



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche
جامعة الشهيد حمدة لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar-El OUED
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de biologie Cellulaire et Moléculaire

N série

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences
biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

THEME

**Optimisation de production de protéase acide
par l'*Aspergillus niger* sur milieu solide**

Présenté Par :

M^{elle} BOUTERA Zohra

M^{elle} SADDALAHE Samia Mouna

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me} MEDILA Ifriqya

M.C.B, Université d'El Oued.

Examinatrice : M^{me} MAHBOUB Nassma

M.A.A, Université d'El Oued.

Promotrice : M^{elle} BOUKHARI Dalel

M.A.B, Université d'El Oued.

Année universitaire 2016/2017

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions le DIEU, notre créateur de nos avoir donné les forces, la volonté et le courage afin d'accomplir ce modeste travail.

*Nous adressons le grand remerciement à notre encadreur **M^{elle} BOUKHARI Dalel** Maitre assistante à l'université Chahid Hamma Lakhder d'el Oued pour avoir acceptée d'encadrer ce travail et pour ses conseils et ses précieuses orientations, ses encouragements, sa patience qu'elle n'a cessé de nous apporter tout au long de ce travail.*

*Nos sincères et respectueux remerciements vont également à **M^{me} MEDILA Ifriqya***

Maitre assistante à l'université Chahid Hamma Lakhder d'el Oued qui nous a honoré en acceptant d'être président de ce jury et pour ses précieux conseils.

*Nous exprimons nos vifs remerciements à **M^{me} MAHBOUB Nassma**, Maitre assistante à l'université Chahid Hamma Lakhder d'el Oued de nos avoir accordé le privilège de participer à ce jury et d'examiner avec soin ce mémoire. Tout l'honneur lui en revient.*

Nos vifs remerciements s'adressent à responsable du laboratoire Direction de la santé et de logement DSL d'el Oued, pour leur aider et leur disponibilité. Qu'il soit assuré de notre profonde gratitude.

*Un grand merci aussi à toute l'équipe de laboratoire de **contrôle de qualité** pour ses aides et ses confiances à fin d'obtenir des bons résultats.*

*Nous tenons à remercier particulièrement **M^{elle} GOUBI Sana** ingénieur du laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie et tous les techniciens chacun et son nom, pour leur aide durant toute la période de notre travail.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements chaleureux vont également au responsable du laboratoire VTRS au département des Sciences et Technologie à l'université el chahid Hamma Lekhde- el Oued : **Mr LAANEZ Touhami**, et également les 'ingénieurs du laboratoire VTRS **Mr TLIBA Ali** pour leur aider et leur disponibilité.*

A nos collègues et nos amis pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble. Enfin, nous remercions gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Résumé

La production des enzymes constitue un des objectifs de l'utilisation industrielle des microorganismes. Le but de notre étude est l'isolement de *Aspergillus niger* et l'optimisation de leur production de protéase acide sur milieu solide. Dans ce contexte, la production de la protéase acide extracellulaire par l'espèce fongique *Aspergillus niger* isolée localement, sur le sol de complexe touristique thermal de sidi yahia, fermenté par des cultures solides (SSF), a été optimisée de façon à obtenir la meilleure activité protéolytique. Des tests de stabilité de l'enzyme ont été également effectués. Les résultats obtenus montrent que la meilleure production de cette enzyme (169.33 µg/h/ml) a été obtenue sur milieu à base de son de blé (5g), cultivé par l'utilisation d'une solution minérale Czapek-Dox à pH 4 incubé à 30°C pendant 3 jours. Il présente une stabilité dans la gamme du pH 3,0-5,0 à 4°C pendant 24 heures dans le tampon citrate de sodium (0,1M) et une stabilité thermique jusqu'à 50°C pendant 1 heure.

Mots clés:

Aspergillus niger , Isolement, Optimisation, SSF, Protéase acide, activité protéolytique

ملخص

تعتبر عملية إنتاج الإنزيمات من أهم أهداف الاستغلال الصناعي للكائنات الحية الدقيقة ، الهدف من دراستنا آلية إنتاج البروتياز الحمضي عن طريق عزل فطر *Aspergillus niger* من تربة منبع المياه الحارة للمنتج الصحي سيدي يحيى ببسكرة ، وزرعها في وسط صلب (نخالة القمح) ثم البحث عن الشروط المثالية لإنتاج البروتياز الحمضي المفرز خارج الخلية ذا أحسن نشاط إنزيمي ، كما أجرينا بعض اختبارات استقرار الإنزيم ، النتائج المتحصل عليها تبين إن أفضل إنتاج لهذا الإنزيم (169.33 ميكرو غرام / مل / سا) تم الحصول عليه على نخالة القمح (5 غ) ، المزروعة باستخدام المحلول المعدني Czapek-Dox في pH = 4 و 30 درجة مئوية خلال 3 أيام. حيث استقر الإنزيم المستخلص في درجة حموضة من 3 الى 5 في 4 درجات مئوية خلال ساعة في سترات الصوديوم (1M) كما استقر حراريا لمدة ساعة حتى 50 درجة مئوية.

الكلمات المفتاحية:

Aspergillus niger، عزل، التحسين، التخمر في وسط صلب، البروتياز الحمضي، نشاط التحلل البروتيني

LISTE DES ABREVIATION

μ: Micron

a_w: Activity of water

AP: Activité Protéolytique

ATP: Adenosine très phosphate

ATPase: Enzyme Adenosine très phosphate

BBC :Bleu Brillant de Coomassie

BSA: Bovin Serum Albumin

CYA: Czapek Yeast Extract Agar

HCl: Acidechlorhydrique

GRAS: Generally Regarded As Safe

FDA: Food and Drug Administration (USA)

k Da: Kilo Dalton

NaOH: Hydroxyde de sodiums

OTA: Ochratoxine A

p/v: poids/volume

PDA: Potato Dextrose Agar

pH: potentiel d'Hydrogène

SSF: Solid-State Fermentation

T°: Température

TCA: Acide trichloracétique

U:Unité enzymatique

I.U.B:. International Union of Biochemistry Bergmeyer

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 01	Les premières images de conidiophores <i>Aspergillus</i> comme représenté par Pier Antonio Micheli en 1729 mucédinées "par t-il botaniste français Philippe Edo	14
Figure 02	Apparence Microscopique: <i>Aspergillus</i> tête <i>Aspergillus niger</i>	15
Figure 03	La structure d' <i>Aspergillus niger</i>	18
Figure 04	Structure de l'appareil conidien des <i>Aspergillus</i> . a) Organisation générale. b) Disposition en colonne	19
Figure 05	La contamination de l'exemple d'un oignon <i>Aspergillus niger</i>	22
Figure 06	<i>A. niger</i> sur gélose Sabouraud (Colónia de <i>Aspergillus niger</i>)	23
Figure 07	Présentation géographique de la zone d'étude Tamanrasset	27
Figure 08	Les étapes d'isolement	29
Figure 09	Préparation du lait gélosé à 30% (LG)	30
Figure 10	Les étapes de préparation du milieu de culture solide son de blé	32
Figure 11	les étapes de la fermentation d' <i>Aspergillus niger</i>	34
Figure 12	Les étapes du extraction et purification de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i>	36
Figure 13	Aspect des colonies d' <i>Aspergillus niger</i> après 5 j à 30° C sur le milieu CYA	37
Figure 14	Mise en évidence de l'activité protéolytique d' <i>Aspergillus niger</i> sur milieu lait gélosé (AP : anneau de protéolyse, culture de 5 jours).	39
Figure 15	Influence de la composition des milieux salins sur la production de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> (incubation à 30°C).	41
Figure 16	Effet du pH initial du milieu minéral sur la production de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> (solution Czapek-Dox, 30°C).	41
Figure 17	L'effet de la température d'incubation sur la production de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> (solution Czapek-Dox, pH= 4).	42
Figure 18	Influence du temps d'incubation sur la production de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> (solution Czapek-Dox, 30°C, pH4).	43
Figure 19	Effet de la température sur l'activité protéolytique de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i>	45
Figure 20	L'influence du pH sur l'activité protéolytique de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i>	45

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Classification des enzymes selon la réaction catalysée	04
Tableau 02	Les enzymes produites par <i>A.niger</i>	19
Tableau 03	Les milieux de cultures utilisés pour <i>l'Aspergillus niger</i>	28
Tableau 04	Caractères cultureux et morphologiques des colonies <i>d'Aspergillus niger</i>	37
Tableau 05	Observations macroscopiques et microscopiques des colonies <i>d' Aspergillus niger</i>	38
Tableau 06	Dénombrement des spores des inocula utilisés pour la fermentation	40

SOMMAIRE

Remerciements
Liste des figures
Liste des tableaux
Résumé
Introduction

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: Les protéases	
I.1.1. Généralités sur les enzymes.....	3
I.1.2. Définition de protéase.....	5
I.1.3. Les origines des protéases protéolytique	5
I.1.3.1. Protéases d'origine végétale.....	5
I.1.3.2. protéases d'origine animale	5
I.1.3.3. Protéases d'origine microbiens.....	6
I.1.4. Classification des protéases.....	6
I.1.4.1. Selon leur site d'action	6
I.1.4.2. Selon la localisation cellulaire.....	8
I.1.4.3. Selon leur pH optimal	8
I.1.4.4. Selon leur besoin en ATP.....	9
I.1.5. Mode d'action des protéases.....	9
I.1.6. Caractères des protéases.....	9
I.1.7. Les applications des protéases	10
Chapitre 2 : <i>Aspergillus niger</i>	
I.2.1. Généralité.....	13
I.2.2. L'espèce <i>Aspergillus niger</i>	16
I.2.3. Taxonomie.....	17
I.2.4. Morphologie	17
I.2.5. Reproduction.....	18
I.2.6. Les enzymes produites par <i>l'Aspergillus niger</i>	19
I.2.7. Isolement d' <i>Aspergillus niger</i>	21
I.2.7.1. Substrats.....	21
I.2.7.2. Milieu.....	22
I.2.7.3. Culture.....	22
I.2.8. La Fermentation sur milieu solide.....	23

I .2.8.1.Avantages de la fermentation sur milieu solide.....	23
I. 2.8.2.Microorganismes utilisés.....	24
I. 2.8.3.Applications industrielles de la fermentation sur milieu solide.....	24

DEUXIEMES PARTIE: MATERIEL ET METHODES

II. Matériel et Méthodes	
II.1.Présentation de la région d'étude	25
II .2. Isolement.....	25
II.2.1.Les milieux de cultures utilisés.....	26
II.2.2.Préparation de la suspension du sol.....	26
II-2-3-Observation et repiquage des mycéliums.....	27
II.2.4.Identification	27
II .2.5. Conservation.....	27
II.3.Méthodes de dosage.....	27
II.3.1.Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	27
II.3.2.Mesure de l'activité protéolytique.....	29
II.3.3-Dosage des protéines.....	30
II.4.Méthode de fermentation	30
II.4.1.Préparation du milieu de culture	30
II.4.2.Préparation de l'inoculum.....	30
II.5.Dénombrement des spores	31
II.6.Conduit de la fermentation	31
II.7.Méthodes d'optimisation.....	32
II.7.1.Choix du milieu minéral.....	33
II.7.2.pH initial du milieu minéral.....	33
II.7.3.Température d'incubation.....	33
II.7.4.Temps d'incubation.....	33
II.8.Extraction et purification de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i>	33
II.9.Etude de la stabilité de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i>	34
II.9.1.Stabilité thermique.....	34
II.9.2.Stabilité vis-à-vis du pH.....	34
II.10.Etude statistique.....	34

TROISIEME PARTIE: Résultats et discussion

III. Résultats et discussion.....	
III .1.Isolement des souches.....	35
III .2.Identification morphologique.....	35
III .2.1.Identification macroscopique.....	35
III.2.2.Identification microscopique	36
III.3.Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	36
III.4.Optimisation de la fermentation	37
III.4.1.Dénombrement des spores.....	37
III.4.2.Choix du milieu minéral.....	38
III.4.3. Influence du pH du milieu minéral.....	39
III.4.4. Effet de la température d'incubation.....	40
III.4.5. Effet du temps d'incubation.....	41
III.5. Etude de la stabilité.....	42
III.5.1. Stabilité thermique.....	42
III.5.2. <i>Stabilité vis-à-vis du pH</i>	43
Conclusion	44
Références bibliographiques.....	45
Annexes.....	56
résumé et mots-clés	

INTRODUCTION

Introduction

Au cours des dernières décennies, le développement de la microbiologie a abouti à l'obtention de matériels biologiques très divers, modifiés génétiquement ou non et susceptibles d'être utilisés dans des procédés de production de vitamines, d'hormones, de vaccins et d'enzymes (**Scriban, 1999**).

Les enzymes d'origine microbienne, présentent des propriétés et des spécificités diverses. Parmi ces enzymes, on recense les protéases qui sont d'une grande importance en biotechnologie (**Scriban, 1999**). Ces propriétés reflètent de plus en plus leurs utilisations dans divers domaines d'applications, tels que l'industrie alimentaire humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (**Bottonet et al., 1999**). La culture des champignons pour la production d'enzymes s'effectue soit sur substrat solide, soit en culture submergée comme c'est le cas pour la production de la plupart des métabolites d'origine microbienne (**Pol, 1996**).

Actuellement, la compétition est très forte dans le monde des enzymes industrielles et les prix de ces produits d'hautes technologies sont à la baisse entraînant des réductions majeures dans les coûts de production. La capacité de l'industrie de produire des un faible coût est donc essentielle pour maintenir sa compétitivité (**Nathalie, 1999**).

La majorité des enzymes fongiques sont produites principalement par des genres d'*Aspergillus*, *Mucor*, *Entothia*, *Rhizopus*, *Penicillium* et *Fusarium* (**Vishwanatha et al., 2010**). Ces espèces fongiques sont caractérisées par leur adaptation aux cultures solides à base des substrats bon marché, facilitant ainsi l'extraction et la récupération des protéases extracellulaires à partir des milieux de fermentation avec des rendements rentables tout en réduisant les coûts d'exploitation (**Sathya et al., 2009**). Le choix du milieu approprié de fermentation est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes (**Dubey et al., 2000**).

L'isolement d'une souche locale d'*Aspergillus niger*, à partir du sol de la région de Biskra, caractérisée par sa capacité de produire une protéase et l'optimisation des condition favorable pour cette production nécessite une étude approfondie afin d'améliorer la production et la qualité des produits obtenus.

Dans cette optique, nous avons étudié la possibilité d'obtention de la protéase acide, produites à partir d'une souche fongique localement isolée. Notre étude comporte ces étapes:

- Isolement des de " l' *Aspergillus niger*" à partir du sol de Biskra, et son identification.
- Mise en évidence de l'activité protéolytique chez les moisissures purifiées.
- Production des protéases par fermentation submergée sur milieu à base de son de blé.
- étude de la stabilité des extraits enzymatiques brut

PREMIERE PARTIE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1
LES PROTEASES

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: les protéases

I. 1 Les protéases

I. 1.1. Généralités sur les enzymes

I. 1.1.1. Définition

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (**Bergmeyer & Gawekn, 1979 ; Scriban, 1993 ; Pelmont, 1995 ; Drouin, 2005**).

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

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

I. 1.1.2. Marché des enzymes

Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité conserve une forte croissance. Estimé à plus de 1,5 milliards US\$ en l'an 2000. Il est prévu qu'en 2011, il atteindra 6 milliards de dollars (**Kumar et al, 2008**). Les enzymes protéolytiques sont les plus importants des enzymes de industriels représentant, de larges ventes mondiales de environ 60% o f l'ensemble du marché de l'enzyme (**Rao et al, 1998**).

le marché de l'enzyme industrielle a atteint 1,6\$ milliard en 1998 divisé dans les domaines d'application suivants: alimentation 45 % ; 34 % détergent; textile 11 % cuir 3 %; pâtes et papiers 1.2 %. cela ne comprend pas enzymes.in diagnostique et thérapeutique 2000, le marché de l'enzyme industriel atteint 2\$ milliards (**José & Arnold, 2005**). Parmi les enzymes industrielles les plus importantes, les protéases ce qui représente près de 65% du marché mondial de l'enzyme. Ils ont de nombreuses applications dans diverses industries: alimentaire, pharmaceutique, détergent, dehairing en cuir, récupération d'argent à partir d'occasion films X-ray, la synthèse cosmétique et peptide (**Hayet et al, 2014**).

I. 1.1.3. Origines des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles proviennent de source végétale, animale ou microbienne . L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. En effet, les principaux avantages des enzymes de production par apport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendement de production pouvant être augmenter de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (**Scriban, 1993**).

Les enzymes Industriel sont utilisés dans la lessive et la vaisselle détergents, jeans délavage à la pierre, de la pâte et la fabrication du papier dehairing en cuir et de la tannerie, d'encollage des textiles, désencrage de papier, et le dégraissage des peaux (**Oyeleke, 2011**).

I. 1.1.4. Classification des enzymes

Selon la commission des enzymes de l'I.U.B. (*International Union of Biochemistry Bergmeyer, 1979*). les enzymes se répartissent en six classes (Tableau 1). Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases (**Rao et al., 1998 ; Assamoi et al., 2009**).

Tableau 01: Classification des enzymes selon la réaction catalysée (**Voet, 2004**).

E.C (classe)	Classification	Type de reaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupement fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de double liaisons
E.C.5	Isomérases	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaison couplée à l'hydrolyse de l' ATP

I. 1.2. Définition de protéase

Les protéases (peptidase ou enzymes protéolytiques) (**Monteiro, 2015**) sont des enzymes hydrolytiques qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques clivant les protéines en fragments peptidiques plus petits (**Radha, 2012**) elles peut être spécifiques conduisant à une clivage sélective des protéines pour la modification et la maturation post-traductionnelle (**Monteiro, 2015**).

les protéases sont capables de dégrader in vitro un nombre multiple de substrats et, la plupart du temps, plusieurs protéases ont la capacité de dégrader in vitro un même substrat. Cette caractéristique découle du fait que la spécificité d'une protéase n'intervient généralement peu ou pas au niveau de la conformation du substrat, mais plutôt au niveau de la liaison peptidique à cliver (**Barry, 1997; Reginald et al., 2000**).

La protéase constitue un grand groupe et complexe des enzymes qui joue un rôle nutritionnel et régulateur importante dans la nature. Les protéases sont (Physiologiquement) nécessaire pour les organismes vivants; ils ubiquiteures et trouvé dans grande diversité des sources (**Muthulakshmi, 2011**), il se produire dans tous les êtres vivant tels que plantes, animaux, microorganismes (**Radha, 2012**).

Les enzymes protéolytiques sont les enzymes industrielles le plus importantes, représentant environ 60% du ventes mondiale du marché total de l'enzyme. Elles sont résistant haut température avec activités spécifiques élevées et caractéristiques physiques et chimiques supérieures (**Mukhtar & Haq, 2009**).

I. 1.3. Les origines des protéases

I. 1.3.1. Protéases d'origine végétale

L'utilisation de plantes en tant que source de protéases est régie par plusieurs facteurs tels que la disponibilité des terres pour la culture et l'adéquation des conditions climatiques pour la croissance. En outre, la production de protéases de plantes est un processus de longue haleine. papaïne, bromélaïne, kératinases et ficin représentent quelques-unes des protéases bien connues d'origine végétale (**Mala, 1998**).

I. 1.3.2. Protéases d'origine animale

Les protéases les plus connus d'origine animale sont la trypsine, la pancréatique, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine. Ceux-ci sont préparés sous forme pure en grande

quantités. Mais, la production de ces enzymes dépend de la disponibilité de bétail, qui est gouverné par la politique et les bris d'agriculture (Mala, 1998).

I. 1.3.3. Protéases d'origine microbiens

L'incapacité des protéases végétales et animales pour répondre aux exigences mondiales actuelles du monde a conduit à un intérêt accru pour les protéases microbiennes. Les micro-organismes constituent une excellente source d'enzymes en raison de leur grande diversité biochimique et leur sensibilité à la manipulation génétique. Les protéases microbiennes représentent environ 40% du total des ventes d'enzymes dans le monde. Les protéases microbiennes sont préférées aux enzymes végétales et animales car elles possèdent presque toutes les caractéristiques souhaitées pour leurs applications biotechnologiques (Mala, 1998).

I. 1.4. Classification des protéases

Les protéases (EC3.4.21-24) forment un large groupe des enzymes ubiquistes et la catégorie la plus centrale des enzymes d'un point de vue industriel. Elles catalysent l'hydrolyse de liaisons peptidiques présentes dans des protéines et sont principalement classées selon : leur site d'action, leur pH optimal, la localisation cellulaire, leur besoin en ATP (Ishtiaq, 2011; Sethia, 2016).

I. 1.4.1. Selon leur site d'action

Selon leur site d'action, les protéases peuvent être classées en deux groupes : exopeptidases et endopeptidases (Sethia, 2016).

A). Les exopeptidases

Agissent uniquement à proximité des extrémités des chaînes polypeptidiques. On distingue les amino-peptidases agissant sur la liaison peptidique N-terminale et les carboxypeptidases clivant la liaison peptidique C-terminale (Monteiro, 2015; Kiran, 2016) :

- ❖ **Aminopeptidases** (EC 3.4.14) agissent à une extrémité N-terminale libre de la chaîne de polypeptide et libèrent un résidu d'acide aminé unique, dipeptide, ou d'un tripeptide. (Monteiro et al., 2015)
- ❖ **Carboxypeptidases** agissent à l'extrémité C-terminale de la chaîne polypeptidique et libèrent un seul acide aminé ou un dipeptide. Elles peuvent être divisées en trois grands groupes, les sérine peptidases (EC 2.4.16), les métallo-peptidases (EC 2.4.17), et les cystéine

peptidases (EC 2.4.18), basée sur la nature des résidus d'acides aminés au niveau du site actif des enzymes (**Monteiro, 2015**).

B). Les endopeptidases

Sont caractérisés par leur action préférentielle au niveau des liaisons peptidiques dans les régions internes de la chaîne de polypeptide (**Monteiro, 2015**). En fonction de l'acides aminés présent au niveau du site actif, ces protéases peuvent être classées en serine, thréonine, cystéine, aspartate et métallo-protéases (**Sethia, 2016**).

- ❖ **Les protéases à sérine:** les serine proteases sont caractérisées par la présence d'un groupe de serine dans le site actif. Ils sont généralement actifs à pH neutre et alcalin, avec optimale à pH 7-11, de faible masse moléculaire (18-35 kDa) et avoir des applications dans un certain nombre d'industries (**Monteiro, 2015**). Les protéases à sérine jouent un rôle prépondérant dans l'homéostasie du système vasculaire, notamment dans la coagulation, la fibrinolyse et le remodelage tissulaire. Dans le sang, ces protéases à sérine circulent sous formes inactives appelées zymogènes, qui, une fois activées, sont rapidement et irréversiblement inhibées par des inhibiteurs circulants, appelés serpins (**Boulaftali, 2012**) .
- ❖ **Métalloprotéases:** les métalloprotéases sont les plus diverses des types catalytiques de protéases. Elles sont caractérisées par l'exigence d'un ion métallique divalent pour leur activité (**Monteiro, 2015**). L'association coordonnée de processus d'adhérence à la barrière endothéliale, à des processus de protéolyse facilite leur extravasation et l'infiltration des tissus cibles (**Devy, 1999**).
- ❖ **protéases cystéines:** l'activité de toutes les protéases cystéines dépend d'une dyade catalytique consistant en la cystéine et de l'histidine. En général, les protéases cystéines sont actives uniquement en présence d'agents réducteurs tels que HCN, ou la cystéine. La papaïne est la cystéine-protéase la plus connue (**Monteiro, 2015**).
- ❖ **Protéases acides aspartiques (Protéase à acide aspartique):** Les protéases aspartiques appelées également protéases acides, sont des enzymes protéolytiques dont l'activité catalytique dépend d'un résidu d'acide aspartique présent au niveau du site actif de l'enzyme (**Voet, 2004 ; Souza, 2014**). Elles ont été regroupées en trois familles, à savoir, la pepsine (A1), retro-pepsine (A2), et les enzymes de para-rétrovirus (A3). La majorité de ces enzymes ont à un pH isoélectrique entre 3 et 4,5 et une activité maximale à des faibles pH (généralement de 3 à 5) qui est déterminée par la et position l'orientation de tous les résidus à proximité du site actif (**Rao et al.,**

1998). Les protéases acides sont reconnues par leur inhibition spécifique par le pepstatin, un penta-peptide produit naturellement par des souches de *Streptomyces sp.* Il contient deux résidus d'acide aminé inhabituel: la statine. L'oxygène de l'hydroxyle de la première statine forme des liaisons hydrogènes avec les deux résidus catalytiques d'aspartate, ce qui provoque l'inhibition (Yang & Quail, 1999; Reginald et al., 2000).

I. 1.4.2. Selon la localisation cellulaire

Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur localisation dans la cellule, soit les protéases intracellulaires et extracellulaires (Mathieu, 2005).

A). Les protéases intracellulaires

Ces protéases jouent un rôle essentiel dans l'élaboration et la régulation des processus cellulaires et métaboliques, ce type de protéases est moins intéressant à l'utilisation industrielle car ces enzymes nécessitent une étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction (Mala et al., 1998).

B). Les protéases extracellulaires

Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des protéines en petits peptides assimilables par les cellules. Ces enzymes sont plus intéressantes pour utilisation en industrie car elles ne nécessitent pas d'étapes de lyse cellulaire pour en faire l'extraction (Mala et al., 1998).

I. 1.4.3. Selon leur pH optimal

Selon leur pH optimal on distingue les protéases acides: pH optimal inférieur à 7,0 (2,0-5,0), les protéases alcalines: pH optimal supérieur à 7,0 et les protéases neutres: pH optimal 7,0 (Sethia, 2016).

Les protéases neutres sont principalement d'origine végétale avec une activité optimale à un pH compris entre 8 et au-dessus (Alnahdi, 2012). Elles sont importantes pour l'industrie alimentaire car elles possèdent une fonction spécifique à hydrolyser des liaisons d'acides aminés hydrophobes réduisant ainsi l'amertume des hydrolysats de protéines alimentaires. (Ishtiaq, 2011)

Les protéases alcalines produites à partir de micro-organismes jouent un rôle important dans plusieurs industries exemple détergent, bronzage, industries photographiques, pharmaceutiques et de traitement des déchets, etc. Le genre "*Bacillus*" est une source importante de protéases alcalines industrielles et sont probablement les seuls genres

commercialisé pour la production de protéase alcaline (**Alnahdi, 2012**). La sécrétion de protéases semble jouer un rôle important dans l'invasion des tissus de l'hôte (**Aissi, 2004**). Les protéases acide obtenu les meilleurs résultats dans un intervalle de pH de 2,0 à 5,0 et sont principalement produites par des champignons (**Alnahdi, 2012**).

I. 1.4.4. Selon leur besoin en ATP

Un quatrième critère de classement, est lié au besoin ou non d'ATP pour fonctionner, ce groupe de protéases comprend celles composées de plusieurs sous-unités contenant des domaines d'ATP ase et des domaines protéolytiques. Ils existent des protéases qui ne peuvent être classées dans aucun de ces groupes (exemple : les signaux peptidases des lipoprotéines) (**Kumar et al., 1998**).

I. 1.5. Mode d'action des protéases

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'H₂O) (**Pelmont, 1995**).

I. 1.6. Caractéristiques des protéases

Les protéases constituent un groupe très large et complexe contenant des enzymes qui diffèrent dans leurs propriétés tels que: le site actif, le mécanisme catalytique les optima du pH et de température, le profil de la stabilité et la spécificité du substrat (**Sumantha et al., 2006; Vishwanatha et al., 2009**). La vitesse des réactions enzymatiques dépend aussi de la présence de certains activateurs ou des inhibiteurs (**Penasse, 1974**).

La spécificité d'action des enzymes protéolytiques est régie par la nature de l'acide aminé et d'autres groupes fonctionnels (aromatiques, aliphatiques ou la présence de sulfure) autour de la liaison à hydrolyser (**Sumantha et al., 2006; Benedykt & Katarzyana, 2008**).

Ces enzymes sont très importantes du fait qu'elles ne contrôlent pas seulement les réactions protéolytiques, mais aussi elles régulent les diverses cascades enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire tels que la décomposition des lipides et des glucides.

Les protéases sont capables de modifier les propriétés biologiques des chaînes polypeptidiques suite à la coupure des liaisons peptidiques (activation, inactivation ou une protéolyse non spécifique pendant la dégradation). La raison pour laquelle les protéases peuvent être dangereuses pour les cellules en altérant leur environnement. De ce fait, la cellule a développé une large gamme des mécanismes pour contrôler l'activité protéolytique.

Cette régulation peut être effectuée à n'importe quelle étape de l'expression des gènes (la transcription depuis l'opéron, la traduction, les modifications post-traductionnelles, l'interaction avec les inhibiteurs et d'autres protéines) **(Reginald, 2000; Benedykt & Katarzyna, 2008)**.

I. 1.7. Les applications des protéases

Les protéases sont parmi les trois plus grands groupes des enzymes industrielles (hydrolases), comptent pour environ 60-65% des ventes totales dans le monde entier des enzymes en raison de leurs applications dans plusieurs secteurs industriels **(Souza, 2014)**.

I.1.7.1. Industrie alimentaire

A). La fabrication du fromage

Des recherches approfondies ont permis de prouver que la majorité des protéases acides microbiennes possède une grande capacité à coaguler le lait pour former le caillé, l'étape clé dans la production fromagère ce qui facilite l'expansion de l'industrie fromagère, dont le développement a été limité par la pénurie de la présure animale **(Chellappan, 2006)**.

Le traitement chimique, par des agents oxydants, appliqué à l'extrait enzymatique obtenue à partir de *Mucor meihei* permet d'obtenir une enzyme aux propriétés similaires celles de la présure de veaux, en termes de productivité et la qualité du produit final **(Neelakantan et al., 1999)**.

Dans l'industrie du lait, les protéases acides, neutres et basiques produites par *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Thermoascus aurantiacus*, *Irpepex lactis*,

Endothiaparasitica et autres espèces du genre *Mucor* ont été également utilisées (**Aguilar, 2008**).

B). Boulangeries

les protéases acides de champignons sont utilisées dans la préparation du sirop digestif, la digestion des protéines de soja pendant la préparation de la sauce, La tendrement de la viande, l'hydrolyse du gluten du pâte de blé utilisée pour la préparation des biscuits en boulangerie qui les rend croustillantes, en fabrication de l'alcool pour la fermentation du grain. Parmi les souches fongiques, protéases acides d'*Aspergillus oryzae* sont bien caractérisées par rapport à celui de l'*Aspergillus niger* (**Merheb et al., 2007**).

I. 1.7.2. Synthèse des peptides

Dans des milieux aqueux, les protéases catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques mais la réaction se procède en sens inverse (synthèse) dans des médias où l'eau est «restreint (présence des solvants organiques) (**Radha, 2012**). Récemment, l'application des protéases (principalement des protéases à serine, à acide aspartique et les métallo-protéases) dans la production de certains oligopeptides (principalement des di et tri-peptides) a reçu une grande attention comme une voie alternative à l'approche chimique en raison de ses avantages. Cependant «l'utilisation de ces biocatalyseurs est limitée par la spécificité et l'instabilité de l'enzyme en présence des solvants organiques (**Gupta et al., 2005**).

I. 1.7.3. Synthèse de l'aspartam

Biens que les protéases soient des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse. Sous certaines conditions cinétiquement contrôlées, une préparation de thermolysine provenant de *Bacillus thermo-protolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartam (un édulcorant à basse calorie) à partir de l'acide L-aspartique et de la L-phénylalanine méthyle ester. Il est produit industriellement par Toya Soda (Japon) (**Wang, 2008**).

I. 1.7.4. Gestion des déchets industriels et ménagers

La possibilité de dépuration des déchets issus de différents secteurs, en les utilisant comme des substrats pour diverses bio-productions d'intérêt économique potentiel, a été largement développée. Les enzymes protéolytiques de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amylolique faciens* *Streptomyces sp.* et de différentes souches d'*Aspergillus* sont actuellement utilisées dans ce domaine (**Leisola et al., 2001**).

I. 1.7.5. Utilisation médicale

Les enzymes protéolytiques sont également utilisées pour développer des produits d'importance médicale: Les protéases d'*Aspergillus* s'appliquent pour soulager les troubles digestives gastro-intestinaux tels que la dyspepsie. La brinase, une protéase acide plasmin-like, hydrolyse la fibrine et le fibrinogène. Elle est appliquée sur des patients en hémodialyse chronique avec des canules artério-coagulés (**Hernández et al., 2006**).

I. 1.7.6. Traitement des eaux usées industrielles

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. En effet, les protéases peuvent traiter les rejets riches en protéines (**Kumar et al., 1999 ; Sumantha et al., 2006**).

I. 1.7.7. Autres applications

La protéase neutre peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. ils sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (**Aviron-Violet et al., 1982**).

CHAPITRE 2
ASPERGILLUS NIGER

Chapitre 2 : *Aspergillus niger*.

I. 2.1. Généralité

Les *Aspergillus* sont des champignons microscopiques qui contaminent les récoltes dans les champs ou pendant la conservation dans les silos ou greniers. Lorsque les conditions climatiques sont favorables (**Pane et al, 2011**). Il est un champignon filamenteux, cosmopolite et omniprésent trouvé dans la nature (**Rahul & Jha, 2014**). Pier Antonio Micheli (1679-1737) décrit *Aspergillus* comme l'un des 1400 genres romande plantes dans son Nova planétarium genres (**Dijksterhuis & Wösten, 2013**).

Le genre *Aspergillus* comprend plus de 200 espèces. Environ 20 espèces ont été rapportées comme agents responsables d'infections opportunistes chez homme. Parmi ceux-ci, *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus couramment isolés, suivis par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*. Les groupes *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, et *Aspergillus versicolor* sont parmi les autres espèces moins souvent isolé sous forme d'agents pathogènes opportunistes (**Rahul & Jha, 2014**).

Les espèces d'*Aspergillus* sont parmi les champignons les plus abondants partout dans le monde. Ils ne sont pas très sélectifs en ce qui concerne les conditions de croissance abiotiques. Par exemple, ils peuvent se développer sur une large gamme de température (6-55°C) et à une humidité relativement faible. En outre, les espèces d'*Aspergillus* se nourrissent d'une grande variété de substrats, y compris les matières fécales animales et les tissus humains (**Bleichrodt et al., 2013**).

Bien que *Aspergillus niger*, l'espèce la plus commune, soit reconnu comme opportuniste pathogène, sans spécialisation d'hôte, les autres membres de la section *Nigri* sont généralement considérés comme des champignons bénins. En outre, les produits élaborés par *Aspergillus niger* détiennent le label GRAS du FDA aux Etats Unis en dépit du fait que la capacité de produire l'ochratoxine A (OTA) par cette espèce a été signalée (3 à 10%) des souches connues d' *Aspergillus niger* produisent ces mycotoxines sous certaines conditions fermentatives (**Mhetras et al., 2009; Masayuki & Katsuya, 2010**).

I. 2.1.1. caractéristique du genre *Aspergillus*

La morphologie constitue une part importante du concept d'espèce *Aspergillus*. Les caractères de colonies utilisés pour caractériser les espèces comprennent : les taux de croissance des colonies, la texture, le degré de sporulation, la couleur de mycélium, pigments

solubles, les sécrétions, revers de colonies. La reproduction sexuée et asexuée se produit chez *Aspergillus* et les caractéristiques microscopiques de ces structures sont importantes (**Rahul & Jha, 2014**).

La caractéristique du genre *Aspergillus* est la structure du port-spore sous forme d'un le goupillon. Elle est la caractéristique microscopique la plus utilisée dans la taxonomie d'aspergillus. Pendant la différenciation mycéliennes certaines cellules agrandir, développe une paroi cellulaire lourde sous forme 'T' ou 'L' «cellules de pied» (qui ne sont pas des cellules séparées) qui produire une seule conidiophores perpendiculaire à la longue axe de la cellule. Parfois, il est difficile de voir 'la cellule de pied', mais quand elle est visible, les morphologistes la prennent comme aussi forte preuve qu'un isolat est une espèce *Aspergillus* (**Rahul & Jha, 2014**).

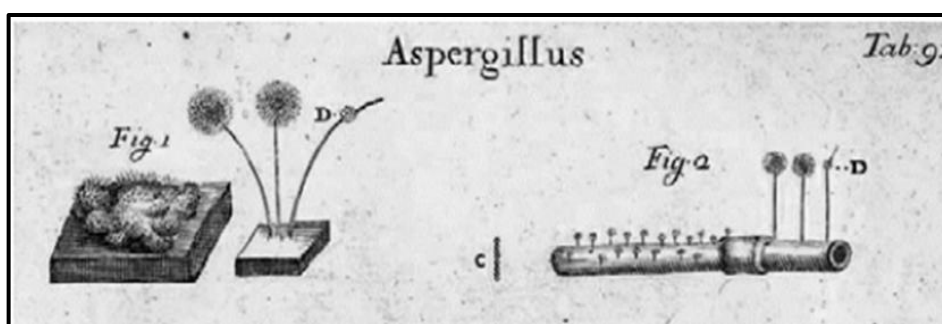


Figure 1: Les premières images de conidiophores *Aspergillus* comme représenté par Pier Antonio Micheli en 1729 mucédinées "par t-il botaniste français Philippe Edo (**Dijksterhuis & Wösten, 2013**).

La branche de l'hyphe qui se développe de la cellule de pied est la conidiophore, qui s'élargit à son sommet pour former une vésicule en forme arrondie elliptique. La région fertile de la vésicule donne naissance à une couche de cellules appelées phialides (ousteigmata dans la littérature ancienne), qui produisent de longues chaînes de spores mitotiques appelés conidies ou conidiospores. Par exemple, les espèces du groupe *Aspergillus niger* portent des spores noires, *Aspergillus ochraceus* est jaune à marron, alors que *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus flavus* sont vert (**Rahul & Jha, 2014**).

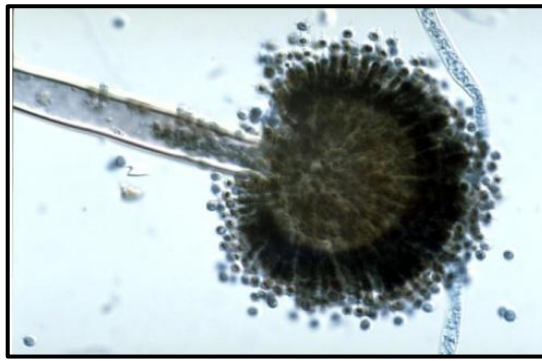


Figure 02:Apparence Microscopique: *Aspergillus* tête *Aspergillus niger* (Luisa & Correia, 2013).

I. 2.1.3. Applications technologiques d'*Aspergillus*

Aspergillus est un genre varié avec un fort impact économique et social. Les espèces se trouvent partout dans divers habitats et ils sont connus pour dégrader la nourriture, produire des mycotoxines et sont fréquemment rapportés comme pathogènes humains et animaux. En outre, plusieurs espèces sont utilisées en biotechnologie pour la production d'une variété de métabolites tels que les antibiotiques, les acides organiques, et les médicaments ou les enzymes, ou comme agents dans de nombreux modules fermentaires alimentaires (Samson et al., 2014).

I. 2.1.4. Production d'enzymes

Aspergillus sp sécrète une grande variété d'enzymes qui dégradent des polymères à l'intérieur du substrat en molécules qui peuvent être des nutriments. Par exemple, les amylases sont sécrétées pour dégrader l'amidon, les xylanases pour dégrader le xylane et les pectinases pour dégrader la pectine dans les matières végétales. De même, l'élastase est sécrétée dans le poumon humain pour dégrader l'élastine (Bleichrodt et al., 2013).

Ils sont également des candidats pour la manipulation génétique dans l'industrie biotechnologique. Puisque *Aspergillus niger* sont utilisées sous certaines conditions industrielles, elles ont été accordées le GRAS (Generally Regarded As Safe) par l'administration de la nourriture et les médicaments du gouvernement des États-Unis (Robert et al., 2011).

I. 2.1.5. Production d'acides organiques

La majorité des *Aspergillus* produisent de l'acide citrique, *Aspergillus niger* le produit par fermentation jusqu'à 200 g/l dans une période de 5 à 7 jours (Ward et al., 2006). L'acide

gluconique et l'acide oxalique sont par ailleurs produits par *Aspergillus niger* (Bennett, 2010).

La capacité à sécréter de grandes quantités de protéines et d'autres métabolites tels que les acides organiques en combinaison avec la technologie de fermentation mis en place et biologie moléculaire font *Aspergillus* tels que *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus sojae*, et *Aspergillus terre* un usines cellulaires attirant pour la production de protéines homologues et hétérologues (Bleichrodt et al., 2013).

I. 2.2. L'espèce *Aspergillus niger*

I. 2.2.1. Historique

Aspergillus niger a été décrite en 1867 dans un manuscrit intitulée «Physiologie des mucédinées" par le botaniste français Philippe Edouard Léon van Tieghem. Il a isolé ce champignon à partir des galles moulés avec l'objectif principal d'étudier la production de l'acide gallique par un procédé de fermentation fongique. Il est également largement utilisé pour la production des additifs alimentaires l'acide citrique et l'acide gluconique. En 1917, il a été montré qu' *Aspergillus niger* produit de grandes quantités d'acide citrique dans un milieu contenant le sucre (Dijksterhuis & Wösten, 2013).

L'histoire de l'utilisation sûre pour *Aspergillus niger* provient de son utilisation dans l'industrie alimentaire pour la production de nombreuses enzymes tels que l' α -amylase, l'amyloglucosidase, les cellulases, la lactase, l'invertase, les pectinases et les protéases acides (Anonyme, 1997).

Aspergillus niger a quelques utilisations comme l'organisme lui-même, en plus de ses produits de fermentation. Par exemple, en raison de son visualisation et résistance à plusieurs agents antifongiques, *Aspergillus niger* est utilisé pour tester l'efficacité des traitements de préservation (Jong & Gantt, 1987). En outre, il a été démontré qu' *Aspergillus niger* a été utilisée pour l'analyse des sols (Raper & Fennell, 1965). Il ya également intérêt à utiliser ce champignon pour effectuer certaines réactions enzymatiques qui sont très difficiles à réaliser par des moyens strictement chimiques, tels que des ajouts spécifiques des stéroïdes et autres cycles complexes (Jong & Gantt, 1987 ; Anonyme, 1997).

I. 2.3. Taxonomie

En raison de son importance économique, l'*Aspergillus* est l'un des genres les mieux décrits du point de vue taxonomique parmi les champignons filamenteux. Al-Musallam (1980) a révisé la taxonomie du groupe *Aspergillus niger* en prenant essentiellement les caractéristiques morphologiques en compte (Masayuki & Katsuya, 2010).

Récemment, plusieurs méthodes ont été utilisées dans cette section. La classification des espèces dans le groupe varie selon les traitements taxonomiques. Par exemple, Raper et Fennell ont décrit 12 espèces dans le groupe *Aspergillus niger*, Al-Musallam a accepté sept espèces dans la section *niger* et Kusters-van Someren et al. ont accepté six espèces (Koji et al., 2001).

La position systématique d' *Aspergillus niger* est résumée comme suivant:

Règne: Fungi

Phylum: Ascomycota

Classe: Euascomycetes (Eurotiomycetes)

Ordre: Eurotiales

Famille: Trichomaceae

Genre: *Aspergillus* (section Nigri) (groupe niger)

Espèce: *niger*

Il y a plus de 200 espèces nommées d'*Aspergillus*. Les *Aspergillus* noirs font partie d'un groupe d'espèces appelé « section Nigri » et autrefois connu sous le nom de « *Aspergillus niger* groupe »: toutes les espèces de la section ont des têtes de conidies noires (Meyer et al., 2004).

I. 2.4. Morphologie

Les *Aspergillus* sont caractérisés par la présence de longs filaments perpendiculaires (stipes) aux hyphes végétatifs. Les stipes se terminent par une vésicule supportant les cellules de la conidiogenèse : les phialides (Leyral & Vierling, 2007) (7-10 x 3-3,5 µm) sont portées par des métules brunâtres (Badillet et al., 1987), ou sont portées directement par la vésicule

Les phialides produisent des spores ou conidies qui caractérisent le mode de reproduction asexuée du champignon (Leyral & Vierling, 2007; Masayuki & Katsuya, 2010). Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties. Elles mesurent 3,5-5 µm de diamètre, sont brunes, échinulées à très verruqueuses. Les sclérotés parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois vinacé

(Badillet et al., 1987). Si les phialides sont directement insérées sur la vésicule, ces *Aspergillus* sont appelés *Aspergillus* unisériés. Mais, si les phialides sont portées par des cellules intercalaires (métules) insérées sur la vésicule, ces *Aspergillus* sont appelés *Aspergillus* bîsériés (Jesus & Cordova, 1999).



Figure 03: La structure d'*Aspergillus niger* (Kiran, 2016).

I. 2.5. Reproduction

L'Aspergillus niger a le processus à la fois sexué et asexué pour la duplication des spores.

Le cycle asexué est le moyen principal de dispersion des cellules et protège le génome fongique dans des conditions défavorables, et la production des métabolites secondaires est fréquemment associée à ce processus de développement. La sporulation produit des conidies, contenant les spores asexuées haploïdes et un inuclées. La croissance végétative est initiée par la germination du spore, avec formation d'hyphes tubulaires, croissant de façon polaire par extension apicale et ramification pour former un réseau de mycélium, qui procure les nutriments de l'environnement.

Le cycle sexuel est initié à partir de la différenciation des agrégations de mycélium végétatif à cellules ou promodia, qui se développe plus loin dans cleistothecia, qui contiennent des asci. Les ascospores sont produites par la méiose. Certains gènes liés à la reproduction sexuée ont été clonés (Ward et al., 2006).

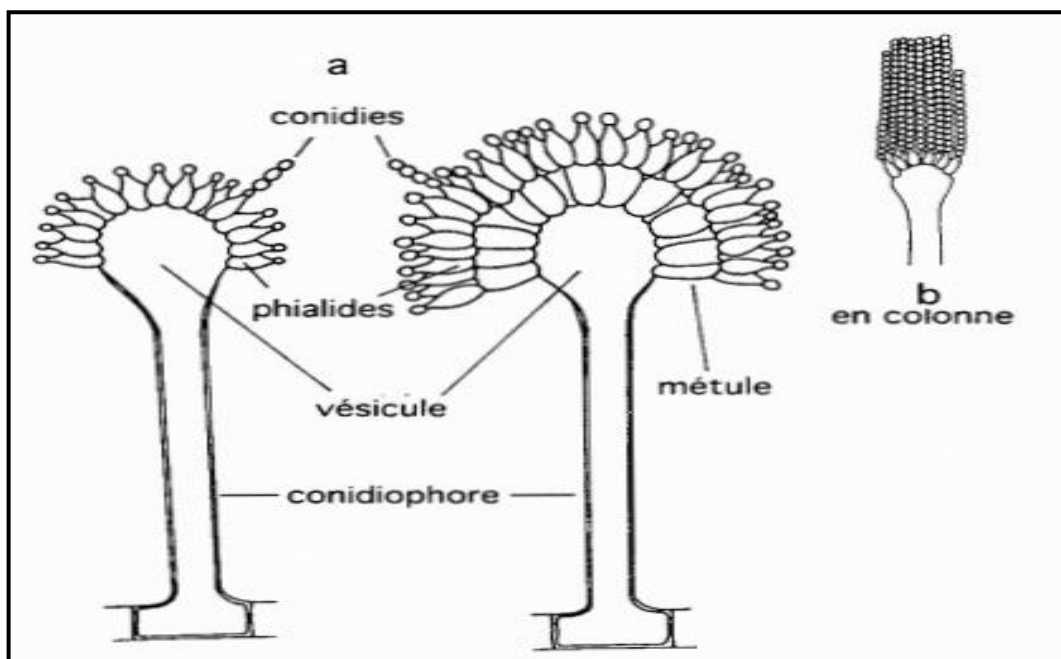


Figure 04: Structure de l'appareil conidien des *Aspergillus*. a) Organisation générale.

b) Disposition en colonne (Jesus & Cordova, 1999).

I. 2.6. Les enzymes produites par l'*Aspergillus niger*

Avec le développement de la technologie recombinante *Aspergillus niger* ont été développés en hôtes importants pour surproduire des enzymes. Un aperçu des produits enzymatiques sûrs fabriqués avec *Aspergillus niger* à partir de sources traditionnellement améliorées et recombinantes a été publié.

Tableau 02: Les enzymes produites par *Aspergillus niger*.

Les enzymes		Références
EC nom	Enzymes	
1.1.3.4	Glucose oxydase	(Smith et Hong-Shum,2011; Heinz et al., 2012)
3.2.1.3	Glucoamylase A	(Neil et Gow, 1999 ;Smith et Hong-Shum,2011; Heinz et al., 2012)
	Glucoamylase B	(Neil et Gow, 1995 ;Smith et Hong-Shum,2011; Heinz et al., 2012)
3.2.1.1	α amylase	(Neil & Gow, 1995; Varga et Samson, 2008; Smith & Hong-Shum,2011;)
3.2.1.4	amyloglucosidase	(Neil & Gow, 1995)

3.2.1.4	cellulase	(Neil et Gow, 1995; Varga & Samson, 2008; Smith & Hong-Shum, 2011; Zheng, 2015)
3.2.1.22	α galactosidases	(Neil & Gow, 1995; Varga & Samson, 2008; Smith & Hong-Shum, 2011;)
3.2.1.23	β galactosidases	(Neil & Gow, 1995; Smith & Hong-Shum, 2011; Zheng, 2015)
3.2.1.6	β glucanase	(Neil & Gow, 1995)
3.2.1.78	hemicellulase	(Neil & Gow, 1995; Zheng, 2015)
3.1.1.3	lipase	(Neil & Gow, 1995; Smith & Hong-Shum, 2011; Zheng, 2015)
-	péctinase	(Neil & Gow, 1995)
3.4.23.6	Protéase acide	(Neil & Gow, 1995)
3.1.1.20	tanase	(Neil & Gow, 1995)
3.2.1.32	xylanase	(Neil & Gow, 1995)
3.1.X	estérase	(Zheng, 2015)
3.1.3.X	phytase	(Zheng, 2015)
-	Transglucosidase	(Zheng, 2015)
3.2.1.15	pectinase	(Zheng, 2015)
3.2.1.55	Arabino-furanosidase	(Varga & Samson, 2008; Zheng, 2015)
3.4.22.33	Bromelain	(Zheng, 2015)
3.1.1.5	Lysophospholipase	(Zheng, 2015)
3.5.1.1	Asparaginase	(Varga & Samson, 2008; Zheng, 2015)
1.1.99.18	Cellobiase	(Zheng, 2015)
1.11.1.6	Catalase	(Varga & Samson, 2008; Smith & Hong-Shum, 2011)
3.2.1.45	β glucosidase	(Smith & Hong-Shum, 2011)
3.4.11.X	Aminopeptidase	(Varga & Samson, 2008)
3.2.1.99	Arabinanase	(Varga & Samson, 2008)
3.4.16.X	carboxypeptidase	(Varga & Samson, 2008)

I. 2.7. Isolement d'*Aspergillus niger*

I. 2.7.1. Substrats

Aspergillus niger est une moisissure très commune, préférant habituellement les sols secs et chauds (**Bijay et al., 2016**). L' *Aspergillus niger* est cosmopolite et d'occurrence très commune: il se développe sur la matière organique en conditions aérobies. Cette espèce est un contaminant commun sur les divers substrats (**Meyer et al., 2004**). Elle a été isolée dans des substrats très variés comme:

Des substrats naturels: sol, bois, cire, eau (douce, polluée, lits de rivière), légumes, fruits frais et secs, noix et noisettes, poussières atmosphériques.

Des produits manufacturés: émulsion de cosmétique, plastiques, photographie, cuir, caoutchouc, composants électroniques, métaux, papiers, peinture murale ou artistique, textiles (coton, jute, laine), vernis.

Aspergillus niger est une espèce cosmopolite qui a été signalée dans le monde entier. Cette moisissure se développe aussi bien en intérieur (où il est possible de la confondre avec *Stachybotrys sp*) que sous forte lumière, en extérieur (**Mhetras et al., 2009**). C'est une des espèces les plus communes du sol. Elle se développe sur la matière végétale en décomposition, comme les composts. Elle peut contaminer la viande et les œufs, ou les fruits séchés au soleil. Elle peut aussi endommager les cuirs en surface et en épaisseur (**Meyer et al., 2004**).



Figure 05: La contamination de l'exemple d'un oignon *Aspergillus niger* (**Luisa & Correia, 2013**).

I. 2.7.2. Milieu

Aspergillus niger est une espèce xérophile, pouvant vivre dans un milieu assez pauvre en eau. Elle peut germer dans un milieu ayant une activité de l'eau de $a_w=0,77$ à la température de 35 °C. C'est pourquoi elle est fréquemment isolée dans les fruits secs et les noix. Elle peut aussi vivre dans un environnement très humide humidité relative de 90 à 100%) (John & Ailsa, 2013).

- *Aspergillus niger* peut croître jusqu'à un pH de 2 (acide) à haute activité.
- *Aspergillus niger* est une espèce mésophile dont les températures optimales de croissance sont entre 11 et 42 °C. La température maximale est de 48 °C mais elle peut survivre à 60°C (John & Ailsa, 2013 ; Bijay, 2016).

I. 2.7.3. Culture

L'identification des *Aspergillus* se fait par une culture en boîte de Petri, sur des milieux de culture classique (Boutton et al., 1990). Les *Aspergillus* peuvent être isolés à l'aide de clés utilisant la coloration de la colonie, la pigmentation et la forme de la tête *Aspergillaire* et l'aspect des spores.

Aspergillus niger forme des colonies atteignant 4 à 5 cm de diamètre en 7 jours sur milieu Czapek incubé à 25 °C, de couleur noire⁶. La température optimale de croissance se situe entre 25 et 30 °C mais il peut croître jusqu'à la température de 47-48 °C. La colonie est d'abord blanche et translucide puis devient noire en sporulant. Le pH du milieu reste inchangé (pH final 5,5) (Ayesha et al., 2003).

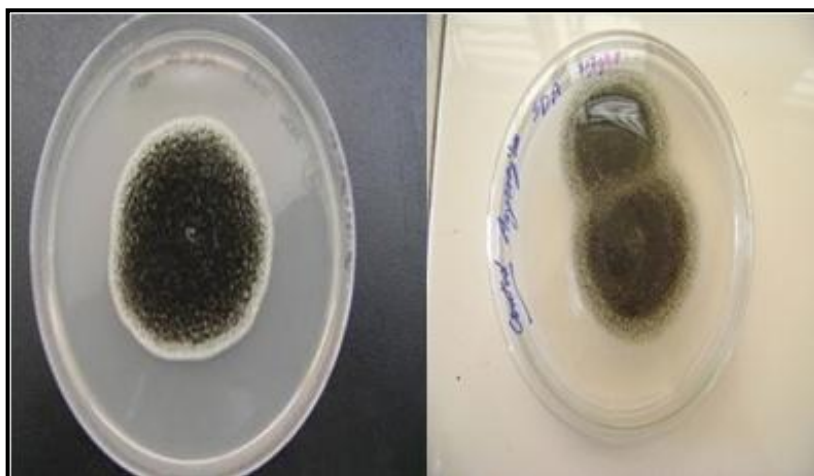


Figure 06 : *Aspergillus niger* sur gélose Sabouraud (Colônia de *Aspergillus niger*)(Luisa & Correia, 2013).

I. 2.8. La 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 par il 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. gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci (**Hölker et al., 2004**).

La fermentation solide existe depuis plusieurs siècles, elle a pour origine la fermentation traditionnellement effectuée en Asie et Japon, appelée fermentation "Koji". la fermentation sur milieu solide est beaucoup mieux adaptée aux microorganismes fongique. Elle s'effectue sur des milieux solide ou semi solide, à base d'agar ou constitués de matériaux solides inertes comme le son de blé, imbibé de milieu nutritif. L'aération est assurée par la diffusion de l'air à travers les tampons de coton des Erlenmeyers ou à travers les interstices des boîtes de pétri, il faudrait aussi que le milieu solide ne soit pas pâteux mais suffisamment poreux. Le développement du mycélium dépendra de l'homogénéité de la répartition de l'inoculum et des sels minéraux ajoutés dans la masse du substrats solide (**Simon & Mounier, 1970**).

I. 2.8.1. Avantages de la fermentation sur milieu solide

La production industrielle des enzymes et d'autres métabolites fait appel aux deux procédés de fermentation. La décision de choisir l'un ou l'autre est probablement basée sur le coût et l'efficacité du processus. Il est donc important de connaître les avantages et les inconvénients de la fermentation sur milieu solide par rapport à la fermentation liquide.

Parmi ces avantages on note :

- ✓ La simplicité de la technique et la diminution des coûts.
- ✓ L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des fermenteurs et les coûts énergétiques nécessaires pour la stérilisation.
- ✓ Le peu d'eau disponible favorise la production de certains métabolites, qui n'apparaissent pas ou peu en culture liquide, ainsi il minimise les contaminations bactériennes qui réclament des taux d'humidité élevés pour croître (en cas de fermentations fongiques).

- ✓ En calibrant bien la taille des particules du substrat, l'aération peut être assurée passivement sans agitation ou par agitation discontinue (croissance en surface donc contact direct avec l'oxygène). En revanche, les champignons filamenteux rendent souvent les milieux liquides fortement visqueux; ce qui entraîne des problèmes d'agitation et du transfert d'oxygène.
- ✓ La réduction des coûts et du temps consommé pendant l'extraction et la récupération du produit (moins de techniques à appliquées et volumes réduits en solvants d'extraction), ainsi que pour le traitement des effluents (en raison de la faible teneur en eau) (Couto & Sanroman, 2006; Wang & Yang, 2007 ; Aguilar et al., 2008).

I. 2.8.2. Microorganismes utilisés

Des précautions doivent être prises en considération lors de la sélection des micro-organismes pour la production des métabolites en fermentation sur milieu solide. La bonne tolérance à la faible activité d'eau, le mode de croissance apical des hyphes fongiques et les conditions de haute pression osmotique donnent l'avantage aux champignons filamenteux d'être les mieux adaptés à ce type de processus par comparaison avec les bactéries et les levures.

Les différents genres fongiques utilisés dans ce processus de fermentation sont *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Trichoderma* et certaines espèces de *Penicillium* (Manpreet et al., 2005).

L'établissement des relations entre la physiologie des microorganismes et les facteurs physico-chimiques est l'objectif pour la réussite et le développement d'un tel procédé. Ces facteurs comprennent la température, le pH, l'aération, l'activité de l'eau l'humidité et la nature du substrat solide employé (Raimbault, 1998).

I. 2.8.3.Applications industrielles de la fermentation sur milieu solide

D'une manière générale, les applications de la fermentation solide concernent l'alimentation humaine, le compostage et l'ensilage, la bio-filtration des gaz malodorants, la production des aliments riches en protéines pour l'alimentation animale, la production des enzymes et des métabolites spécifiques (Manpreet et al., 2005).

DEUXIÈME PARTIE

MATERIEL ET METHODES

DEUXIEMES PARTIE: MATERIEL ET METHODES

II.1. Présentation de la région d'étude

Ce travail base sur la production de protéase secrétées par l' *Aspergillus niger* isolées à partir du sol. Les échantillons du sol on été prélèves à partir du centre thermal de complexe Touristique Thermal **SIDI YAHIA** (**TAYEB OUARDI**).

Le complexe Touristique Thermal **SIDI YAHIA** a une superficie de 13 hectares situes dans la wilaya de Biskra, au Sud- Est du pays. Ce complexe a une centre thermal alimenté par la même eaux de Hamame Salihine il est considères comme un écosystèmes extrêmes (Température élevée).

Les principaux caractères de l'eau de **AIN TAYEB** sont: eau thermal (température 35 à 50 °C) , alcalines (pH= 6,68) et hydrotimétries (eaux profondes).



Figure 07: Présentation géographique de la zone d'étude Biskra

II.2. Isolement

L'isolement d' *Aspergillus niger* à partir de différents échantillons de sol a été réalisé par la méthode de dilution en série. Les ensemencements à partir de différentes dilutions ont été réalisées sur des boites de Pétri individuelles contenant de milieu Sabouraud.

Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 30°C dans un incubateur pendant 4-6 jours pour une sporulation maximale (Iqbal et al., 2015). Les colonies obtenues dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Sabouraud ont été purifiées puis identifiées morphologiquement (Saiah et al., 2011).

II.2.1. Les milieux de cultures utilisés

Un milieu de culture est rendu sélectif pour des espèces microbiennes, lorsqu'il fournit des exigences nutritives et les conditions de développement particulières à ces espèces.

Les milieux de cultures utilisés pour *l'Aspergillus niger* ont été mentionnés dans ce tableau 03 :

Tableau 03: Les milieux de cultures utilisés pour *l'Aspergillus niger*

Milieux	Utilisations	Références
Sabouraud	Isolement	(Oyeleke et al., 2011)
Czapek yeast autolysate (CYA)	Identification	(Verscheure et al., 2002)
Potato Dextrose Agar (PDA)	Conservation	(Iqbal et al., 2015)

II.2.2. Préparation de la suspension du sol

Les échantillons de sol prélevés des différentes zones ont été maintenus dans des boîtes de pétri. La suspension du sol a été préparée en mélangeant un gramme de sol dans 9 ml d'eau physiologique (NaCl à 0.9%), puis agiter. Des dilutions différentes ; 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} ont été préparées à partir de cette solution mère dans de l'eau physiologique dans des conditions aseptiques, suivie d'une agitation pendant 10 minutes pour homogénéiser la suspension du sol (Iqbal et al., 2015).

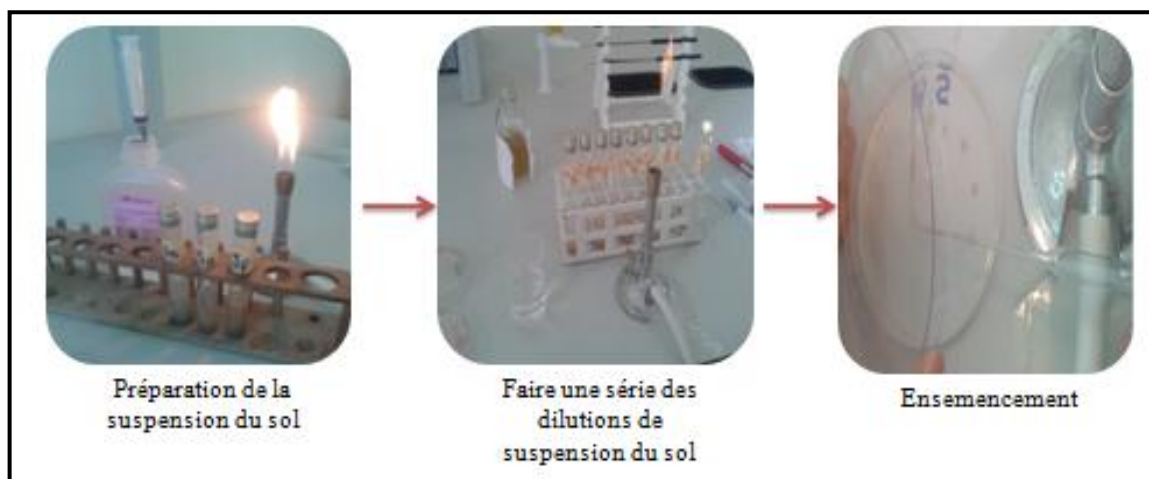


Figure 08: Les étapes d'isolement.

II.2.3. Observation et repiquage des mycéliums

Des observations ont été effectuées dès l'isolement jusqu'à l'apparition des mycéliums. Ces derniers sont repiqués sur différents milieux de cultures (**Monteiro, 2015**).

II.2.4. Identification

L'identification s'effectue généralement par deux techniques principales: l'observation macroscopique et l'étude microscopique des souches cultivées sur milieu Sabouraud et Czapek yeast autolysate (CYA) (**Verscheure et al., 2002**).

L'identification microscopique est réalisée par coloration au bleu de méthylène et une observation sous microscope optique à grossissement x400 des mycéliums des souches isolées.

Le milieu CYA est un milieu sélectif et permet d'établir que *l'Aspergillus niger* non productrice de l'Ochratoxine A (**Fazouane, 2010**).

II.2.5. Conservation

La souche d' *Aspergillus niger* identifiée a été cultivée sur milieu de culture PDA pendant 5 jours, puis conservée à 4°C pour des études ultérieures (**Monteiro, 2015; Iqbal et al., 2015**). Des repiquages sur le même milieu ont été réalisés si nécessaire.

II.3. Méthodes de dosage

II.3.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Elle s'effectue typiquement, en se basant sur la capacité de la souche fongique isolée de croître sur des milieux de culture à base de protéines comme la seule source d'azote et de

générer des zones de protéolyse claires autour de la culture. On a utilisés le milieu de lait gélosé à 30 % comme seule source d'azote.

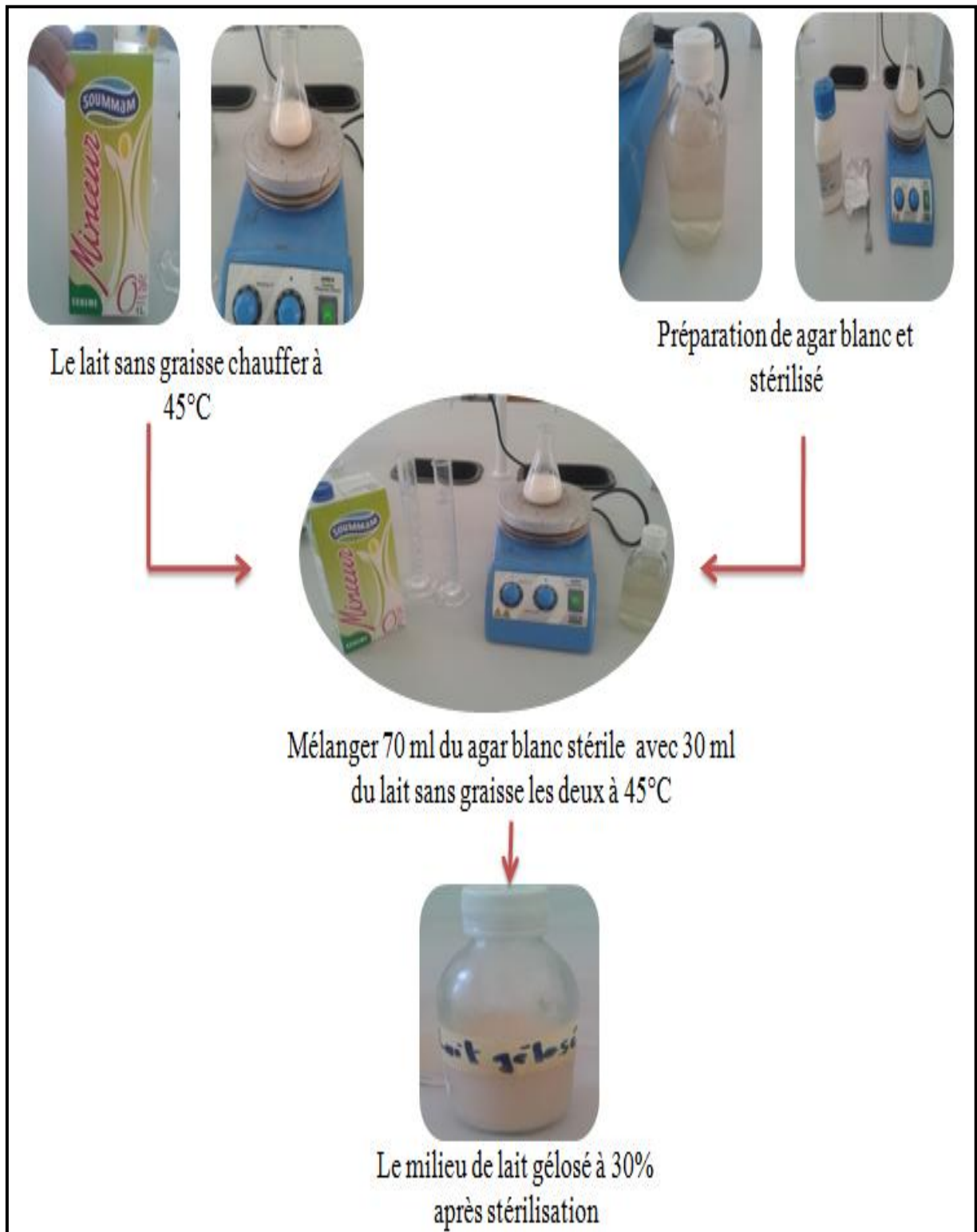


Figure 09: Préparation du lait gélosé à 30% (LG).

II.3.2. Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique ou l'activité spécifique est définie comme le nombre d'unités d'activité protéolytique par μg de protéines; celles-ci sont dosées par la méthode spectrophotométrique (**Desmazeaud, 1968**).

La mesure de l'activité protéolytique c'est la mesure de la concentration de tyrosine produite après la protéolyse des caséines en solution sous l'action enzymatique de l'extrait (**Bhatnagar, 2010**). L'hydrolyse enzymatique des caséines aboutit à la libération de peptides de faibles poids moléculaires qui sont séparés des caséines (**Siboukeur, 2005**). Cette réaction est arrêtée par l'addition de d'acide tricarboxylique (TCA) de 0,4 M et on filtre. Les équivalents de la tyrosine et de tryptophane ont été déterminés par la couleur bleue donnée par le folin. La couleur a été comparée aux normes pour l'estimation des protéines. Les unités de protéase sont exprimées sous forme de microgrammes de tyrosine libérés en une minute par la quantité totale d'enzyme extraite d'un gramme de substrat fermenté séché, dans des conditions d'essai standard (**Bhatnagar, 2010**). La détermination de l'activité protéolytique des extraits comporte quatre étapes :

- ❖ Le mélange réactionnel est préparé par addition de :
 - 0.5 ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage ;
 - 1 ml du tampon citrate de sodium à 0,02 M, pH 5,2
 - 2,5 de substrat (solution de caséine 2,5% dans le citrate de sodium à 0,02 M).
- ❖ Après agitation et incubation 30 minutes au bain-marie à 40°C,
- ❖ la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid (4%). Il est ensuite filtré sur papier filtre courante (**Desmazeaud, 1968 ; Jakob, 2002; Siboukeur, 2005; Bhatnagar, 2010**).
- ❖ Dosage des acides aminés aromatiques: dosés par la méthode d'Anson (1938). 1 ml du filtrat sont mélangés avec 2,5 ml de Na_2CO_3 à 2% dans le NaOH (0,1N). Après agitation et incubation 10 min à température ambiante, 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au $1/10^{\text{ème}}$ est ajouté. Les mélanges sont bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant au moins 30 min. L'absorbance de la coloration bleu développée est lue à 750 nm ; l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 20 $\mu\text{g/ml}$ (voir Annexe E). Une unité (U) de

protéase est l'équivalent de 1 μg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme. Le blanc est préparé de la même manière. Chaque dosage est effectué en triple.

II.3.3. Dosage des protéines

La concentration de la protéine a été déterminée par la méthode de Bradford (1976).

En utilisant la solution bovine serum albumin (BSA) comme protéine standard. La quantité de protéine soluble a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage en mg de protéine par ml d'échantillons (voire annexe C).

II.4. Méthode de fermentation

II.4.1. Préparation du milieu de culture

La fermentation a été réalisée sur milieu solide à base de son de blé. Le son de blé a été utilisé comme substrat pour le criblage du champignon protéolytique le plus puissant par un dosage quantitatif dans SSF (Solid-State Fermentation) (Villegas, 1993; Sumantha, 2005). Une masse de 5 g du substrat sec a été introduite dans une Erlenmeyer de 250 ml et stérilisée par autoclavage pendant 20 min.

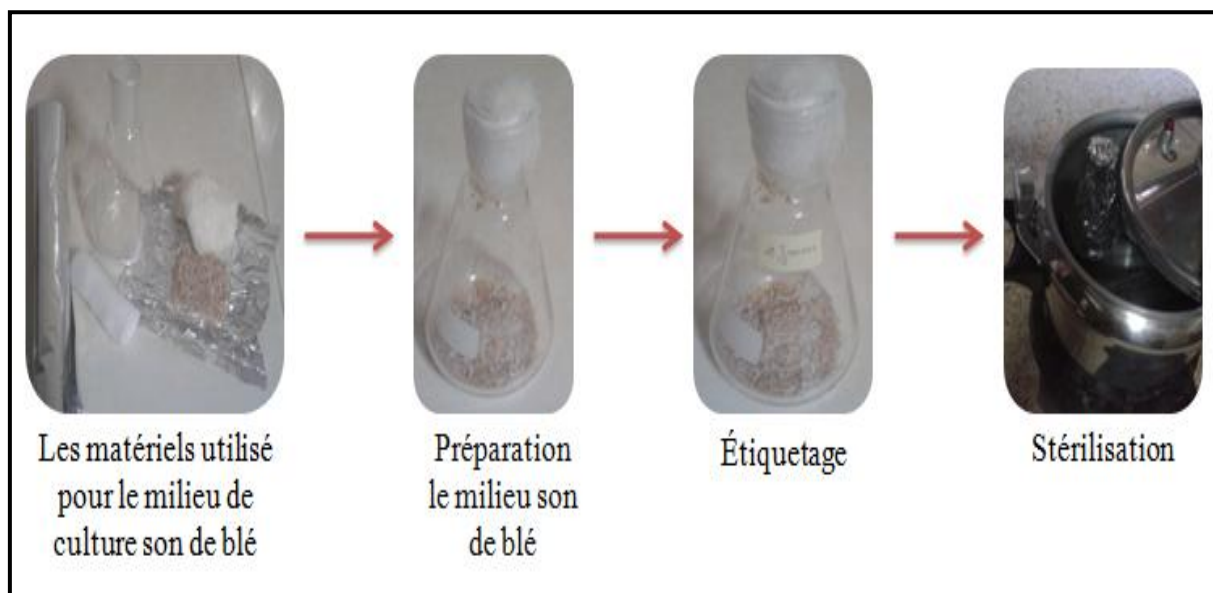


Figure 10 : Les étapes de préparation du milieu de culture solide son de blé.

II.4.2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été obtenu à partir d'une culture de 5 jours de la souche *d'Aspergillus niger* sur PDA. La suspension de spores a été préparée en versant 10 ml de Tween 80 à 0,1%

stérile par agitation et raclage en utilisant une boucle stérile (**Bhatnagar, 2010**). La concentration de spores a été déterminée à l'aide d'une Cellule Malassez.

II.5. Dénombrement des spores

La dénombrement des cellules viable est souvent besoin lors de manipulations ou d'expériences de microbiologie de déterminer le nombre de cellules présentes dans une culture, tant sur milieu solide qu'en suspension dans un milieu liquide. Il peut s'agir de bactéries, de levures, de moisissures; d'algues unicellulaires, etc. En particulier, un tel dénombrement est indispensable lors d'expériences portant sur le métabolisme cellulaire pour déterminer le nombre de molécules consommées ou produites (glucose, oxygène, dioxyde de carbone, etc.) par une seule cellule, par exemple par respiration, fermentation ou photosynthèse (**Guezlane et al., 2010**).

L'estimation du nombre de spores de la suspension fongique est effectuée par un dénombrement des spores d' *Aspergillus niger* effectué sur cellule Malassez sous microscope photonique type UKA-Technic Nahita au grossissement (x400).

II.6. Conduit de la fermentation

Les milieux stériles ont été additionnés de 4 ml de milieu minéral stérile, puis inoculés avec 1 mL de suspension des spores et incubés à 30°C pendant 72 h (**Sumantha, 2005**) dans un étuve.

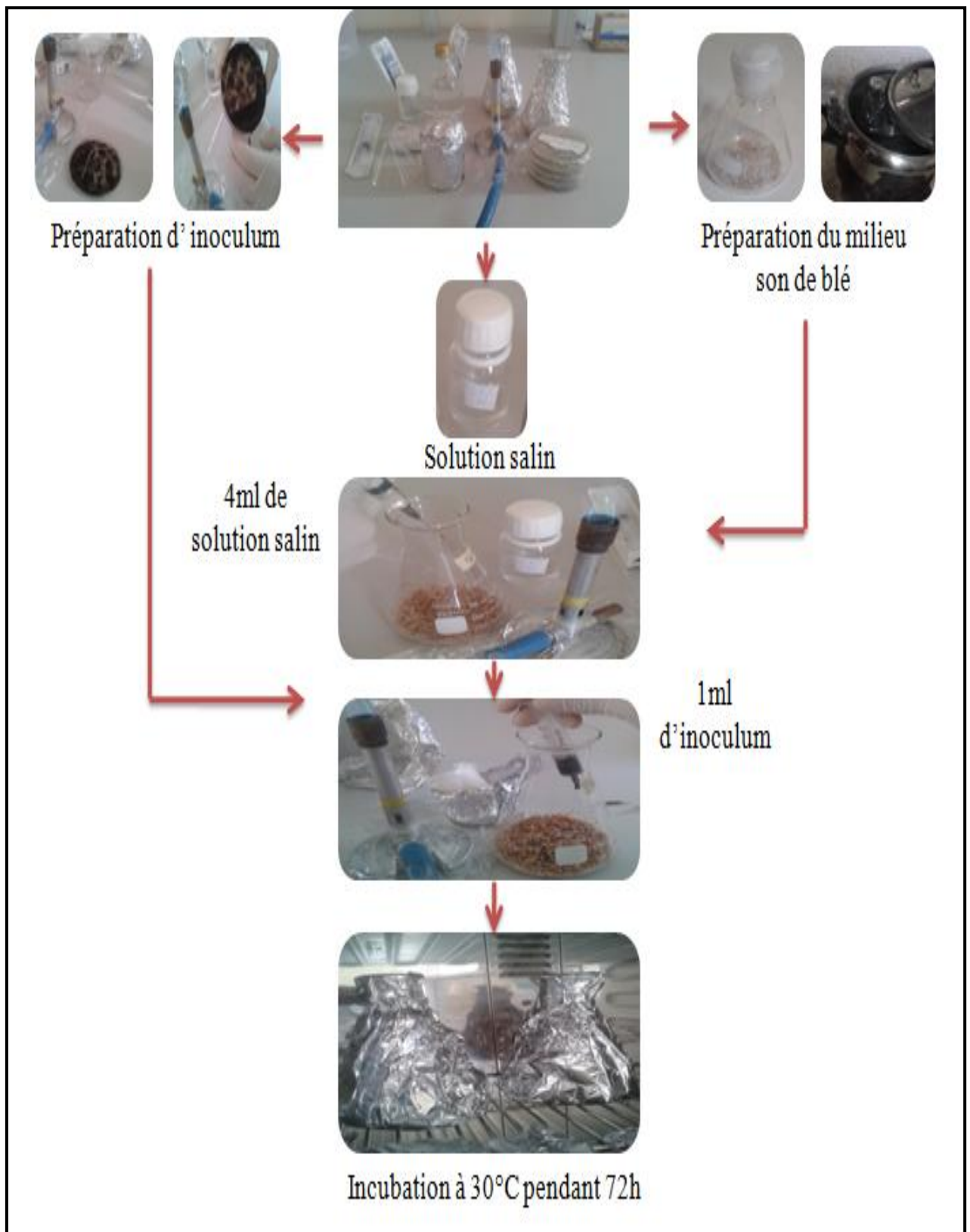


Figure11 : Les étapes de la fermentation d' *Aspergillus niger*.

II.7. Méthodes d'optimisation

Le protocole adopté pour l'optimisation des paramètres du processus de production d'enzyme était d'évaluer l'effet des paramètres un par un et d'incorporer le paramètre optimisé

avant d'optimiser le prochain paramètre (**Anand, 2016**). Le changement des paramètres de processus influencent la production de protéase telle que le temps de fermentation, la teneur initiale du milieu de culture et la température de fermentation (**Sumantha, 2005**).

Le profil de production de la protéase acide a été étudié à la période d'incubation et à différentes température d'incubation.

II.7.1. Choix du milieu minéral

Des milieu minéral sur la production de la protéase d' *Aspergillus niger* a été étudié sur des cultures à base de son de blé incubées à des différentes milieu minéral: czapek dox (NaNO_3 ; KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KCl) (**Bhatnagar, 2010**), solution minérale (SM) (NH_4NO_3 ; KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; NaCl) (**Sumantha, 2005**) et sulfate d'ammonium (**Kumar, 2005**). incubées pendant 3 jours dans un étuve.

II.7.2. pH initial du milieu minéral

L'effet de la pH de milieu salin de fermentation sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger* a été étudié sur des fermentations sont conduites à la milieu salin qui assure la meilleure production. mais à différents pH variant de 3 à 7 pendant 3 jours. L'ajustement du pH est effectué avec une solution d'HCl et /ou du NaOH (1N).

II.7.3. Température d'incubation

Afin d'étudier l'influence du température de l'incubation sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger*, des fermentations sont conduites à la pH optimale mais à différents température allant de 20 à 45 °C avec un intervalle de 5°C pendant 3 jours. On utilisé l'étuve .

II.7.4. Temps d'incubation

L'effet de temps d'incubations sur la productivité de la protéase d' *Aspergillus niger*.ont été déterminés par incubation des cultures dans les conditions optimales préalablement mais à différents temps allant de 1 à 7 jours avec un écart de 24h.

II.8. Extraction et purification de la protéase d'*Aspergillus niger*

À la fin de la fermentation, la protéase d' *Aspergillus niger* est extraite à l'eau distillée. Le son de blé fermenté est repris dans 50 ml d'eau distillée. Après agitation à 160 rpm pendant 2 heures à 30°C, le mélange est centrifugé à 5000 g pour 15 min à 4°C (**Campos et al., 2010**).

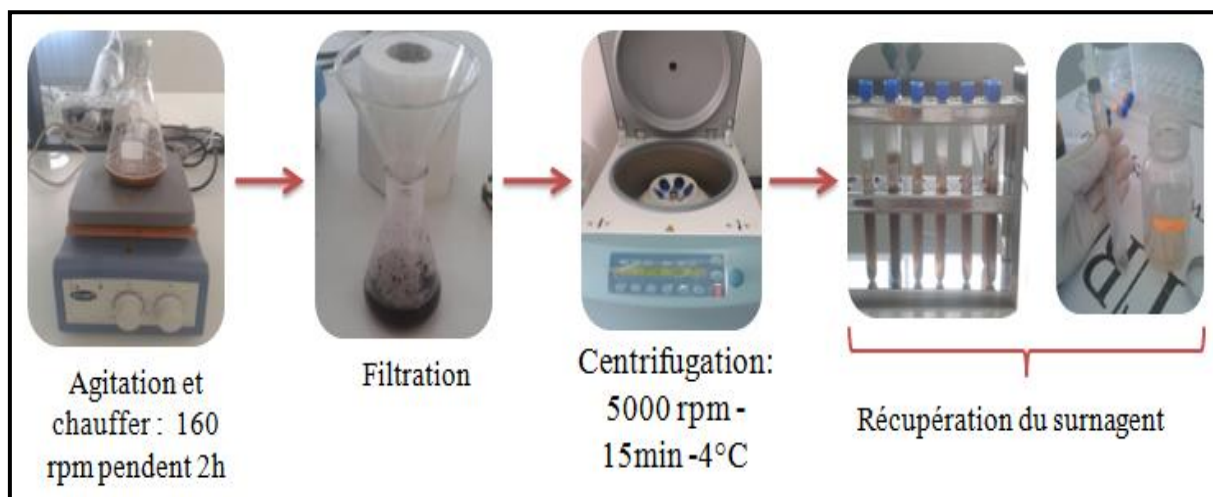


Figure 12: Les étapes du extraction et purification de la protéase d'*Aspergillus niger*.

II.9. Etude de la stabilité de la protéase d' *Aspergillus niger*

L'étude de la stabilité de l'extrait enzymatique brut d'*Aspergillus niger* a été déterminée en fonction de la température et le pH (**Bensmail et al., 2013**), où l'activité protéolytique varier selon les conditions standards de la mesure.

II.9.1. Stabilité thermique

La stabilité thermique a été étudiée en incubant les extraits enzymatiques à des températures variant de 30 à 65°C dans le tampon citrate de sodium (0,1M ; pH 5,2) pendant 60 min.

II.9.2. Stabilité vis-à-vis du pH

La stabilité vis-à-vis du pH est déterminée par la mesure de l'activité protéolytique de l'extrait brut maintenu pendant 24 heures à 4°C dans le tampon citrate de sodium (0,1M) à des pH varient de 2 à 8.

II.10. Etude statistique

L'évaluation statistique est effectuée par le test **T** de student. Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types (ES). Alors, nous avons utilisé un logiciel **MINITAB 17** et **EXCEL** (office 2007) qui nous aident pour faire l'analyse.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSION

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus portant sur l'isolement d'*Aspergillus niger*, l'optimisation de la production de la protéase acide d'*Aspergillus niger*, la procédure d'extraction de l'enzyme ainsi que l'étude de leur stabilité vis-à-vis quelques paramètres physico-chimiques (pH du milieu réactionnel et la température).

III.1. Isolement des souches

Après 5 jours d'incubation, nous avons obtenu la souche cible (*Aspergillus niger*) presque dans toutes les boîtes de Petrie contenant le milieu sélectif Sabauroud. (Le sol: source de prélèvement de notre souche présente une microflore mycélienne très importante).

III .2. Identification morphologique

Après incubation, nous avons procédé à l'identification des colonies des moisissures obtenus. Le résultat de l'examen microscopique et macroscopique de la souche isolé et purifiée, sont résumés dans le tableau 04 et 05.

III .2.1. Identification macroscopique

L'étude macroscopique des isolats après incubation de 5 jours sur milieux CYA et sabauraud à température 30° C a été réalisée par des observations à l'œil nu. Les résultats d'observation sont rassemblés dans le tableau 04.

Tableau 04: Caractères cultureux et morphologiques des colonies d'*Aspergillus niger*.

Milieu	Température	Aspect	Couleur	Surface
CYA	30°C	granuleux	noire	Bombée
Sabauraud			Noire foncé	Plate



Figure 13: Aspect des colonies d'*Aspergillus niger* après 5 j à 30° C sur le milieu CYA.

III.2.2. Identification microscopique

L'étude macroscopique réalisée préalablement a été complétée par une étude microscopique dans le but de déterminer les espèces des souches sélectionnées.

L'étude microscopique de ces souches a été réalisée au grossissement $\times 400$. En comparant ces résultats avec ceux donnés par littérature (**Anand, 2016**) nous avons pu identifier notre souche; il s'agit bien de *Aspergillus niger*. Elle montre les structures suivantes.

- ❖ Conidiophore non ramifié.
- ❖ Tête conidienne radiée avec vésicule globuleuse.
- ❖ Phialides emportées par les vésicules.

Tableau 05: Observations macroscopiques et microscopiques des colonies d' *Aspergillus niger*

	Aspect macroscopique	Aspect microscopique ($\times 400$)	Aspect microscopique de (Anand., 2016)
Milieu CYA			
Milieu Sabaud			

III.3. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Après l'identification de la souche d'*Aspergillus niger*, la mise en évidence de son activité protéolytique a été effectuée par culture sur milieu lait gélosé (la gélose au lait).

Les résultats obtenus après l'incubation sur le lait gélosé pendant 3 jours, ont permis l'apparition de l'halo transparent (anneau clair) résultant de la dégradation de lait gélosé par l'exoprotéase produite et qui entoure les colonies d'*Aspergillus niger*. Cette réaction d'hydrolyse donne des acides aminés solubles utilisables (**Clarke & Steel, 1966**). Le diamètre de cette zone est étroitement lié à la quantité des protéases extracellulaires produites par l'*Aspergillus niger* entre. La zone de lyse à présentée un diamètre de 1,5 à 2 mm.

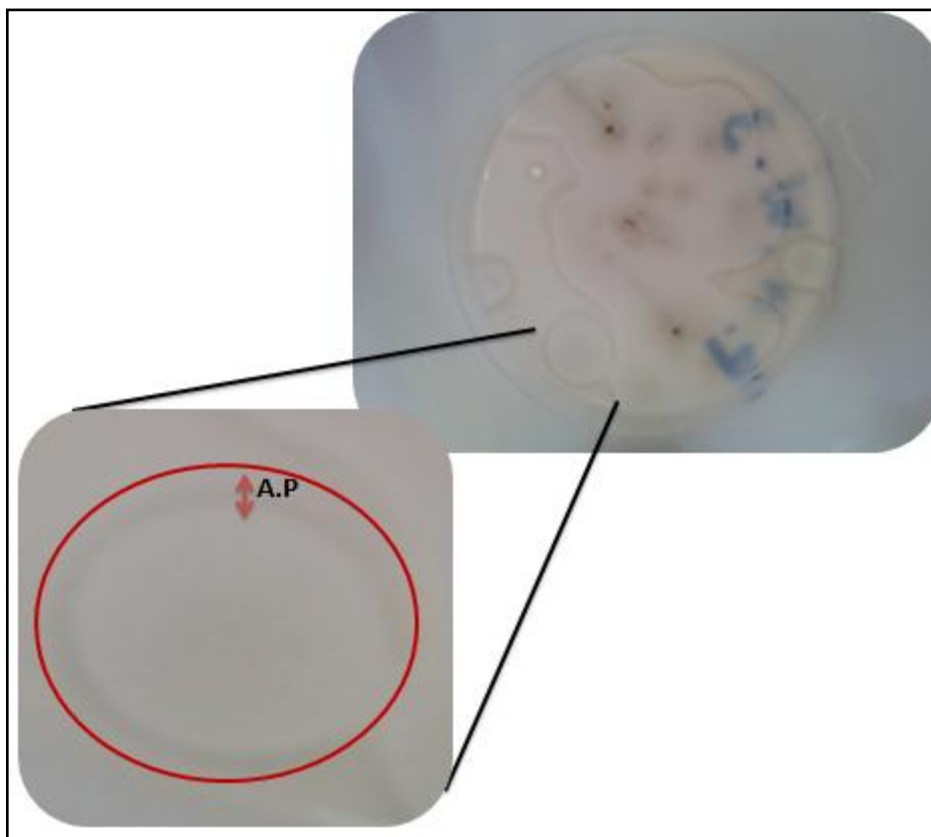


Figure 14: Mise en évidence de l'activité protéolytique d'*Aspergillus niger* sur milieu lait gélosé (AP : anneau de protéolyse, culture de 5 jours).

III.4. Optimisation de la fermentation

III.4.1. Dénombrement des spores

Les inocula de nombres des spores/ml $\times 10^6$ ont été utilisés durant les étapes d'optimisation; par la méthode classique de dénombrement des spores sous le microscope photonique à l'aide d'une cellule Malassez. Le tableau 06 représente le dénombrement des spores de la suspension fongique d' *Aspergillus niger* par ml.

Tableau 06: Dénombrement des spores des inocula utilisés pour la fermentation.

la suspension fongique	L'inoculum de choix de milieu minéral	L'inoculum d'Influence du pH du milieu minéral	L'inoculum de température d'incubation	L'inoculum de temps d'incubation
Le nombre des spores/1ml ($\times 10^6$)	3.7	2.6	2.7	1.5

III.4.2. Choix du milieu minéral

Afin de répondre aux exigences nutritionnelles des micro-organismes, les sous-produits agricoles sont généralement utilisés comme des sources de carbone et d'azote, mais les oligo-éléments sont habituellement ajoutés pour augmenter les rendements de production des divers métabolites et favoriser la croissance microbienne (**Tunga et al., 1998; Bensmail et al., 2013**).

La figure 15 montre les résultats d'étude d'influence de la composition du milieu minéral sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger*. Ce qui a été évaluée par l'utilisation de trois milieux minéraux différents: solution du Czapek-Dox (C.Dox), solution du sulfate d'ammonium à 0,05% (SA) et une solution minérale (SM).

La présente étude démontre que l'addition des sels inorganiques a un effet direct sur la production d'enzyme. Les résultats obtenus révèlent que la solution du Czapek-Dox additionnée au son de blé assure une meilleure production de la protéase d'*Aspergillus niger* avec une activité protéolytique de (157. 33 $\mu\text{g/h/ml}$), et une concentration protéique (5.204 $\mu\text{g/ml}$). Par contre, la sulfate d'ammonium (SA) donne la plus faible activité (106 $\mu\text{g/h/ml}$) et le plus faible teneur en protéines (2.842 $\mu\text{g/ml}$).

Attrassi et al (2005) obtenus même résultats, le milieu Czapek-Dox donne la meilleure production du protéase . Par contre Bensmail (2013) révèlent que la solution minérale (SM) assure une meilleure production de la protéase.

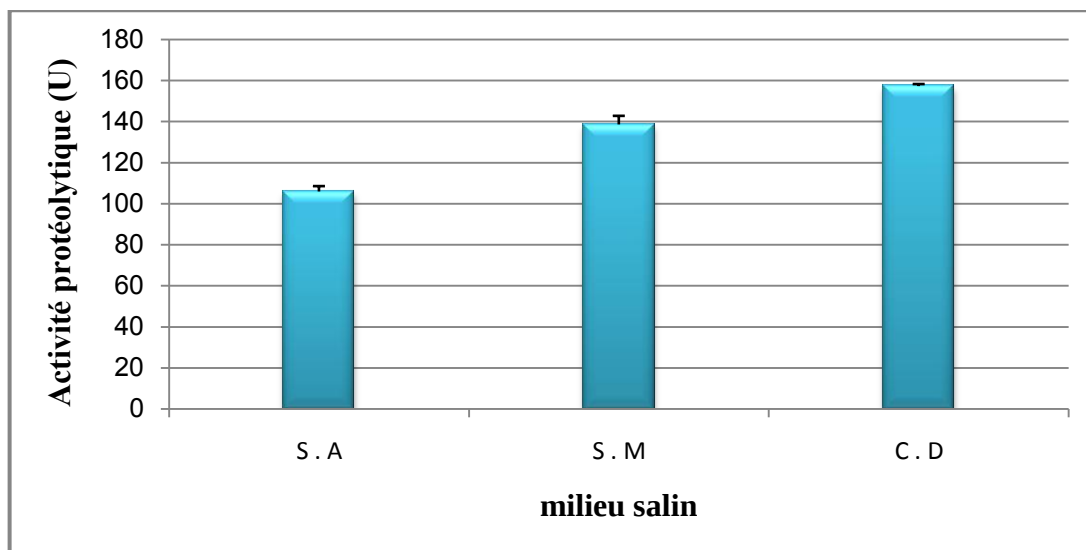


Figure 15: Influence de la composition des milieux salins sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger* (incubation à 30°C). (SA: sulfat d'ammonium, SM: solution minérale, CD: Czapek-Dox.)

III.4.3. Influence du pH du milieu minéral

D'après l'expérimentation précédente nous avons choisi la solution saline Czapek-Dox comme solution optimale pour humidifier le son de blé et fournir les éléments minéraux à la souche. Après en a réalisé l'optimisation du pH de la solution Czapek-Dox.

L'influence du pH initial de la solution saline Czapek-Dox sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger* a été étudiée en incubant la souche à différents pH. Les fermentations ont été conduites à 30°C mais à différents pH variant de 3 à 7 pendant 72 heures. Les résultats sont résumés dans la figure 16.

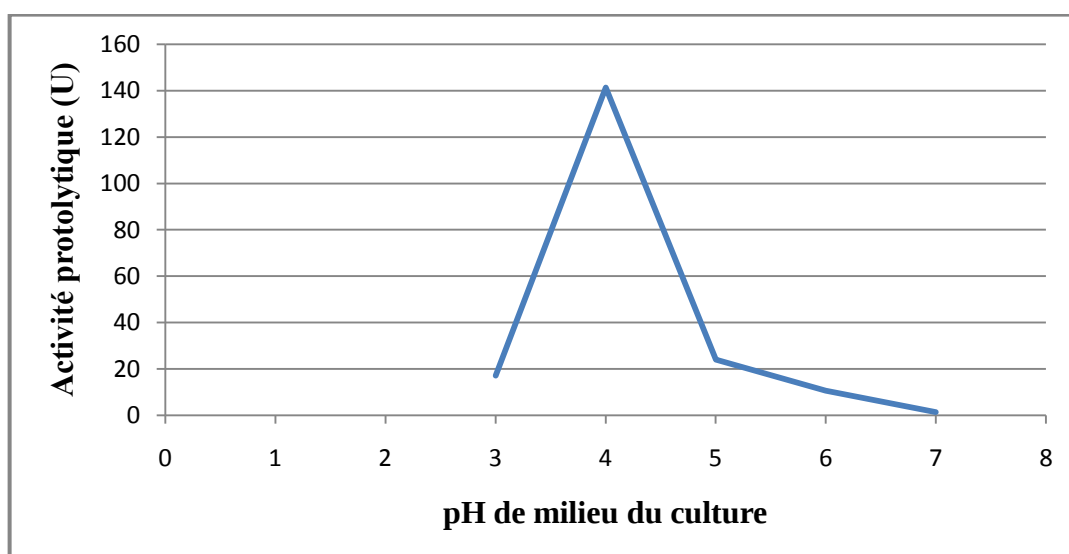


Figure 16: Effet du pH initial du milieu minéral sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger* (solution Czapek-Dox, 30°C).

On note que la production de la protéase d'*Aspergillus niger* est affectée si le niveau de pH est supérieur ou inférieur à l'optimum 4 qui conduit à une activité protéolytique 141.33 µg/h/ml (le dosage des protéines a montré la présence des protéines avec une concentration de 3.436 µg/ml dans l'extrait enzymatique à pH 4).

Nos résultats sont proches de celles obtenus par les travaux de (Rauf1 et al., 2010), dont le maximum de production de la protéase a été obtenu à pH 3,5. Par ailleurs, (Singh et al., 1994) trouvent que l'optimum de production de la protéase est le pH 4 par l'utilisation de la fermentation sur milieu liquide pour produire la protéase acide d'*Aspergillus niger*.

la variation du pH initial du milieu minéral dans l'intervalle du pH 5-7 ne provoque pas une grande différence dans les rendements de production, qui peut être expliquée par l'excellente capacité tampon du son de blé (ainsi que quelques autres résidus agro-industriels) et par l'utilisation de petites quantités expérimentales (Sandhya et al., 2005; Chutmanop et al., 2008).

III.4.4. Effet de la température d'incubation

Les dosages, de l'activité protéolytique ainsi que du teneur en protéine, dans les extraits enzymatiques obtenus à partir des fermentations à différentes températures d'incubation ont montré un effet direct de la température.

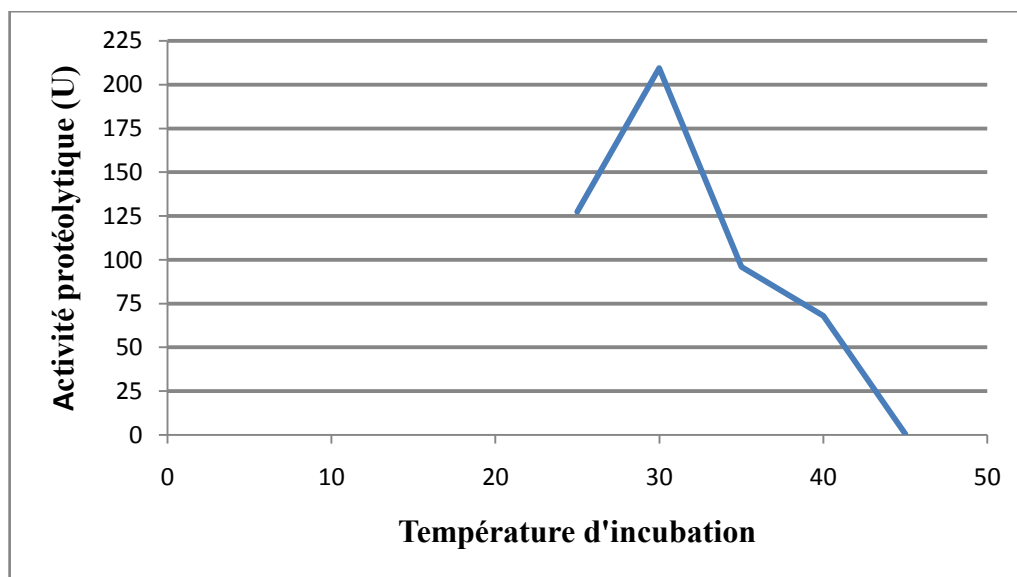


Figure 17: L'effet de la température d'incubation sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger* (solution Czapek-Dox, pH= 4).

Ces résultats démontrent que la température optimale pour la production d'enzymes s'est révélée être de 30°C, où la production maximale de protéase mesure 209.333 µg/h/ml qui s'accompagne avec une concentration des protéines de 5.038 µg/ml. Ce qui reflète la nature

mésophile de l'espèce utilisée (**Bousmeil, 2013**). Une production plus faible a été observée à des températures plus basses et plus élevées, associée à une moindre production des protéines qui s'annule à 45°C.

Cette température optimale est similaire à celles décrites pour *Aspergillus niger* (**Mukhtar & Haq, 2009**), *Penicillium griseoroseum* (**Haq et al., 2004**), *Rhizopusoryzae* (**Kumaret et al., 2005**), *Aspergillus niger* (**Oyeleke et al., 2011**) et *Aspergillus oryzae* (**Shata, 2005; Vishwanatha et al., 2010**) produisant des protéases par fermentation sur milieu solide à base du son de blé.

La température d'incubation affecte les performances de la fermentation sur milieu solide; en raison de son importance dans la croissance des microorganismes et la production des métabolites (accélère la vitesse de toutes les réactions enzymatique). La production de la protéase d' *Aspergillus niger* à plus basse température est plus avantageuse, car elle entraîne une baisse des taux d'évaporation ce qui évite l'augmentation de la température de fermentation pendant la période d'incubation. Mais, des phénomènes inverses se produisent à des températures élevées: l'élévation de la température dans la masse fermentable due à un dégagement de la chaleur métabolique, provoque un assèchement de la culture, une baisse de l'activité de l'eau (a_w) et de la disponibilité des éléments nutritifs ce qui limite l'aération et induit une croissance limitée voir impossible (**Bousmeil, 2013**).

III.4.5. Effet du temps d'incubation

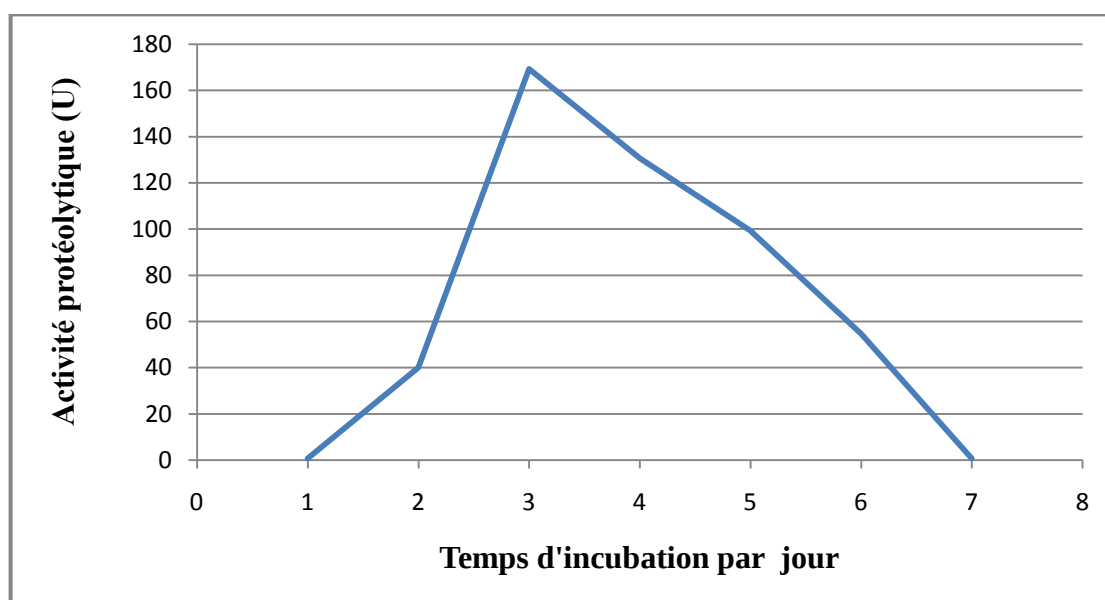


Figure 18: Influence du temps d'incubation sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger* (solution Czapek-Dox, 30°C, pH4).

Les résultats ont montré que la production enzymatique était maximale après 72h (169.33 µg/h/ml) avec une concentration protéique de (3.7911µg/ml). Une diminution progressive des unités enzymatiques a été observée avec une augmentation de la période d'incubation suggérant clairement que le rôle de l'enzyme comme métabolite primaire est produit dans la phase de retard de la croissance du champignon pour l'utilisation des nutriments présents dans le substrat solide (**Rauf1 et al., 2010**).

La diminution subséquente des unités enzymatiques pourrait probablement être due à l'inactivation de l'enzyme. Nos résultats sont comparables à celles obtenus par Sumantha (2005) qui a déclaré une activité enzymatique maximale après 3 jours avec la fermentation à l'état solide. Des résultats similaires ont également été rapportés par (**Ikasari & Mitchell, 1994**) utilisant *Aspergillus sp.*

III.5. Etude de la stabilité

III.5.1. Stabilité thermique

Les résultats illustrés dans la figure 11; montrent que la protéase extraite à partir d'*Aspergillus niger* est thermiquement stable jusqu'à une température de 50°C. L'enzyme retient seulement 80 µg/h/ml d'activité protéolytique à 50°C. Par la suite, une diminution de l'activité a été notée jusqu'à proche l'inhibition totale à 60°C, qui s'explique par la dénaturation de la structure moléculaire de l'enzyme.

Le taux de tous les processus physiologiques est augmenté en augmentant la température, mais au-delà de certaines limites, il commence à diminuer car les enzymes sont sensibles à la température. L'élévation de la température dans certaines limites a pour effet d'augmenter l'activité des enzymes, mais des températures très élevées sont destructrices. Une enzyme perd ses propriétés catalytiques à haute température en raison de l'étirement et de la rupture finale des liaisons hydrogénées faibles présentes dans la structure enzymatique; Cela entraîne le changement complet de la nature de l'enzyme et les rend inactifs (**Conn et al., 1977**).

La même gamme de la stabilité est indiquée par Kumar *et al.* (2005) et Merheb-Dini *et al.* (2010) concernant les enzymes protéolytiques d'*Aspergillus. oryzae* et de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. La protéase d'*Aspergillus niger* F2078 et celle du *Thermoascus auranticus* présentent une stabilité thermique dans l'intervalle compris entre 30 et 60°C (**Singh et al., 1994; Merheb et al., 2007**).

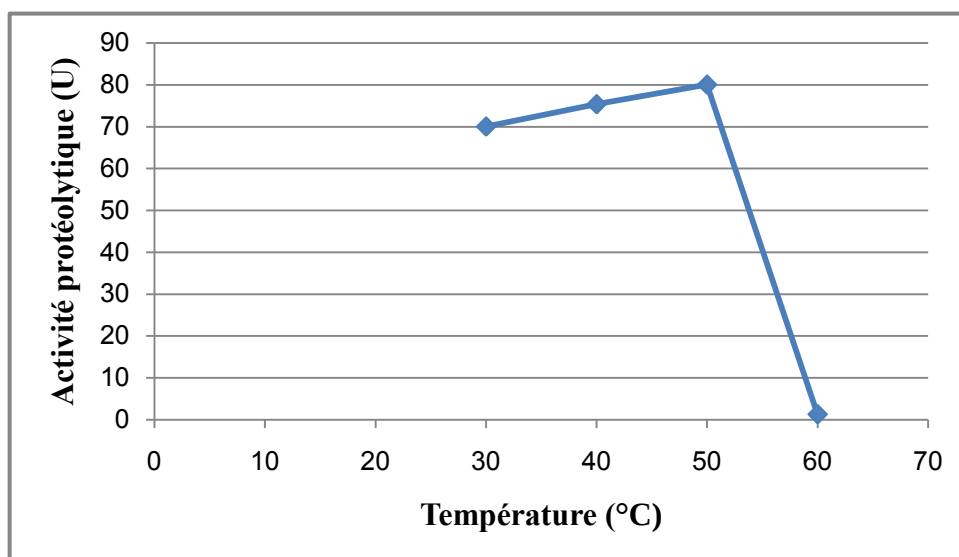


Figure 19: Effet de la température sur l'activité protéolytique de la protéase d'*Aspergillus niger*.

III.5.2. Stabilité vis-à-vis du pH

D'après la figure 20, l'enzyme protéolytique d' *Aspergillus niger* garde son activité maximale dans l'intervalle du pH compris entre 2 et 5, après incubation des extraits enzymatiques pendant 24 heures à 4°C dans le tampon citrate de sodium (0,1M). L'augmentation du pH provoque la diminution de l'activité qui disparaît à pH 8. La même réponse vis-à-vis la variation du pH, est obtenue par Singh *et al.* (1994); Fernandez-Lahore *et al.* (1999) et par Merheb-Dini *et al.* (2010) lors d'étude des enzymes coagulantes élaborées par *Aspergillus niger* F2078, *Mucor sp.* et *Thermomucor indica-seudaticae* N31 respectivement, présentant une bonne stabilité dans l'intervalle du pH 3-6.

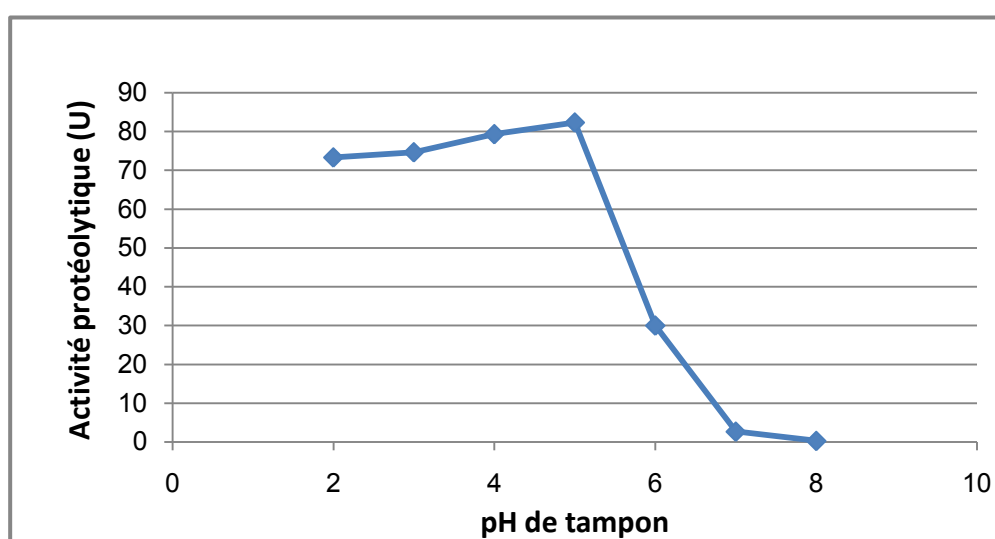


Figure 20: L'influence du pH sur l'activité protéolytique de la protéase d'*Aspergillus niger*.

CONCLUSION

Conclusion

Dans le monde industriel le développement de la microbiologie a abouti à l'obtention de matériels biologiques très divers, utilisés dans des procédés de production de vitamines, de vaccins et d'enzymes. Les enzymes protéolytiques sont principalement d'origine fongique produites par le genre *Aspergillus*. Ce genre fongique est caractérisé par leur adaptation à la culture solide à base de substrat bon marché.

Nos résultats montrent que la protéase acide produite par *Aspergillus niger* isolée de sol possède les caractéristiques d'une enzyme intéressante à des applications industrielles (pH optimal acide, thermostable).

Une activité protéolytique maximale de l'ordre de 169.33 µg/h/ml de l'extrait enzymatique brut produit par *Aspergillus niger* ont été obtenus après optimisation des conditions de la fermentation sur milieu solide à base de son de blé (milieu salin Czapek Dox, pH du milieu 4, température 30°C, durée d'incubation 72h). Par comparaison des travaux concernant la production de protéase en utilisant l'extrait enzymatique aux nombreuses recherches qui ont été réalisées sur la substitution de la présure animale par divers succédanés, on peut dire que nos résultats sont encourageants et qui requièrent plus de travail, mais qui ouvrent également le chemin pour tester la capacité de cette enzyme dans le monde industriel.

Au terme de ce travail, il est nécessaire de compléter et de développer le sujet par les études suivantes:

- Purifier l'enzyme et étudier sa structure.
- Tester l'activité de la protéase avec d'autres substrats pour évaluer son éventuel intérêt et applications.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. **Aguilar, C. N., Gerardo, G. S., Plilia, A., Raul, R. H., José, M. H., & Juan, C. E. (2008).** Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*., 4 (4), 354-366.
2. **Aissi, M. (2004).** étude *in vivo* et *ex vivo* de la de gradation des protéines constitutives de membranes basale par la serine-protéase d'*aspergillus fumigates*. *sciences & technologie*. 18(21), 85-90.
3. **Alnahdi, S. (2012).** Isolation and screening of extracellular proteases produced by new Isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*., 2 (9), 71-74.
4. **Anand, K. (2016).** Fungal Protease Production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* Using Rice Bran as the Substrate. *Academia Journal of Agricultural Researc*. United States of America (USA)., 4(6),333-338.
5. **Anonyme, (1997).** Final risk assessment for *Aspergillus niger*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*., 4 (4), 354-366.
6. **Anson, M. L. (1938).** The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*. United States of America (USA)., 149(4), 79-89.
7. **Assamoi, A.A., Destain, J., & Thonart, P.(2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures: le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol* .Argon.
8. **Attrassi, K., Selmaoui, K., Ouazzani, A., Badoc, A. & Douira, A. (2005).** Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine. *Bull Soc Pharm Bordeaux*., 144(83), 47-62.
9. **Aviron-Violet, P., Baret, J.L., Bertrand, C., Blazy, B., & Bouvier, F. (1982).** les enzymes: Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. 23(123), 140– 153.
10. **Ayesha, K., Ikram, U.H., Waseem, A.B., & Sikander, A.(2003).** Isolation and screening of *Aspergillus niger* isolates for xylanase biosynthesis. *Biotechnology*, 185-190.
11. **Badillet, G., Briève, C. & Guého E. (1987).** Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique* (vol:2). Paris: Edition VARIA.
12. **Barry, I.(1997).** Les protéases multifonctionnelles de la famille des insulinas. *Biochimie metabolism signal médecine/sciences*, 13(4), 601-609.

13. **Beatrice, W. N., Sheila, O., Vincent, A.(2015).**Identification Key for *Aspergillus* species isolated from maize and soil of Nandicounty, Kenya.*Advances in Microbiology.*, (5), 205 -229.
14. **Belmessikh, A.(2011).**Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de magister. Université Mentouri Constantine.
15. **Benedykt, W., & Katarzyana, P. (2008).**Regulation of bacterial protease activity. *Cellular & Molecular Biology Letters.*, 13: 212-229
16. **Bennett, J, W.(2010).**An overview of the genus *Aspergillus*. Caister Academic Press.
17. **Bensmail, S. (2012).**Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Mémoire de magister. Université M'Hamed Bougara de Boumerdès.
18. **Bensmail, S., Nouar, S, H., Bouchenak, K. & Fazouane, F. (2013).** Etude de l'aptitude fromagere d'un extrait enzymatique coagulant produit par *aspergillus niger* ffb1.*Microbiol Ind. san et Environn.*, 7(1), 98-119.
19. **Bergmeyer, H.U., & Gawekn, K. (1979).** Principes de l'analyse enzymatique. Paris: Edition Tech et Doc. Lavoisier.
20. **Bhatnagar, D., Imelda, J. & Paul raj, R.(2010).** Amylase and acid protease production by solid state fermentation using *Aspergillus niger* from mangrove swamp. *Central Marine Fisheries Research Institute (ICAR).*, 57(1), 45-51.
21. **Bijay, K .S.,Arijit, J.,, Prativa, K.N.,Pradeep, K.M.,&Santi, L.S.(2016).** Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chicklingvetch peels. *Journal of Taibah University for Science* (10), 571–583.
22. **Bleichrodt, R.,Vinck, A., Krijgheld, P., Van- Leeuwen, M.R., &Wösten, H. A. B.(2013).**Studies in mycology 74,cytosolic streaming in vegetative mycelium and aerial structures of *Aspergillus niger*.
23. **Boulaftali, Y. (2012).** La protéase nexine-1 : une serpine clé dans l'hémostase et la biologie vasculaire. *Hématologie.*, 18(6), 318-324
24. **Boutton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, Ph, Larpent, J.P., Reymend, P., Sanglier, J.,Vayssier, Y.,& Veau. P.(1990).** Moisissure utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2ème Ed .*Masson*. Paris. Millan. Barcelone. Mexico.

25. **Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry.*, (72), 248-254.
26. **Campos, C., Dias, D.C., Valle, J. S., Colauto, N. B. & Linde, G. A. (2010).** Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, 13(1), 19-24.
27. **Chellappan, S., Jasmin C., SoorejBasheer, M., Elyas, K. K., SaritaBhat, G. & Chandrnasekaran, M. (2006).** Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry.*, (41), 956-961.
28. **Chinnasamy, M.(2011).** Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. *Jordan Journal of Biological Sciences.*, 4, (3), 137 – 148.
29. **Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y., & Srinophakun, P. (2008).** biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.*, (62), 597-635.
30. **Clarke, P.H., & Steel, K.J. (1966).** Rapide and simple biochemical tests for bacterial identification. Academic press. London.
31. **Conn, E.E. & stumpf, P.K. (1977).** Outlines of Biochemistry (vol:5). Scotland: Edition. Biochemical education.
32. **Couto, S. R. & Sanromán, Á. M. (2006).** Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *Journal of food Engineering.*, 76(68), 291-302.
33. **Desmazeaud, M. & Hermier, J. (1968).** Isolment, purification et proprietes d'une protease exocellulaire de *micrococcus caseolyticus*. *ann. biol. anim. bioch. Biophys*, 8 (4), 565-577.
34. **Devy, L. (1999)** Métalloprotéases matricielles, protéases à sérine et migration des cellules hématopoïétiques. *Hématologie.*, 5(4), 72- 256.
35. **Dijksterhuis, J., Wösten, H. (2013).** Development of *Aspergillus niger*. Studies in mycology ,CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, an institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
36. **Drouin, M.(2005).** Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat.
37. **Dubey, A.K., Suresh, C., Kavitha, R., Karanth, N.G., & Umesh-Kumar, S.(2000).** Evidence that the glucoamylases and α -amylase secreted by *Aspergillus niger* are

- proteolytically processed products of a precursor enzyme.-FEBS Lett., 2000, 471(2), 251- 255.
38. **Fazouane, F., Mechakra, A., Abdellaoui, R., Nouani, A., Magagi Daga, S., Marou, A., Gais, S. & Penninckx, M. J. (2010).** Characterization and cheese-making properties of rennet-like enzyme produced by a local Algerian isolate of *Aspergillus niger*. *Biotechnology*., 24(18), 258-269.
 39. **Fernandez-Lahore, H. M., Auday, R. M., Fraile, E. R. (1999).** Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor sp.* solid-state cultures. *Journal of Peptides Research*.,(53),599-605
 40. **Graminha, E. B., Gonçalves, A. Z., Pirota, R. D., Balsalobe, M. A., Dasilva, R., & Gomes, E. (2008).** Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144: 1-22.
 41. **Guerra, N. P., & Pastrana, L. (2003).** Enhancement of nisin production by *Lactococcus lactis* in periodically re-alkalized cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*.,(38), 157-167.
 42. **Guezlane, N, Kahlouche, B, Athmani, R (2010).** Microbiologie (travaux personnel 2^{ème} année TCB et LMD). (vol:3). Edition Office des Publications Universitaires
 43. **Gupta, A., Roy, I., Khare, S. K. & Gupta, M. N. (2005).** Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* P se A. *Journal of Chromatography*., (1069),155-161.
 44. **Hamid, M., & Ikram-Haq, .(2009).** Production of acid protease by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *Zoological society (Pakistan J. Zool of Pakistan)*.,253-260.
 45. **Hanan, S.(2012).** Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus sp.* *Journal of Applied Pharmaceutical Science*., 2 (9), 071-074.
 46. **Haq, I. H., Mukhtar, Z. A., & Riaz, N. (2004).** Protease biosynthesis by mutant strain of *Penicillium griseoroseum* and cheese formation. *Pakistan J. Biol. Sci.*
 47. **Hayet, L., Hind, L., Estelle, C., Francis, D., & Aicha, M.(2014).** Utilization of tomatopomace as a substrate for neutral protease production by *Aspergillus oryzae* on solid-state fermentation. *International Journal of Advanced Research* 2, (11), 338-346.
 48. **Heinz, E., Esser, K., Kubitzki, K., Schnepf, E. et Ziegler, H. (2012).** Progress in Botany / Fortschritte der Botanik: Morphology Physiology Genetics Taxonomy Geobotany / Morphologie Physiologie Genetik Systematik Geobotanik.(vol:3).Berlin: Edition Springer Science & Business Media.

49. **Hernández, M. S., Marilú, R., Nelson, P. G. & Renato, P. R. (2006).** Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, (73),93-100.
50. **Hölker, U., Höfer, M. & Lenz, J. (2004).** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied of Microbiology and Biotechnology.*, 64(82), 175-186.
51. **Ichida, J.M., Krizova, L., Lefebvre, C.A., Keener, H.M., Elwell, D.L., & Burt, Jr E.H. (2001).** Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. Microbiol. Methods.*, (47), 199–208.
52. **Iqbal, J., Haq, I., Javed, M.M., Hameed, U., Khan, A.M., Parveen, N. & Khan, T. S. (2015).** Isolation of *Aspergillus niger* Strains from Soil and their Screening and Optimization for Enhanced Citric Acid Production Using Cane Molasses as Carbon Source, *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences.*, 5(4), 128-137.
53. **Ishtiaq, A. (2011).** Characterization and detergent compatibility of purified protease produced from *Aspergillus niger* by utilizing agro wastes. *Bio Resources.*, 6 (4), 4505-4522.
54. **Jakob H. (2002).** The Protein Protocols Handbook. Waterborg. Germany., 6(04), 2-9.
55. **Jesus, A. & Cordova, L. (1999).** isolement, identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide. centre de montpellier (vol: 10). France: Edition VARIA.
56. **John, I.P., Ailsa, D. H.(2013).** Fungi and food spoilage. Third. Edition .London.
57. **Jong, S.C., & Gantt, M.J.(1987).** Catalogue of fungi and yeasts, 17th edition. American type culture collection Rockville.
58. **José, L., Arnold, L.(2005) .** Microbiel enzymes and biotransformations. A centry of progress, totowa new jersey 07512.
59. **Kiran, A. (2016).** Fungal Protease Production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* Using Rice Bran as the Substrate. *Academia Journal of Agricultural Research.*, 4(6), 333-338.
60. **Koji, Y., Wang, L., Makoto, M., Kazuko, N.(2001).** Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiology Letters* .,(200),241-246.
61. **Kumar, C.G., & Takagi, H. (1999).** Microbial alkaline proteases: From a bio industrial iew point. *Biotechnology Advances.*, (17) 561-594.

-
62. **Kumar, D., Savitri., Thakur, N., Verma, R., & Bhalla, T.C. (2008).** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.*, 3(12), 661–672.
63. **Kumar, D., & Bhalla, T. C. (2005).** Microbial proteases in peptide synthetics: approaches and applications. *Applied of Microbiology and Biotechnology.*, (68), 726–736.
64. **Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O., & Turunen, O. (2001).** Industrial use of enzymes laboratory bioproc. Eng., Helsinki University of Technology, Finland.
65. **Leyral G. & Vierling E. (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires (vol:4). France: Edition Doin.
66. **Luisa, I., Correia, C. (2013).** *Aspergillus aspergillose* –Les défis dans la lutte contre la maladie. Master en sciences pharmaceutiques. Université Fernando Pessoa.
67. **Mala, B. (1998).** Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol and Molecular Biology Reviews.*, 62 (3), 597–635.
68. **Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., & Banerjee, U. C. (2005).** Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology.*, 1 (2), 1-9.
69. **Manpreet, S., Sawraj S., Sachin D., Pankaj S. & Banerjee U. C. (2005).** Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology.*, 1 (2), 1-9.
70. **Masayuki, M., & Katsuya, G. (2010).** *Aspergillus: molecular biology and genomics.* Edition Caister Academic Press, Norfolk (England).
71. **Merheb, C. W., Cabral, H., Gomes, E., & Da-Silva, R. (2007).** Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry.*, (104) 127-131.
72. **Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M. & Silva, R. (2010).** Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermucor indicae* - *seudaticae* N31. *Food Chemistry.*, (120), 87-93.
73. **Meyer, A., Deiana, J., & Bernard, A. (2004).** Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés. 2ème Edition.
74. **Mhetras, N.C., Bastawde, K. B., & Gokhale, D. V. (2009).** Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology.*, (100), 1486-1490.
-

75. **Monteiro, P. (2015).** Biotechnology perspective of fungal proteases. Microbiology., 46 (2), 337-346.
76. **Mukhtar, H. & Haq, I. (2009).** Production of Acid Protease by *Aspergillus niger* Using Solid State Fermentation. Zoological Society., 41(4), 253-260
77. **Muthulakshmi, C. (2011).** Production, Purification and Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. Jordan Journal of Biological Sciences, 4(3), 137 – 148.
78. **Neelakantan S., Nohanty A. K. and Kaushik J. K. (1999).** Production and use of microbial. Enzymes for dairy processing. Current Sciences., (77),143-148.
79. **Neil, A. & Gow, R. (1995).** Growing Fungus. Brlin: Edition Springer Science & Business Media.
80. **Oyeleke, S. B., Oyewole, O. A. & Egwim, E. C. (2011).** Production of Protease and Amylase from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* Using *Parkia biglobossa* (Africa Locust Beans) as Substrate in Solid State Fermentation. Advances in Life Sciences., 1(2), 49-53 .
81. **Pane, B., Sourabie, O., Philippe, A., Nikiem, A., Alfred, S. & Traor, E. (2011).** Caractérisation de souches d'*Aspergillus sp* isolées des grains d'arachides cultivées au Burkina Faso, Afrique de l'Ouest. International Journal of Biological and Chimical Science., 5(3), 1232-1249.
82. **Patel, R., Dodia, M., Singh, S.P.(2005).** Extracellular alkaline protease from a newly isolated halo alkaliphilic *Bacillus sp* : Production and optimization. Proc. Biochem.
83. **Paula, M. S.(2015).** A biotechnology perspective of fungal proteases,(vol 46). Brazilian Journal of Microbiology.
84. **Pelmont, J.(1995).** Enzymes: catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble.,7(621), 652–654.
85. **Penasse, L. (1974).** Les enzymes cinetiques et mecanisme d'action. Masson., 39 (4), 58-86. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agro-industrial substrates. Journal of Chemical Technology and Biotechnology., (83),1012–1018.
86. **Pol, D. (1996).** Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire. Ellipses edition marketing S.A, Paris. 15: 20-38, 42-57, 141-151.
87. **Radha, S. (2012).** Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation.

- Pelagia Research Library European. Journal of Experimental Biology., 2 (5), 1517-1528.
88. **Rahul, P., & Jha, S. N. (2014).** Basics of the genus *Aspergillus*. International Journal of Research in Botany., 4(2), 26-30.
 89. **Raimbault, M. (1998).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* (EJB), 1(3), 174 -188.
 90. **Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M.S., & Deshpande, V.V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews., 62 (3), 597-653.
 91. **Raper, K. & Fennell, D.J. (1965).** The genus *Aspergillus* (vol:2). Baltimore: Edition Williams and Wilkins.
 92. **Reginald, H., Garrett, C. & Grisham, M. (2000).** Biochimie.(vol:1). Belgique: Edition De Boeck Supérieur.
 93. **Robert, A.S., János, V., & Jens, C.F. (2011).** Taxonomic studies on the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology 69 .
 94. **Saiah, F., Bendahmane, B. S., Benkadda, M. Y., Berkani, A., Lakhdari, W. & Kolai, N. (2011).** Isolement de champignons entomopathogènes à partir de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae); *Entomologie faunistique. Faunistic Entomology.*, 63 (3), 199-202.
 95. **Sathya R., Pradeep B. V., Angayarkanni J., and Palaniswamy M. (2009).** Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using Agro-industrial Wastes. Biotechnology and Bioprocess Engineering., (14) 788-794.
 96. **Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S.B., Hubka, V. (2014).** Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in mycology., (78), 141 – 173.
 97. **Sandhya, C., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. (2005).** Microbial proteases. Methods Bio technol., (17), 165–179.
 98. **Scriban, R. (1993).** Biotechnologie. 4ème édition. Techniques et Documentation. Paris.
 99. **Sethia, K. (2016).** Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus*. Journal of Taibah University for Science., 10(15), P 571–583.
 100. **Scriban, R. (1999).** Biotechnologie. 5^{ème} édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (ed.). Paris.p : 401-409.

101. **Shatahoda, M. A. (2005).**Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae*. Polish Journal of Microbiology., 54 (3),241-247.
102. **Siboukeur, O., Mati, A., & Hesses, B. (2005).** Amelioration de l'aptitude a la coagulation du lait cameline (camelus dromedarius): utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. Cahiers d'études et de recherches francophone/ Agriculture., 14(05), 473-478
103. **Simon, P. & Meunier, R. (1970).** Microbiologie industrielle et génie biochimique. Paris: Edition Masson et Cie.
104. **Singh, A., Ghosh, V. K., Ghosh, P. (1994).** Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. Letters in Applied Microbiology., (18),177-180.
105. **Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey A. (2009).** Recent advances in solide state fermentation. Biochemical Engineering Journal., (44), 13-18.
106. **Smith, J. & Hong-Shum, L. (2011).** Food Additives Data Book. New York :Edition United States.
107. **Souza, M. (2014).** A biotechnology perspective of fungal proteases. Brazilian Journal of Microbiology., 46, (2), 337-346.
108. **Sumantha, A., Larroche, C. & Pandey, A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food- grade proteases: a perspective. Food Technology and Biotechnology.,44 (2),211-220.
109. **Sumantha, A., Sandhya, C., Szakacs, G., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2005).** Production and partial purification of a neutral metallo-protease by fungal mixed. substrate fermentation. Food Technology and Biotechnology., 43 (4), 313-319.
110. **Sumantha, A., Deepa, P., Sandhya, C., Szakacs, G., Soccol, C.R., & Pandey, A. (2006).** Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. Brazilian Archives of Biology and Technology., 49 (5), 843-851..
111. **Tunga, R., Banerjee, R. & Bhattacharya B.C. (1998).** Optimizing some factors affecting protease production under solid-state fermentation. Bioprocess Engineering, 19(22), 187-190.
112. **Uniprot, C. (2009).** Taxonomy : fungi metazoa group. Site de Uniprot.
113. **Varga, J. & Samson, R. A. (2008).** *Aspergillus* in the Genomic Era(vol:2). Holanda: Wageningen Academic Publishers.

114. **Verscheure, M., Lognay, G. & Marlier, M. (2002).** Les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 6 (3), 131–142.
115. **Villegas, E., Aubague, S., Alcantara, L., Auria, R. A. & Revah, S. (1993)-** Solid state fermentation acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. *United States of America (USA).*, 11(08), 387-397
116. **Vishwanatha, K. S., Appu, Rao A. G., & Singh, S. A. (2009).** Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry.*, (114) 402-407.
117. **Vistwanatha, K. S., Rao-Appu, A. G.,& Sigh, S. A. (2010).** Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology.*, (37),129-138.
118. **Voet, D.(2004).** Biochemistry. Biochimie 2^{ème} édition.
119. **Wang, L. & Yang, S.-T. (2007).** Solid-state fermentation and its applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources.*, 5(4), 465- 489.
120. **Wang, Q.(2008).** Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process Biochemistry.*,(43), 280-286.
121. **Ward, O. P., Qin, W. M., Dhanjoon, J. & Singh, A. (2006).** Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances IN Applied Microbiology.*, 5(8), 571–583.
122. **Yang, J., Quail, J. W., (1999).** Structure of the *Rhizomucormiehei* aspartic proteinase complexed with the inhibitor pepstatin A at 2.7 Å resolution. *Acta-Cristallogr .D.Biol .Crystallog.*, (55), 625-630.
123. **Zheng, W. (2015).** GB 2760 National Food Safety Standard Food Additive Usage Standard. (Translated English of Chinese Standard).

ANNEXES

ANNEXE A : MATERIELS

1-Autoclave : Model: PA-NM12, PA-NM18, PA-NM24

2- Etuve: Modèle: THITEC 250

Modèle: THITEC 125

Etuve a co2 - inco memmert

3- Incubateur: modèles EN 025-055-120

4- Microscope photonique : UKA-Technic Nahita

5- Balance: KERN EMB 1000-2

6- Balance de précision (analytique) - Ohaus PA114

7- Centrifugeuses réfrigérées *Hettich* (ROTINA 380)

8- Bain Marie: Memmert

9- Spectrophotomètre UV/VIS 9200: Zuzi Model 4201/50

10- Agitateurs magnétiques: Stirrer 6806, Nahita
ARE, Velp Scientifica)

11- pH mètre: Nahita 903
inoLab pH 7110

12- Plaque chauffante :AREX Heating Magnetic Stirrer
STURAT

ANNEXE B: COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE ET DES SOLUTIONS

1-Milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*)

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 :

- Pomme de terre 200 g
- Agar 15 g
- Glucose 20 g
- Eau distillée compléter jusqu' à 1000 ml

- Laver la pomme de terre non pelée.
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min.
- D'autre part faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Compléter le volume à 1000 ml.
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

2- Milieu de lait gélosé 30%:

Ensemencement (Technique)	composition	Caractères recherchés	Résultats
-milieu présenté en boîte. -faire une strie centrale à la surface du milieu. -Incuber 24h à 7 jours à la température désirée	Agar blanc + lait sans graisse à 45°C stérile	Mise en évidence de l'hydrolyse de la caséine, protéine du lait.	L'hydrolyse de la caséine se traduit par l'apparition d'une zone claire autour de la culture.

Pour obtenir un du lait gélosé 30% mélange 70ml d'Agar blanc avec 30ml lait sans graisse à 45°C

3-Czapek dox (Bhatnagar, 2010)

La composition de czapek dox était (g/l):

NaNO ₃	2,5
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5
KCl.....	0,5

4-Solution minérale (SM) (% , p/v) (Sumantha, 2005)

NH ₄ NO ₃	0,5
KH ₂ PO ₄	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
NaCl.....	0,1

5-Sulfate d'ammonium (Kumar, 2005).

6-Tampon Citrate de Sodium (0,1M; pH 5,2)

- ❖ **Solution A:** acide citrique 21,01 g/l (0,1M), (C₆H₈O₇.H₂O)
- ❖ **Solution B:** le dissodique 35,6 g/l (0,2M), (Na₂HPO₄.2H₂O)

Pour avoir une solution tampon à pH 5,2 mélanger: 46,9 ml de la solution A et (100 - 46,9) ml de la solution B.

ANNEXE C : DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES.

- Solutions utilisées:

- Solution mère : BSA (bouvine albumine sérum)
- Réactif de Bradford

- Protocole

Tableau A : Préparation de la gamme d'étalonnage de la BSA (1mg/ml).

N° de tubs Solution et réactifs	Blanc	1	2	3	4	5	l'échantillon à doser.
Solution mère: BSA(µl)	0	20	40	60	80	100	
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0	
Réactif de Bradford (ml)	2ml						
Absorbance à 595 nm							

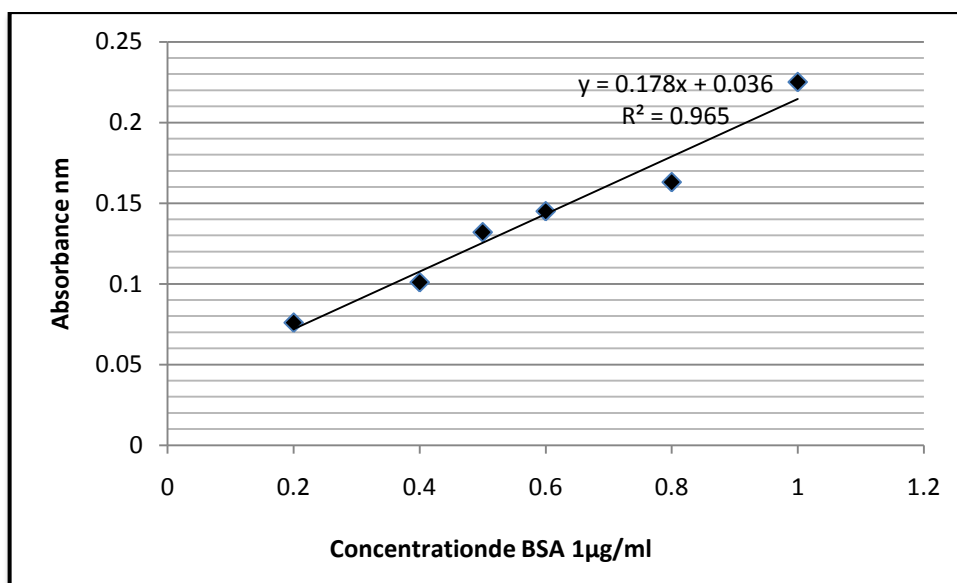


Figure A: Courbe étalon pour le dosage des protéines.

ANNEXE D : MESURE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

1-Solutions utilisées

- Caséine 2,5 % dans Citrate de Sodium (0,02 M).
- Solution mère 100 µg /ml de Tyrosine.
- TCA 4 %.
- Na₂CO₃ 2 % dans NaOH (0,1 N).
- Folin-Ciocalteux 1/10^{ème}.

2-Courbe d'étalonnage de la tyrosine:

Tableau B: Protocole de courbe d'étalonnage de la tyrosine

Dilution (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Volume de tyrosine prélevé (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Na2CO3 à 2% dans du NaOH 0,1N (ml)	2.5					
Agiter correctement puis laisser stabiliser le mélange pendant 10 min						
Réactif de Folin dilué (1/10 ^{ème})	0.5					
Mélanger après chaque addition du réactif de Folin et laisser reposer à l'ombre pendant 30 min au minimum						
Lecture de l'absorbance à 750 nm.						

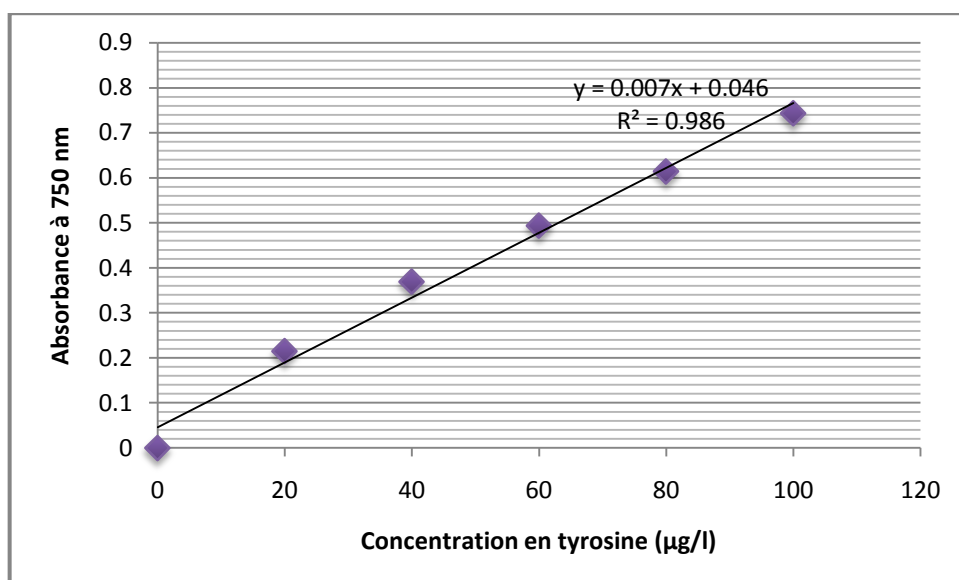


Figure B: Courbe d'étalonnage de la tyrosine.

Une unité de protéolyse correspond à la libération de 1µg de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans un ml d'échantillon (1µg/h/ml). La concentration déduite de la courbe d'étalonnage correspond à 0,5 ml d'échantillon dilué par les réactifs ajoutés au cours de la première étape.

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

