Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. : .....

Présenté et soutenu par :
Aicha BERBAS et Nour Elhouda MEGHAZI

Le : mardi 9 juillet 2019

Thème

Optimisation de la production de protéases par *Aspergillus niger* sur milieu solide : caractérisation et application

---

Jury :

Mme.	Djamila MOKRANI	MAA	Université de Biskra	Président
Mme.	Fatiha BENGUERAICHI	MAB	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	Wassila DENDOUGA	MCB	Université de Biskra	Examinateur

Année universitaire : 2018 - 2019

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions Allah tout puissant, l'omniscient et le miséricordieux de nous avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.

Nous remercions vivement et chaleureusement, Madame BENGUERAICHI Fatiha, maître assistant au département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Mohamed KHIDER - Biskra, pour avoir encadré et dirigé ce mémoire avec une grande rigueur scientifique aussi pour ses encouragements, ses conseils, sa confiance, sa patience, elle a constamment porté un regard critique ouvert et constructif sur ce travail.

Mes sincères remerciements vont aussi aux membres de jury pour l'honneur qu'ils auront fait en acceptant de juger ce travail; à Madame MOKRANI Djamila pour accepter de présider le jury à DENDOUGA Wassila qui ont consacré leur temps pour examiner de ce travail.

Également, nous tenons à remercier les techniciens et les employés de laboratoire : Mesdames, TIBERMACINE Moufida, BACHA Saliha, CHELOUAI Sara, SOLTANI Alima, Messieurs SAHRAOUI Abd Allah, BAIA Abd El Kader, DRIDI Oualid, ZOUZOU Oussama pour l'aide offerte lors des différentes étapes de la réalisation de ces travaux.

Finalement, Nous adressons notre reconnaissance à tous nos proches pour le support moral, l'encouragement et la compréhension qu'ils nous ont offerts tout au long de nos études.

Aicha&Nour El houda

Dédicace

Ce travail Modest est dédié à :

A mes chers parents :

A mon ange dans cette vie, à qui j'ai été le secret de mon succès

A mon grand-mère : Mariem,

A mes chères sœurs : Imane, Asmaa, Ibtihal

A les petits enfants de ma famille :Djoumana, Malek et Roudina.

A mes frères : Zakaria et Mohamed Islam

A époux de ma sœur : Abd el razzak.

A mes sœurs, à qui ma mère pas donné naissance:

Safia et Nour Elhouda.

A tous mes collègues de promotion 2018-2019.

Berbas Aicha.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encourage et leur soutien tout au long de mes études, que Allah les bénisse.

A mon très chère encadreur: *Mme Bengueraichi Fatiha.*

A mes chères sœurs: *Wahiba, Fadhila, Raihana et soumia.*

A mes chers frères: *Abd El rahmane, Nasser Eldine, Mohamed Elamine et Zine Elabidine.*

Aux époux de mes sœurs: *Naili Fayçal, Salim et Mihi Salim.*

Aux épouses des mes frères.

A ceux qui sont proches de mon cœur :*Imane, Aicha, Ibtihal et Aya.*

A tous mes amies et mes collègues.

MEGHAZI Nour El houda

Table des matières

Liste des Tableaux I
Liste des Figures II
Liste des abréviations III
Introduction 1
Première partie: Synthèse bibliographique
Chapitre01: Protéases
1.1.Définition 3
1.2. Sources des protéase 3
1.2.1. Protéases d'origine animales 3
1.2.2. Protéases d'origine végétales 3
1.2.3. Protéases d'origine microbiennes 3
1.3. Classification des protéases 3
1.4. Applications des protéases 4
1.4.1. Industrie alimentaire 4
1.4.1.1. Fabrication du fromage 4
1.4.1.2. Boulangeries 4
1.4.2. Industrie des détergents 4
1.4.3. Médicale et pharmaceutique 5
1.4.4. Autres applications 5
Chapitre02:*Aspergilus niger*
2.1. Généralité 6
2.2. Taxonomie 6
2.3. Morphologie 7
2.3.1. Aspect macroscopique 7
2.3.2. Aspect microscopique 7
2.4. Habitat 8
2.5. Reproduction 8
2.6. Diverses enzymes produites par l'*A.niger* 8
Chapitre03:Fermentation
3.1. Fermentation liquide ou Submerged Fermentation (SmF) 9
3.2. Fermentation solide 9
3.2.1. Avantages et inconvénients 9

3.2.2. Substrats utilisés 10
3.2.3. Microorganismes utilisés 10
3.3. Applications industrielles de la fermentation sur milieu solide 11
Deuxième partie: Partie expérimentale
Chapitre04: Matériels et méthodes
4.1. Matériel biologique 12
4.1.1. Revivification de la souche« *Aspergillus niger* » 12
4.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique de la souche d'*A.niger* 12
4.3. Préparation de l'inoculum 13
4.4. Dénombrement des spores 13
4.5. Fermentation sur milieu solide SSF 13
4.6. Extraction de la protéase d'*A. niger* 13
4.7. Méthode de dosage 14
4.7.1. Dosage des protéines 14
4.7.1.1. Principe 14
4.7.2.2 Elaboration de la courbe d'étalonnage 14
4.7.3. Mesure de l'activité protéolytique 15
4.7.3.1. Principe 15
4.7.3.2. Mode opératoire 16
a. Courbe d'étalonnage de la tyrosine 16
b. Dosage de l'activité protéolytique 16
4.7.4. Mesure de l'activité coagulante 18
4.8. Optimisation de la production de protéases extracellulaires 19
4.8.1. Température d'incubation 19
4.8.2. pH initial du milieu minéral 19
4.8.3. Concentration d'inoculum 20
4.8.4. Temps d'incubation 20
4.9. Etude de quelques caractéristique de l'extrait brut d'*Aspergillus niger* 20
4.9.1. Détermination de pH optimal 20
4.9.2. Détermination de la température optimale 20
4.10. Purification partielle de l'enzyme 21
4.10.1. Précipitation par sulfate d'ammonium 21
4.10.2. Dialyse 21
4.11. Evaluation des propriétés technologiques des protéases extraites 22
4.11.1. Test de lavage 22

4.11.2. Digestion des protéines naturelles 22
4.11.2.1. Activité digestive 22
4.11.2.2. Activité anticoagulante 22
Chapitre05: Résultats et discussion
5.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique 24
5.2. Mesure de l'activité protéolytique 25
5.3. Mesure de l'activité coagulante 26
5.4. Optimisation de la production de la protéase extracellulaire 26
5.4 .1. Température optimale 26
5.4.2. pH optimum 27
5.4.3. Concentration d'inoculum optimale 28
5.4.4. Temps d'incubation optimal 29
5.5. Etude de quelques caractéristiques de l'extrait brut d'A*spergillus niger* 30
5.5.1. pH optimal 30
5.5.2. Température optimal 32
5.6. Purification partielle de l'enzyme 33
5.6.1. Précipitation par sulfate d'ammonium 33
5.7. Evaluation des propriétés technologiques des protéases extraites 34
5.7.1. Test de lavage 34
5.7.2. Digestion des protéines naturelles 34
5.7.2.1. Activité digestive 34
5.7.2.2. Activité pharmaceutique 35
Conclusion 36
Références 38
Annexes

Liste des Tableaux

Tableau 1. Préparation de la gamme d'étalonnage de BSA (0,1mg/ml). 14
Tableau 2. Préparation de la gamme d'étalonnage de tyrosine. 16
Tableau 3. Préparation de mélange réactionnel. 17
Tableau 4. Dosage de l'activité protéolytique. 18
Tableau 5. Mise en évidence de l'activité protéolytique d'*A.niger* sur milieu de lait gélosé à 30%. 24
Tableau 6. Activité protéolytique de l'extrait après la précipitation au sulfate d'ammonium. 33
Tableau 7. Tableau de saturation en sulfate d'ammonium solide. Annexe 3

Liste des Figures

Figure 1. Aspect microscopique (hyphe et spores) d'*Aspergillus niger* 7
Figure2. Représentation schématisée d'une tète aspergillaire. 8
Figure 3. Culture d*'Aspergillus niger* sur milieu PDA. 12
Figure 4. Courbe d'étalonnage de la solution de BSA 15
Figure 5. Courbe d'étalonnage de la solution de tyrosine 16
Figure 6. Mise en évidence de l'activité protéolytique d'*A niger* sur milieu lait gélosé à 30%. 25
Figure 7. Influence de la température d'incubation sur la production de la protéase d'*A.niger*. 26
Figure 8. Effet du pH sur la production de protéase d'*A.niger*. 28
Figure 9. Influence de la concentration d'inoculum sur la production de protéase d'*A.niger*. 29
Figure 10. Influence de temps d'incubation sur la production de protéase d'*A.niger*..... 30
Figure 11. Effet de pH sur l'activité protéolytique de l'extrait brut d'*A.niger*. 31
Figure 12. Effet de la température sur l'activité protéolytique de l'extrait brut d'*A.niger*. 32
Figure 13. Test de lavage par l'extrait brut d'*A.niger*. 34
Figure 14. Test de l'activité digestive de l'extrait enzymatique 35
Figure 15. Test de l'activité anticoagulante de l'extrait enzymatique 35

Liste des abréviations

AC : Activité Coagulante.

AP : Anneau de Protéolyse.

BBC-G250 : Bleu Brillant de Coomassie.

BSA : Bovin Serum Albumin.

E.C.: Enzyme Commission.

FMS: Fermentation en Milieu Solide.

h : heure.

Met: Méthionine.

PDA: Potato Dextrose Agar.

pH : potentiel d'Hydrogène.

Phe : Phenylalanine.

rpm: rotation par minute.

SmF : Submerged Fermentation.

SSF: Solid-State Fermentation.

sp. : Espèce.

TCA ;TriChloroacetic Acid.

UP : Unité Présure.

Introduction

Les enzymes protéolytiques ou les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines . Ces enzymes constituent l'un des groupes les plus importants des enzymes industrielles représentant environs 60% du total marché industriel. Elles sont applicables dans une large gamme des utilisations commerciales, telle que l'industrie des détergents, du cuir, des aliments et les industries pharmaceutiques. Le marché mondial des enzymes devrait enregistrer un taux de croissance annuel d'environ 7,8% au cours de la période de prévision 2015-2020 (Sharma *et al.,* 2017).

La demande industrielle des préparations actives des enzymes protéolytiques appropriées aux pH et des températures extrêmes stimule à continuer la recherches des nouvelles sources des protéases, les enzymes protéolytiques ont un rôle physiologique chez tous les organisations vivantes et par conséquence, ils sont présent dans large éventail des sources telles que les animaux, les plantes et les microorganismes.

Cependant les sources fongiques particulièrement les champignons filamenteux tel que les *Aspergillus* ont été l'organisme de choix pour la production à grande échelle des enzymes industrielles, parmi le genre d'*Aspergillus*, l'*Aspergillus niger* est principalement concentré pour la production de protéase en raison de son caractère omniprésent, une exigence nutritionnelle non fastidieuse , sa adaptation aux cultures à base des substrats solides peux couteux, facilitant ainsi la récupération des protéases extracellulaires avec des rendements accru tout en réduisant les coûts d'exploitation (Benazir *et al.,* 2011).

Les enzymes protéolytiques peuvent être produites par la fermentation liquide comme solide (De castro *et al.,* 2014). Le coût de la production des enzymes disponibles dans la commerce par la fermentation immergée (liquide) est généralement trop élevée pour les applications biotechnologique à ce raison la fermentation solide est une technique alternative pour la production des enzymes industriels (Mais, 2018).

Certaines caractéristiques rendent la fermentation à l'état solide plus attrayant que la fermentation en immersion : la simplicité, le faible coût, des rendements et des concentrations des enzymes élevées, l'utilisation des résidus agricoles peu coûteux et largement disponibles comme substrats (De casro *et al.,* 2014).

La production des enzymes précisément les protéases par l'*Aspergillus niger* isolée à partir du sol d'une source thermale « Hammam El-Hadjeb » Biskra caractérisée par une force coagulante et une capacité protéolytique élevée assure pour notre pays une autre source

des succédanés des produits chimiques utilisés dans les champs industriels dont une étude approfondie s'est devenue nécessaire afin d'améliorer sa production et la qualité des produits obtenus.

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

- l'optimisation de la production de ces enzymes par fermentation sur milieu solide (SSF), en utilisant un résidu agroalimentaire peu coûteux (son de blé) afin d'obtenir une forte activité coagulante et activité protéolytique ;
- la caractérisation physicochimique de l'extrait enzymatique brut d'*A.niger* ;
- la purification partielle de l'enzyme ;
- l'évaluation des propriétés technologiques des protéases extraites.

Pour cela, nous avons réalisé une étude en deux parties :

La première partie comporte une synthèse bibliographique traitant en général les protéases, l'espèce d'*Aspergillus niger* et le processus de fermentation. La partie deuxième consacrée aux méthodes employées afin d'atteindre les objectifs ciblés plus les résultats obtenueset sa discussion.Par la suite, une section est dédiée à la présentation de la conclusion et des recommandations.

1.1.Définition

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x). En effet, ce sont des enzymes qui hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites de façon extracellulaire ou intracellulaire (Kumar*et al*., 2008). Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs. Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques (Pelmont, 1995).

1.2. Sources des protéases

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

1.2.1. Protéases d'origine animales

La plupart des protéases d'origine animales sont pancréatiques. En effet, elles ont la propriété de dégrader les protéines alimentaires. Elles sont toutes synthétisées sous forme d'un précurseur tels que : la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine (Rao*et al*., 1998).

1.2.2. Protéases d'origine végétales

Les enzymes d'origine végétale et spécialement les protéases sont par ordre décroissante en technologie. La papaïne, la bromélaïne, la kératinase et la ficine représentent quelques-unes des protéases bien connues d'origine végétale (Rao*et al*., 1998).

1.2.3. Protéases d'origine microbiennes

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (Sandhya*et al.*, 2005). Elles sont produites par une grande variété de microorganismes dont les bactéries, les actinomycètes, les moisissures et les levures (Devi *et al*., 2008).

1.3. Classification des protéases

Les protéases peuvent être réparties en deux grands groupes en fonction de leur capacité de couper les liaisons peptidiques N– ou C-terminales (exopeptidases : aminopeptidases, carboxy-peptidases respectivement), ou les liaisons peptidiques internes (endopeptidases, appelées également les protéinases) (Sumantha *et al*., 2006)

En fonction du pH ; ces enzymes peuvent être classées dans trois groupes:les protéases acides ont à un pH isoélectrique entre 3 et 4,5 et une activité maximale à des faibles pH (généralement de 3 à 5) (Rao *et al*., 1998), les protéases neutres à pH 6,5 et 7,5 et les

protéases alcalines agissent à des valeurs de pHsupérieures à 7,5 jusqu'à11 (Kumar*etal* .,2008 ; Boukhalfa-Lezzar, 2015).

Les protéinases sont divisées en six familles en fonction du groupement fonctionnel au niveau du site actif. les protéase à sérine (EC3,4,21), les protéases à carboxysérine (EC 3.4.16) les protéases àcystéine (EC 3.4.22), les protéases à acide aspartique (EC 3.4 .23), les métalloprotéases(EC3,4,24) et les carboxymétallo protéases (EC 3.4.17) qui forment le groupes du protéinase le plus varié (Sharma *et al*., 2017).

1.4. 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 (Kumar*etal*., 2008).

1.4.1. Industrie alimentaire

1.4.1.1. Fabrication du fromage

L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages (Rao *et al*., 1998).Des recherches approfondies ont permis de prouver que la majorité des protéases microbiennes acides possède une grande capacité à coaguler le lait pour former le caillé, l'étape clé dans la production fromagère (Neelakantan*et al*., 1999; Sumantha*et al.,* 2006).

Les protéases utilisées à cette fin sont produites par des microorganismes *Aspergillus niger*,*Aspergillus oryzae, Thermoascusaurantiacus, Irpexlactis, Endothiaparasitica*etautresespèces du genre *Mucor*ont également été utilisées en industrie laitière (Merheb *et al.,* 2007).

1.4.1.2. Boulangeries

Les endo et les exoprotéinases d'*A. oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten de blé par une protéolyse limitée selon les caractéristiques désirées de la pâte ; un tel traitement enzymatique permet de réduire le temps de pétrissage (Belmessikh, 2011). Des protéases bactériennes sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (Rao *et al*., 1998).

1.4.2. Industrie des détergents

Les protéases présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergents pour leur capacité à favoriser l'élimination des taches protéiques vue leur avantage unique qui ne peut autrement être obtenue avec la technologie des détergents classiques (Gupta *et al.*,

2002).Maintenant, elles sont ajoutées comme ingrédients clés, ce qui représente environ 25-30% des ventes totales dans le monde entier des enzymes (Singh *et al*., 2016).

Parmi les principales conditions préalables pour l'utilisation des protéases dans la production des détergents sont : l'action sur une large gamme des substrats, l'activité et la stabilité à des pH et à des températures élevés et en présence des agents oxydants additionnés (Mukherjee *et al*., 2008). Aujourd'hui, toutes les protéases des détergents actuellement commercialisés sont des protéases à sérines (subtilisines et/ou des protéases alcalines) produites par *Bacillus sp*. (Singh *et al*., 2016).

1.4.3. Médicale et pharmaceutique

La grande diversité et spécificité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement des agents thérapeutiques efficaces. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus* sont utilisées pour soulager les troubles digestives gastro-intestinaux tels que la dyspepsie (Sumantha*et al*., 2006) des collagénases provenant de *Clostridium sp*. ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des bruleurs, plaies et des ulcères dermiques (Rao *et al*., 1998) .

1.4.4. Autres applications

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

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

2.1. Généralité

Les champignons du genre *Aspergillus* ont été décrits la première fois en 1729, dont ce genre comprend aujourd'hui 185 espèces, dont vingtaine retrouvées en pathologies humains. (Desoubeaux etChandenier, 2010).

Aspergillus niger est une espèce fongique mélanisé qui est omniprésent et couramment utilisé dans les industries biotechnologies comme hôtes de production de l'acide citrique et les enzymes industriels (Jillian*et al.*,2018).Parmi lesquelles: les cellulases, les pectinase, les xylanases, les amylases, les glucoamylases et les protéases (Murphy et Horgan,2005 ; Ward *et al*.,2006).

2.2. Taxonomie

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

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

- Phylum : Tallophyta
- Sous-phylum : Fungi (Mycota)
- Division de sous-phylum : Eumycota
- Subdivision : Deuteromycotina (Fungiimperfecti)
- Classe : Hyphomycètes (forme filamenteuse)
- Ordre : Moniliales
- Famille : Moniliaceae
- Sous-famille : Hyalosporae
- Tribu : Aspergilleae
- Genre : *Aspergillus*
- Espèce : *Aspergillus niger*

2.3. 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 qui s'appelle les phialides (Leyral et Vierling, 2007).

2.3.1. Aspect macroscopique

Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais l'*A. niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunâtres et à maturité elles deviennent noires (Bensmail, 2012).

2.3.2. Aspect microscopique

Les têtes conidiennes, bisériées et radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres à noires. Les conidiophores sont longs atteignant 1,5-3 mm, lisses à stipes non cloisonnés, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure, formés d'une cellule courte appelée cellule podale (footcell) avec un hyphe fertile. Les vésicules (50-70µm) sont globuleuses avec des têtes aspergillaires hémisphériques volumineuses, à panache radié. Les phialides (7-10 x 3-3,5 µm) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables (10-15µm). Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties de couleur brunâtre et qui mesurent 3,5 à 4,5 µm ; parfois jusqu'à 6 µm de diamètre (Bensmail, 2012).

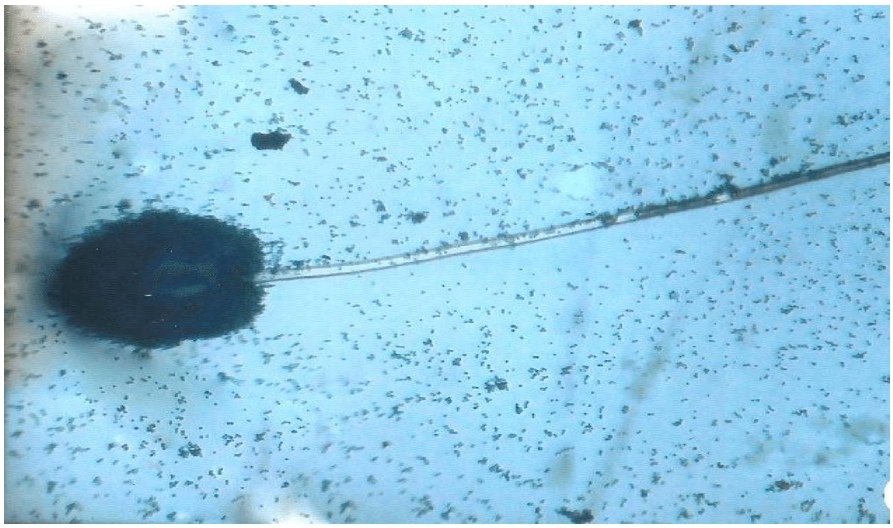

Figure 1. Aspect microscopique (hyphe et spores) d'*Aspergillus niger* (Benazir *et al.*, 2011).

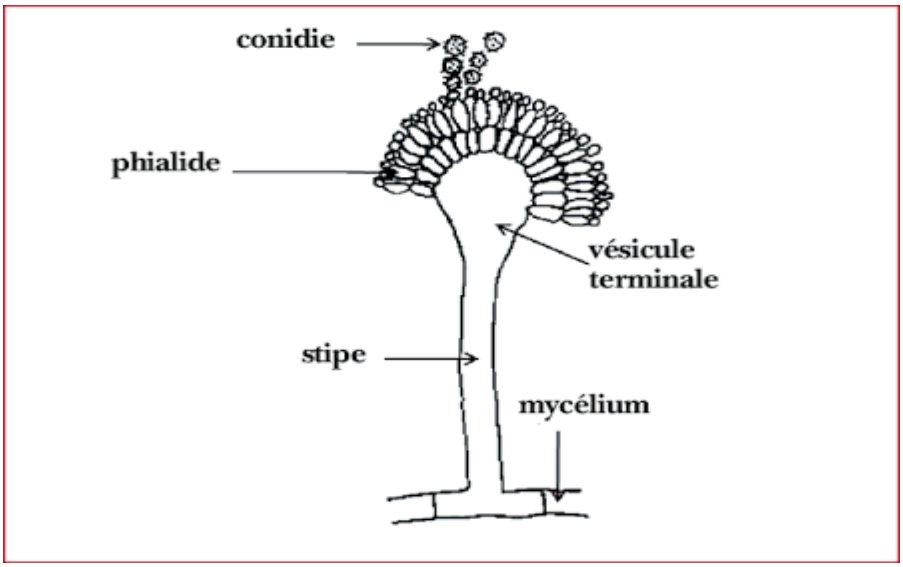

Figure2. Représentation schématisée d'une tète aspergillaire (Desoubeaux, 2013).

2.4. Habitat

A. niger est l'un des champignons les plus communs dans l'environnement humain, qui vive en saprobiose (Ward *et al*.,2006). Il est très répondu dans les zones sombres et humides, les sols, le compost, pousse à la surface des matières organiques en décomposition, des denrées alimentaires, des sous-produits agricoles surtout les céréales et ses dérivés (son de blé, son de riz, bagasse...) et de nombreux autres substrats (Pasqualotto, 2010).

2.5. Reproduction

L'état asexuel d'*Aspergillus* est ce qui attire le plus souvent les bio-technologistes. Il est en fait caractérisé par la production d'un grand nombre des spores en chaînes . La sporulation produit des conidies contenant des spores asexuées haploïdes, disséminées dans l'atmosphère après maturation. La croissance végétative est initiée par la germination des spores avec formation d'un hyphe tubulaire (extension strictement apicale) donnant naissance à un réseau mycélien par ramification, qui acquiert les éléments nutritifs de l'environnement (Meyer *et al*., 2004 ; Ward *et al*., 2006).

2.6. Diverses enzymes produites par *A.niger*

Les espèces d'*Aspergillus* en particulier les souches *Aspergillus niger* servent à la production à grande échelle d'enzymes industriellement précieuses telles que : protéases glucoamylase,α-amylase, xylanase , cellulas, tannase, lipase, phytase, polygalaturonase, pectinase, α-galactosidase,Uréase et hemicellulase (Bensmail, 2012).

3. Fermentation

La nature de la fermentation, solide ou liquide (submergée), influe divers aspects de la croissance des micro-organismes ainsi que la production des substances d'intérêt (Sumantha *et al.,* 2005).

3.1. Fermentation liquide ou Submerged Fermentation (SmF)

La fermentation submergée comprend une large variété de processus microbiens agités et non agités, où la biomasse est complètement encerclée dans le milieu de culture liquide. Les protéases de *Mucor miehei*, *Endothiaparasitica* et la majorité des espèces de *Bacillus* sontproduites par les fermentations liquides (Sandhya*et al*., 2005). Celles-ci sont réalisées avec différents substrats, habituellement dissout ou en suspension dans un milieu aqueux. Beaucoup de types de SmFs ont été décrits, tel que, la culture en batch, fed batch et continue. Les fermentations continues donnent de meilleurs rendements que cellesdes cultures en batch (Sumantha *et al*.,2006).

3.2. Fermentation solide

La fermentation solide (fermentation de substrats solides, fermentation humide, culture solide, etc. et en anglais : solid-state fermentation ou SSF) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux et des champignons supérieurs, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique (Holker *et al*.,2005).

la fermentation en milieu solide est définie comme une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou presque d'eau libre. La FMS est donc constituée de trois phases : une matrice (phase solide), une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. Le développement des champignons filamenteux en FMS se fait par extension et ramification des filaments formant le mycélium (Prevot, 2013).

3.2.1. Avantages et inconvénients

La production actuelle des enzymes industriels s'oriente de plus en plus vers la fermentation solide à partir des résidus agricoles ou agroalimentaires par rapport à la fermentation liquide grâce à les avantages qui lui donne, Parmi ces avantages on a :

- la simplicité de cette technologie (applicable en milieu rural), le cout des équipements et des opérations est donc faible ;

- le peu d'eau disponible favorise la production de certains métabolites qui n'apparaissent pas ou peu en culture liquide.
- la réduction des coûts et du temps consommé pendant l'extraction et la récupération du produit (Assamoi*et al*., 2009) .
- 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). (Bensmail,2012).

Cependant, cette renommée est largement surfaite, surtout lors du développement d'applications pilotes ou industrielles. Dans ces conditions et bien d'autres, la fermentation solide présente des nombreux inconvénients :

- les microorganismes utilisés sont limités. En effet, seuls qui se développent bien aux basses humidités peuvent être employés, cela s'applique aux champignons filamenteux et aux certaines bactéries xérophiles .
- les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur milieux solides sont faibles.
- les problèmes de transfert d'oxygène et de chaleur rendent difficile l'augmentation d'échelle des procédés.
- la nature solide et hétérogène des substrats utilisés complique le suivi direct des paramètres de fermentation (Assamoi *et al*., 2009) .

3.2.2. Substrats utilisés

Le choix du substrat dépend de plusieurs paramètres économiques (coût, disponibilité) et biologiques. De ce fait, les résidus agro-alimentaires semblent d'êtres les plus intéressants, en raison de leurs avantages potentiels surtout pour les champignons filamenteux, qui sont capables de pénétrer à l'intérieur de leurs structure solide. Par contre, les bactéries et les levures sont caractérisées par un développement superficiel (Singh et Pandey, 2009).

3.2.3. Microorganismes utilisés

Des précautions doivent être prises en considération lors de la sélection des microorganismes 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).

3.3. Applications industrielles de la fermentation sur milieu solide

La fermentation en milieu solide est traditionnellement utilisée pour la fabrication de nombreux produits alimentaires dans les pays orientaux et africains. La culture solide est appliquée à large échelle dans les processus industriels, principalement en Japon pour la production d'aliments traditionnels, d'enzymes, d'acides citrique et d'acides itaconique , de même que Lyven-France qui utilise exclusivement la fermentation solide pour la production des enzymes industrielles La culture solide est également utilisée pour la production des champignons comestibles (*Agaricusbisporus*) (Belmessik, 2011).

4.1. Matériel biologique

L'espèce fongique utilisée dans ce travail est *Aspergillus niger* isolée localement d'une source thermale (Hammam El Hadjeb).

La souche est conservée dans des tubes PDA (potato dextrose agar) inclinés à 4°C. Un repiquage s'effectue tous les deux mois sur le même milieu afin d'assurer la préservation de la vitalité de la souche.

4.1.1. Revivification de la souche« *Aspergillus niger* »

Des quelques spores ou un fragment mycélien ont été prélevés à partir des tubes PDA inclinés, que les on transfère sur le même milieu coulé dans des boite de Pétri sous les conditions d'asepsie. La culture fongique est incubée à 28±2°C pendant 5-7 jours.

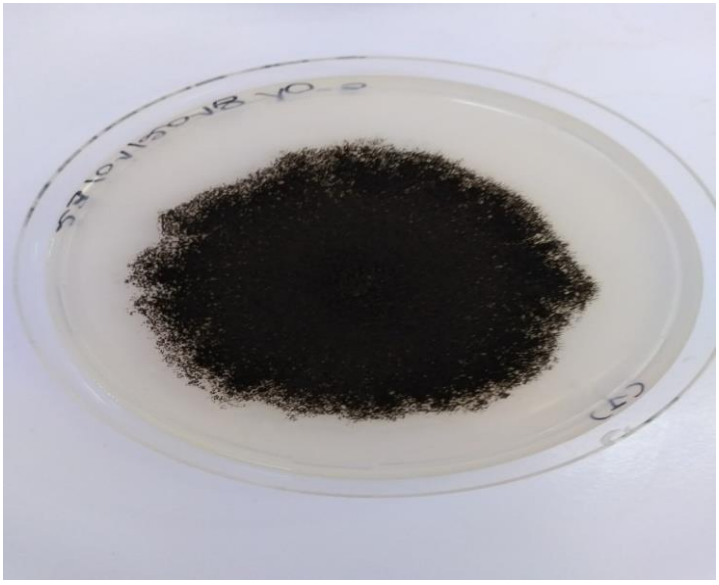

Figure 3. La culture d*'Aspergillus niger* sur milieu PDA.

4.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique de la souche d'*A.niger*

L'activité protéolytique c'est la capacité de la souche fongique de croitre sur milieu de culture à base de protéine comme la seule source d'azote et générer des zones de protéolyse claires (Nygren *et al*., 2007).

L'activité protéolytique de la souche d*'A.niger* a été recherchée qualitativement sur milieu lait gélosé stérile à 30 % (voir annexe 2). L'apparence des zones d'hydrolyses après l'ensemencement des quelques spores au centre de la boite de Pétri avec une incubation à 28±2°C pendant 5 jours permettant la mise en évidence de l'activité protéolytique de la souche isolée.

Au cinquième jour, on mesure le diamètre de colonie et diamètre de l'anneau de protéolyse (c'est une zone claire formée autour de la colonie fongique).

Le milieu lait gélosé présente plusieurs avantages tels que :

- ✓ la simplicité de la préparation
- ✓ la variété et la richesse en protéines
- ✓ le faible coût (Dendouga, 2006).

4.3. Préparation de l'inoculum

La suspension de spore est préparée par addition de 10ml d'eau physiologie stérile contenant 0.1 % de tween 80 (10 ml/boite de Pétri) à la souche cultivée sept jours sur milieu PDA en boite de pétri. Les spores sont déboitées superficiellement en utilisant une anse de platine sous les conditions aseptiques. Puis filtrés par papier filtre stérile.

4.4. Dénombrement des spores

À la fin de la filtration, l'estimation du nombre de spores de la suspension fongique est effectuée à l'aide de la cellule de Malassez sous microscope photonique au grossissement (x400). Un volume de la suspension de spore contenant 10^6spore/ml est utilisé comme inoculum.

4.5. Fermentation sur milieu solide SSF

L'activité protéolytique d'*A.niger* a été testée quantitativement, où le son de blé est utilisé comme substrat pour favoriser la production de protéases extracellulaires.

Dans des erlenmeyers de 250 ml, on introduit 5g du son de blé moulu (pour réduire la taille des particules de 0.425à 0.85mm) avec 4ml du milieu minéral, ayant la composition suivante (% p/v): NH_4NO_3 0,5; KH_2PO_4 0,2; $MgSO_4.7H_2O$ 0,1; NaCl 0,1 dont le pH=4, le mélange est ensuite stérilisé et après refroidissement, on inocule le milieu avec un volume de la suspension de spores d*'A. niger*, ce qui correspond à un inoculum de 10^6 spores/ml puis incubé pendant 3jours.

4.6. Extraction de la protéase d'*A. niger*

Après la fermentation, la protéase extracellulaire d'*A. niger* est extraite par l'ajoutde 50ml de l'eau distillée stérile, et après l'agitation à 160 rpm pendant 2 heures à 30°C, le mélange est centrifugé à 4000 rpm pendant 30 min à 4°C, dont le surnageant récupéré représente l'extrait enzymatique brut utilisé pour les études analytiques (Tunga*et al*., 2003 ; Sandhy *et al.*, 2005).

4.7. Méthode de dosage

4.7.1. Dosage des protéines (Bradford, 1976)

4.7.1.1. Principe

La concentration des protéines totales de l'extrait enzymatique a été déterminée selon la méthode de Bradford, (1976); c'est une technique colorimétrique rapide qui repose sur l'interaction en milieu acido-alcoolique entre les protéines et le BBC G-250. Ce colorant s'adsorbe sur les protéines ce qui provoque un déplacement de son pic d'absorption maximale qui passe du rouge (464nm, forme cationique) au bleu (595nm, forme anionique). Cette adsorption se fait principalement de façon spécifique par des liaisons ioniques avec des acides aminés basiques (Arg, Lys, His) de la molécule protéique.

4.7.2.2 Elaboration de la courbe d'étalonnage

Une gamme étalon est réalisée avec des quantités croissantes de sérum albumine bovine (BSA): 0, 20, 40, 60, 80 et 100 µg. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 1000 µl. l'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc, Les concentrations en protéine des extraits enzymatiques seront déterminées graphiquement directement à partir de cette courbe d'étalonnage.

Tableau 1. Préparation de la gamme d'étalonnage de BSA (0,1mg/ml).

N° du tube / Solutionet réactif	Blanc	1	2	3	4	5	Echantillon
Solution BSA (µl)	0	200	400	600	800	1000	500 d'extrait brut
Eau physiologie (µl)	1000	800	600	400	200	0	500
Réactif de Bradford (ml)	5						

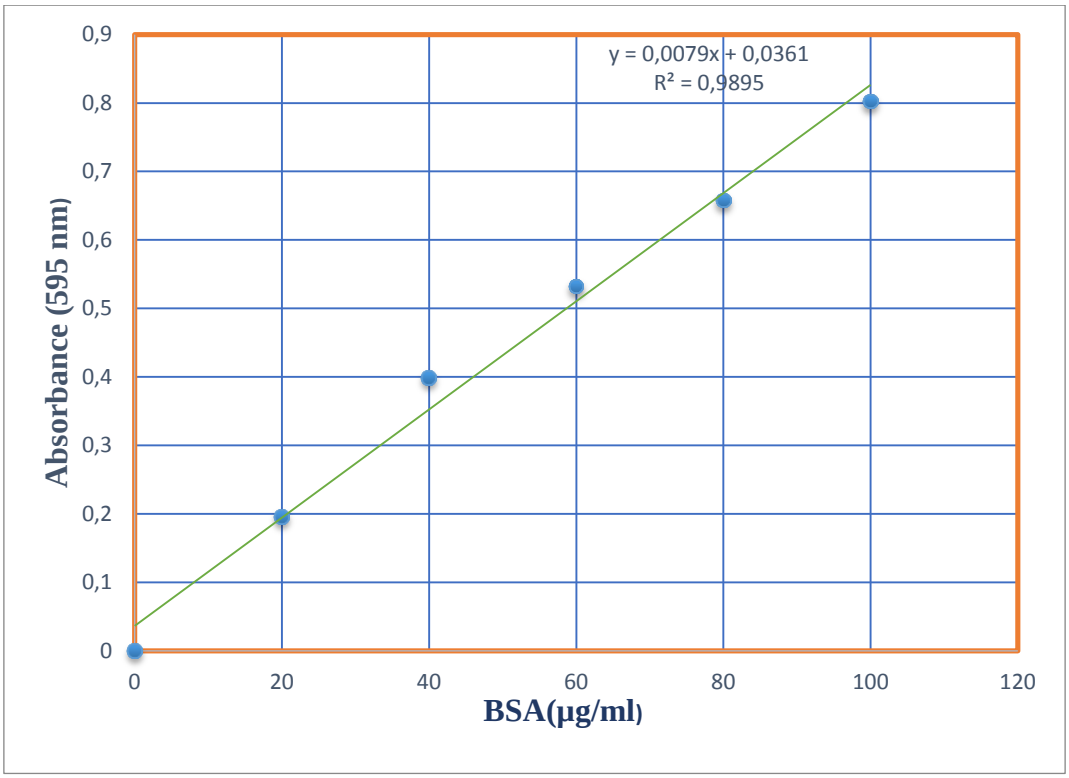

Figure 4. Courbe d'étalonnage de la solution de BSA (mg/ml)

4.7.3. Mesure de l'activité protéolytique

4.7.3.1. Principe

L'activité protéolytique est déterminée à partir de l'effet de l'enzyme sur la caséine suivant la méthode d'Anson, (1938) que se base sur l'estimation de la quantité des peptides simples et des acides aminés libres formés par l'hydrolyse d'une protéine substrat sous l'action d'une protéase ou un mélange des protéases.

La tyrosine est utilisée comme standard de dosage colorimétrique de l'activité protéolytique parce que c'est un acide aminé présent dans toutes les protéines, ce dosage est effectué à l'aide du réactif folin-ciocalteau qui réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner un complexe bleu (Belmessikh, 2011).

La réaction enzymatique est stoppée par l'addition du TCA, qui fait précipiter les protéines non attaquées par la protéase.

4.7.3.2. Mode opératoire

a. Courbe d'étalonnage de la tyrosine

Tableau 2. Préparation de la gamme d'étalonnage de tyrosine.

N° du tube / Réactif et solution	Blanc	1	2	3	4	5
Concentration de tyrosine (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
Na_2CO_3 à 2% dans du NaOH 0,1N (ml)	2,5					
agiter manuellement puis laisser stabiliser le mélange pendant 10 min						
Réactif de folin dilué1/10 (ml)	0,5					
mélanger de nouveau rapidement et énergiquement après chaque addition du réactif de folin et laisser reposer à l'ombre pendant 30 min au minimum						

Figure 5. La courbe d'étalonnage de la solution de tyrosine (µg/ml).

b. Dosage de l'activité protéolytique

La manipulation est réalisée en deux étapes :

- réaction enzymatique : il s'agit de faire agir l'extrait enzymatique sur le substrat (la caséine à 2,5% dissoudre dans le tampon citrate de sodium).

Tableau 3. Préparation de mélange réactionnel.

N° du tube / Réactifs et solution	Blanc	1	2	3
Extrait enzymatique (ml)	-	0,5	0,5	0,5
Solution de caséine (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5
Volume de tampon (ml)	1	0,5	0,5	0,5
Bien mélanger et placer au bain Marie 40°C pendant une heure				
TCA à 4% (ml)	5			
filtrer les solutions sur papier filtre				
le filtrat constitue la solution contentant le produit de la réaction (la tyrosine)				

- Dosage de l'activité : la quantité de produit formé (la tyrosine) est dosée selon la méthode d'Anson, (1938). L'absorbance de l'échantillon mesurée est transformée en concentration par référence à la courbe d'étalonnage précédemment obtenue.

Tableau 4. Dosage de l'activité protéolytique.

N° du tube / Réactifs et solution	Filtrat de Blanc	Filtrat1	Filtrat2	Filtrat3
Volume prélevé (ml)	1	1	1	1
Eau distillée (ml)	1	1	1	1
Na_2CO_3 à 2% dans du NaOH 0,1N (ml)	2,5			
Agiter correctement puis laisser stabiliser le mélange pendant 10 min				
Réactif de Folin dilué1/10ème (ml)	0,5			
Mélanger de nouveau rapidement et énergiquement après chaque addition du réactif de folin et laisser reposer à l'ombre pendant 30 min au minimum avant effectuer la lecture				

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

4.7.4. Mesure de l'activité coagulante

La coagulation du lait est provoquée par la dénaturation de la caséine, protéine majoritaire du lait où les protéases entraîne le décollète des liaisons Phe105-Met106 de celle ci, ce qui rend les micelles de caséine instables et provoque éventuellement leur agrégation conduisant à la formation de coagulum (Kumar*et al*., 2006; Bruno *et al*., 2010).

L'activité coagulante (AC) de l'extrait enzymatique est déterminée selon la méthode d'Arima *et al*.,(1970). Elle est basée sur l'évaluation visuelle de l'apparition des premiers flocons de la coagulation du lait écrémé. 5ml (V_1) du lait écrémé à 10% préparé dans la solution du $CaCl_2$ à 0.01M (pH 6,4) est utilisé comme substrat. 0,5ml (V_2) d'extrait enzymatique brut est additionné au substrat pré-incubé à 35°C pendant 15 min. La rotation du tube immergé permet la formation d'un film homogène sur la paroi interne du tube à essai et le temps de coagulation (t en seconde) est atteint des qu'apparaissent les premières particules de caillé.

L'activité coagulante exprimée en Unité Présure (UP) est calculée selon l'expression suivante :

$$AC\ (UP) = 10xV_1/t\ xV_2$$

Dont :

V_1 : volume du lait écrémé utilisé

V_2 : volume de l'extrait coagulant utilisé

t : temps de coagulation (en sec).

L'activité coagulante est également exprimée en force de coagulation, selon la relation suivante :

$$F\ (US) = 2400xV_1/t\ xV_2$$

Dont :

2400 : 40 min x 60 sec

V_1 : volume du lait écrémé à coaguler

V_2 : volume de l'extrait coagulant employé

t: temps de coagulation (en sec).

4.8. Optimisation de la production de protéases extracellulaires

Les conditions de croissance et de production des enzymes extracellulaires sont fortement influencées par différents paramètres tels que la composition du milieu de fermentation (la source de carbone, d'azote et les sels minéraux), les facteurs physicochimiques (température, pH, densité d'inoculum) et par le temps d'incubation (Celik et Calik, 2004).

4.8.1. Température d'incubation

L'effet de la température de la culture de fermentation sur la production de la protéase d'*A.niger* a été étudié sur des cultures à base de son de blé incubées à des températures allant de 25 à 55°C avec un intervalle de 5°C pendant 3 jours.Selon la littérature, en utilisant le milieu minéral qui assure la meilleure production (Anandan*et al.*, 2007).

4.8.2. pH initial du milieu minéral

À la fin de sélection de la température d'incubation, on étudie l'influence du pH de ce milieu sur la production de la protéase d'*A.niger*.

Des fermentations sont conduites à la température optimale 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).

4.8.3. Concentration d'inoculum

L'effet de la concentration d'inoculum sur la productivité de la protéase d'*A. niger*a été élucidé par ensemencement des cultures avec un volume de la suspension de spores/5g de son de blé, dont la concentration en inoculum varie de 1 à $5x10^6$ spores/ml (l'intervalle est de ($1x10^6$ spores/ml). Les cultures sont incubées pendant 3 jours aux conditions optimales de la production.

4.8.4. Temps d'incubation

L'influence de la durée d'incubation sur la production de protéase d'*A. niger* a été déterminée par incubation des cultures dans les conditions optimales préalablement établies à différents temps allant de 2 à 7 jours avec un écart de 24h.

4.9. Etude des propriétés de l'enzyme

L'extrait brut produit a été étudié afin déterminer les propriétés suivantes : température optimale et pH optimal.

4.9.1. Détermination de pH optimal

Le pH optimal est mesuré par dosage de l'activité protéolytique à des pH variant de 4 à 9 (avec intervalle de 0.5), sachant que les tampons utilisés sont :

Acide citrique – phosphate disodique (0.1M/0.2M) de pH 4 à 5.5.

Phosphate monosodique – phosphate disodique (0.2M/0.2M) de pH 6 à 9.

L'optimum est déterminé en traçant la courbe de l'activité protéolytique en fonction des pH.

4.9.2. Détermination de la température optimale

L'influence da la température sur l'activité de la protéase est étudiée en portant le mélange réactionnel à différentes températures de 25 à 80°C (avec un intervalle de 5°C) à pH 6,5.

L'optimum est déterminé en traçant la courbe de l'activité protéolytique en fonction de la température.

4.10. Purification partielle de l'enzyme

La purification partielle de l'enzyme passe par une précipitation fractionnée des protéines par sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2\ SO_4$) puis une dialyse à membrane semi-perméable.

4.10.1. Précipitation par sulfate d'ammonium

Cette méthode a été utilisée comme première étape pour la purification des protéases (Fazouane *et al.,* 2010) qui permet de précipiter les protéines présentes dans une solution aqueuse dans un certain intervalle de concentration en sel selon la nature de la protéine à extraire. Elle est l'une des méthodes les plus rapides qui permet de récupérer les protéines sous forme concentrées tout en gardant leurs activités biologiques (Walsh et Headon, 1997).

Mode opératoire

La précipitation au sulfate d'ammonium de l'extrait enzymatique brut a été effectuée à 70% de saturation. Une quantité de 22,1g de sulfate d'ammonium (voir Annexe 3) est ajouté à 50 ml d'extrait brut sous agitation pour atteindre le 70% de saturation à 4°C.

Elle est suivie par une centrifugation à(4000rpm, 30 min.), la présence de l'enzyme est recherchée dans le surnageant et le culot. Ce dernier est mis en suspension dans un volume réduit du tampon citrate de sodium (0,1M ; pH 5,2) (voir annexe 2).

4.10.2. Dialyse

Principe

La dialyse est une méthode de séparation basée sur le mouvement des molécules à travers une membrane semi-perméable du milieu plus concentré au moins concentré. Seules les molécules possédantes une taille inférieure au diamètre des pores de la membrane sont capables de diffuser de part et d'autre et d'atteindre l'équilibre avec le volume total de la solution dans le système, telles que celles du solvant, des sels et des petits métabolites. Par contre, les macromolécules comme les protéines ne sont pas diffusables où elles seront retenues dans le même compartiment de la membrane comme au début de l'expérience (Sheehan, 2009; Janson, 2011).

Mode opératoire

Les protéines précipitée mises en suspension dans un volume réduit du tampon citrate de sodium (0,1 M; pH 5,2) sont dialysées contre le même tampon, en utilisant une membrane semi-perméable sous une faible agitation à 4°C pendant 48h. Par la suite, la fraction protéique

diluée est concentrée en recouvrant le boudin avec une solution de saccharose à 50% pendant 2h.

4.11. Evaluation des propriétés technologiques des protéases extraites

4.11.1. Test de lavage

Les protéases présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergents pour leur capacité à favoriser l'élimination des taches protéiques .

Le morceau de tissu propre a été coupé à des tailles égales (5×5cm) puis tachées par le sang et séché, L'action détergente des protéases est testée selon la série suivante:

- Eau distillée (100 ml).
- Eau distillée (100 ml) + 1ml de détergent Ariel (7mg /ml).
- Eau distillée (100 ml) + 1ml de détergent Ariel (7mg /ml) + 2ml d'extrait enzymatique à partiellement purifie.

L'incubation des morceaux a été effectuée à la température ambiante pendant 20 min. Après l'incubation, chaque pièce a été rincée à l'eau pendant 2 min puis séchée.

L'élimination des taches est évaluée par simple examen visuel des différentes pièces.

4.11.2. Digestion des protéines naturelles

4.11.2.1. Activité digestive

Le substrat utilisé dans ce teste est blanc d'œuf, 2 ml d'extrait enzymatique mélangé avec 1 ml de tampon citrate de sodium à pH 5.2 et 2 ml de substrat, puis incubé à la température ambiante pendant 12 h.

Le résultat de l'hydrolyse est évalué par simple examen visuel.

4.11.2.2. Activité anticoagulante

Des troubles vasculaires sanguins cardiaques et cérébraux sont les principales causes de décès dans le monde. Un caillotde sang dans le pipeline vasculaire est le résultat d'une fonction anomalie des protéines plasmatiques. Pour lutter contre ces maladies vasculaires, un agent de dissolution de caillot doit perfuser. Les agents disponibles à la dissolution de caillot sont appelés thrombolytique essentiellement les protéases (Srilakshmi *et al*., 2014).

Dans ce travail on a testé l'activité de protéase sur le sang coagulé comme un substrat. 1 ml de tampon citrate de sodium à pH 5,2 plus 2 ml de l'extrait enzymatique ont été additionné à 3 ml de sang coagulé puis incubé à la température ambiante pendant 14 h. (Najafi, 2005).

Le résultat de l'hydrolyse est évalué par simple examen visuel.

Ce chapitre expose l'ensemble des résultats obtenus sur l'activité protéolytique, l'optimisation de la production de protéases, la caractérisation physicochimique de l'extrait brut, la purification partielle des protéases et l'évaluation des propriétés technologiques d'extrait d'*A.niger*.

5.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Les protéases microbiennes sont l'un des groupes d'enzymes industriels les plus importants en raison de leurs applications dans plusieurs secteurs industriels qu'elles présentent les avantages techniques et économiques les plus recherchées dans les applications biotechnologiques (singh *et al*., 2016). Pour cet objectif, la souche d'*Aspergillus niger* a subi à un test d'activité protéolytique sur un milieu gélosé à base de lait écrémé. Les résultats obtenus après l'ensemencement de lait gélosé donne une zone d'hydrolyse permettant la mise en évidence de la capacité de production des protéases par la souche isolée (tableau 5).

Tableau 5. Mise en évidence de l'activité protéolytique d'*A.niger* sur milieu de lait gélosé à 30%**.**

Jours d'incubation / Diamètre	2ème J	3ème J	4ème J	5ème J
Diamètre de colonie (mm)	08	22	30	46
Diamètre de zone hydrolyse (mm)	6	8	10	11

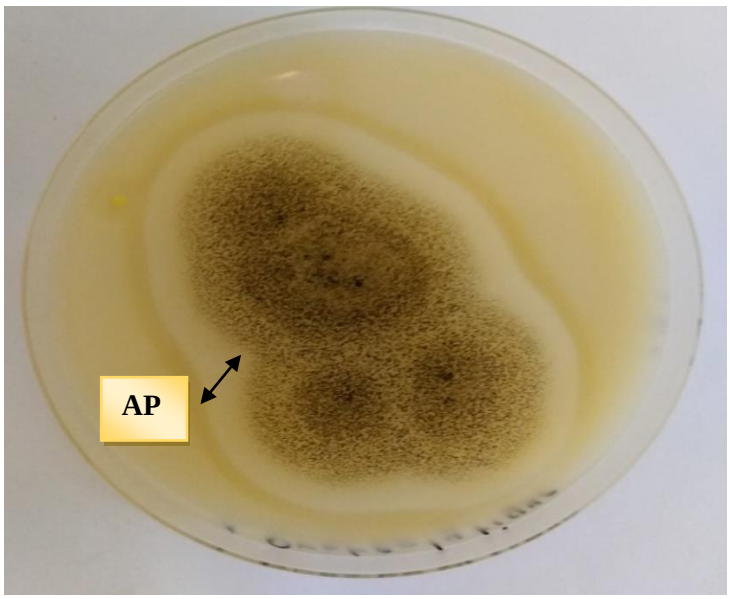

Figure 6. Mise en évidence de l'activité protéolytique d'*A niger* sur milieu lait gélosé à 30% (AP: anneau de protéolyse des cultures de 5 jours).

5.2. Mesure de l'activité protéolytique

Afin d'évaluer l'aptitude de la souche d'*Aspergillus niger* à produire des protéasessur le lait gélosé, l'activité protéolytique a été dosée selon la méthode d'Anson, (1938).L'absorbance de l'échantillon mesurée est transformée en concentration par référence à la courbe d'étalonnage précédemment obtenue.

Les résultats obtenus après une fermentation sur milieu solide à base de son de blé humidifié par une solution minérale montrent que l'*Aspergillus niger* possède une activité protéolytique de l'ordre de2628.2 (µg/h/ml) avec un teneur en protéines 90,85µg/ml.

Ce résultat explique le choix de l'espèce *Aspergillus niger* pour la production à grande échelle des enzymes industrielles et principalement les protéases en raison de ses diverses applications dans les détergents, les industries alimentaires et pharmaceutiques…etc (Benazir *et al*., 2011).

Cette activité protéolytique peut être augmentée en optimisant l'extraction de la protéase par plusieurs paramètres comme: concentration de l'inoculum (nombres des spores), la composition du milieu de fermentation, les facteurs physicochimiques (pH, température…) et par le temps d'incubation de la fermentation…etc.

5.3. Mesure de l'activité coagulante

D'après la mesure de la capacité des protéases à coaguler le lait selon la méthode expliquée dans le chapitre précédant, l'extrait brut de l'*Aspergillus niger* ayant une activité coagulante de 617,14 US/ml, la même activité testée peut être exprimé en Unité Présure (UP) de l'ordre de 2,57 UP. Ces valeurs sont supérieurs à celui obtenue par Bensmail (2012) lors l'étude d'une protéase produite parla même espèce. Ces résultats indiquent la possibilité d'intégrer ce type des protéases étudiées dans le processus de la coagulation du lait et la fabrication fromagère.

5.4. Optimisation de la production de protéases extracellulaires

L'estimation de la production des protéases par l'*Aspergillus niger* dans des conditions culturelles optimisées a été effectue par le dosage de l'activité protéolytique lorsque la quantité de tyrosine libéré est correspondante à la quantité des protéases produites.

5.4 .1. Température optimale

Les erlenmayers de fermentation ont été incubés à des différentes températures 25, 30, 35, 40, 45, 50 et 55°C pour étudier l'effet de la température d'incubation sur la production de protéase d'*A.niger*.

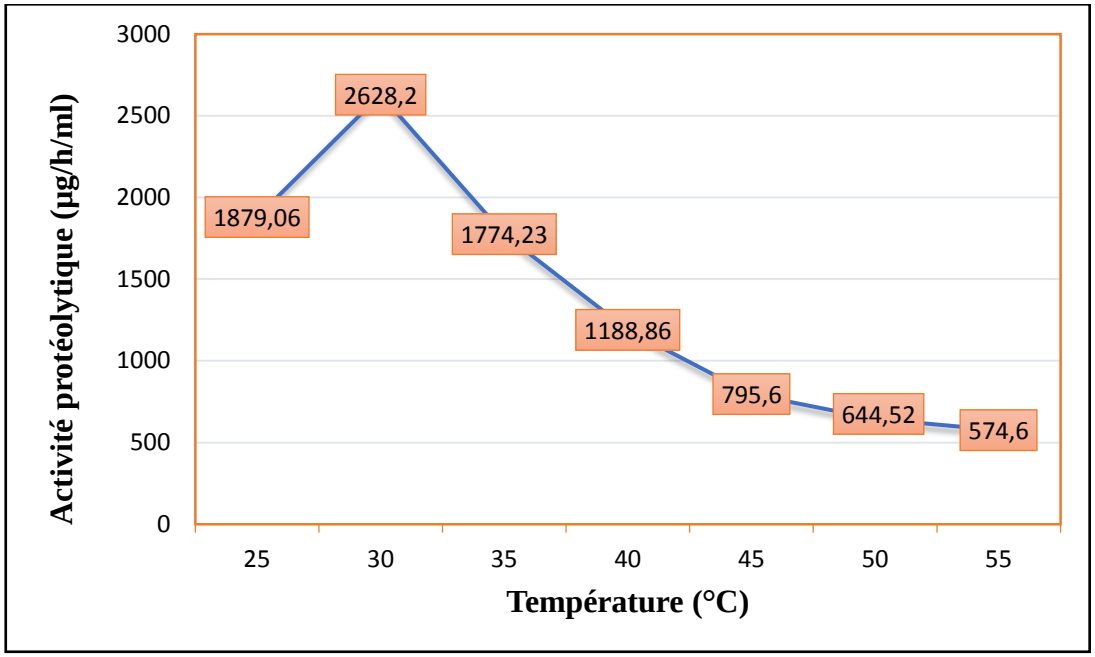

Figure 7. Influence de la température d'incubation sur la production de la protéase d'*A.niger*.

D'après la figure 7, l'isolat a montré une augmentation de la production de protéase jusqu'à une température de 30°C avec une activité productrice de protéase maximale

enregistrée ce qui reflète la nature thermotolérente de l'espèce utilisée. L'incubation à haut température pourrait conduire à une croissance médiocre et une réduction du rendement en enzymes.

Des études similaires sont signalées par Mukhtar et UI-Haq (2009) et Bensmail *et al*.(2015) pour la production de protéase à partir de l'*Aspergillus niger*, de même pour des autres espèces comme l'*A.Oryzea* et *A.terrus* par Vishwanatha *et al*. (2010) et Sethi *et al*. (2016) respectivement où la température optimale est 30°C, une température supérieur (40°C) à celle-ci est trouvée par Mais (2018) pour l'*A.niger*.

Par apport à la majorité des études précédentes, des auteurs trouvent que l'activité de la production des protéases d'*A niger* par la fermentation sur milieu solide est cessée totalement au delà de la température 40°C. Mais en cours de notre travail, elle a diminué sans interruption même avec des températures élevées (50 et 55°C) car notre souche d'*Aspergillus niger* a été extraite à partir d'une source thermale (Hammam El-Hadjeb).

Ces résultats ont révélé un lien entre la synthèse enzymatique et le métabolisme énergétique chez les microorganismes qui était contrôlé par la température (Asha et Palaniswamy, 2018). La production de la protéase d'*A. niger* à plus basse température est plus avantageuse, car l'élévation de la température dans la masse fermentable provoque un assèchement de la culture, une baisse de l'activité de l'eau (aw) et de la disponibilité des éléments nutritifs ce qui limite l'aération et induit une croissance limitée voir impossible (Bensmail, 2012).

5.4.2. pH optimal

La figure 8 montre que le pH influencé positivement sur la productivité de la protéase par l'*Aspergillus niger*. Le pH étudié était compris entre 3 et 7 pendant 3 jours dont la production d'enzyme s'est attient au maximale en pH ajusté à 4, Une baisse dans la productivité en enzyme est observée si le niveau du pH est supérieur ou inférieur par rapport à cette valeur cependant la protéase était produite à tous les pH.

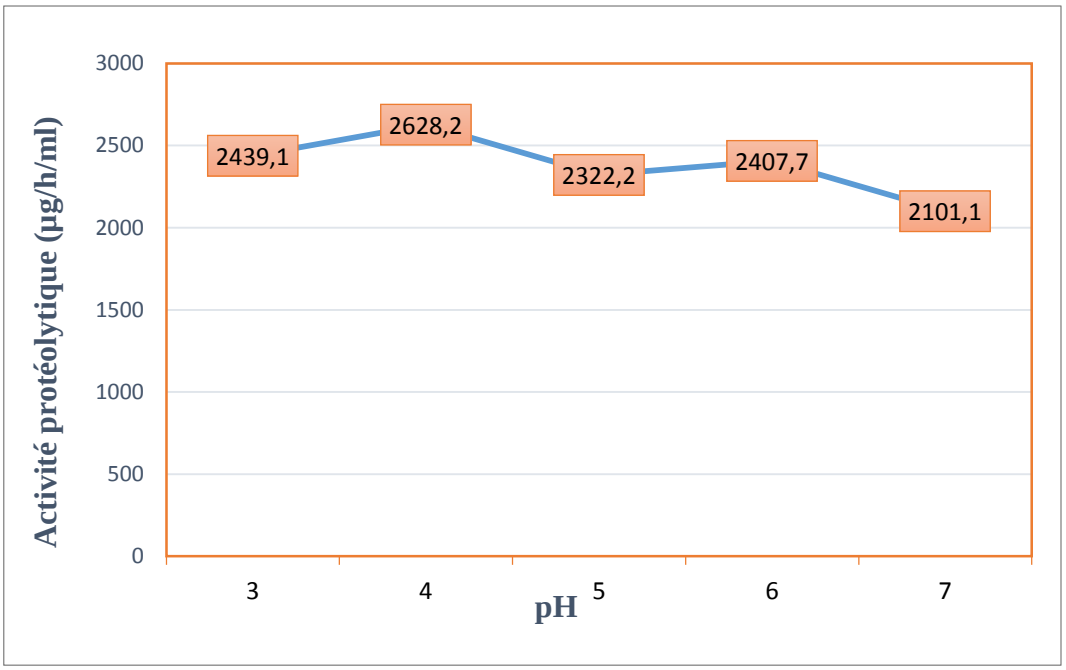

Figure 8. Effet du pH sur la production de protéase d'*A.niger*.

Des résultats proches sont également trouvés pour une production de protéase maximale à pH 4 et 4,5 par Bensmail *et al*. (2013) et Mukhtar et UI-Haq (2009) respectivement lors l'étude sur l *'A.niger* par contre une activité productrice maximale a été remarqué à pH neutre 7 (Paranthaman *et a*l.,2009) et autre alcalin (Chandrasekaran *et al*., 2015) pour la même espèce.

Le pH a un effet marqué sur la quantité et le type d'enzyme produite par les microorganismes (Mukhtar et UI-Haq, 2009) même que les activités métaboliques des microorganismes sont très sensibles à la variation de pH, car il influe fortement sur des nombreux processus enzymatiques ainsi que le transport de différents éléments nutritifs à travers la membrane cellulaire assurant la croissance et la production des métabolites (Paranthaman *et al*., 2009).

5.4.3. Concentration d'inoculum optimale

L'influence de la concentration des spores sur la production de protéases par la souche sélectionnée est étudié avec une concentration d'inoculum variait de 10^6 à $5x10^6$ spores /ml. Le résultat montre que une quantité significative d'enzyme a été produite lorsque 10^6 des spores /ml ont été ajoutés à la culture de fermentation solide sur le son de blé (figure 9).

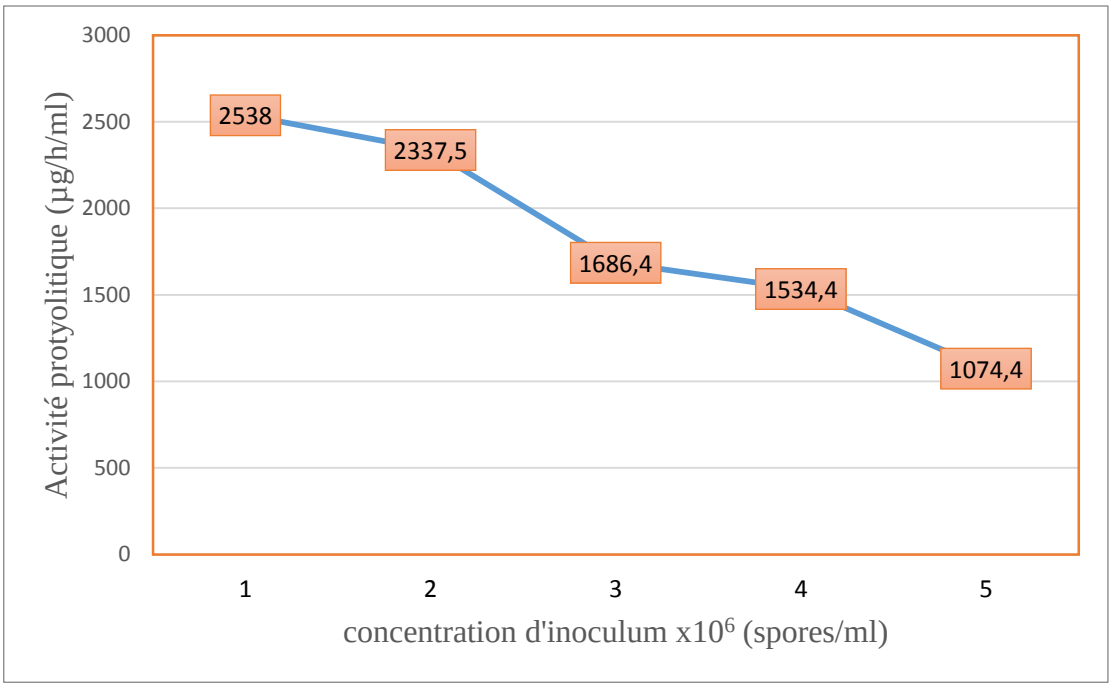

Figure 9. Influence de la concentration d'inoculum sur la production de protéase d'*A.niger*.

Bensmail *et al*.,(2015) et Mais (2018) mentionnent que la même concentration est nécessaire pour une production maximale de protéase par l'*Aspergillus niger* pendant que la production de protéase par l'*A.oryzea* est optimale lorsque une concentration de $8x10^6$ spores/ml d'inoculum a été additionnée (Sandhya *et al*., 2005).

La concentration d'inoculum a une grande influence sur la production de protéase. Une concentration d'inoculum appropriée est essentielle pour la croissance et l'augmentation du nombre des cellules (spores) qui garantit toute fois une prolifération de la biomasse et la synthèse enzymatique. Après certaine limite, la production d'enzyme pourrait diminuer en raisonde l'épuisement rapide des nutriments nécessaires à la croissance rapide de la culture et à l'activité métabolique (Sabu *et al*., 2006).

5.4.4. Temps d'incubation optimal

Pour déterminer le temps d'incubation optimal pour la production de protéase par l'*A.niger*, les cultures fongiques ont été incubées dans les conditions optimales préalablement établies à différents temps allant de 2 à 7 jours.

L'analyse de l'activité de protéase à différents intervalles de temps, (figures 10) montre que la productivité maximale de protéase atteint après 72 heurs d'incubation. Après cette période, l'activité enzymatique est légèrement diminuée jusqu'avait une baisse activité à

7ème jours. Le même résultat a été obtenu avec *A. niger* (Mukhtar et UI-Haq, 2009), (Bensmail *et al.*, 2015) et l'*A.oryzea* (Sandhya *et al.*, 2005) par contre, un temps d'incubation plus court de 42h a été trouvé par Oludumila *et al.*, (2015) en étude sur l'*A.niger* .

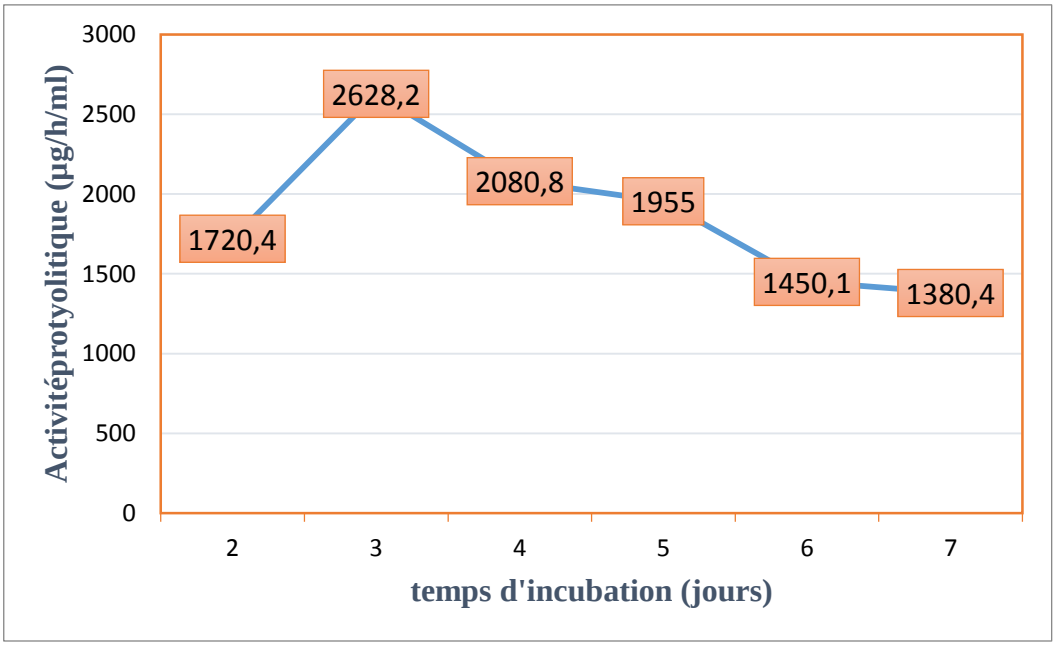

Figure 10. Influence de temps d'incubation sur la production de protéase d'*A.niger*.

La période d'incubation est directement proportionnelle à la production d'enzyme et des autres métabolites dans des certaines mesures. Après cela la production d'enzyme et la croissance des microorganismes commence à décliner ce qui peut être attribuable à la diminution de l'offre de nutriment aux microorganismes et l'accumulation des métabolites toxiques (Mukhtar et UI-Haq, 2009).

5.5. Etude de quelques caractéristiques de l'extrait brut d'*Aspergillus niger*

5.5.1. pH optimal

Avant de procéder au étape de purification, les différentes formes des protéases contenues dans l'extrait brut d'*Aspergillus niger* isolée localement sont caractérisées par la mesure de l'activité enzymatique de l'extrait dans deux système tampons déférentes où cette activité a une large gamme de pH entre 4 et 9. Les résultats sont illustrés dans la figure 11.

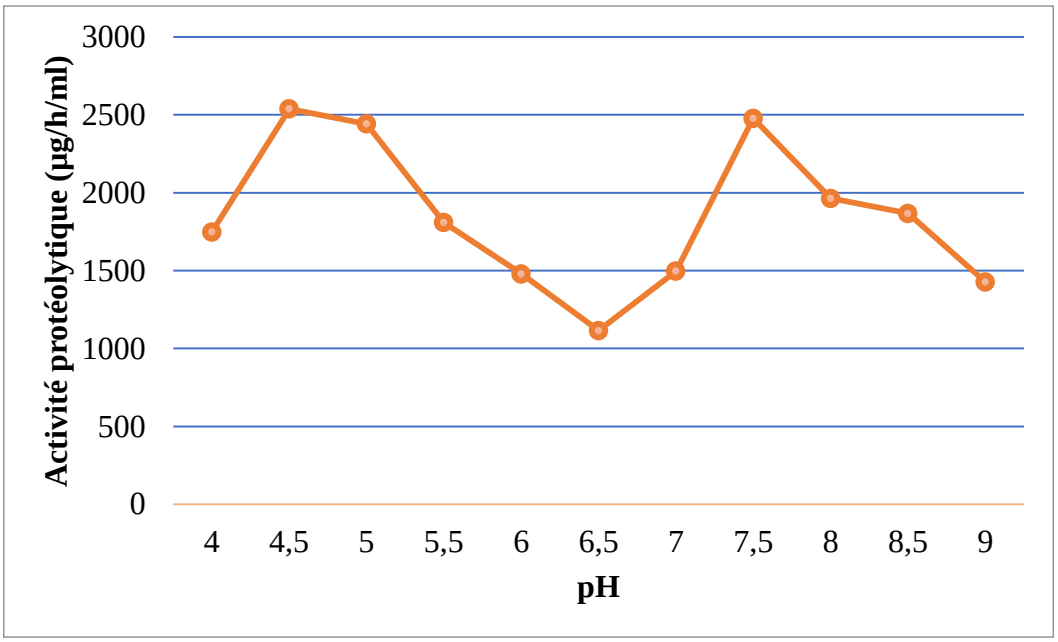

Figure 11. Effet de pH sur l'activité protéolytique de l'extrait brut d'*A.niger*.

La courbe montre deux pics d'activité, le premier à pH 4,5 et le deuxième 7,5 où les deux activités obtenues presque sont égales. Ces résultats peuvent prouver relativement que la souche isolée à partir la source thermale produit donc au moins deux protéases, l'une ayant un pH optimum de 4,5 et l'autre a un pH optimal de 7,5. Le pH 4,5 est proche du pH optimal de la protéase acide produite par plusieurs microorganismes. En effet, les protéases acides de *Penicillium oxalicum* (Benlounissi *et al*.,2014) a pH 4 ; d'autres protéases comme de *Clostridium acetobutylicum ATCC 824* (Croux *et al*.,1990), d'*Aspergillus foetidus* (Souza *et al*., 2017) présentent pH optimal 5; entre 5 et 6 pour les protéases d*'Aspergillus* et *Rizopus* (Mechakra-Masa*et al*., 2011).

Par ailleurs, une deuxième augmentation de l'activité est observée à le pH 7,5. Cela indique la co-production d'une protéase neutre ayant ce pH optimal. Des résultats sont proches àles protéases de *Sterptomyces sp* (Bono et al., 1996),d'*Aspergillus oryzea* (Benkahoule *et al*., 2012 ; Sumantha *et al*., 2005 ; Boukhalfa, 2003) et de *Bacillus subtilis* (Egwim *et al*., 2013).

Chaque enzyme possède un pH optimal qui donne leur maximum d'activité enzymatique, des changements de ce pH peuvent provoquer une dénaturation de l'enzyme entrainant à la perte d'activité catalytique, et peut aussi causer des changements dans l'état ionique du substrat pouvant entraîner la formation de particules chargées qui ne peuvent pas

correspondantes aux sites actifs de l'enzyme, donc le complexe substrat-enzyme ne peut pas former (Mukhtar et UI-Haq, 2009).

5.5.2. Température optimal

Les résultats de l'effet de la température sur l'activité protéolytique d'*Aspergillus niger* sont donnés dans la figure 12.

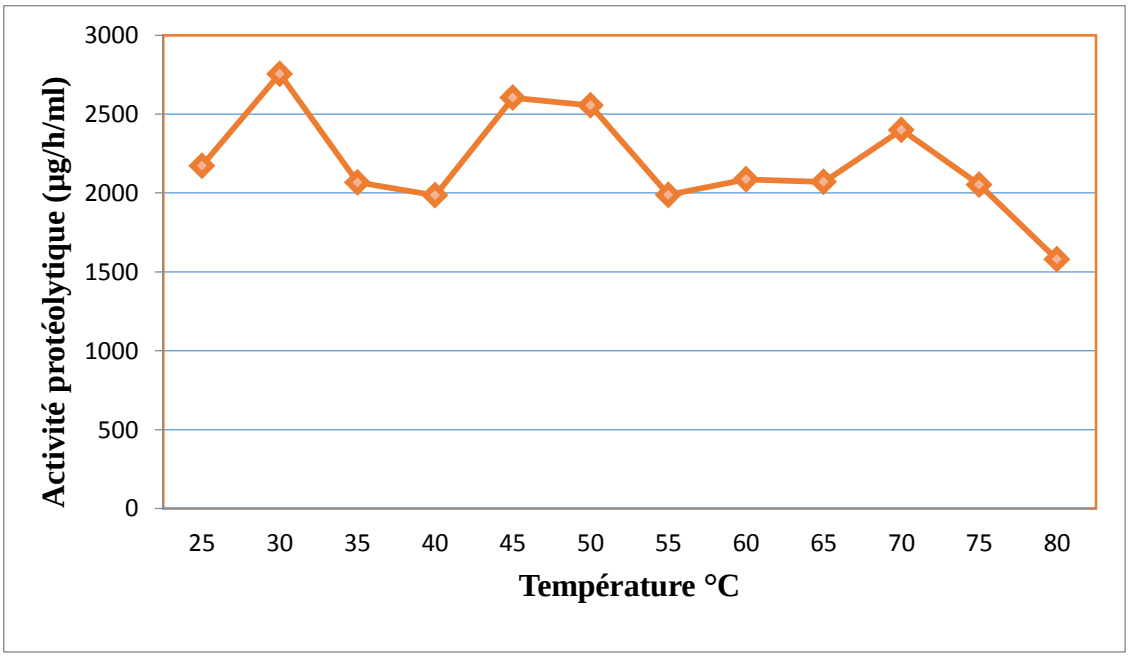

Figure 12. Effet de la température sur l'activité protéolytique de l'extrait brut d'*A.niger*.

La détermination de la température optimale de l'activité protéolytique de l'extrait brut d'*Aspergillus niger* a été effectuée par l'essai à plusieurs températures entre 25 et 80°C avec un incrément 5°C.

Selon ces résultats, l'enzyme est active dans une large gamme de température avec trois pics d'activité protéolytique observées aux températures 30°C ,45°C et 70°C où l'activité protéolytique est (2754.66 (µg/h/ml), 2604.4(µg/h/ml) et 2400.4µg/h/ml) respectivement, Cela indique qu'il existe au moins trois formes différentes des protéases dans notre souche étudiée (figure12).

Ces protéases présentent une activité protéolytique maximale à baisse température (30°C), cette dernière est très proche à celui indiqué par Benlounissi *et al.,* (2014) pour protéase de *Penicillium pinophilum*.

La température optimale 45°C est obtenue par plusieurs auteurs aussi bien pour la protéase acide d'*Aspergillus niger* (Fazouane *et al.*,2010), hors les moisissures cette

température optimal a été trouvé pour la protéase de *Clostridium acetobutylicum ATCC 824* (Croux *et al.*,1990).

Des résultats proches à 45°C sont donnés pour la protéase d'*Aspergillus niger* (De castro *et al.*,2014) et d'*Aspergillus tamarii* (Benlounissi *et al* ., 2014) dont la température maximale est 50°C.

Une activité élevée également enregistrée à haute température (70°C), cette température est supérieur qu'est trouvé à protéase d'*Aspergillus fumigatus* (Hernández-Martínez *et al.*,2011).

5.6. Purification partielle de l'enzyme

5.6.1. Précipitation par sulfate d'ammonium

L'extrait brut issu de l'*A.niger* caractérisé par une activité protéolytique de 2628.2 (µg/h/ml) et une force coagulante de 617,14 US/ml est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium à 70%de saturation, le culot est repris dans le tampon citrate de sodium (0,1M; pH 5,2). L'activité protéolytique du culot et du surnageant est mesurée (tableau 6).

Tableau 6. Activité protéolytique de l'extrait après la précipitation au sulfate d'ammonium.

Pourcentage en sulfate d'ammonium (%)	Activité protéolytique du surnageant (µg/h/ml)	Activité protéolytique du culot (µg/h/ml)
70	459,2	2526,2

D'après les résultats portés dans le tableau 6, nous avons constaté que le taux de saturation de 70% en sulfate d'ammonium a donné une activité protéolytique élevée au niveau de culot par apport au surnageant. A ce raison on peut dire que la majorité des protéases présentes dans l'extrait d'*A.niger* sont précipitées à 70% en sulfate d'ammonium.

La précipitation fractionnée de protéase d'*A.niger* par Mais (2018) et de protéase de *Bacillus cereuse TD5B* par Winarti *et al*., (2018) ont montré une activité maximale à 70% de saturation de sulfate ammonium.

5.7. Evaluation des propriétés technologiques des protéases extraites

5.7.1. Test de lavage

La partie plus importante des plusieurs applications commerciales de protéase est son utilisation dans l'industrie des détergents pour la décoloration des taches. Pour cela, l'extrait partiellement purifiées est appliqué sur des morceaux de coton tachés par le sang pour éliminer les taches. Les résultats sont présentés dans la figure13.

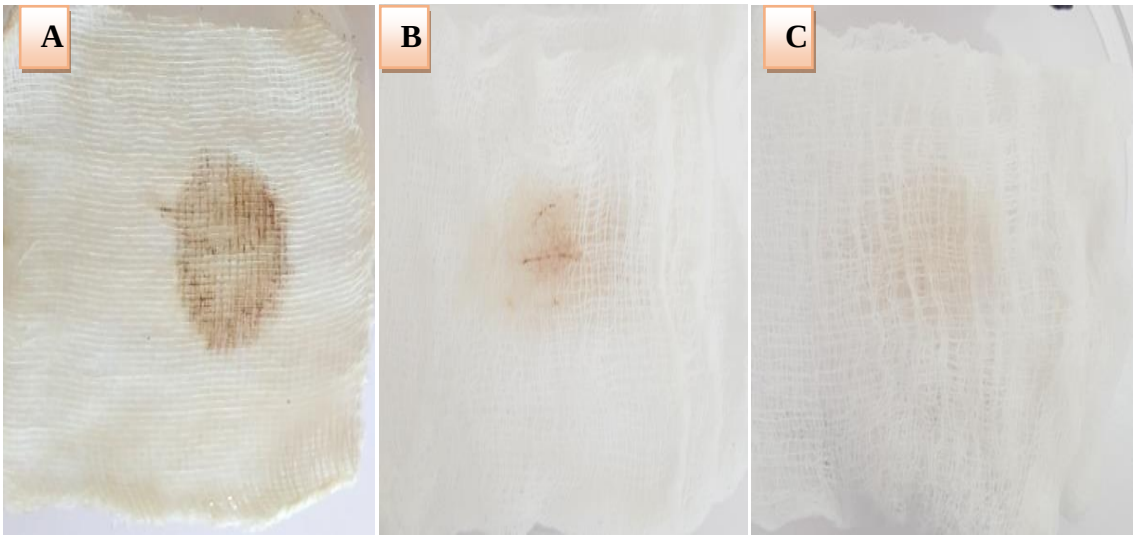

Figure 13. Test de lavage par l'extrait brut d'*A.niger*.

A:eau distillée, **B:** eau distillé + Détergent, **C :**eau distillée + détergent+ extrait enzymatique semi purifié.

Dans le cas où la pièce de coton est imbibée d'eau distillée (A), on observe des traces de sang légèrement diminuées par l'action de l'eau, ainsi qu'une solution de détergent entraine une élimination minime des taches, tandis qu'une solution de détergent avec l'enzyme semi purifié a fortement éliminé la tache de sang appliquée sur le morceau. Cela indique que les protéases obtenue à partir la souche isolée d'*A.niger* ont une grande utilité et peuvent être considérées comme un bon additif dans l'industrie des détergents.

5.7.2. Digestion des protéines naturelles

La digestion des protéines naturelles permet d'évaluer l'activité digestive et pharmaceutique de l'extrait issu de la souche d'*A.niger.*

5.7.2.1. Activité digestive

La figure 14 montre qu'après l'incubation du blanc d'œuf avec l'extrait enzymatique, leur forme insoluble a été convertie en forme soluble, Ces protéases peuvent agir donc comme un agent digestif. Ce résultat est similaire à ce trouvé par Najafi *et al*. (2005).

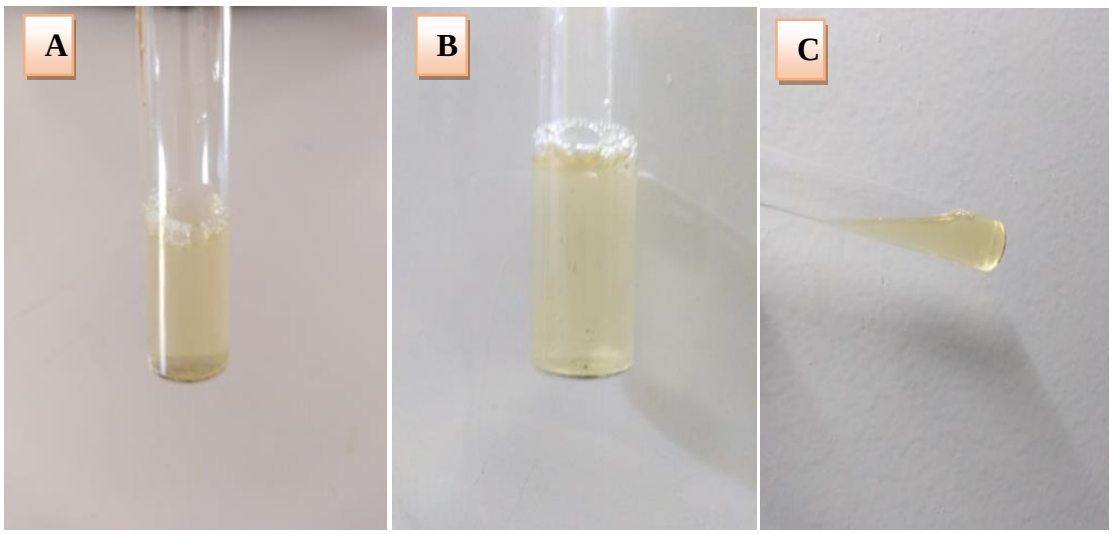

Figure 14. Test d'activité digestive d'extrait enzymatique par *A.niger*

A : blanc d'œuf, B+C : blanc d'œuf +extrait enzymatique.

5.7.2.2. Activité pharmaceutique

L'apparition de la couleur claire et la forme soluble de sang après d'incubation avec l'extrait enzymatique à 14h, indique l'hydrolyse des protéines du sang après cette période (Figure15), Ces protéases réagissent donc comme un facteur anticoagulant.

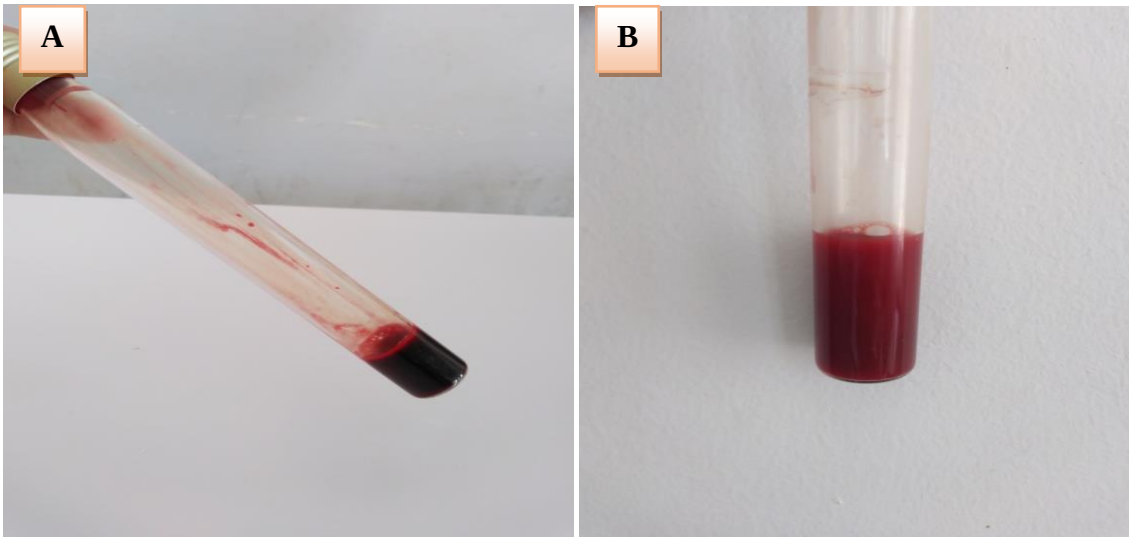

Figure 15. Test d'activité anticoagulante par l'extrait enzymatique d'*A.niger*

A : sang coagulé, B : sang coagulé+ extrait enzymatique.

On conclure que la protéase est capable à digérer des différentes substrats protéiques naturels, pour cela on suggère que l'utilisation de cette enzyme à différentes applications.

Conclusion

Le but de cette étude est la production de protéases par une moisissure filamenteuse, *Aspergillus niger*,sur milieu solide (SSF). En effet, de part ses propriétés physiologiques, enzymatiques et biochimiques, les moisissures sont le groupe des microorganismes le plus utilisé dans le processus SSF, pour cela des déchets agroalimentaire (son de blé) ont été utilisé comme substrat.

Une proportion importante en protéines (137,56µg/ml) trouve dans le son de blé assure la croissance microbienne et la production des métabolites. Le dosage de l'activité protéolytique a montré que ce milieuest favorable à la production des protéases extracellulaire par *Aspergillus niger*, en effet elle produit une activité importante de 2628.2 µg/h/ml.

Ce dernier a été obtenu après optimisation des conditions de la fermentation:

- température de la fermentation est de 30°C ;
- la concentration d'inoculum est de 10^6 spores/ml ;
- temps d'incubation est de 72 heures;
- pH initial du milieu minéral est 4.

Selon l'étude des caractères physicochimie de l'extrait enzymatique dans une large gamme de pH montre que notre souche est produit au moins deux formes déférentes des protéases, l'un est acide et l'autre est neutre, dont ces protéases ayant des application importantes dans différents domaines bien que les protéases acides offrent une variété des applications industrielles notamment l'industrie agro-alimentaire, l'industrie laitière comme des agents de coagulation du lait pour la fabrication du fromage ou pour améliorer le goût des aliments (Siala *et al*., 2009). Ainsi que les protéases neutres sont la composante la plus importante des préparations commerciales, elles ayant des applications dans la boulangerie, les aliment pour les animaux et les industries pharmaceutiques (Sumantha *et al*., 2005).

Dans le même cadre de recherche, l'*Aspergillus niger* est produit également des protéases ayant une activité maximale aux températures optimales suivantes : 30, 45 et 70 °C.

Une étape de purification de l'extrait brut a été effectuée par la précipitationau sulfate d'ammonium, indique que la majorité des protéines ont été précipité en 70%.

L'activité coagulante ayant un intérêt plus important dans le domaine industrielle (fabrication du fromage),notre étude a démontré que l'extrait brut issu de la souche sélectionnée a une forte activité coagulante 617,14US/ml.

De plus de l'activité coagulante, l'étude de propriété technologique permet également de savoir d'autres domaine d'application de notre extrait telle que: domaine pharmaceutique, digestion des protéines et détergeant, après tester sur le sang coagulé, le blanc d'œuf et des morceaux de coton tachés par le sang. Ces tests ont montré un potentiel hydrolytique de protéase sur les différents substrats utilisés.

Donc, on conclure que notre souche produit des protéases ayant une bonne propriété désirée (activité protéolytique et activité coagulante) dans différents domaines d'applications.

Les objectifs fixés dans ce travail sont atteints, mais ils ont ouvert un chemin de recherche vers d'autres perspectives comme:

- la purification de l'enzyme protéolytique et la détermination de son poids moléculaire ;
- l'étude de la toxicité de cette souche l'*Aspergillus niger*.

Références

Anandan D., Marmer W.N., Dudley R.L. 2007.Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamari.J Ind Microbiol Biotechnol 34:339–347.*

Anson M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. Journal of General Physiology, 19: 446-459.

Arima K., Yu J. and Iwasaki S. 1970. Milk-clotting enzyme from Mucor pusillus var. Lindt. In: Perlmann G, Lorand L (eds) Methods in enzymology, Academic, New York, 19:446-459.

Asha B., Palaniswamy M.2018. Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. Journal of Applied Pharmaceutical Science 8(02):119-127.

Assamoi A. A., Destain J. and 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. Agron. Soc. Environ., 13 (2): 281-294.

Atik W., Nanung A. F., Jamhari A.P., Zaenal B., Yudi P., Yuny E. 2018. Optimizing of Protease Purification from *Bacillus cereus* TD5B by Ammonium Sulfate Precipitation. Chemical engineering transactions 63: 709-714.

Atlas R. M. 2006. The handbook of microbiological media for the examination of food. 2nd edition, CRC Press, New York, p. 112.

Belmessikh A. 2011. Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Thèse de magistère, Université Mentouri Constantine, 129.

Benazir J. F., Suganthi R., Anjana H., Ramesh K. V., Aswathi M.P.,Niraimathi G., Mala M.K., Sukanya S., Santhi R. 2011. Bio utilization of agroindustrial waste in solid state fermentation by *Aspergillus niger* for the production of protease . Asiatic Journal of Biotechnology Resources 2(04): 422-435.

Benchiheub M.2015. Etude des protéases de quelques plantes endémiques. Purification, propriétés, mécanisme d'action et applications technologiques. Thèse de doctorat, Université Constantine, 144 p.

Benkahoul M., Mechakra A1., Boukhalfa H.2012.Caractéristiques de la métalloprotease produite par *Aspergillus oryzae* sur dechets d'organges. Sciences & Technologie (35):50-54.

Benlounissi A., Mechakra-Maza A.,. Blum L.J., Marquette C.A. 2014. Identification and characterization of milk-clotting proteases produced by two species of mold. African Journal of Biotechnology 13(11): 1275-1280.

Bensmail S., Mechakra A, Fazouane -Naimi.F. 2015. Optimisation of Milk-Cloting Protease Production by a local Isolate of *Aspergillus niger* FFB1 in Solid-State Fermentation.Journal of microbiology, biotechnology and food sciences 4(5) :467-472.

Bensmail S., Nouar H, K. Bouchenak K., Fazouane -Naimi F. 2013. Etude de l'aptitude fromagere d'un extait enzymatique coagulant produit par *Aspergillus niger* FFB1. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn 7 : 98-119.

Bensmail S.2012. Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation, Thèse de magistère, Université M'hamed Bougara de Boumerdès, 141 p.

Bono F., Savi P., Tuong A., Maftouh M., Pereillo J. M., Capdevielle J., Guillemot J.C., Maffrand J.P., Herbert J.M. 1996. Purification and characterization of a novel protease from culturefiltrates of a *Streptomyces* sp. FEMS Microbiology Letters 141: 213-220.

Boukhalfa H. 2003. Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* cultivée sur milieu à base de déchets de tomates. Optimisation de milieu de culture et étude des caractéristiques de l'extrait enzymatique. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université Mentouri Constantine.

Boukhalfa-lezzar H. 2015. Etude de la production de la protéase par *Aspergillus oryzae* sur milieu solide en fermenteur fujiwara. Utilisation des déchets de tomate comme substrat de fermentation. Thèse de doctorat en sciences, université des frères Mentouri, Algérie, 106.

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.

Bruno M. A., Lazza C. M., Errasti M. E., Lopez L. M., Caffini N. O., Pardo M.F.2010. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from Bromelia hieronymi fruits. LWT - Food Science and Technology, 43: 695-701.

Celik E., Calik P. 2004. Bioprocess parameters and oxygen transfer characteristics in beta-lactamase production by Bacillus species. Biotechnology Progress 20: 491–499.

Chabasse D., Guiguen C., Contet-Audonneau N. 1999. Mycologie médicale. Ed MASSON, Paris P: 320.

Champion R.1997. Identifier les champignons transmis par les semences. INRA éditions, Paris, 403 p.

Chandrasekaran S., Kumaresan S.S.P., Manavalan M. 2015.Production and Optimization of Protease by Filamentous Fungus Isolated from Paddy Soil in Thiruvarur District Tamilnadu. Journal of Applied Biology and Biotechnology 3 (06): 066-069.

Croux C., Paquet V ., GOMA G., SOUCAILLE P. 1990. Purification and Characterization of Acidolysin, an Acidic Metalloprotease Produced by *Clostridium acetobutylicum ATCC 824*. Applied and environmental microbiology, 56 (12): 3634-36.

Davet P., Rouxel F. 1997. Détection et isolement des champignons du sol. INRA éditions, Paris, p.53.

Dawson RMC., Elliot DC, Elliot WH., Jones KM. 1986. Data for biochemical Research. 3rd. oxford: oxford science Publication, Clarendon Press: 537.

De Castro, R.J.S., Nishide T.G., Sato H.H. 2014. Production and biochemical properties of proteases secreted by*Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.

Dendouga W. 2006. Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite, Thèse de magistère, Université Mentouri Constantine, 84 p.

Desoubeaux G., Chandenier J. 2010. *Aspergillus* et maladies aspergillaires .feuiles de biologie 51 (293):33-40.

Devi M.K., Banu A.R., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V., Planiswamy M. 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. Indian Journal of Science and Technology 1(7): 1-6.

Durand G., Monson P. 1982. Les enzy mes: production et utilisations industrielles. Bordas. Paris. P : 36-153.

Fazouane-Naimi F., Mechakra A., Abdellaoui R., Nouani A., Magagi Daga S., Marou Alzouma 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*. Food Biotechnology, 24:258-269.

Guiraud J. P. 1998. Microbiologie alimentaire. DUNOD, Paris, p.330.

Harrigan W.F. 1998. Laboratory methods in food microbiology. 3rd edition, Academic press. London, 533 p.

Hernández-Martínez R., Gutiérrez-Sánchez G., Bergmann C.W., Loera-Corral O., Rojo-Domínguez A., Huerta-Ochoa S., Regalado-González C, Prado-Barragán L.A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*.Process Biochemistry 46:2001–2006.

Hölker U., Jürgen L. (2005). Solid-state fermentation, are there any biotechnological advantages?. Current Opinion in Microbiology 8: 301-306.

Janson J.-C. 2011. Protein purification: principals, high resolution methods and applications. 3ème Ed John Wiley and Sons, P. 548.

Kumar A., Sharma J., Mohanty K. A., Grover S., Batish V. K. 2006. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (Capra hircus). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 145: 108-113.

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.

Leyral G., Vierling E. 2007. Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4èmeEd Doin, P. 287.

Mais E. A.2018.Extraction and purification of protease from *Aspergillus niger* isolation.Pharmacy & Pharmacology International Journal 6 (2):96–99.

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.

Mechakra-Meza A.,Boucherit Z., Belmessik A., Bensmail S., Gais S., Fazouane-Naimi F. 2011. Physico-chemical and technological properties of acid proteinases produced by local fungus strains. European Biotechnology Congress.

Merheb Carolina W., Cabral H., Gomes E. and 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.

Meyer A., Deiana J., Bernard A. 2004. Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés. 2ème Ed Doin, P. 430.

Mukherjee A. K., Adhikari H., Rai S. K. 2008. Production of alkaline protease by a thermophilic Bacillus subtilis under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. Biochemical Engineering Journal 39: 353-361.

Mukhtar H., Ikram U H. 2009. Production of Acid Protease by *Aspergillus niger* Using Solid State Fermentation. Pakistan J. Zool. 41(4):253-260.

Murphy R.A., Horgan K.A. 2005. Antibiotics, enzymes and chemical commodities from fungi, in Kavanagh K., Fungi: Biology and applications, John Wiley & Sons Ltd, England. 125- 134.

Najafi M.F. 2005. Potential application of protease isolated from Pseudomonas *aeruginosa PD100*. Electronic Journal of Biotechnology 8 (2).

Neelakantan S., Nohanty A. K., Kaushik J. K. 1999. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. Current Sciences 77: 143-148.

Nygren C. M., Edqvist J., Elfstrand M., Heller G. and Taylor A. F. 2007. Detection of extracellular protease activity in different species and genera of ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 17:241-248.

Oludumila O.R., Abu-Temitope F.A., Enujiugha V.N., Sanni D.M. 2015.Extraction, purification and characterization of protease from *Aspergillus niger* isolated from yam peels. International journal of nutrition and food Sciences 4(2): 125-131.

Paranthaman *R.,* Alagusundaram *K.,* Indhumathi *J*. 2009.Production of Protease from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. World Journal of Agricultural Sciences5 (3): 308-312.

Pasqualotto A. C. 2010. Aspergillosis: from diagnosis to prevention. Ed Springer Science & Business Media, New York P: 1027.

Pelmont J. 1995. Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble. Paris. 619-655.

Prevot V. 2013.Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de doctorat, Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE,France,159.

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.

Rao Y. K., Lu S.-C., Liu B.-L., Tzeng Y.-M. 2006. Enhanced production of an extracellular protease from Beauveria bassiana by optimization of cultivation processes. Biochemical Engineering Journal, 28: 57-66.

Romsdahl J, Blachowicz A, Chiang AJ, Singh N, Stajich JE, Kalkum M, Venkateswaran K, Wang CCC. 2018. Characterization of *Aspergillusniger* isolated from the International Space Station. mSystems 3:e00112-18.

Sabu A., Augur C., C. Swati C.,Pandey A. 2006. Tannase production by *Lactobacillus sp.* ASR-S1 under solid-state fermentation. Process Biochemistry 41: 575–580.

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

Sen S., Venkata D., Dutta K., Mandal B. 2011. Characterization of novel surfactant and organic solvent stable high-alkaline protease from new *Bacillus psidofirmus SVB1*. Research Journal of Microbiology 6(11): 769 -783.

Sethi B.K., Jana A., Nanda P.K., Das Mohapatra P.K., Sahoo S.L. 2016. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels. Journal of Taibah University for Science10: 571–583.

Sharma K. M., Kumar R., Panwar S., Kumar A. 2017. Microbial alkaline proteases: Optimization ofproduction parameters and their properties. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 15:115-126.

Sheehan D. 2009. Physical biochemistry: principles and application. 2ème Ed John Wiley and Sons, P. 407.

Siala R., Sellami-Kamoun A., Hajji M., Abid I., Gharsallah N., Nasri M. 2009. Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* I1: purification and characterization.African Journal of Biotechnology Vol. 8 (18): 4582-4589.

Singh P., nee'Nigam ., Pandey A. 2009. Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation.

Singh R., Anshumali M., Manoj K., Praveen K.M. 2016. Microbial Proteases in Commercial Applications. Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological4(3): 365-374.

Smith N. R., Gordon R. E., Clark F.E. 1952. Aerobic spores-forming bacteria. J. Appl. Bact. 27: 78-99.

Souza P.M., Werneck G.,Aliakbarian B.,Siqueira F., Ferreira Filho E.X.., Perego P.,Converti A.,Magalhaes P.O., Junior A.P.2017. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. Food and Chemical Toxicology : 1-8.

Srilakshmi J., Madhavi J., Lavanya S., Ammani K. 2014. Commercial potential of Fungal protease: Past, present and Future prospects. Journal of pharmaceutical, chemical and Biological sciences 2 (4): 218-234.

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

Sumantha A., Sandhya C., Szakacs G., Soccol C. R. and 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.

Vishwanatha K.S., Appu Rao A.G ., Singh S.A.2010. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae MTCC 5341*: optimization of process parameters. J IndMicrobiol Biotechnol 37:129–138.

Walsh G., Headon D. 1997. Protein Biotechnology. Ed John Wiley and Sons, P. 363.

Ward O. P., Qin W. M., Dhanjoon J., Ye J., Sing A. 2006. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. Advances in Applied Microbiology 58: 1-75.

Annexes

Annexe 1: Matériels

1. Agitateurs - plaque chauffante (ISOLAB Laborgeräte GmbH)
2. Autoclave (Systec VB 150)
3. Bain Marie (Memmert)
4. Balance (KERN 440 - 33 N)
5. Balance de précision (analytique) (KERN ABJ)
6 Centrifugeuses réfrigérées (Hettich ZENTRIFUGEN)
7. Congélateur (Haier)
8. Etuve (memmert)
9. Four Pasteur (ALUEX Line)
10. Incubateur (memmert)
11. Microscope photonique (NOVEX HOLLAND)
12. Spectrophotomètre (SELECTA)
13. pH mètre (OHAUS STARTER 2100)

Annexe 2. Composition des milieux de culture et des solutions

Eau Physiologique (Guiraud, 1998)

Chlorure de sodium……..…….8,5 g

Eau distillée…….……..……..…….1000 ml

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Pomme de terre …….. 200 g

Agar ……...……. 15 g

Glucose ……...…... 20 g

Eau distillée…….....1000 ml

Stérilisation à l'autoclave

Lait gélosé à 30 % (Harrigan, 1998)

Mélanger de manière aseptique 10 ml d'une solution stérile à 2,5% d'agar avec 5 ml de lait écrémé reconstitué stérile et verser dans une boîte de Pétri. Ce milieu peut être recouvert d'une couche mince sur une couche de 10 ml d'agar simple préalablement coulé et laissé se solidifier.

Solution minérale (SM) (%, p/v) (Sumantha *et al*., 2005)

NH4NO3…….0,5

KH2PO4 …….....0,2

MgSO4.7H2O …….....0,1

NaCl……...0,1

Composition du réactif de Bradford

BBC G-250……..…….……..100 mg.

Ethanol absolu …….50 ml.

Acide phosphorique à 85%.....……100 ml.

Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée.

Conservation pendant 3 semaines à 4°C et à l'abri de la lumière.

Tampon Citrate de Sodium (0,1M; pH 5,2) (Bensmail, 2012)

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.

Annexes 03 : Tableau de saturation en sulfate d'ammonium solide

Tableau 7. Tableau de saturation en sulfate d'ammonium solide (Dawson *et al.*,1986).

Initial concentration of ammonium sulfate(% saturation at0°C)	Final concentration of ammonium sulfate(% saturationat 0°C)																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Gramssolid ammonium sulfate to add to 100 ml of solution																
0	10.7	13.6	16.6	19.7	22.9	26.2	29.5	33.1	36.6	40.4	44.2	48.3	52.3	56.7	61.1	65.9	70.7
5	8.0	10.9	13.9	16.8	20.0	23.2	26.6	30.0	33.6	37.3	41.1	45.0	49.1	53.3	57.8	62.4	67.1
10	5.4	8.2	11.1	14.1	17.1	20.3	23.6	27.0	30.5	34.2	37.9	41.8	45.8	50.0	54.4	58.9	63.6
15	2.6	5.5	8.3	11.3	14.3	17.4	20.7	24.0	27.5	31.0	34.8	38.6	42.6	46.6	51.0	55.5	60.0
20	0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.5	17.7	21.0	24.4	28.0	31.6	35.4	39.2	43.3	47.6	51.9	56.5
25		0	2.7	5.7	8.5	11.7	14.8	18.2	21.4	24.8	28.4	32.1	36.0	40.1	44.2	48.5	52.9
30			0	2.8	5.7	8.7	11.9	15.0	18.4	21.7	25.3	28.9	32.8	36.7	40.8	45.1	49.5
35				0	2.8	5.8	8.8	12.0	15.3	18.7	22.1	25.8	29.5	33.4	37.4	41.6	45.9
40					0	2.9	5.9	9.0	12.2	15.5	19.0	22.5	26.2	30.0	34.0	38.1	42.4
45						0	2.9	6.0	9.1	12.5	15.8	19.3	22.9	26.7	30.6	34.7	38.8
50							0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.3	27.2	31.2	35.3
55								0	3.0	6.2	9.4	12.9	16.3	20.0	23.8	27.7	31.7
60									0	3.1	6.3	9.6	13.1	16.6	20.4	24.2	28.3
65										0	3.1	6.4	9.8	13.4	17.0	20.8	24.7
70											0	3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	21.2
75												0	3.2	6.7	10.2	13.9	17.6

80														0	3.3	6.8	10.4	14.1
85															0	3.4	6.9	10.6
90																0	3.4	7.1
95																	0	3.5
100																		0

ملخص

يشغل البروتياز المرتبة الأولى في السوق العالمية للإنزيمات وذلك لدوره الفعال في التكنولوجية الحيوية .
لهذه الغاية فان إنتاج البروتياز بواسطة سلالة معزولة محليا ل*Aspergilus niger* باستخدام بقايا زراعية غير مكلفة عن طريق التخمر في وسط صلب قد تم تحسينه لضمان أفضل نشاط للإنزيم، أثبتت نتائج تحسين الشروط الزراعية لإنتاج البروتياز،أنأ فضل إنتاج لهذا الإنزيم(262,82ميكروغرام/ساعة/مل) بواسطةهذه السلالةتحصل عليها في درجة حرارة 30 درجة مئوية ,ذو درجة حموضة 4 ، تركيز10^6من ابواغ/مل لمدة 72 ساعة من الحضن.أكدت الخصائص الكيماوية لمستخلص *Aspergilus niger*أن البروتياز أكثر نشاطا في وسط حمضي 4,5 و أخرى في وسط معتدل 7,5بالإضافة أن النشاط الإنزيمي سجل ثلاث ذروات خلال درجاتا لحرارة التالية : 30،45 و 70 درجة حرارة مئوية.أغلبية البروتياز خارج الخلية، تم تصفيته جزئيا بواسطة الترسيب باستعمال كبريتات الامونيوم عند درجة تشبع 70%. و قد تم اختبار خصائص أخرى للبروتياز المستخلص من نفس النوع حيث اثبت فعاليته التكنولوجية المختلفة. و كذلك هذه الإنزيمات يمكن استعمالها كمضاف لسائل الغسيل و كعامل هضمي و أيضا عامل ضد التخثر. و هذا يسمح بإمكانية استعماله في التطبيقات الصناعية.

الكلمات المفتاحية : البروتياز، Aspergillus niger، تخمر صلب. تحسين،

Résumé

Les protéases occupent la première place dans le marché mondial des enzymes, particulièrement par leur rôle potentiel dans la biotechnologie. Dans cet objectif la production des protéases par *Aspergillus niger* isolée à partir d'une source thermale sous la fermentation d'état solide (SSF) sur un résidu agroalimentaire peu couteux (son de blé) comme substrat, a été optimisée de façon à obtenir la meilleure activité protéolytique, les résultats d'optimisation des conditions culturelles de la production des protéases montrent que la production maximale des protéases (2628,2 µg/h/ml) par l'isolat a été obtenue à 30°C, pH 4, 10^6 spores /ml et 72h pour la température, le pH, la concentration de l'inoculum et le temps d'incubation respectivement. La caractérisation biochimique d'extrait brut d'*A .niger* montré que les protéases était les plus actives en pH acide 4,5 et autre neutre 7,5 plus que trois pics d'activité protéolytique ont enregistrés à les températures suivantes: 30°C, 45°C et70°C. La majorité des protéases extracellulaires ont été semi purifié en utilisant la précipitation au $(NH4)_2SO_4$ à 70% de saturation.D'autres propriétés testées avec les protéases extraites de même espèce ont montré différents potentiels technologiques. Ainsi ces enzymes capables d'agir comme additif détergeant, digestif et comme anticoagulant. Ce qui permet une utilisation d'éventuelles applications industrielles.

Mots clés : Protéase, *Aspergillus niger*, fermentation solide, Optimisation.

Abstract

The proteases rank first in the global enzyme market, particularly in their potential role in biotechnology.For this purpose the production of proteases by *Aspergillus niger* isolated from a thermal source under solid state fermentation (SSF) on an inexpensive agro-food residue (wheat bran) as a substrate, has been optimized to obtain the enhanced proteolytic activity. The results of the cultural conditions optimization of the protease production showed that the maximum production of proteases (2628.2 µg / h / ml) by the isolate was obtained at 30 ° C. pH 4, 10^6 spores / ml and 72h for temperature, pH, concentration of inoculum and incubation time respectively. The biochemical characterization of A.niger crude extract showed that the proteases were the most active in acidic pH 4 and other neutral 7.5 more than three peaks of proteolytic activity recorded at the following temperatures: 30 ° C, 45 ° C and 70 ° C.The majority of extracellular proteases were semi-purified using $(NH_4)_2SO_4$ precipitation at 70% saturation. Other properties tested with proteases extracted from the same species showed different technological potentials. These enzymes are capable of acting as a detergent additive, digestive and anticoagulant in which they allow to use any industrial applications.

Key words: Protease, *Aspergillus niger*, solid-state fermentation, Optimization.