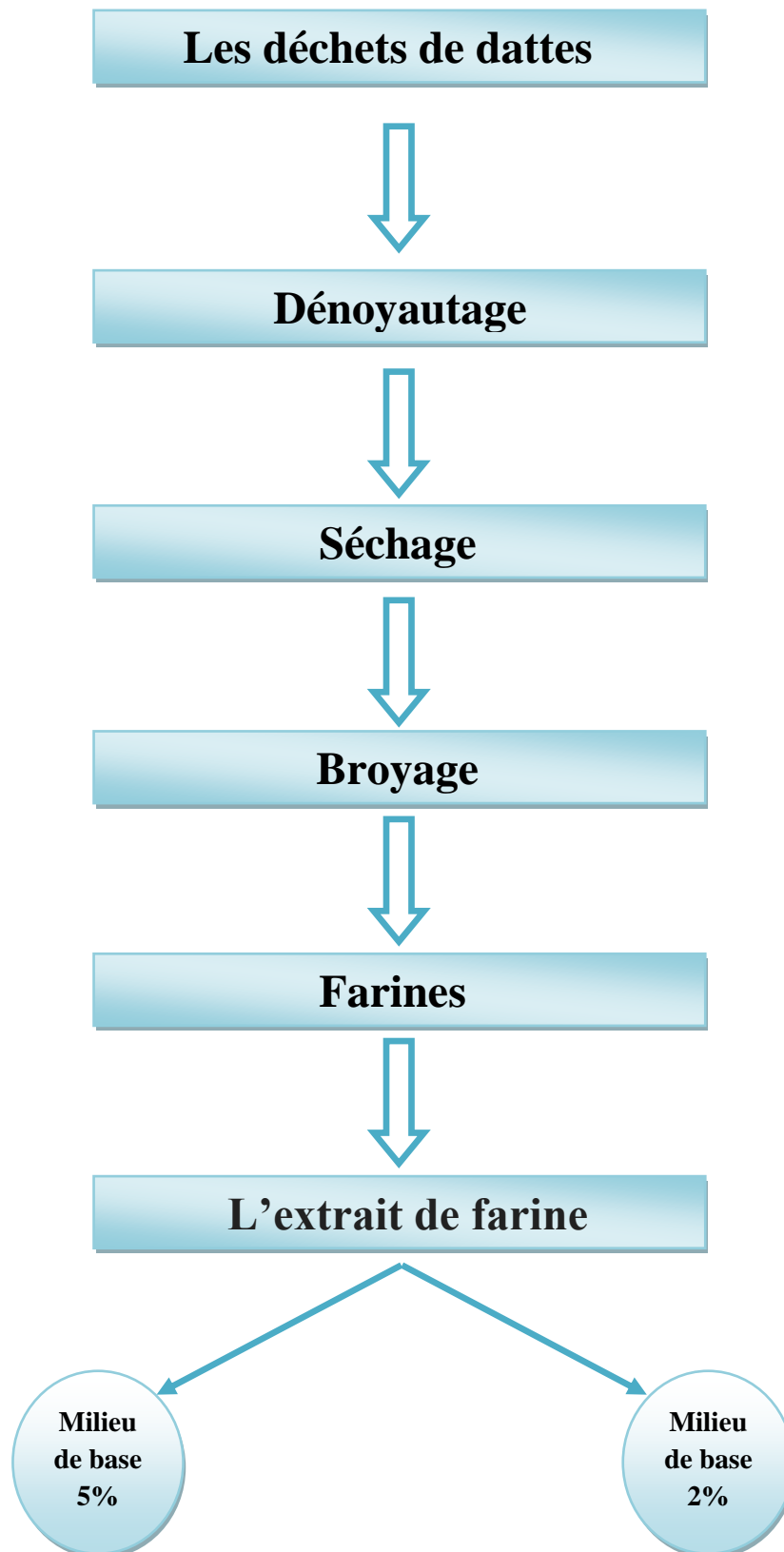


Figure 7 : Préparation de milieu de base.

## **2-Méthode statistique**

### **2.1-Plan expérimental (Plackett et Burman, 1946)**

L'enrichissement du milieu de culture, de base a été réalisé en adoptant une planification expérimentale, il s'agit des matrices de Plackett et Burman (1946). Ces dernières permettent de sélectionner les facteurs influençant la production de l'enzyme protéolytique. Ces matrices sont basées sur des blocs incomplets équilibrés (B.I.E). 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 4). Ces matrices sont construites par permutation circulaire, à partir d'un générateur de base (tableau 5). Dans la présente étude, une matrice pour 7 facteurs, soit 8 combinaisons a été utilisée, mais afin de pouvoir garder une réserve statistique pour l'évaluation de l'erreur. 5 facteurs réels seulement et 2 facteurs irréels (erreurs) ont été étudiés (Tableau 6).

**Tableau 4** : structure de plan de Plackett et Burman pour l'étude des 7 facteurs

| N° d'essais | <u>Facteurs</u> |                |                |                |                |                |                |
|-------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|             | X <sub>1</sub>  | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>4</sub> | X <sub>5</sub> | X <sub>6</sub> | X <sub>7</sub> |
| 1           | +1              | +1             | +1             | -1             | +1             | -1             | -1             |
| 2           | -1              | +1             | +1             | +1             | -1             | +1             | -1             |
| 3           | -1              | -1             | +1             | +1             | +1             | -1             | +1             |
| 4           | +1              | -1             | -1             | +1             | +1             | +1             | -1             |
| 5           | -1              | +1             | -1             | -1             | +1             | +1             | +1             |
| 6           | +1              | -1             | +1             | -1             | -1             | +1             | +1             |
| 7           | +1              | +1             | -1             | +1             | -1             | -1             | +1             |
| 8           | -1              | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             |

**Tableau 5** Générateur des matrices pour N=8, 12,16 et 20 essais selon Plackett et Burman 1946.

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

**Tableau 6 :** Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs.

| FACTEUR  | NIVEAU - | Niveau +  |
|--|----------|-----------|
| <b>X<sub>1</sub> : Corn-steep liquor</b>                                       | 0        | 2%        |
| <b>X<sub>2</sub> : pétales de fleurs</b>                                       | 0        | 2%        |
| <b>X<sub>3</sub> : Erreur</b>  | -        | -         |
| <b>X<sub>4</sub> : concentration du milieu de base (les dettes déclassées)</b> | 2%       | 5%        |
| <b>X<sub>5</sub> : Erreur</b>  | -        | -         |
| <b>X<sub>6</sub> : extrait de levure</b>                                       | 0        | 2%        |
| <b>X<sub>7</sub> : Sels :</b>  |          |           |
| - <b>Mn SO<sub>4</sub></b>   | 0        | 0,5g / L  |
| - <b>FeSO<sub>4</sub></b>  | 0        | 0,5 g / L |
| - <b>Mg SO<sub>4</sub></b>   | 0        | 0,5 g / L |
| - <b>Zn SO<sub>4</sub></b>   | 0        | 0,5 g / L |

## **2.2-Conduite de la fermentation**

Les cultures sont réalisées dans des Erlen-meyers de 250 ml à raison de 40 ml par erlen, les facteurs sont ajoutés dans chaque Erlen meyer selon le plan de Plackett et Burman. Ces facteurs sont le déchet de datte , pétales de fleurs *Galactite tomentosa* , extrait de levure , Corn-steep liquor et les sels ( $Mn SO_4$  ,  $FeSO_4$  ,  $Mg SO_4$  et  $Zn SO_4$ ) avec une agitation et ajustement de pH à 5 .

Puis stérilisées à  $110C^\circ$  pendant 20 min. Après refroidissement, l'ensemencement des milieux de cultures est réalisé avec une suspension de spores à raison de  $10^5$  spores par 1 ml de milieu de culture.

Les Erlen-meyers ensemencés et fermés avec du coton cardé et du papier aluminium sont ensuite incubés à  $30 C^\circ$  pendant 72 h sous agitation (150 rpm). Les pH sont mesurés après la fermentation.

### **2.2.1-Détermination de la biomasse**

Les poids humides et secs de la biomasse est déterminé à la fin des fermentations après filtration sur papier Whatman n° 2 Les échantillons sont séchés à  $70^\circ C$  jusqu'à poids constant puis pesés pendant 3jours.

### **2.2.2- Dosage de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique est déterminée par action de l'enzyme sur la caséine (substrat de la réaction). La tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés (Mathieu, 2005).

- **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 libérée est utilisée comme standard de dosage colorimétrique de l'activité protéolytique à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu. Celui-ci réagit avec la tyrosine pour donner par réduction un complexe bleu.



- **Réaction enzymatique**

L'activité protéolytique est déterminée par utilisation de la caséine comme substrat (Lenoir et Auberger, 1977). Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

- 1 ml de l'extrait enzymatique.
- 1,5 ml du tampon phosphate 0,2M (pH 5).
- 2,5 ml de la solution de caséine dans le citrate de sodium (0,02 M) à pH 5,5.

Après agitation, le mélange est incubé à 40°C au bain marie pendant 1 heure. La réaction est ensuite arrêtée par addition de 5 ml de TCA à 4%, ce qui entraîne la précipitation des protéines non hydrolysées. Le mélange est laissé reposer 15 à 20 minutes, puis filtré sur du papier Whatman n° 2 pour avoir le filtrat.

- **Protocole de dosage de l'activité**

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés comme suit :

- 0,5 ml du filtrat.
- 2,5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.2M).
- 0,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 50%.

Les mélanges sont bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance de la coloration bleue développée est lue à 750 nm. L'activité est calculée par référence à une courbe étalon de la tyrosine préalablement établie comme standard (voir annexe 4).

Le blanc réactionnel est préparé de la même manière que l'échantillon sauf que l'incubation ne se fait car le TCA (4%) est rajouté avant le substrat.

### **2.2.3-Dosage des protéines**

- **Principe**

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et *al.*, (1965) dont le principe de base est fondé sur la résultante de deux réactions.

Dans le premier temps, la présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin entraîne la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et la liaison peptidique avec apparition d'une coloration violette proportionnelle à la quantité d'acides aminés présentes dans le milieu (réaction de Biuret).

La deuxième réaction résulte de la réduction de tyrosine et tryptophane qui sont les groupements chromogéniques dans les protéines par le constituant actif du réactif de Folin-Ciocalteu l'acide phosphomolybdotungstique pour donner naissance à un Complexe bleu.

- **Les solutions utilisées**

- Solution A : 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans le NaOH (0,1N)
- Solution B: 1%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dans l'eau distillée.
- Solution C : 2% tartrate double de sodium et de potassium dans l'eau distillée.
- Solution du mélange M :
  - 20 ml de la solution A
  - 1 ml de la solution B
  - 1 ml de la solution C
- Solution E : réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10ème.

- **Protocole de dosage des protéines**

1ml de l'échantillon dilué au 1/10 (100ul d'échantillon +900ul de tampon), puis on ajoute 1ml du mélange M. On laisse reposer 15 minutes puis on ajoute 3 ml du réactif de Folin-Ciocalteu .on agite juste après et on incube 45 minutes à température ambiante et à l'obscurité. La lecture de l'absorbance se fait à 750 nm au spectrophotomètre en se référant à la courbe d'étalonnage préalablement établies avec différentes concentrations de BSA , (voire Annexe 4).

*Résultats  
et discussion*

Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus portant sur l'optimisation d'un milieu de culture pour la production d'une protéase acide par *Aspergillus niger*.

Les cultures s'effectuent en "batch". La cause d'optimisation de milieu c'est que la grande majorité des micro-organismes industriels sont chimiohétérotrophe et donc il est nécessaire d'apporter dans le milieu une source de carbone, d'azote et des sels minéraux. Avant toute procédure d'optimisation des conditions de culture, une sélection préliminaire des souches les plus protéolytiques est nécessaire pour une meilleure orientation du travail.

### 1-Réactivations des souches

Les souches sont réactivées sur milieu PDA



**Figure.8:** Réactivation de la souche *Aspergillus niger*



**Figure.9:** Réactivation de la souche *Rhizopus sp.*



**Figure.10:** Réactivation de la souche *Paecilomyces sp.*



**Figure.11 :** Réactivation de la souche *Trichoderma sp.*

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

La mise en évidence de l'activité protéolytique a été effectuée par culture sur milieu gélose au lait résulte l'apparition des zones de protéolyse (anneau clair) autour des colonies est le résultat de la réaction d'hydrolyse des protéines qui donne des acides aminés solubles utilisables. Le diamètre de cette zone est lié à la quantité des protéases extracellulaires produite par chaque champignon (tableau 7).

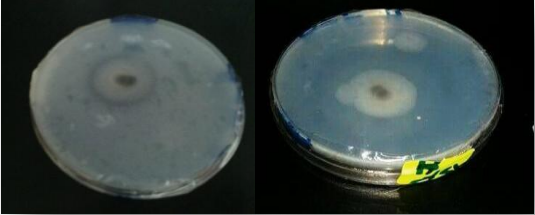
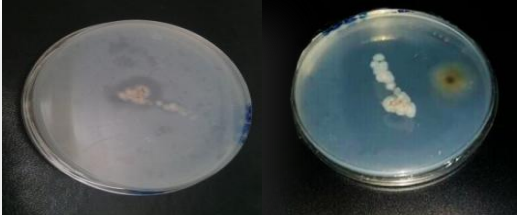
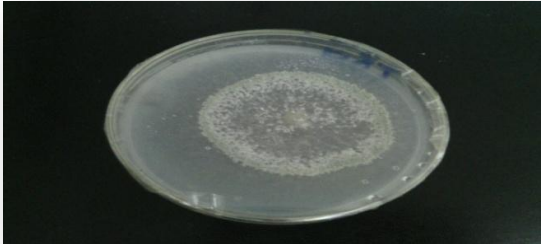

### **2-1 Sélection de la souche**

Les tests de protéolyse réalisés sur le lait gélosé ont permis la mise en évidence de l'activité protéolytique chez deux moisissures parmi les quatre souches testées. Une première souche est caractérisée par des zones d'hydrolyse autour du mycélium : c'est celle du genre *Paecilomyces sp* qui présente une zone d'hydrolyse considérable et non négligeable (tableau 7) mais sa croissance est très lente par rapport à *Aspergillus niger*. De ce fait, elle n'a pas été retenue.

Alors qu'*Aspergillus niger* est caractérisé par une zone d'hydrolyse de diamètre variant entre 1,2 et 2,8 cm (tableau 7). Ces résultats permettent de considérer cette souche comme la moisissure productrice de protéases exocellulaires. Cette dernière est retenue pour la suite du travail.

*Aspergillus niger* est l'une des espèces les plus utilisées dans la production des enzymes. En effet, l'optimisation de milieu de culture pour la production d'alpha-amylase produite par *Aspergillus niger* présente l'un des exemples à donner satisfaction quand à cette espèce (Djekrif-dakhmouche et al.,2006).

**Tableau n° 7 : Activité protéolytiques testées sur le lait gélosé des quatre souches.**

| La souche                | Le temps d'incubation  | Les résultats  |
|--------------------------|--|--|
| <i>Aspergillus niger</i> | Formation de la zone claire<br>Après le deuxième jour d'incubation.<br>$\Phi = 1,7\text{cm}$ |    |
| <i>Paecilomyces sp.</i>  | formation de la zone claire<br>Après le deuxième jour d'incubation.<br>$\Phi = 1,1\text{cm}$ |   |
| <i>Trichoderma sp</i>    | Absence de la zone claire  |  |
| <i>Rhizopus sp</i>       | Absence de la zone claire  |  |

### 3-L'optimisation de la production de la protéase acide

#### 3.1-La production de la biomasse

La croissance d'*A. niger* donne une morphologie différente Sur milieu liquide que le milieu solide, elle donne un mycélium crème à jaune .sous forme imbriqué par simple filtration En *SmF*, (figure.15).

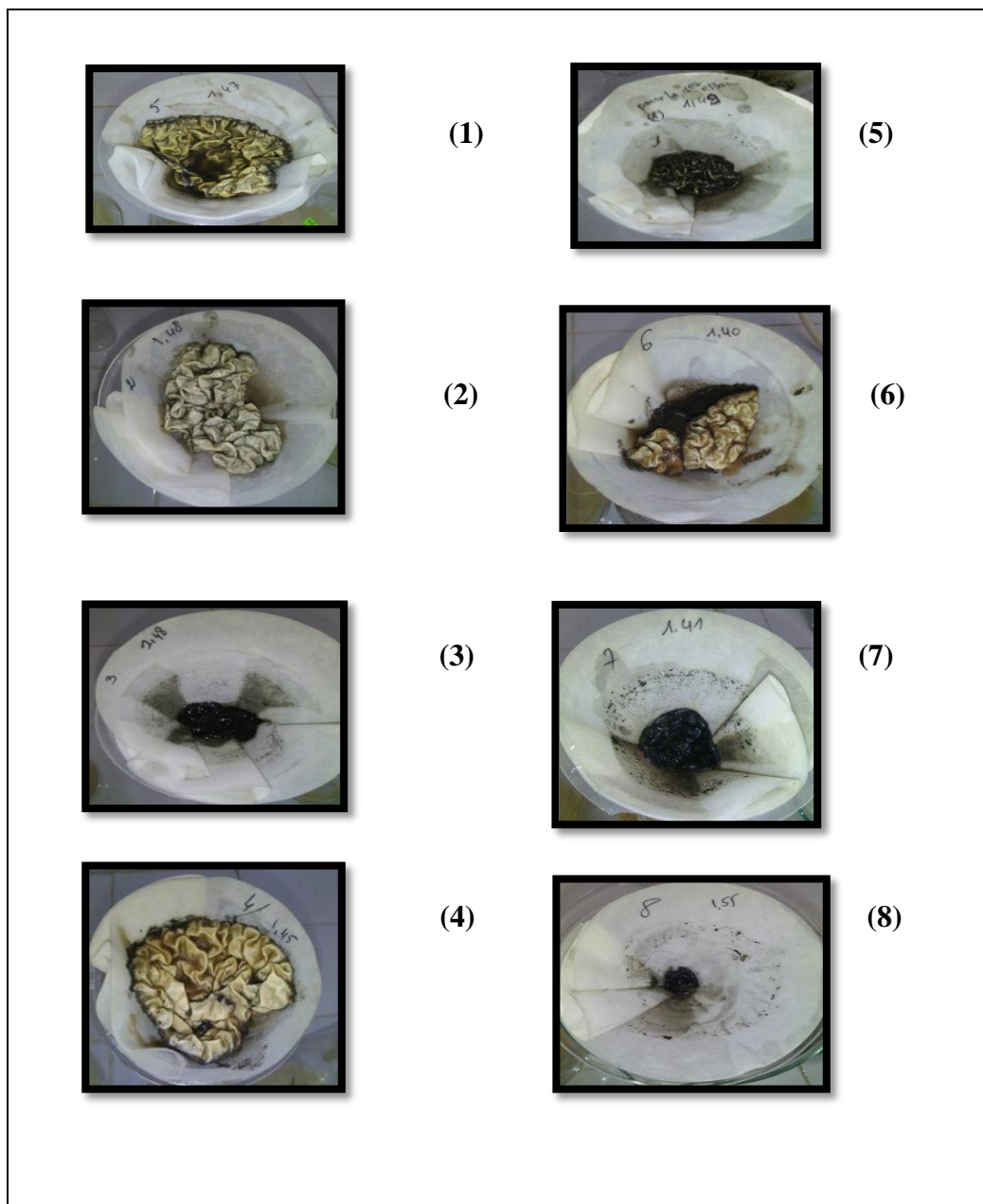


Figure 12: Aspect d'*Aspergillus niger* sur culture liquide.



### 3.2-Résultats du pH

La plupart des champignons se développent à des pH plus ou moins acides (Berthier et Valla, 1998 ).Outre la croissance, le pH joue un rôle primordial dans la production de métabolites ( Larpent, 1991).

Les résultats du pH sont mentionnés dans le Tableau n° 8. Une diminution de pH dans la plupart des essais à été noté. Cette diminution peut être due à une libération d'acides organiques dans le milieu (Botton et al., 1990) . La variation du pH affecte la perméabilité membranaire et entraîne un ralentissement de l'activité enzymatique et de la croissance (Bourgeois., Mesclé et al. 1996). Et selon Badid et al., (2001). Les souches d'*Aspergillus niger* ont un optimum de croissance à pH 4. Des résultats similaires ont été trouvés par Singh et al., (1994), utilisant la fermentation sur milieu liquide pour produire la protéase acide d'*A. niger*.

**Tableau 8 : Les variations de pH**

| Numéro de l'expérience          | 1     | 2     | 3     | 4     | 5    | 6    | 7     | 8    |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|------|------|-------|------|
| <b>pH avant l'ensemencement</b> | 5     | 5     | 5     | 5     | 5    | 5    | 5     | 5    |
| <b>pH après fermentation</b>    |       |       |       |       |      |      |       |      |
| <b>Essai 1</b>                  | 3 ,17 | 2 ,55 | 3 ,16 | 3,09  | 3,33 | 4,72 | 2,85  | 3,37 |
| <b>Essai 2</b>                  | 3,14  | 2,44  | 3 ,50 | 3,39  | 3,85 | 4,21 | 3 ,08 | 3,01 |
| <b>Moyenne</b>                  | 3 ,15 | 2,49  | 3,33  | 3 ,42 | 3,59 | 4,46 | 2,96  | 3,19 |

#### **4- L'effet des facteurs**

L'effet des facteurs étudiés sur la biomasse, les protéines et l'activité protéolytique est déterminé par l'analyse statistique et la modélisation des résultats qui ont permis de mesurer l'effet de chaque facteur et son niveau de signification sur la croissance et la production de la protéase acide et les protéines.

- **Traitement statistique des résultats**

L'analyse statistique et la modélisation des résultats expérimentaux à l'aide du logiciel « *Minitab 15* » ont permis de mesurer l'effet de chaque facteur par le calcul du coefficient de corrélation et son niveau de signification sur chaque réponse par la mesure de la probabilité (P): Le principe d'exploitation consiste à calculer les coefficients du modèle polynomial, plus sa valeur absolue est élevée, plus le terme correspondant (facteur simple ou interaction) a une influence importante sur la réponse étudiée. S'il est faible, il a peu ou pas d'effet. S'il est négatif, dans ce cas l'augmentation de la valeur du facteur entraîne une diminution de la réponse. La signification statistique est déterminée grâce au test de probabilité (P):

- $P < 0,05$ : le résultat est significatif, donc le facteur est retenu.
- $P > 0,05$ : le résultat est non significatif, donc le facteur ne présente pas un effet important sur la réponse ce qui l'exclut de l'étude.

**Tableau 9 (a,b,c) :** Biomasse sèche, activité protéolytique et protéines produites selon le plan de Plackett et Burman

**Tableau 9a :** biomasse sèche selon le plan de Plackett et Burman.

| N° d'essais | Facteurs       |                |                |                |                |                |                | Biomasse sèche (g /l) |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|
|             | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>4</sub> | X <sub>5</sub> | X <sub>6</sub> | X <sub>7</sub> |                       |
| <b>1</b>    | +1             | +1             | +1             | -1             | +1             | -1             | -1             | 0,565                 |
| <b>2</b>    | -1             | +1             | +1             | +1             | -1             | +1             | -1             | 0,995                 |
| <b>3</b>    | -1             | -1             | +1             | +1             | +1             | -1             | +1             | 0,430                 |
| <b>4</b>    | +1             | -1             | -1             | +1             | +1             | +1             | -1             | 1,725                 |
| <b>5</b>    | -1             | +1             | -1             | -1             | +1             | +1             | +1             | 0,835                 |
| <b>6</b>    | +1             | -1             | +1             | -1             | -1             | +1             | +1             | 1,020                 |
| <b>7</b>    | +1             | +1             | -1             | +1             | -1             | -1             | +1             | 0,365                 |
| <b>8</b>    | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | 0,145                 |

**Tableau 9b :** Activité protéolytique selon le plan de Plackett et Burman .

| N° d'essais | Facteurs       |                |                |                |                |                |                | Activité protéolytique (U) |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------------------|
|             | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>4</sub> | X <sub>5</sub> | X <sub>6</sub> | X <sub>7</sub> |                            |
| <b>1</b>    | +1             | +1             | +1             | -1             | +1             | -1             | -1             | 58,60                      |
| <b>2</b>    | -1             | +1             | +1             | +1             | -1             | +1             | -1             | 74,30                      |
| <b>3</b>    | -1             | -1             | +1             | +1             | +1             | -1             | +1             | 91,60                      |
| <b>4</b>    | +1             | -1             | -1             | +1             | +1             | +1             | -1             | 227,77                     |
| <b>5</b>    | -1             | +1             | -1             | -1             | +1             | +1             | +1             | 650,20                     |
| <b>6</b>    | +1             | -1             | +1             | -1             | -1             | +1             | +1             | 330,00                     |
| <b>7</b>    | +1             | +1             | -1             | +1             | -1             | -1             | +1             | 283,80                     |
| <b>8</b>    | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | 21,50                      |

**Tableau 9c** : Protéine selon le plan de Plackett et Burman.

| N° d'essais | Facteurs       |                |                |                |                |                |                | protéine (mg/ml) |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|
|             | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>4</sub> | X <sub>5</sub> | X <sub>6</sub> | X <sub>7</sub> |                  |
| <b>1</b>    | +1             | +1             | +1             | -1             | +1             | -1             | -1             | 4,30             |
| <b>2</b>    | -1             | +1             | +1             | +1             | -1             | +1             | -1             | 4,90             |
| <b>3</b>    | -1             | -1             | +1             | +1             | +1             | -1             | +1             | 1,49             |
| <b>4</b>    | +1             | -1             | -1             | +1             | +1             | +1             | -1             | 3,08             |
| <b>5</b>    | -1             | +1             | -1             | -1             | +1             | +1             | +1             | 1,55             |
| <b>6</b>    | +1             | -1             | +1             | -1             | -1             | +1             | +1             | 7,50             |
| <b>7</b>    | +1             | +1             | -1             | +1             | -1             | -1             | +1             | 6,85             |
| <b>8</b>    | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | 0,87             |

**Tableau 10a** : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de la biomasse.

| N° du facteur | Nom du facteur  | Effet (de -a +) | Valeur de T | P            |
|---------------|---|-----------------|-------------|--------------|
| <b>1</b>      | <b>Corn-steep liquor</b>                                | <b>0,3175</b>   | <b>1,74</b> | <b>0,224</b> |
| <b>2</b>      | Pétales de fleurs                                       | -0,14           | -0,77       | 0,523        |
| <b>4</b>      | concentration du milieu de base (les dettes déclassées) | 0,2375          | 1,30        | 0,323        |
| <b>6</b>      | <b>extrait de levure</b>                                | <b>0,7675</b>   | <b>4,21</b> | <b>0,052</b> |
| <b>7</b>      | Sels  | -0,195          | -1,07       | 0,397        |

Les résultats de biomasse ainsi que leur analyse statistique sont mentionnés dans le Tableau n° 9a. D'après ce tableau, le poids du mycélium sec d'*Aspergillus niger* dans la culture liquide varie de 0,145 à 1,725 g/l. La simple observation de ces résultats montre que la meilleure croissance est enregistrée dans l'essai n°4 contenant le corn steep liquor, extrait de levure et 5% de déchet de dattes alors que la plus faible croissance est obtenue dans l'essai n°8 dans le milieu de base.

### **4.1-Effet sur la biomasse**

Dans le (Tableau n°10a) ; L'effet de corn-steep liquor est significatif sur la croissance de la moisissure. En effet la présence de corn-steep liquor entraîne une augmentation de biomasse ( $p=0,224$ ). Ces résultats est confirmé par l'étude de Benkahoul ,(2002) .ce facteur est suivi par l'extrait de levure qui a un effet positif et hautement significatif sur la croissance mycélienne ( $p=0,052$ ). Par contre La concentration de milieu de base à 5 % à un effet positif mais non significatif sur la croissance mycélienne ( $p=0,323$ ). En effet, la concentration des déchets de dattes de 2% apparaît suffisante pour la croissance de notre moisissure et donc l'augmentation de cette source de carbone n'apporte pas un effet significatif supplémentaire, ce qui permet de dire que la concentration de 2% est largement suffisante pour la croissance d'*A. niger* dans ces conditions de travail. Avec Les pétales de fleur ( $p=0,523$ ) et les sels ( $p=0,397$ ) les deux présentent un effet négatifs mais qui n'est pas significatif.

Cette supplementation du milieu de base par une source azotée permet d'équilibrer le milieu pour permettre un bon développement du microorganisme ( Badid et *al.*, 2001). L'optimisation physico-chimique du milieu augmente significativement la production de biomasse produite par différentes souches d'*Aspergillus niger* cultivées sur 1 litre de CSL concentré à 10 % . L'extrait de levure représente une valeureuse source de nutriments et de facteur de croissance, étant utilisé dans la majorité des milieux de culture par son précieux contenu en aminoacides, l'extrait de levure peut contribuer à la stimulation de la croissance des bifidobactéries dans le lait et, aussi, à l'amélioration de la viabilité de ces bactéries dans les produits laitiers acides (Sommer, 1996)

**Tableau 10b** : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de protéase acide.

| N° du facteur | Nom du facteur  | Effet (de -a +) | Valeur de T | P            |
|---------------|---|-----------------|-------------|--------------|
| 1             | Corn-steep liquor                                       | 15,64           | 0,13        | 0,912        |
| 2             | Pétales de fleurs                                       | 99              | 0,79        | 0,510        |
| 4             | concentration du milieu de base (les dettes déclassées) | -95,7           | -0,77       | 0,523        |
| 6             | <b>extrait de levure</b>                                | 206,7           | 1,66        | <b>0,239</b> |
| 7             | <b>Sels</b>   | 243,36          | 1,95        | <b>0,190</b> |

L'activité protéolytique varie de 21,50 U à 650,20 U (Tableau 9b). L'activité protéolytique la plus importante est constatée dans l'essai n°5 où le milieu de base est enrichi par l'extrait de levure, les pétales de fleur, la concentration de milieu de base étant à 2% et les sels. La composition de ce dernier semble favorable pour la production de la protéase acide (659,20U).

Au contraire, l'activité la plus faible est obtenue dans l'essai n°8 le milieu de base.

### **4.2-Effet sur la protéase acide**

L'enrichissement de milieu par les sels influe positivement sur la production de la protéase acide, l'influence est significative ( $p=0,190$ ), l'extrait de levure également a un effet positif important sur la production d'enzyme ( $p=0,239$ ). Quand au corn steep liquor ( $p=0,912$ ) et les pétales de fleur ( $p=0,510$ ) ainsi que la concentration de milieu de base ( $p=0,523$ ) ont un effet qui positif mais pas significatif sur la production de l'enzyme (Tableau 10b).

La supplementation de milieu de base en source azotée et en sels minéraux et la concentration des minéraux sont inspirées de la bibliographie (witteveen *et al.*, 1990).

L'effet significatif de l'extrait de levure sur la production d'enzyme est confirmé par les résultats de beaucoup d'études testées par d'autres chercheurs qui ont permis de produire des enzymes amylolytiques. L'amylase produite par *Aspergillus niger* est obtenue à 5 g/l de milieu (Zhu *et al.*, 2004), alors que le maximum d'activité amylolytique produite par un *Bacillus* est obtenu avec 20 g/l Teodoro et Martins, (2000).

Le  $MgSO_4$  joue un rôle dans le métabolisme des champignons est principalement lié à l'activation de plusieurs variétés de systèmes enzymatiques. Par ailleurs, il contribue à la formation et au fonctionnement de la membrane des moisissures. Il se lie à l'ATP et à l'ADP et joue un rôle dans le transport du phosphore (Francis *et. Khasraji*, 1991).



Cette signification aussi confirmée par des études comparatives de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* permis de sélectionner les sels ont un effet significatif sur la production de protéase (Belmassikh, 2011).

D'après Bensmail, (2011) L'application du plan factoriel fractionnaire à l'optimisation de la production de la protéase acide d'*A. niger*, a permis de déterminer l'influence significative de la quantité de sels ( $\text{CaCl}_2$ ) dans le milieu et donne une activité coagulante de 582 US/g.

Selon la littérature, des concentrations faibles ou élevées, ainsi que la combinaison des sels ont des effets remarquables sur les activités métaboliques des microorganismes puisqu'ils augmentent les rendements de production des métabolites et favorisent la croissance microbienne (Tunga *et al.*, 1998).

Les résultats des protéines (Tableau 9c) montrent que le meilleur taux de protéines (mg/l) est obtenu dans l'essai n° 6 (7,50) qui contient le corn steep liquor, l'extrait de levure, les sels et la concentration de milieu de base à 2 % alors que le faible taux est constaté dans l'essai n° 8 qui n'est pas enrichi.

### **4.3-Effet sur les protéines**

L'analyse statistique des résultats (Tableau 10c) révèle que la présence de corn steep liquor influe de manière significative ( $p = 0,248$ ) sur la production des protéines. Les facteurs possédant un effet non significatifs sont la concentration de milieu de base ( $p = 0,818$ ), l'extrait de levure ( $p = 0,703$ ), les sels ( $p = 0,649$ ) et les pétales de fleur ( $p = 0,619$ ). Le corn steep est riche en azote. En effet, l'azote est un élément indispensable à la constitution des molécules de protéines, d'enzymes et des acides nucléiques (Scriban, 1993) Ce même résultat est confirmé par les travaux de Benaïmon et al. (2004), Badid et al. (2001), (tableau 10c).

**Tableau 10c :** Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production des protéines.

| N° du facteur | Nom du facteur  | Effet (de -a +) | Valeur de T | P            |
|---------------|---|-----------------|-------------|--------------|
| <b>1</b>      | <b>Corn-steep liquor</b>                                | <b>3,23</b>     | <b>1,61</b> | <b>0,248</b> |
| <b>2</b>      | Pétales de fleurs                                       | 1,164           | 0,58        | 0,619        |
| <b>4</b>      | concentration du milieu de base (les dettes déclassées) | 0,524           | 0,26        | 0,818        |
| <b>6</b>      | extrait de levure                                       | 0,88            | 0,44        | 0,703        |
| <b>7</b>      | Sels  | 1,06            | 0,53        | 0,649        |

## **5-Expression des réponses sous forme d'équation**

Les résultats de l'activité protéolytique peuvent être présentés par une équation polynomiale du premier degré ayant la forme suivante :

$$y = B_0 + B_1 x_1 + B_2 x_2 + B_3 x_3 + B_4 x_4 + B_5 x_5 + B_6 x_6 + B_7 x_7$$

- **Activité protéolytique**

L'équation obtenue pour la production de protéase :

$$y_1 = 217 + 7,8 x_1 + 49,5 x_2 - 47,9 x_4 + 103 x_6 + 122 x_7$$

- **Biomasse**

$$y_2 = 0,760 + 0,159 x_1 - 0,0700 x_2 + 0,119 x_4 + 0,384 x_6 - 0,0975 x_7$$

- **Protéine**

$$3,82 + 1,61 x_1 + 0,58 x_2 + 0,26 x_4 + 0,44 x_6 + 0,53 x_7$$

# *Conclusion*

Le but de cette étude est la production de la protéase par une moisissure filamenteuse, *Aspergillus niger* sur le milieu liquide (*SmF*). Les résultats obtenus montrent que les déchets des dattes utilisés comme milieu de base constituent un substrat convenable pour la croissance de la moisissure à cause de leur richesse en sucres et en protéines. Ces sources carbonées et azotées conviennent donc aussi bien à la croissance microbienne qu'à la production de métabolites. Dans ce cas, la protéase acide.

La production de l'enzyme par *A. niger* a commencé par un test sur la capacité de la souche à produire des protéases. La mise en évidence de l'activité est réalisée sur le milieu gélose au lait où une zone d'hydrolyse considérable a été noté avec une croissance de la moisissure jugée rapide.

L'optimisation du milieu de culture en réalisant les expériences dans le cadre d'un plan statistique pour la sélection des facteurs d'enrichissement ayant un effet significatif a été réalisé. Pour cela, cinq facteurs sont utilisés : la concentration de milieu de base, corn steep liquor, l'extrait de levure, les pétales de fleurs et les sels et deux facteurs erreurs.

L'analyse statistique des résultats de la matrice Plackett et Burman et la modélisation selon une régression linéaire multiple ont permis de sélectionner les facteurs influençant la production de protéase acide, de la biomasse et des protéines. De ce fait, la production de la protéase acide a montré la nécessité d'utiliser l'extrait de levure et les sels.

Ces résultats exigent d'autres études et ouvrent de nouvelles perspectives :

Tester les différents déchets agroalimentaires pour la production des différentes substances par des souches fongiques.

Utilisation des méthodes statistiques facilite le travail et donne des résultats exacte.

- *A. niger* à la capacité de produire des protéases.
- Les résultats obtenus montrent que les déchets des dattes utilisés comme milieu de base constituent un substrat convenable pour la croissance de la moisissure à cause de leur richesse en sucres et en protéines.
- L'analyse statistique des résultats de la matrice Plackett et Burman ont permis de sélectionner les facteurs influençant la production de protéase acide, de la biomasse et des protéines. De ce fait, la production de la protéase acide a montré la nécessité d'utiliser l'extrait de levure et les sels

*Références  
bibliographiques*

- Abraca L. M., Francese A., José C. et Cabañes J. F. (2004).** Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Mémoire de Magister : Biochimie -Microbiologie Appliquées. Boumerdès : Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, 141p.
- Adams T.H.(1994).** Etude de la diversité génétique et du pouvoir pathogène d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydomphila psittaci* chez les oiseaux. Thèse de doctorat : Microbiologie. paris : Paris Tech .Institut des sciences et des technologies.214p.
- Adams T. H., Wieser J. K., et Yu J. H., (1998).** Asexuel sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol .Mol. Biol. Rev. **62**:35-54.
- Aftab A., Singh A. et Ward O. P. (2007).** Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Mémoire de Magister : Biochimie -Microbiologie Appliquées. Boumerdès : Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, 141p.
- Al-hooti S.,Sidhu j.s.,Qabazard H., (1997),** Caractérisation physique-chimique comparative de deux principaux tissue constitutifs de la pulpe de datte Mech-Dagla. thèse de magister : technologie alimentaire. Boumerdes : université M'hamed Bougara de Boumerdes.112p.
- Al-Shahib W. et Marshall R.J. (2002).** Dietary fibre content of dates from 13 varieties of date palm Phoenix dactylifera L. International Journal of Food Sciences and Nutrition, **54**,247-259.
- **Amellal H. (2008).** Caractérisation physique-chimique comparative de deux principaux tissue constitutifs de la pulpe de datte Mech-Dagla. thèse de magister : technologie alimentaire. Boumerdes : université M'hamed Bougara de Boumerdes.112p
- Anagnostakis D. et Hankin A. (1975).** Isolement et identification de moisissures productrices de protéase à partir de milieux extrêmes.Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de Magister : Biochimie-Microbiologie appliquées. Constantine :Université Mentouri Constantine,84p



- Aviron-Violet P., Baret J.L., Bertrand C., Blazy F., Bouvier B., Comtat M., Coulet P.R., Dupuy P., Hervagault J.F., Joyea A., Laurent J., Monsaq P., Thomas D., Sicarde P., Van Beynum G.M.A., (1982).** Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) .Université du Québec.INRS-Eau.184p
- Badid N., Moussaoui A. et Belbraouet S. (2001).** Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires Cultivés sur Corn Steep Liquor et Evaluation Nutritionnelle de la Biomasse *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, 11-28
- Badillet G., de Briève C. et Guého E. (1987).** Isolement des moisissures productrices de protéase coagulantes .production et purification des enzymes et études de leur effet sur la coagulation de lait. Thèse de doctorat: Biochimie-Microbiologie appliquées. Constantine : Université Mentouri Constantine,127p
- Bailey J E et Ollis D.F (1977).** Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* 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 : Université Mentouri Constantine,80p
- Bakhtiari M. R., Faezi M. G., Fallahpour M., Noohi A., Moazami N. et Amidi Z. (2006).** Medium optimization by orthogonal array designs for urease production by *Aspergillus niger* PTCC5011. *Process Biochemistry*, 41: 547-551.
- Barreveld W.H. (1993).** Date palm products. FAO Agricultural Services Bulletin No. 101.
- Belmassikhe A. (2011).** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée, Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine. 129p
- Benkahoul M. (2002)** .Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* 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 : Université Mentouri Constantine,80p.

- Bennamoun L., Meraihi Z., Dakhmouche S. (2004).**Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l'α-amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivée sur milieu à base de déchets d'oranges. *Journal of Food Engineering* 64.257–264.
- Bensmail S. (2011)** Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Mémoire de Magister : Biochimie - Microbiologie Appliquées. Boumerdès : Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, 141p.
- Berthier J. et Valla G. (2001).** Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires Cultivés sur Corn Steep Liquor et Evaluation Nutritionnelle de la Biomasse *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, 11-28.
- Bessah .R et Touzi A. (2001).** Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (P. O. U) à partir des Déchets de Dattes. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, 37-40
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1990).**Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée ,Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine :Université Mentouri Constantine,102p.
- Bourgeois C.M. (1996).** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée ,Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine,102p.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J. (1996).** Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires Cultivés sur Corn Steep Liquor et Evaluation Nutritionnelle de la Biomasse *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, 11-28
- **Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J. (1989).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P. 216-244.

- **Bousdira K. (2007)**. Contribution à la connaissance de la biodiversité du palmier dattier pour une meilleure gestion et une valorisation de la biomasse : caractérisation morphologique et biochimique des dattes des cultivars les plus connus de la région du Mزاب, classification et évaluation de la qualité. Mémoire Magister, Boumerdes, 149 p.
- **Box G.E.P., Wilson K.B. (1951)**. Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée, Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine. 129p.
- **Castro P.M.L., Hayter P.M., Ison A.P. et Bull A.T. (1992)**. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38; 84–90.
- **Cerning J., GRIPON J.P. et DESMAZEAND M. (1984)**. Utilisation des enzymes dans l'industrie laitière. *la technique laitière*, 992 :9-24.
- **Chabasse D., Guiguen C. et Contet-Audonneau N. (1999)**. Mycologie médicale. Ed MASSON, Paris, P. 320.
- **Chermette, R., et Bussieras J. (1993)** . Etude de la diversité génétique et du pouvoir pathogène d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydomphila psittaci* chez les oiseaux. Thèse de doctorat : Microbiologie. Paris : Paris Tech .Institut des sciences et des technologies. 214p
- **Colwell R.R. & Grigorova. R. (1989)**. Methods in microbiology. (Ed) St E dimunds burt press limited. Great Britain. P. 133-138.
- **Davet P. (1996)**. Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée, Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine, 102p.
- **Delarras C. (2007)**. Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée , Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine, 102p.
- **Deming S.N. et Morgan S.L. (1988)**. Experimental Design: A Chemometrix Approach, Elsevier, New York, USA.

- Desoutter, A. (2008)**. Interet des modeles experimentaux d'aspergillose ; etude particuliere des stades precoces de l'infection chez les poussins (*Gallus gallus*). Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, Maisons-Alfort.
- Devi M.K., Banu A.R.et Gnanaprabhal G.R. (2008)**. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.*, 1(7); 1–6.
- Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z.et Bennamoun L.,(2006)** Application of a statistical design to the optimization of culture medium for a-amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder / *Journal of Food Engineering* 73 .190–197
- Djerbi M. (1994)**. Caractérisation physique-chimique comparative de deux principaux tissue constitutifs de la pulpe de datte Mech-Dagla. thèse de magister : technologie alimentaire. Boumerdes : université M'hamed Bougara de Boumerdes.112p
- Djouab A. (2007)**. Essai de formulation d'une margarine allégée à base d'un extrait de dattes Mech-Degla. Mémoire Magister, Boumerdès, 102 p.
- Diguta C. F. (2010)**. Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin. Thèse de Doctorat, France : Université de Bourgogne, Dijon, France.
- Ducroo P. (1982)**.utilisation industrielle des enzymes *.Ind.aliment .Agric*, 99, 6,401-416.
- Dutta P.K.et Banerjee R., (2004)**. Optimization of culture parameters for extracellular protease production from a newly isolated *Pseudomonas* sp. using response surface and artificial neural network models. *Proc. Biochem.*, 39; 2193–2198.
- Durand G.et Monson P. (1982)**.Production de la protéase neutre par *Aspergilluse oryzae* 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 : Université Mentouri Constantine,80p
- **Ellouz-Chaabouni S., Rhimi M. etBejar S. ( 2008)**. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* with high catalytic efficiency. *Biochimie*. 90:1291-1305.

- Espiard E. (2002)**. Caractérisation physique-chimique comparative de deux principaux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Dagla. thèse de magister : technologie alimentaire. Boumerdes : université M'hamed Bougara de Boumerdes.112p
- **Estanove P. (1987)**.Note Technique : Valorisation de la datte .Options Méditerranéennes. Sér .A/N 11,302-318
- Estanove P. (1990)**. Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée , Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine. 129p
- Francis R. et. Khasraji T.O. (1991)**. Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires Cultivés sur Corn Steep Liquor et Evaluation Nutritionnelle de la Biomasse *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, 11-28
- Frazier W.C. ( 1967)**. Isolement et identification de moisissures productrices de protéase à partir de milieux extrêmes.Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de Magister : Biochimie-Microbiologie appliquées. Constantine :Université Mentouri Constantine,84p
- Ferrero M.A. (2000)**. Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée, Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine, 129p.
- Germino J.et Bastia D. (1984 )** .Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* 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 : Université Mentouri Constantine,80p.
- Godon B.( 1996)** '*Protéines Végétales*', Ed. Tech. et Doc., Lavoisier, Paris, pp. 150-200.
- Gregory F., Rombouts P. et Buxton F.P. (1993)**. '*Cloning and Characterisation of PEPC, a Gene Encoding a Serine Protease from Aspergillus niger*', Gene, 06937, Elsevier, 25, pp. 57-64.
- Guillaume V. (2006)**. Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Mémoire de Magister : Biochimie - Microbiologie Appliquées. Boumerdès : Université M'Hamed Bougara de Boumerdès.141p.
- Guiraud J.P. (1998)**. Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. pp. 79.

- Hajji M., Rebai A., Gharsallah N. et Nasri M. (2008)**. Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée, Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine. 129p.
- Harrigan W.F. et McCance M.E. (1976)**. Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Academic press. London*. P. 21-277.
- Hartely B. (1960)** . Isolement et identification de moisissures productrices de protéase à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de Magister : Biochimie-Microbiologie appliquées. Constantine : Université Mentouri Constantine, 84p.
- Hölker U., Höfer M. and Lenz J. (2004)**. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 64: 175-186.
- Hölker U. and Jürgen L. (2005)**. Solid-state fermentation, are there any biotechnological advantages?. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 301-306.
- Iwashita K. (2002)**. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi – review. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94: 530-535.
- Jaouadi B, Abdelmalek B, Fodil D, Ferradji FZ, Rekik H, et Zarai N. (2010)**. Purification et caractérisation d'une kératinase thermostable KERAK-29 chez une nouvelle souche d'Actinomycète. Thèse de doctorat : Biochimie Appliquée. Annaba : Université Badji Mokhtar Annaba. 413p.
- Jarai G. et Buxton F. (1994)**. Nitrogen, carbon and pH regulation of extracellular acidic protease of *Aspergillus niger*. *Current Genetics*, 26: 238-244.
- Kammoun R., Naili B. et Bejar S. (2008)**. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresour. Technol.*, 99; 5602–5609.
- Kacem-Chaouch N., Maraihi Z., Destain J. et Thonart P. (2005)** Etude de la production de catalase par une souche mutante d'*Aspergillus phoenicis* dans l'extrait de farine d'extraction cultures submergées.

- Kennedy M. et Krouse D (1999)**. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 23, 456–75.
- Khenfar B. (2004)**. Caractérisation physique-chimique comparative de deux principaux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Dagla. thèse de magister : technologie alimentaire. Boumerdes : université M'hamed Bougara de Boumerdes. 112p
- 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.
- Larpent. J.P. (1991)** 'Biotechnologies des Levures', Ed. Masson, Paris, pp. 59-147.
- Lenoir J. et Auberger B. (1977)**. Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*, II- Caractérisation d'une protéase neutre. *Le lait*, 57; 471-489.
- Leyral G. et Vierling E. (2007)**. Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Mémoire de Magister : Biochimie -Microbiologie Appliquées. Boumerdès : Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, 141p.
- Lewis G., Mathieu D. et Phan-Tan-Luu R. (1999)**. Pharmaceutical Experimental Design, Marcel Dekker, *New York, USA*.
- **Loffler. A (1986)**. proteolytic enzymes : sources and applications .food technology. 60-70.
- Lowry O. H., Rosebroughi N. J., Farr A. L. et Randall R. J. (1965)**. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1) : 265-275.
- Madigan M.T. et Martinko J.M. (2007)**. Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée, Option: Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine, 102p.
- Mala B.R., Aparna M.T., Mohini S.G. et Vasanti V.D. (1998)**. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 597-635.

- Mathieu D. (2005).** Purification et caractérisation d'une kératinase thermostable KERAK-29 chez une nouvelle souche d'Actinomycète. Thèse de doctorat : Biochimie Appliquée. Annaba : Université Badji Mokhtar Annaba.413p.
- Martinelli S. D. et Kinghorn J. R. (1994).** *Aspergillus: 50 years on*. Elsevier. Amsterdam. P. 586-649.
- Matallah M. (1970).** Caractérisation physique-chimique comparative de deux principaux tissue constitutifs de la pulpe de datte Mech-Dagla. thèse de magister :technologie alimentaire. Boumerdes : université M'hamed Bougara de Boumerdes.112p
- Mehaia M.A. et Cheryan M. (1991).** Fermentation of date extracts to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors. *Enzyme Microbiol. Technol*, 13, 257–261.
- Mhetras N. C., Bastawde K. B. etGokhale D. V. (2009).** Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology*, 100: 1486-1490.
- Meyer A., Deiana J. et Bernard A. (2004).** Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Mémoire de Magister : Biochimie -Microbiologie Appliquées. Boumerdès : Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, 141p.
- Moreau C. (1978).** Isolement des moisissures productrices de protéase coagulantes .production et purification des enzymes et études de leur effet sur la coagulation de lait. Thèse de doctorat: Biochimie-Microbiologie appliquées. Constantine : Université Mentouri Constantine, 127p
- Moodie p. (2001).** Isolement et identification de moisissures productrices de protéase à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de Magister : Biochimie-Microbiologie appliquées. Constantine : Université Mentouri Constantine, 84p
- 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.
- Mukherjee A.K., Adhikari H.,et Rai S.K. (2008).** Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrical* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochem. Eng. J.*, 39; 353–361.



- Mullai P., Syed Ali Fathima N.et Rene E.R. (2010)**. Statistical analysis of main and interaction effects to optimize xylanase production under submerged cultivation conditions. *J. Agric. Sci.*, 2(1); 144–153.
- Murthy P.S., Naidu M.M.( 2010)**. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Appl. Sci. J.*, 8(2); 199-205.
- Munier k. (1973)**. Caractérisation physique-chimique comparative de deux principaux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Dagla. thèse de magister : technologie alimentaire. Boumerdes : université M'hamed Bougara de Boumerdes.112p
- Neu J. CrimW. N. et Sadowski J.A. (1984)** .Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* 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 :Université Mentouri Constantine,80p
- Noui Y., (2007)**. Caractérisation physique-chimique comparative de deux principaux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Dagla. thèse de magister :technologie alimentaire. Boumerdes : université M'hamed Bougara de Boumerdes.112p.
- Oskouie S.F.G., Tabandeh F., Yakhchali B.et Eftekhari F. ( 2008)**. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochem. Eng. J.*, 39; 37–42.
- **Paranthaman R., Alagusundaram K.et Indhumathi J. ( 2009)**. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World J. Agric. Sci.*, 5(3); 308-312.
- Pasqualotto A. C. (2010)**. Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Mémoire de Magister : Biochimie -Microbiologie Appliquées. Boumerdès : Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, 141p
- Pelmont J. (1995)**. Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble. Paris. P. 619-655.
- Plackett R.L.et Burman J.P.( 1946)**. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33; 305–325.
- Rai S.K.et 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.

- Raper K.B. et Fennell. (1965).** The genus *Aspergillus*. *Food Microbiol* 5: 163-176.
- Razi,M .(1993).** Caractérisation physique-chimique comparative de deux principaux tissue constitutifs de la pulpe de datte Mech-Dagla. thèse de magister : technologie alimentaire. Boumerdes : université M'hamed Bougara de Boumerdes.112p.
- 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.
- Regnault j,p. (1990).**Microbiologie générale ,Ed .vigot , paris ,143-164.
- Reddy L.V.A., Wee Y.-J., Yun J.-S.et Ryu H.-W. (2008).** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée, Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine. 129p
- Roukas T. et Kotzekidou P. (1991).** Pretreatment of date syrup to increase citric acid production. *Enzyme Microb. Technol*, 21, 273–276.
- **Sandhya C., Sumantha A.,et Szakacs G. (2005b).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 40; 2689–2694.
- **Scriban R., (1993).** Biotechnologie. 4eme édition. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 39; 42; 351- 356
- Scriban R. (1999).** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier .Paris. P. 149-159.
- Singh A., Ghosh V. K and Ghosh P. (1994).** Optimisation de la production de laprotéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée, Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine, 129p.
- Singh P. et Pandey A. (2009).** Production de la protéase neutre par *Aspergilluse oryzae* 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 : Université Mentouri Constantine,80p.
- Singhania R. R., Patel A. K., Soccol C. R. et Pandey A. (2009).** Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44: 13-18.

- Siboukeur O.(1997)**. Aptitude technologiques de quelque variétés communes de datte : Formulation d'un yaourt naturellement et sucré aromatisé. Thèse de doctorat : génie alimentaire. Boumerdes : université M'hamed Bougara de Boumerdes.186p
- Siboukeur O. (1997 a)**. Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes.Thèse Magister, INA. El-Harrach, Alger, 106 p.
- Smith N. R., Gordon R. E. et Clark F.E. (1952)**. Isolement et identification de moisissures productrices de protéase à partir de milieux extrêmes.Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de Magister : Biochimie-Microbiologie appliquées. Constantine : Université Mentouri Constantine,84p
- Sommer, R. (1996)** Yeast extract: Production, Properties and Components, International Symposium of Yeast, Sydney, August.
- Srinubabu G., Lokeswari N.et Jayaraju K., (2007)**. Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. *E-J. Chem.*, 4(2); 208-215.
- Tari C., Genckal H.et Tokatl F.( 2006)**. Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Proc. Biochem.*, 41; 659–665.
- Taguchi G. et Konishi S. (1987)**. Taguchi Methods, Orthogonal Arrays and Linear Graphics,American Supplier Institute, Dearborn, USA.
- Tabuc C. (2007)**. Incidence of *Fusarium* species and of their toxins in the compound feeds for poultry, International Scientific symposium: Performances and competitiveness in animal production, 26-27 avril 2007, Iasi, Roumanie.
- Teodoro( C.E.De S), Martins (M.L.L.) ( 2000)**. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. - *Braz. J. Microbiol.*, (4), 298-302.  
<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v31n4/a11v31n4.pdf>
- Touzi A. (1997)**. 'Production d'Ethanol à Partir des Déchets de Dattes', Recherche Agronomique, INRA, 1, pp. 53-57,
- Trap C. et Boireau P. (2000)**.Isolement et identification de moisissures productrices de protéase à partir de milieux extrêmes.Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de Magister : Biochimie-Microbiologie appliquées. Constantine : Université Mentouri Constantine,84p
- Tunga R., Banerjee R. et Bhattacharya B. C. (1998)**. Optimizing some factors affecting protease production under solid-state fermentation. *Bioprocess Engineering*, 19: 187-190.

- Tunga R., Shrivastava B. et Benerjee R. (2003)**. Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister : En Microbiologie Appliquée, Option : Biotechnologies Microbiennes. Constantine : Université Mentouri Constantine, 129p.
- 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.
- Vilkas M., (1993)**. Aptitude technologiques de quelques variétés communes de datte : Formulation d'un yaourt naturellement et sucré aromatisé. Thèse de doctorat : génie alimentaire. Boumerdes : université M'hamed Bougara de Boumerdes. 186p
- Ward O.P., Qin W.M., Dhanjoon J., Ye J., Singh A., (2006)**. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Adv. Appl. Microbiol.*, 58; 1-55.
- Wang S.-L., Chen Y.-H., Wang C.-L., Yen Y.-H. et Chern M.-K. (2005b)**. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme Microb. Technol.*, 36; 660–665.
- Witteveen C.F.B., De Vandervoort P.V., Swart K. et Visser J. (1990)**. Surproduction de la glucose-oxydase et mutants négatifs d'*Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, p. 683-686.
- Wu T.Y., Mohammad A.W., Jahim J.Md. et Anuar N. (2006)**. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microb. Technol.*, 39; 1223–1229.
- Zergat F. (1996)**. Contribution à l'Etude de la Production d'Acide Citrique par *Aspergillus niger* Cultivée sur Moût de Dattes. Mémoire d'ingénieur: d'état en agronomie saharienne, Ouargla : Université Kasdi Merbah, Ouargla 160p.
- Zhu L.Y., Nguyen C.H., Sato T. et Takeuchi M. (2004)** .Biosci Analysis of secreted proteins during conidial germination of *Aspergillus oryzae* RIB40. - *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68(12), 2607-2612.

# *Annexes*

## ANNEXE 01

- **Potato Dextrose Agar ( PDA)**

Le milieu pomme de terre dextrose agar (*Potato Dextrose Agar*), est recommandé pour l'isolement, la culture et le dénombrement des levures et des moisissures dans les denrées alimentaires et autres produits (Guiraud, 1998).

La composition chimique type en g/l d'eau distillée de ce milieu est :

- Infusât de pomme de terre (à partir de 200 g de pomme de terre).....4 g
- Glucose.....20g
- Agar-agar.....15g

pH final  $5,6 \pm 0,2$  à 25°C

Stérilisation à l'autoclave : 121°C pendant 15 min .

## **ANNEXE 2**

- **Milieu au lait gelose**

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

Lait.....100 ml

Agar.....20 g

Eau distillée sterile.....1000 ml

- Dissoudre l'agar dans les flacons.

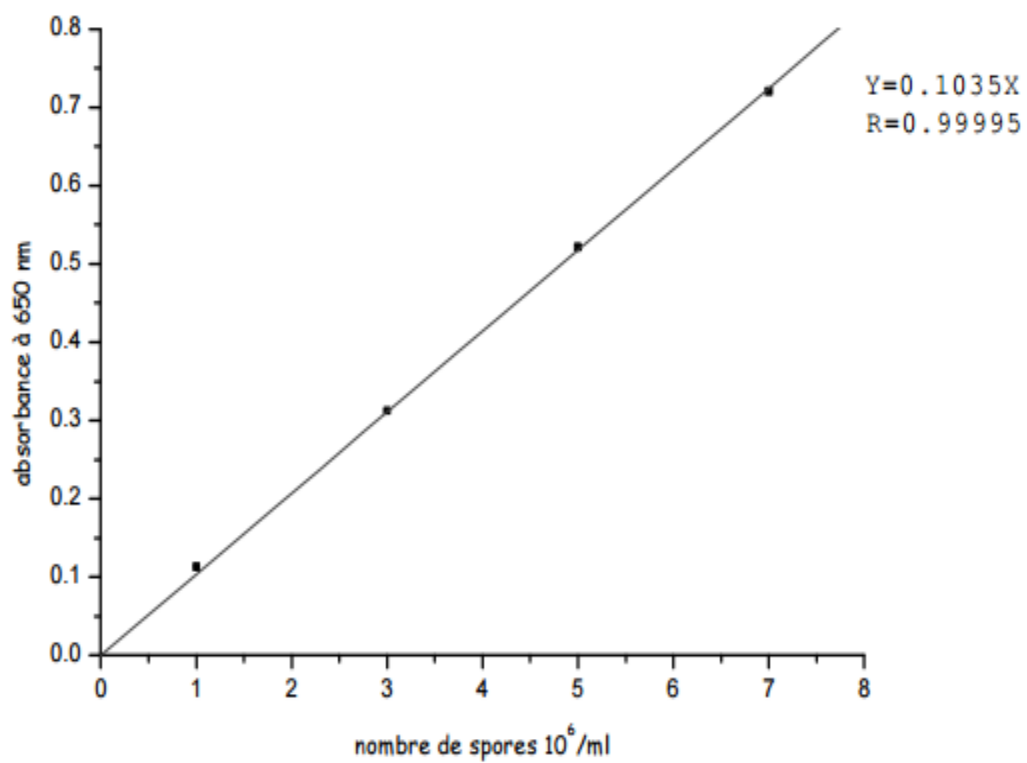
- Compléter chaque flacon avec de l'eau distillée

- Agiter jusqu'à homogénéisation pour obtenir l'eau gélosée

- Stériliser 20 minutes à 121°C.

- Après stérilisation, ajouter le lait écrémé stérile juste avant l'utilisation du milieu.

## ANNEXE 03 :

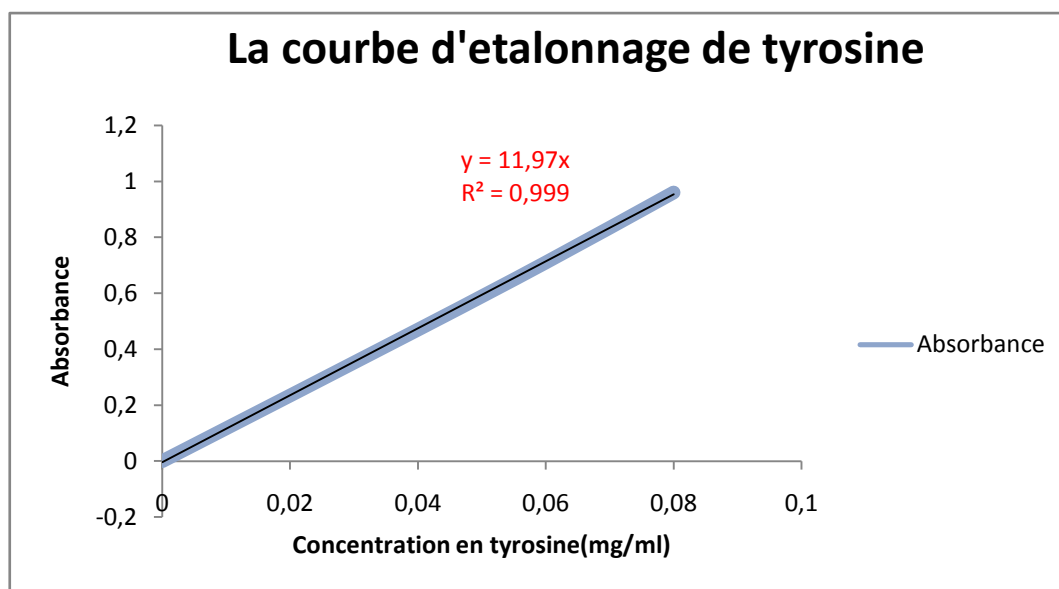


**Courbe étalon des spores d'*Aspergillus niger***



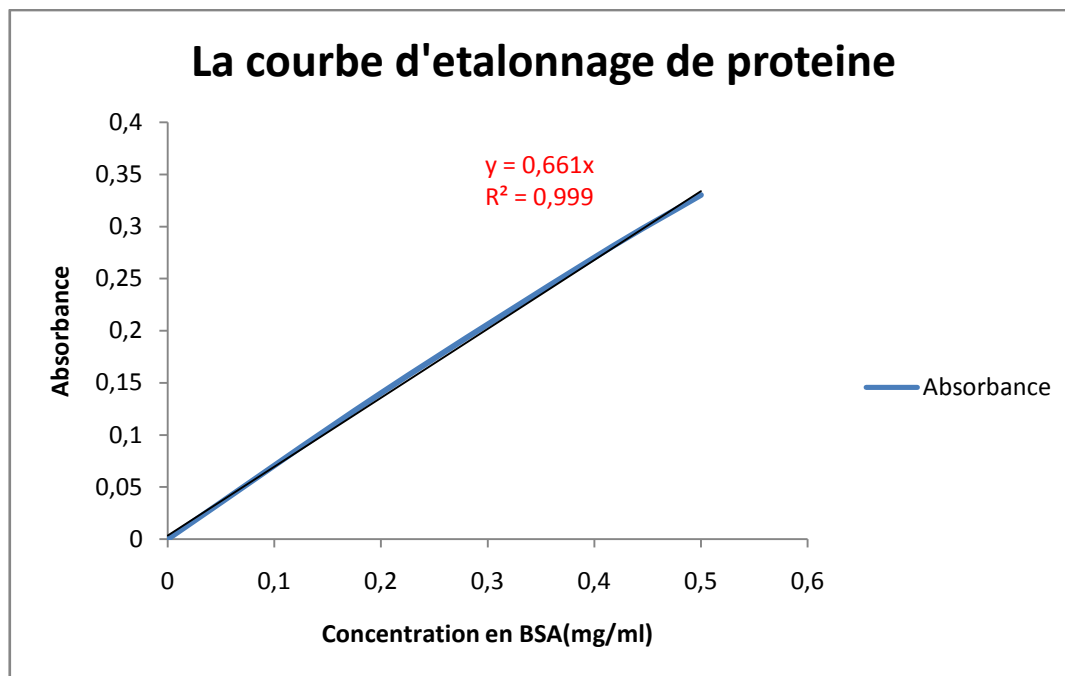
**ANNEXE 04 :**

- La courbe d'étalonnage de tyrosine



**Courbe d'étalonnage de la tyrosine**

- La courbe d'étalonnage des protéines



**Courbe d'étalonnage de protéine**

## Annexe 5

- **Plan d'expériences de Plackett et Burman**

Mathématiquement l'effet de chaque facteur ainsi que l'erreur est exprimé comme suit :

$$E = \frac{\sum \text{réponses au niveau (+)}}{n} - \frac{\sum \text{réponses au niveau (-)}}{n}$$

Où  $E$  : Effet de chaque facteur ;

$n$  : Nombre d'apparition du facteur au niveau supérieur ou inférieur,  $n = 4$

إنتاج البروتينات الحمضية بواسطة *Aspergillus niger* في الوسط السائل مستعملين بذلك بقايا التمور كمادة أولية للوسط المعيشي. والتي حسنت هذه الأخيرة وفقا لأسلوب إحصائي يتوافق مع مصفوفات Plakett et Burman  $n=8$  تجارب و  $n=1$  عامل : خمسة حقيقية (ببلا ت الزهور, خلاصة الخميرة , corn steep liquor , والأملاح). وخطأين. يكشف على النتائج التالية : خلاصة الخميرة  $p=0,239$  و الأملاح  $p=0,190$  يكون لها تأثير ايجابي إلا حد كبير على إنتاج الإنزيم البروتيني. أما بالنسبة  $p=0,224$  و خلاصة الخميرة  $p=0,052$  هما العاملان المؤثران على الكتلة الحيوية و corn steep liquor فهو المؤثر الوحيد على إنتاج البروتين . وأخيرا التحليل الإحصائي يمكن من تحديد العوامل التي تؤثر في إنتاج الانزيمات الحمضية بواسطة *Aspergillus niger* وهي خلاصة الخميرة , corn steep liquor والأملاح.

الكلمات المفتاحية : : الأنزيم البروتيني, *Aspergillus niger* . تخمر السائل, بقايا التمور, تحسين التخمر, Plakett et Burman

La production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur une culture liquide (*SmF*) est réalisée sur un milieu à base de déchets de dattes. Le milieu est optimisé suivant une méthode statistique en utilisant un plan d'expérience. La matrices de Plackett et Burman à  $N = 8$  expériences et  $N-1$  facteurs, cinq réels (les facteurs de production : la concentration de milieu de base, corn steep liquor, l'extrait de levure, le pétale de fleur et les sels) et deux erreurs. L'analyse statistique a révèlè les résultats suivants: l'extrait de levure ( $p=0,239$ ) et les sels ( $p=0,190$ ) ont un effet positif hautement significatif sur la production de protéase acide .et le corn steep liquor ( $p=0,224$ ) et l'extrait de levure ( $p=0,052$ ) ces deux facteur ont un effet positif hautement significatif sur la biomasse .Et pour la production de protéine le corn steep liquor ( $p=0,248$ ) a un effet significatif. En conclusion, l'analyse statistique permet la sélection des facteurs tels que corn steep liquor, l'extrait de levure, et les sels aussi bien pour une bonne croissance et une meilleure activité protéolytique possible.

Mots-clés : Protéase, *Aspergillus niger*, fermentations liquides, déchets de dattes, optimisation, Plakett et Burman .

A study of the production of the acid protease by *Aspergillus niger* on a liquid culture (SmF) is carried on a medium based on waste dates. The medium is optimized according to a statistical method using an experimental design. The Blackett and Burman matrices with  $N=8$  experiments and  $N-1$  factors, five real (concentration of base medium, corn steep liquor, yeast extract, flower petal and salts) and two errors, statistical analysis revealed the following results; yeast extract ( $p = 0,239$ ) and salts ( $p = 0,190$ ) had a highly significant positive effect on the production of acid protease and corn steep liquor ( $p = 0,224$ ) and yeast extract ( $p = 0,052$ ) both factors on the biomass. For protein production, corn steep liquor ( $p = 0,248$ ) has a significant effect. In conclusion, statistical analysis allows selection of factors such as corn steep liquor, yeast extract, and salts, are the most proteolytic activity possible.

**Keywords:** protease, *Aspergillus niger*, Liquid fermentation, Dates résiduels, optimization, Plackett and Burman.

**Thème:** Optimisation d'un milieu de culture à base de dattes déclassées pour la production d'une protéase acide par *Aspergillus niger*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des Mycètes / Fermentation et production de substances fongiques.

### Résumé

La production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur une culture liquide (*SmF*) est réalisée sur un milieu à base de déchets de dattes. Le milieu est optimisé suivant une méthode statistique en utilisant un plan d'expérience. La matrices de Plackett et Burman à  $N = 8$  expériences et  $N-1$  facteurs, cinq réels (les facteurs de production : la concentration de milieu de base, corn steep liquor, l'extrait de levure, le pétale de fleur et les sels) et deux erreurs. L'analyse statistique a révélé les résultats suivants: l'extrait de levure ( $p=0,239$ ) et les sels ( $p=0,190$ ) ont un effet positif hautement significatif sur la production de protéase acide .et le corn steep liquor ( $p=0,224$ ) et l'extrait de levure ( $p=0,052$ ) ces deux facteur ont un effet positif hautement significatif sur la biomasse .Et pour la production de protéine le corn steep liquor ( $p=0,248$ ) a un effet significatif. En conclusion, l'analyse statistique permet la sélection des facteurs tels que corn steep liquor, l'extrait de levure, et les sels aussi bien pour une bonne croissance et une meilleure activité protéolytique possible.

**Mots clés :** Protéase, *Aspergillus niger*, fermentations liquides, déchets de dattes, optimisation, Plackett et Burman.

**Laboratoire de recherche :** *Biologie et Environnement au biopôle de Chaab-Ersass,*

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Mme LEGHLIMI Hind. Maître de conférences B. Université Constantine 1.

**Rapporteur :** Mme BENKAHOUL Malika. Maître de conférences B. Université Constantine 1.

**Examineur :** Mme ABD LAZIZ Ouidad. Maître assistant A. Université Constantine 1.

**Date de soutenance :** 19/06/2017