

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université A. MIRA - Béjaïa**

*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Microbiologie*  
*Spécialité : Biotechnologie Microbienne*



**Réf :.....**

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

***Thème***

**Caractérisation des souches fongique productrice de  
protéases**

Présenté par :

**MOUTERFI Amina & SAICHE Cylia**

Soutenu le : **13 Juillet 2022**

Devant le jury composé de :

M <sup>me</sup> BOUCHERBA Nawel	Pr	Présidente
M <sup>r</sup> BETTACHE Azzeddine	Pr	Encadreur
M <sup>elle</sup> MOUSSI Kenza	Doctorante	Co-encadreur
M <sup>elle</sup> AZZOUZ Zahra	MAB	Examinatrice

**Année universitaire : 2021 / 2022**

## *Dédicas*

*Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant, pour avoir guidé mes pas vers un avenir.*

*Tout-puissant pour me porter, protéger et me donner la vie, ma chère et tendre mère KARIMA qui a veillé des nuits pour me soutenir et qui s'est assurée de m'enseigner avec sa patience et ses sacrifices pour mon succès. A mon généreux père MATOUK, qui m'a soutenu dans mon cheminement scolaire depuis mes premiers pas à l'école, sauve le dieu protège sa vie.*

*A ma chère sœur et compagne dans cette vie, avec elle je suis et sans elle je ne suis pas, à qui je vois l'optimisme avec ses yeux et le bonheur dans son rire KAHINA. A mes chères frères AISSA et BILLAL.*

*Aux grands-pères et grand-mère que dieu les protèges.*

*A tous mes oncles, tantes et leurs enfants.*

*A mon fiancé ALI pour se tenir à côté de moi.*

*A mon très chère encadrant Mr BETTACHE AZZEDINE*

*A mon adorable Co-promotrice la doctorante MOUSSI  
KENZA*

*A mon binôme et mon cher amie CYLIA*

*Ainsi qu'à mes chers amis : LILA, HASSINA, THIZIRI,  
MANAL NAWAL, SIHAM.*

*A tous les étudiants de ma promotion de Biotechnologie  
2021/2022.*

*AMINA.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

- ❖ *A m'adorable mère aucune dédicace ne serait exprimée envers elle.*
- ❖ *A mon adorable père qui apporté amour et soutien et qui a contribué à ma réussite.*
- ❖ *A mes chers frères : Bachir, Toufik, Bilal et mon petit Gouda Ainsi mes cousins.*
- ❖ *A mes chères sœurs : Hassina, Zohra, Fahima ainsi mes cousines.*
- ❖ *A mes nièces que j'adore : Leticia, Imane, Younes, Oussama, Yassmin, Milissa, Alycia, Hanane.*
- ❖ *A mes très chères oncles et tantes.*
- ❖ *A toute ma famille ainsi que tous mes proches.*
- ❖ *A tous les membres de l'association Agraw.*
- ❖ *A mon cher encadreur moussi kenza*
- ❖ *A mon binôme, ma chérie Amina.*
- ❖ *A mon cher encadreur Mr BETTACHE Azzeddine*
- ❖ *A mes voisines Milida, Saadia, Sarah.*
- ❖ *A ma chère copine Kenza.*
- ❖ *A tous mes amis notamment :  
Hinouch, Siham, Hassina, Tiziri, Dyhia, Lydia, Kenza, Hanane,  
Ainsi que toute la section Biotechnologie Microbienne, promotion  
2021/2022.*
- ❖ *A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

*Cylia*

## Remerciement

*Nous tenons à remercier en premier DIEU le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la volonté afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.*

*Nous adressons le grand remerciement à notre encadreur Mr Bettache Azzeddine Professeur à l'université Abderrahmane mira de Bejaïa pour avoir acceptée d'encadrer ce travail, pour ses conseils et ses précieuses orientations, ses encouragements, sa patience qu'elle n'a cessée de nous apporter tout au long de ce travail.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements à notre Co- promotrice M<sup>lle</sup> Moussi Kenza, doctorante au Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'université de Bejaïa pour son aide, nous la remercions pour sa bienveillance et ces conseils pour son dynamisme, son aide et ses précieux conseils, qui nous ont permis d'avancer et de mener à bien notre projet de fin d'étude.*

*À notre présidente de jury, M<sup>me</sup> BOUCHERBA Nawal, Professeur à l'université de Bejaïa, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette soutenance, Hommage respectueux.*

*À notre examinatrice M<sup>lle</sup> AZZOUC Zahra, enseignante chercheuse à l'université d'El Kseur, qui nous a fait l'honneur de juger et d'examiner ce travail. Que ce travail soit le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.*

*Nos vifs remerciements vont, également, à tout le personnel du laboratoire de recherche LMA, pour leur aide et surtout leur gentillesse et sympathie.*

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

# **Sommaire**

# Sommaire

## *Dédicas*

Remerciement

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction ..... 1

Première partie: Synthèse bibliographique

Chapitre I: Les protéases

I. 1 Généralités sur les enzymes ..... 3

I. 1.1 Définition..... 3

1.1.2 Marché des enzymes ..... 3

I.2 Définition de protéase ..... 3

I.2.1 Source de protéase ..... 4

I.2.2 Classification des protéases ..... 4

I.3 Applications des protéases ..... 5

I.3.1 Applications alimentaires ..... 6

I.3.2 Synthèse des peptides ..... 6

I. 3.3 Synthèse de l'aspartam ..... 6

I. 3.4 Gestion des déchets industriels et ménagers..... 6

I. 3.5 Utilisation médicale ..... 7

I. 3.6 Traitement des eaux usées industrielles ..... 7

I. 4 Autres applications ..... 7

Chapitre II: Les champignons filamenteux

II .1 Définition..... 8

II .2 Les caractéristiques morphologiques ..... 8

II .3 Développements ..... 9

II .4 Le mode de vie fongique .....	10
II .5 La Reproduction .....	10
II .6 Méthodes d'identification des champignons filamenteux .....	11
II. 6.1 Analyse macroscopique .....	11
II.6.2 Analyse microscopique .....	11
II.6.3 Analyse moléculaire.....	11
II.7 Fermentation de substrats solides (FMS) .....	11
II.7.1 Généralités et définitions.....	11
II.7.2 Fermentation sur milieu solide.....	12
II.7.3 Avantages et inconvénients de la fermentation solide .....	12

Deuxième partie: Matériels et méthodes

I. Purification et sélection des souches.....	14
I.1 Purification.....	14
I.2 Préparation de l'inoculum.....	14
I.3 Dénombrement des spores .....	15
I .4 Observations macroscopique et microscopiques des souches sélectionnées.....	15
I.4.1 Identification macroscopique .....	15
I.4.2 Identification microscopique .....	15
I.5 Production de protéases par fermentation :.....	16
I.5.1 Fermentation liquide (submergée).....	16
I.5.2 Fermentation solide .....	17
I.5.3 Production de protéases par fermentation mixte .....	18
I.6 Cinétique de production enzymatique des souches sélectionnées .....	18
I.6.1 Dosage de l'activité protéolytique.....	18
I.7 Méthodes de dosage.....	19
I.7.1 Dosage des protéines .....	19
I.7.2 Activité protéolytique.....	20

## Résultats et discussions

I. Identification des souches .....	21
I.1 Etude macroscopique .....	21
I.2 Etude microscopique.....	22
II. Production de protéases par les différentes fermentations.....	23
II.1 Fermentations solides et liquide de la souche 01 (Aspergillus sp).....	24
II.2 Fermentations solides et liquide de la souche 2 (Aspergillus sp).....	26
III. Production de protéase par fermentation solide et submergée de différents déchets agro-alimentaire.....	27
IV. Cinétique de production de la protéase .....	29
V. Fermentation mixte.....	31
Conclusion.....	33

## Références bibliographiques

## Annexes

## Résumé

## Liste des abréviations

BG : Isolat *Aspergillus Sp*

BSA : Bovin Sérum-albumine

FML : Fermentation en milieu liquide

FMS : Fermentation en milieu solide ou SSF

KDa : Kilo Dalton

LMA : Laboratoire de Microbiologie Appliquée

PDA : Potato- Dextrose- Agar.

PH : potentiel d'Hydrogène

Rpm : Rotation par minute

SMA : Kim Milk Agar

Sp : Espèce

T (°C) : Température en degré Celsius

TCA: Tri Chloroacetic Acid.

Tris-HCl: Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride.

μ: Micro

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Préparation de la gamme d'étalonnage de BSA (0,1mg/ml).....	19
<b>Tableau 2</b> : Préparation de la gamme d'étalonnage de la tyrosine .....	20
<b>Tableau 3</b> : Etude macroscopique des souches fongiques.....	22
<b>Tableau 4</b> : Etude microscopique des souches fongiques.....	23

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Réalisation des fermentations submergées dans des flacons.....	16
<b>Figure 02</b> : Réalisation des fermentations solides dans des Erlenmeyers de 250 ml...	17
<b>Figure 03</b> : Réalisation des fermentations solides dans des Erlenmeyers de 250 ml...	17
<b>Figure 04</b> : Fermentations solides dans des Erlenmeyers de 250 ml.....	24
<b>Figure 05</b> : Fermentations submergés dans des flacons.....	24
<b>Figure 06</b> : Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche 1 dans le milieu solide et submergé par différents substrats.....	25
<b>Figure 07</b> : Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche 2 dans le milieu solide et liquide par différents substrats.....	26
<b>Figure 08</b> : Production de protéase en FMS et FML par différents déchets pour la souche 01 ( <i>Aspergillus</i> sp).....	27
<b>Figure 09</b> : Production de protéase en FMS et FML par différents déchets pour la souche 02 ( <i>Aspergillus</i> sp).....	28
<b>Figure 10</b> : Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche 1 dans le milieu de fermentation solide (son de blé).....	29
<b>Figure 11</b> : Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche 2 dans le milieu de fermentation solide (son de blé).....	30
<b>Figure 12</b> : Production de protéases par fermentation mixte sur le milieu solide après 6 jours d'incubation avec son de blé comme substrat.....	31

# **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**).

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

La 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**).

Dans notre étude le son de blé est utilisé comme substrat de base pour la production de protéase sur milieu solide, vue sa richesse en fibres alimentaires insolubles, en protéines et en sels minéraux (**Marlett et al., 2002**). En plus, il a été prouvé que certaines protéases fongiques ont une très grande spécificité d'action vis-à-vis des protéines, des céréales et plus particulièrement celles du blé, ce qui le rend un excellent substrat pour la production des protéases par fermentation solide (**Kumar et al., 2005; Sumantha et al., 2005; Chutmanop et al., 2008; Vishwanatha et al., 2009-2010**).

Dans cette optique, nous avons étudié la possibilité d'obtention de protéases acide, produites à partir des souches fongiques localement isolée. Notre étude comporte les étapes suivantes :

- Identification macroscopique et microscopique des souches sélectionnées.
- Production de protéases par les fermentations solides, submergé et mixte dans le but de sélectionner le meilleur substrat.
- Mise en évidence de l'activité protéolytique des souches fongiques sélectionnées.
- Etude de la cinétique de production d'enzyme sur son de blé.

# **Première partie**

## **Synthèse bibliographique**

# **Chapitre I**

## **Les protéases**

## I. 1 Généralités sur les enzymes

### I. 1.1 Définition

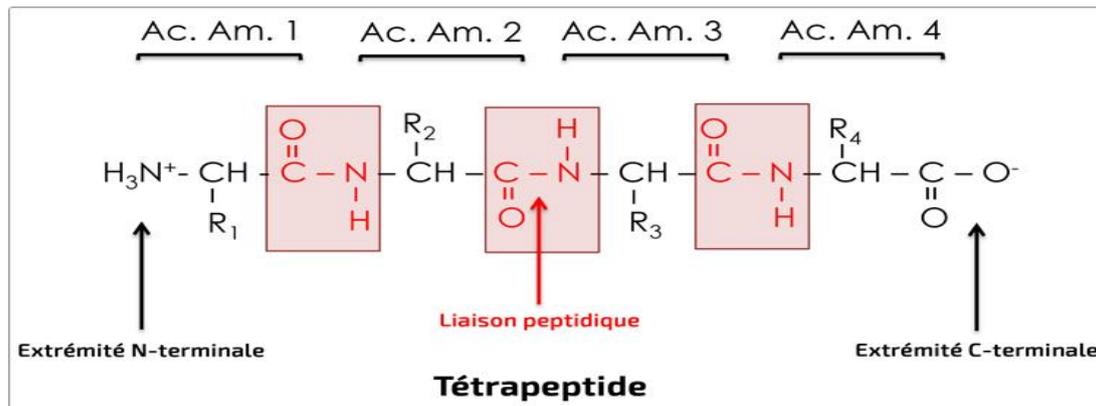
Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kda) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés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

#### 1.1.2 Marché des enzymes

De toutes les enzymes industrielles, les protéases sont de loin le groupe le plus important. En effet, les protéases représentent à elles seules entre 60% du total des ventes d'enzymes. La dominance des protéases dans le marché des enzymes industrielles devrait s'accroître (**García-Gómez et al., 2009 ; Rai et Mukherjee, 2010**). Les ventes industrielles des protéases sont estimées à plus de 350 millions de dollars annuellement (**Kumar et al., 2008**).

### I.2 Définition de protéase

Les protéases sont un groupe d'enzymes très complexe. Elles appartiennent à la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x), formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques (**Kumar et al., 2008**). Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique (Figure 02). Elles scindent les protéines en fragments polypeptidiques qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés, offrant une multitude de structures (**Frazier, 1967 ; Scriban, 1999**). La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysât de protéines ou d'un mélange d'acides aminés.



**Figure 02:** Succession d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques.

([https://rnbio.upmc.fr/Biochimie\\_liaison-peptidique](https://rnbio.upmc.fr/Biochimie_liaison-peptidique)).

### I.2.1 Source de protéase

La vaste distribution des protéases chez les plantes, les animaux, et les microorganismes démontre que ces enzymes sont nécessaires à la survie des organismes ; les protéases jouent des rôles physiologiques importants dans les différents processus biologiques (**Rao et al., 1998**)

#### I.2.1.1 Protéases d'origine microbienne

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 60% du total des ventes d'enzymes dans le monde protéases microbiennes sont préférées aux enzymes végétales et animales car ils possèdent presque toutes les caractéristiques souhaitées pour leurs applications biotechnologiques (**Mala, 1998**).

#### I.2.2 Classification des protéases

En générale, les protéases sont classées selon plusieurs critères majeurs tout en se basant sur la localisation cellulaire, le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (la nature du site catalytique), et selon leur besoin en ATP.

**I.2.2.1 Selon la localisation cellulaire**

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

**A. 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 (**Malaet al, 1998**).

**B. 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 (**Malaet al, 1998**).

**I.2.2.2 Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique**

En fonction de leur mode d'attaque, les peptidases sont subdivisées en deux classes ; les endopeptidases qui agissent à l'intérieur de la chaîne peptidique et les exopeptidases agissent seulement sur les liens peptidiques près des extrémités de la chaîne peptidique (**Penasse, 1974**).

**I.2.2.3 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**).

**I.3 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**).

Les principales industries utilisatrices de protéases sont :

- ✓ Applications alimentaires
- ✓ Industrie des détergents
- ✓ Domaine pharmaceutique et médicale
- ✓ Traitement des eaux usées industrielles
- ✓ Autres applications

### I.3.1 Applications alimentaires

L'application des protéases à l'industrie alimentaire n'est pas récente. Pour la fabrication des fromages, seules les enzymes coagulantes fongiques ont donné de bons résultats, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure et la pepsine bovine et porcine (**Alais, 1975 ; Pepler & Perlman, 1979**).

### I.3.2 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 milieux où l'eau est, restreint (présence des solvants organiques) (**Radha, 2012**).

### I. 3.3 Synthèse de l'aspartam

Bien que les protéases soient des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse. Sous certaines conditions cinétiquement contrôlées, une préparation de thermolysine provenant de *Bacillus 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. 3.4 Gestion des déchets industriels et ménagers

La possibilité de dépuración 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. 3.5 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 plasmine-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. 3.6 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. 4 Autres applications**

La protéase neutre peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Ils sont employés 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 II**

**Les champignons**  
**filamenteux**

## II .1 Définition

Les champignons, encore appelés "Fungi" (du latin) ou mycètes (du grec mukês, champignon), ce sont des organisme eucaryote, immobile, hétérotrophe, tirant leur énergie d'une grande variété de source nutritionnelle, la plupart des espaces de champignons filamenteux sont des saprophyte, c'est à dire qu'ils se nourrissent de matière organique mort en secrètent dans le milieu des enzymes extracellulaires telle que les cellulases, pectinase, protéase et lipase qui leur permettent de dégradé la matière organique telle que les polysaccharides des plantes. Les champignons filamenteux différencient une structure syncytiale appelé thalle durant leur cycle végétatif.

Ces champignons sont incapables de réaliser la photosynthèse (absence de chloroplastes) et présentent une forme végétative composée de cellules assemblées en filaments ou hyphes avec une reproduction sexuée et/ou asexuée.

Les champignons filamenteux sont connus pour leur capacité à sécréter de grandes quantités d'enzymes hydrolytiques différentes, ce qui en fait le principal fournisseur d'enzymes pour l'hydrolyse de la lignocellulose. Cependant, certaines espèces de champignons filamenteux peuvent également fermenter une large gamme de substrats et produire une gamme de produits métaboliques.

## II .2 Les caractéristiques morphologiques

Les champignons filamenteux sont des organismes unicellulaires ou pluricellulaires eucaryotes, c'est-à-dire possédant des noyaux individualisés pourvus d'une membrane nucléaire, de chromosomes, d'un nucléole, et un appareil mitochondrial. Ils possèdent une paroi peptido-polyosidique épaisse, de composition variable selon les groupes : mannanes, glucanes, chitine, chitosan, protéines, phospholipides, et une membrane riche en stérols (ergostérol).

Les moisissures sont des champignons dont le thalle présente leur structure végétative, ils sont constitués de longs filaments fins et ramifiés, a structure cellulaire appelée hyphes qui forme un mycélium (**prescott et all., 2013**). Ces hyphes sont divisés par des cloisons ou septa et chaque cloison contient un seul noyau, on les appelé alors hyphes septes ou segmentes. Chez certaine classe de mycètes, ces hyphes sont non septés avec des noyaux

multiples et on les appelle alors coénocytes, ces cloisons portent des ouvertures permettant le passage de cytoplasme entre les cellules adjacentes.

Les hyphes qu'ils soient segmentés ou non, sont sous formes de petites tubules transparents entourés d'une paroi cellulaire rigide de composition différente de celle des bactéries, elle contient de la chitine et des polymère de la cellulose qui lui donne une grande rigidité et une grande capacité de résistance à la chaleur et à la pression osmotique élevée que celle supportent normalement les bactéries (**Tortora et al., 2003**).L'existence simultanée d'une paroi cellulaire périphérique et de vacuoles turgescentes dans le cytoplasme, les rapproche des végétaux auxquels on les rattachait autrefois. Mais l'absence de chloroplastes (et donc de chlorophylle) en fait, comme les animaux, des organismes hétérotrophes. Ils peuvent se reproduire de façon sexuée et/ou asexuée.

### **II .3 Développements**

Le développement des moisissures et dépendant de facteurs nutritifs et environnementaux.

Elles sont des hétérotrophes exigent donc des éléments nutritifs tels que le carbone et l'azote comme composés organique et le potassium. Le phosphore, le magnésium, le fer ou le soufre comme ions minéraux, aussi elles nécessitent d'autres molécules qui peuvent pénétrés dans la cellule sans transformation comme les acides aminés ou après une digestion enzymatique tels que l'amidon, la cellulose, ou les protéines.

Le développement des moisissures est également dépendant de l'environnementale facteur environnemental le plus important est l'humidité relative, la majorité des moisissures se développent pour une activité de l'eau comprise entre 0,85 et 0.99.

Le deuxième facteur est la température, les exigences thermiques pour le développement des moisissures différent d'une moisissure à l'autre. La majorité des moisissures sont mésophile, se développent aux alentours de 20-25°C. Mais il existe certaines moisissures dites thermophiles, thermotolérantes ou psychrophiles.

Le pH peut avoir une influence sur la croissance et le développement des moisissures. Elles peuvent se développer avec un pH compris entre 4.5 et 8, bien que le pH optimum soit compris entre 5.5 et 7.5 (**Lecellier, 2013**).

## II .4 Le mode de vie fongique

Les champignons sont des organismes hétérotrophes et leur nutrition dépende de la présence de matière organique (Blandeau, 2012). Il existe quatre modes de vie permettent aux champignons de garantir leurs besoins nutritionnels :

❖ **Saprophytisme** : ou il dégrade la matière organique morte ou en décomposition afin de prélever les éléments minéraux essentiels.

❖ **Symbiose** : ou ils obtiennent leurs nutriments grâce à un autre organisme en échange de certains bénéfices (l'eau, les minéraux).

❖ **Commensalisme** : Dans ce cas, les champignons tirent un bénéfice de leur hôte sans leur nuire et sans leur apporter un quelconque avantage.

❖ **Parasitisme** : Où le champignon tire profit de son hôte, et entraînant par fois sa mort (Lecellier, 2013).

La quasi-totalité des champignons vivent en saprophytes dans le sol, sur des plantes mortes ou vivantes, mais uniquement à leur surface et sans leur causer de lésions.

## II .5 La Reproduction

La reproduction chez les mycètes s'effectue par deux modes :

❖ **La reproduction asexuée** : Une spore ou un fragment de mycélium croît et se développe pour former des conidiophores à l'extrémité des hyphes, des conidies sont émises puis disséminées.

❖ **La reproduction sexuée** : Exige la rencontre de deux mycéliums avec des signes sexuels opposés, un mycélium à « n » chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes ce qui donne un mycélium néoformé à 2n chromosomes.

## **II.6 Méthodes d'identification des champignons filamenteux**

L'identification des mycètes repose essentiellement sur trois analyses complémentaires :

### **II.6.1 Analyse macroscopique**

Cette analyse repose sur l'observation de plusieurs critères de développement tels que l'aspect, le relief, la taille, la couleur, la production des pigments.

### **II.6.2 Analyse microscopique**

Dans cette analyse, il est nécessaire d'observer plusieurs structures de champignon comme le thalle végétatif, les organes de fructifications et les spores (**Lecellier,2013**).

### **II.6.3 Analyse moléculaire**

Les méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, les espèces, des genres).

Elles sont basées sur l'étude d'un gène, d'un fragment d'ADN défini, exemple des ITS (Internal Transcribed Spacer), ou encore de l'ADN total par l'étude d'hybridation d'ADN-ADN (**verscheure et al.,2002**).

## **II.7 Fermentation de substrats solides (FMS)**

Pour la valorisation des substrats agricoles et des sous-produits de l'industrie agroalimentaire, les fermentations en milieu solide apparaissent comme une nouvelle voie biotechnologique peu exploitée mais prometteuse pour la fabrication d'enzymes, produits alimentaires, industriels ou pharmaceutiques (**Batteche, 2013**).

### **II.7.1 Généralités et définitions**

La fermentation en milieu solide est un des plus anciens procédés biotechnologiques connus au monde, sans doute le premier procédé technologique fermentaire connu de l'histoire. Aujourd'hui elle est devenue la technologie la plus prometteuse qui peut utiliser globalement les ressources renouvelables (**Azzouz, 2015**).

**II.7.2 Fermentation sur milieu solide**

La fermentation sur milieu solide est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (Durand, 2003 ; Gervais et *al.*, 2003 ; Rahardjo et *al.*, 2006).

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. Le développement des champignons filamenteux en fermentation solide se fait par extension et ramification des filaments formant le mycélium. Après l'inoculation d'un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. A partir de ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules (de la matrice solide) ou dans les espaces inter particulaires (par croissance) à la recherche de composés nutritifs, notamment dans les pores remplis de liquide. A des taux normaux d'humidité, les espaces entre les filaments aériens sont remplis de gaz (aérobie), tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d'eau (anaérobie). Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (Holker et Lenz, 2005; Rahardjo et *al.*, 2006).

**II.7.3 Avantages et inconvénients de la fermentation 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 :

- L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes.
- 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 (Mathot, 1996).

- Les opérations de mélange étant facilement modulables, il n'y a pas de production de mousses lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides.
- En calibrant bien les particules du substrat, l'aération peut être assurée passivement et/ou sans agitation ou par agitation discontinue (Durand, 1983).
- 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).

Dans ces conditions et bien d'autres, la fermentation solide présente de 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 à certaines bactéries xérophiles.
- Les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur milieux solides sont faibles.

# **Deuxième partie**

## **Matériels et méthodes**

La protéase est une enzyme à utilisation biotechnologique intéressante. En effet, elle peut être exploitée dans divers domaines, en l'occurrence : pharmaceutique, médicale, alimentaire et détergent etc. Les deux souches fongiques productrices d'enzymes protéolytiques utilisées dans ce travail, ont été isolées et sélectionnées par la doctorante Moussi Kenza. Le criblage qualitatif a été réalisé à partir d'un fromage expiré sur un milieu à base de lait écrémé SMA (Skim Milk Agar), pour le criblage quantitatif a été effectué sur un milieu liquide par l'utilisation de son de blé comme substrat. Les souches ont été conservées dans des cryotubes contenant le glycérol (à 30%) et de bouillon (à base de la pomme de terre) à -80°C. La partie expérimentale est réalisée au niveau du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) à l'université de Bejaia, sous la direction du Pr BETTACHE Azzeddine (Enseignant-chercheur à l'université de Bejaia) et M<sup>elle</sup> MOUSSI Kenza (Doctorante, université de Bejaia).

## **I. Purification et sélection des souches**

### **I.1 Purification**

Les champignons développés sont repiqués sur le milieu (PDA) (**Annexe 01**). Cette étape est réalisée par prélèvement de quelques colonies à partir des tubes inclinés contenant le milieu PDA, que l'on transfère sur le même milieu coulé dans des boîtes de Petri sous les conditions d'asepsie. Les cultures fongiques sont incubées pendant 3 jours à 30°C jusqu'à l'obtention de souches pures (**Bensmail, 2012**).

### **I.2 Préparation de l'inoculum**

L'inoculum correspond à la suspension sporale de la souche fongique sélectionnée. Cette dernière, est préparée par addition de 100 ml d'eau distillé stérile contenant 1 ml de tween80 aux souches cultivées pendant sept jours sur milieu PDA en boîte de Pétri. Les spores sont récupérées superficiellement en utilisant un râteau sous des conditions aseptiques. Ensuite, la détermination de la concentration de la suspension sporale est effectuée par dénombrement des spores sur cellule de Mallasses.

### I.3 Dénombrement des spores

A un ml de suspension de spores préalablement agitée, on ajoute 9 ml d'eau tweenée; le

Nombre de spores est déterminé par la cellule de Mallasses. L'examen s'effectue au microscope au grossissement (x40).

### I.4 Observations macroscopique et microscopiques des souches sélectionnées

L'identification des moisissures est basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les critères morphologiques reposent sur les paramètres macroscopiques (aspect des colonies, couleur du revers) et microscopiques (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,)

#### I.4.1 Identification macroscopique

Pour toutes les cultures obtenues après 7 jours sur milieu PDA, l'aspect de la colonie est examiné à l'œil nu. Pour déterminer les couleurs des colonies, on les examine à la lumière du jour.

L'identification est fondée sur l'examen des caractères suivant :

- L'aspect, le relief, la taille, la couleur des colonies
- Les structures de fructification.

#### I.4.2 Identification microscopique

L'identification microscopique des moisissures a été réalisée par la méthode de scotch.

➤ **Méthode de Scotch** : un petit morceau de scotch est appliqué par la face collante sur la colonie, puis déposé sur une lame porte–objet, l'observation microscopique est effectuée au microscope optique aux grossissements (GX 40).

## I.5 Production de protéases par fermentation :

### ❖ Mesure le taux d'humidité

L'humidité été mesure à l'aide d'un dessiccateur électronique, on a pris l'humidification a 50%. Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche.

$$H (\%) = [(P_0 - P_{\text{sec}}) / P_0] \times 100$$

P<sub>0</sub> : Poids frais

P sec : Poids sec

$$MS (\%) = 100 - H (\%)$$

### I.5.1 Fermentation liquide (submergée)

Pour la fermentation liquide, on a utilisé 6 substrats, on introduit dans chaque flacon 0.8g de chaque substrat (son de blé, les écorces de grenades, les écorces d'oranges, les écorces de pomme de terre, tourteaux de soja, les plumes de volaille)supplémenté à 40 ml de l'eau minérale ayant la composition suivante (g /l) :KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1.0 ;Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 ;CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.4;MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5 ;Nacl 0.3; NH<sub>4</sub>Cl 1, dont le pH est égale à 5.2.La préparation est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

Après stérilisation les flacons ont été inoculés avec 1 ml de la solution sporale préparé précédemment (10<sup>7</sup> spores /ml) de chaque souche (S1 et S2) dans des conditions stériles, incubé à 30°C pendant 7 jours (dans un Shaker).



**Figure 01** : Réalisation des fermentations submergées dans des flacons.

### I.5.2 Fermentation solide

Les fermentations ont été réalisées en Erlenmeyers de 250 ml, on introduit 10g de chaque substrat motionné précédemment supplémenté à 10 ml de l'eau minéral ; le contenu de chaque Erlenmeyer doit être bien mélangé. Les Erlenmeyers ont été bouchés au coton cardé est stérilisé par la suite à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

Après stérilisation les Erlenmeyers ont été inoculé avec 1 ml de la solution sporale préparé précédemment ( $10^7$  spores /ml) de chaque souche (S1 et S2) dans des conditions stériles, et on incube à 30°C pendant 7 jours dans l'étuve.

Après la fermentation, la protéase extracellulaire de chaque souche est extraite par l'ajout de 100 ml de l'eau distillée stérile, et après l'agitation manuelle à l'aide d'une spatule, le mélange est centrifugé à 7000 g pendant 20 min à 4°C, dont le surnageant récupérer représente l'extrait enzymatique brut utilisé pour les études analytiques.



**Figure 02 :** Réalisation des fermentations solides dans des Erlenmeyers de 250 ml.



**Figure 03 :** Réalisation des fermentations solides dans des Erlenmeyers de 250 ml.

**I.5.3 Production de protéases par fermentation mixte****➤ Fermentation liquide (submergée)**

La fermentation a été réalisée dans un flacon, on introduit 0.8g de son de blé supplémenté à 40 ml de l'eau minérale ayant la composition précédemment, dont le pH est égal à 5.2. La préparation est stérilisée par la suite à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

Après stérilisation le flacon a été inoculé avec 0.5 ml de la solution sporale de la souche 1 et 0.5 ml de la solution sporale de la souche 2 préparé précédemment ( $10^7$  spores /ml) dans des conditions stériles et ont incubé à 30°C pendant 7 jours dans un shaker du marque GFL 3033

**➤ Fermentation solide**

La fermentation est réalisée en Erlenmeyers de 250 ml, on introduit 10g de son de blé supplémenté à 10 ml de l'eau minéral ; le contenu de l'Erlenmeyer doit être bien mélangé. Les Erlenmeyers sont bouchés au coton cardé est stérilisé par la suite à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

Après stérilisation l'Erlenmeyer a été inoculé avec 0.5 ml de la solution sporale de la souche 1 et 0.5ml de la solution sporale de la souche 2 préparé précédemment ( $10^7$  spores /ml) dans des conditions stériles, et on incube à 30°C pendant 7 jours dans l'étuve.

Après la fermentation, la protéase extracellulaire de chaque souche est extraite par l'ajoute de 100 ml de l'eau distillée stérile, après l'agitation manuelle à l'aide d'une spatule, le mélange est centrifugé à 7000 g pendant 20 min à 4°C, dont le surnageant récupérer représente l'extrait enzymatique brut utilisé pour les études analytiques.

**I.6 Cinétique de production enzymatique des souches sélectionnées**

Des prélèvements effectués régulièrement chaque 24 h pendant 5 jours, pour la détermination de l'activité protéolytique pour les souches cultivées.

**I.6.1 Dosage de l'activité protéolytique**

L'objectif de la mesure de l'activité protéolytique est l'évaluation du taux de dégradation du substrat (caséine) par l'enzyme d'origine fongique pendant la réaction primaire. Pour

cela on mesure les concentrations en produits d'hydrolyse de la caséine, solubles dans l'acide trichloracétique (TCA) à 0.4 M.

L'addition du TCA arrête la réaction, et une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 min a permis de séparer le précipité de la caséine (culot) et de produit d'hydrolyse (surnageant), solubilisé dans le TCA

## I.7 Méthodes de dosage

### I.7.1 Dosage des protéines

#### I.7.1.1 Principe

Les protéines ont été dosées par la méthode de (**Bradford,1976**), ou le bleu de coomassie forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595 nm. La coloration très sensible peut être effectuée très rapidement et à l'obscurité, le Sérum Albumine Bovine (SAB) est utilisé comme standard.

#### I.7.1.2 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 tubes Solution et 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)	4ml	4ml	4 ml	4ml	4ml	4ml	4ml

## I.7.2 Activité protéolytique

### I.7.2.1 Préparation des extraits enzymatiques

Après la fermentation, les cultures ont été extraites avec 100 ml d'eau distillée stérile en assurant une agitation manuelle, le mélange est alors filtré à travers une passoire pour éliminer les solides (**Tunga et al. 2003**). Ce dernier, est conservé au congélateur pour le dosage de l'activité enzymatique.

### I.7.2.2 Méthode de dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée à partir de l'effet de l'enzyme sur la caséine. Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par la protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés (**Mathieu, 2005**). Cette quantité de tyrosine libérée, peut être mesurée directement par la méthode colorimétrique, décrite par, **Auberger et al. (1995)** et **Mechakra et al. (1999)**.

### I.7.2.3 Élaboration de la courbe d'étalonnage

- La concentration de la solution mère est de 0.4 mg /ml
- L'absorbance du blanc est de 0.140
- Incubé pendant 30 min

**Tableau 2 :** Préparation de la gamme d'étalonnage de la tyrosine

Les concentrations (µg/ml)	0	40	80	2	4
Solution mère	0	400	600	800	1000
Tampon Tris HCl (µl)	1000	600	400	200	0
TCA	1000	1000	1000	1000	1000

# **Résultats et discussions**

Ce travail porte sur la production de protéases secrétées par des champignons filamenteux par la réalisation des fermentations submergées et solide avec utilisation du son de blé comme substrat de culture. Les souches sélectionnées ont été également identifiées par des techniques macroscopique et microscopique

### **I. Identification des souches**

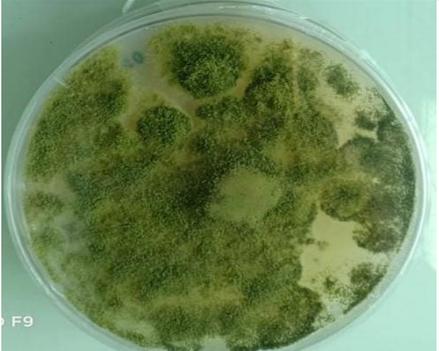
L'identification des deux souches obtenues étant basée essentiellement sur les clés de détermination décrites par la littérature (**Botton et al, 1990 ; Guiraud, 1998**), en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies ou spores (cloisonnement du mycélium, forme des spores, etc.).

#### **I.1 Etude macroscopique**

Les caractères macroscopiques des deux souches sont étudiés sur le milieu de culture PDA, qui est l'un des milieux les plus fréquemment utilisé.

Le Tableau (03) résume l'aspect macroscopique des colonies, des mycéliums, la texture, la couleur du mycélium, le diamètre de la colonie.

**Tableau 3 :** Etude macroscopique des souches fongiques.

Souche obtenue	Milieu de culture	Diamètre de colonie	Texture	La couleur de colonie	Image
<b>Souche 01</b>	PDA	Envahit toute la boîte	Poudreux	Blanche au début et entièrement verte après la sporulation	
<b>Souche 02</b>	PDA	Envahit toute la boîte	Poudreux	Blanc	

## I.2 Etude microscopique

L'étude macroscopique réalisée préalablement est accompagnée par une étude microscopique dans le but d'identifier les espèces sélectionnées. Les caractères microscopiques des souches obtenus ont été résumés dans le (Tableau 04).

**Tableau 4 :** Etude microscopique des souches fongiques.

Souches obtenues	Aspect microscopique du genre	Genre	Aspect microscopique obtenus
<b>Souche 01</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conidiophores lisses incolores qui sont terminé par une tête renflée</li> <li>-Les conidies de petite taille globuleuse</li> <li>- Présente un mycélium cloisonné</li> </ul>	<i>Aspergillus</i> Sp	
<b>Souche 02</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les spores rondes et lisses</li> <li>- Des phialides qui entoure à vésicule prolongeant le conidiphores</li> <li>- Présences des filamenteux hyalins cloisonnés, ramifiés</li> </ul>	<i>Aspergillus</i> Sp	

## II. Production de protéases par les différentes fermentations

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

Les fermentations réalisées (solides et submerger) ont permis après sept jours, de récupérer les filtrats pour chaque souche fermentée afin d'extraire les protéases et réaliser le dosage de l'activité enzymatique.



**Figure 04 :** Fermentations solides dans des Erlenmeyers de 250 ml.

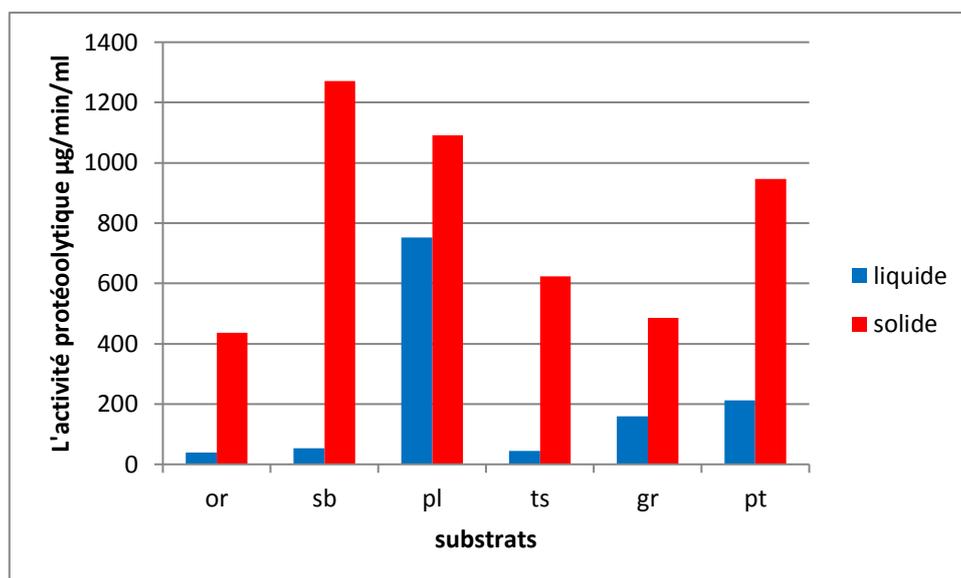


**Figure 05 :** Fermentations submergés dans des flacons.

Le filtrat qui en résulte de chaque opération a été exploité pour le dosage enzymatique.

### **II.1 Fermentations solides et liquide de la souche 01 (*Aspergillus* sp)**

Afin d'estimer l'aptitude des souches d'*Aspergillus* sp à produire des protéases sur le son de blé, l'activité protéolytique a été dosée. L'absorbance de l'échantillon mesurée est transformée en concentration par référence à la courbe d'étalonnage préalablement obtenue.

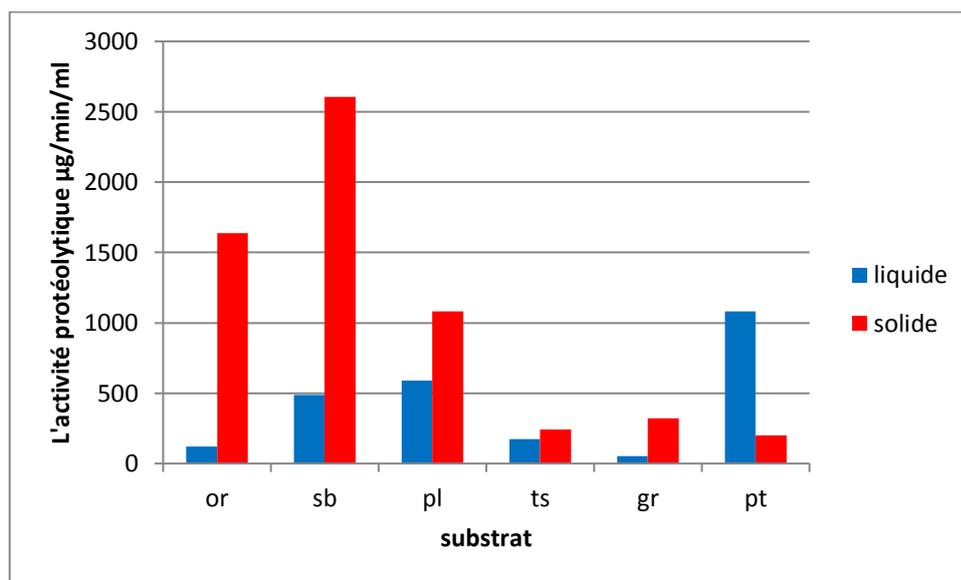


**Figure 06 :** Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche 1 dans le milieu solide et submergé par différents substrats.

❖ Au cours de la fermentation submergé on observe une activité faible avec les écorces d'orange, le son de blé et tourteaux de soja et une activité moyenne avec les écorces de grenade et les écorces de pomme de terre, par contre on observe une grande activité avec la plume. En remarque que la meilleure activité a été obtenue avec les plumes dans les fermentations submergé.

❖ Au cours de la fermentation solide on observe une activité faible avec les écorcés d'orange, tourteaux de soja et écorcés de grenade et une activité moyenne avec les plumes et la pomme de terre, par contre on observe une grande activité avec le son de blé. On remarque que la meilleure activité protéasique est obtenue avec le son de blé dans la fermentation solide.

### II.2 Fermentations solides et liquide de la souche 2 (*Aspergillus* sp)



**Figure 07 :** Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche 2 dans le milieu solide et liquide par différents substrats.

❖ Au cours de la fermentation submergée on observe une activité faible avec les écorces d'orange, écorces de grenade et tourteaux de soja et une activité moyenne avec les plumes et son de blé, par contre on observe une grande activité avec les grenades de pomme de terre. En remarque que la meilleure activité est obtenue avec les grenades de pomme de terre dans les fermentations submergées.

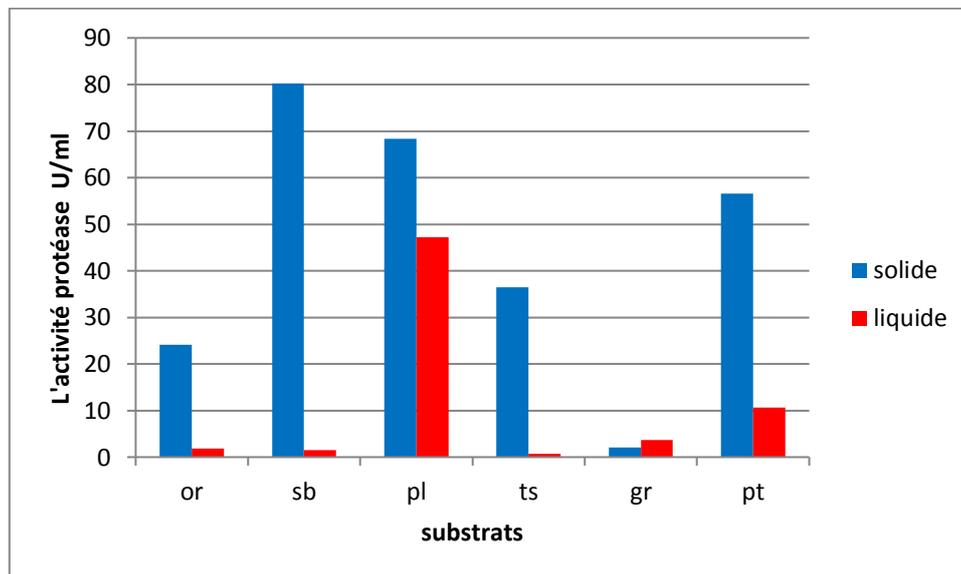
❖ Au cours de la fermentation solide on observe une activité faible avec les écorces de pomme de terre, tourteaux de soja et écorces de grenade et une activité moyenne avec les plumes et les écorcés d'orange, par contre on observe une grande activité avec le son de blé. En remarque que la meilleure activité est obtenue avec le son de blé dans la fermentation solide.

D'après les figures 1 et 2, on constate que parmi des différents substrats utilisés, les meilleures activités ont été obtenues avec le son de blé.

Les résultats ont montré que la production maximale de protéase de la souche 1 (1272 µg/min/ml) et (2604 µg/min/ml) pour la souche 2 ont été obtenues sur le son de blé comme substrat. Sur ce, le son de blé est un excellent substrat pour la production de protéase fongique par fermentation solide.

Selon (Boucherba,2011). Les meilleures activités sont obtenues avec le son de blé, ce dernier semble induire la production de xylanases, plusieurs études ont rapporté son efficacité comme inducteur de xylanases. Selon (Attyia et Ashour (2002)) La taille des particules constitue également un facteur critique dans la fermentation solide.

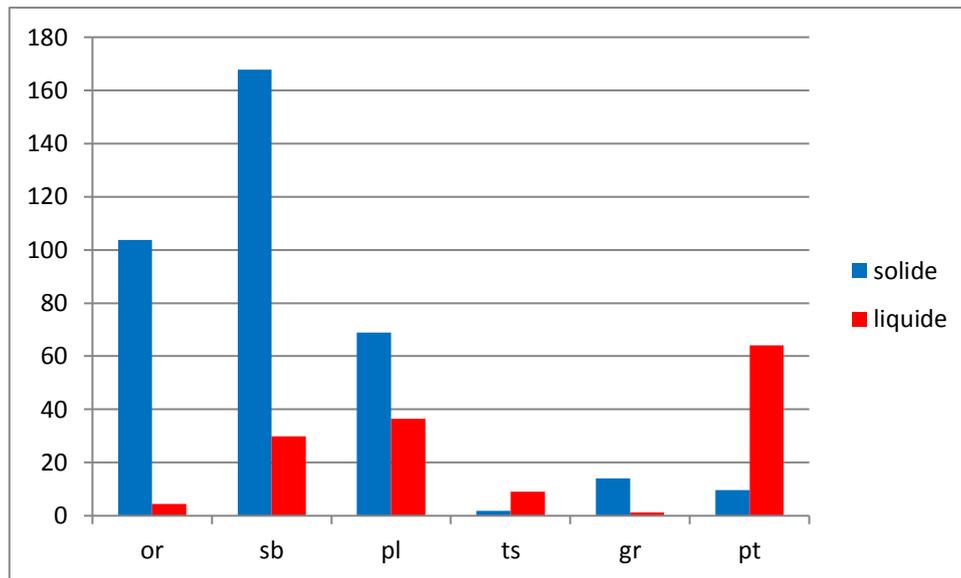
### III. Production de protéase par fermentation solide et submergée de différents déchets agro-alimentaire



**Figure 08 :** Production de protéase en FMS et FML par différents déchets pour la souche 01 (*Aspergillus* sp)

❖ La production de protéase en FML est faible avec les écorces d'orange, son de blé, les écorces de grenade, pomme de terre et avec le tourteau de soja est presque inexistant (0.68 U/ml), par contre on observe une activité moyenne avec les plumes de volaille qui atteignent 47,17 U/ml. En remarque que la meilleure activité de protéase est obtenue avec les plumes dans FML.

❖ Au cours de FMS la production de protéase est presque inexistant avec les écorces de grenade (2,12 U/ml), et on observe une moyenne activité avec les écorces d'orange, plume de volaille, tourteau de soja et pomme de terre, par contre avec le son de blé on a marqué une meilleure activité qui atteint jusqu'à 80,23 U/ml. En remarque que la meilleure activité de protéase est obtenue avec le son de blé dans FMS.



**Figure 09 :** Production de protéase en FMS et FML par différents déchets pour la souche 02(*Aspergillus sp*).

❖ Pour la souche 02(*Aspergillus sp*) la production de protéase en FML est faible avec son de blé, les plume et le tourteau de soja, et avec les écorces d'orange et les écorces de grenade est presque inexistant respectivement (4,44U/ml et 1,21 U/ml), par contre on observe une activité moyenne avec les pommes de terre qui atteindrent 64,16 U/ml. En remarque que la meilleure activité de protéase est obtenue avec les pommes de terre dans FML.

❖ Au cours de FMS la production de protéase pour la souche 02 est presque inexistante avec le tourteau de soja (1,81 U/ml), une faible activité marquée avec les écorces de grenade et pomme de terre respectivement (14,15U/ml et 9,71 U/ml) et on observe une moyenne activité avec les écorces d'orange, plume de volaille, par contre avec le son de blé on a marqué une meilleure activité qui atteindrent jusqu'à 167,86 U/ml. En remarque que la meilleure activité de protéase est obtenue avec le son de blé dans FMS.

D'après les figures 08 et 09, on constate que parmi les différents substrats utilisés des deux souches sélectionnées que le son de blé est un excellent substrat pour la production de protéase par FMS pour la souche 02(*Aspergillus sp*) (167,86U/ml).

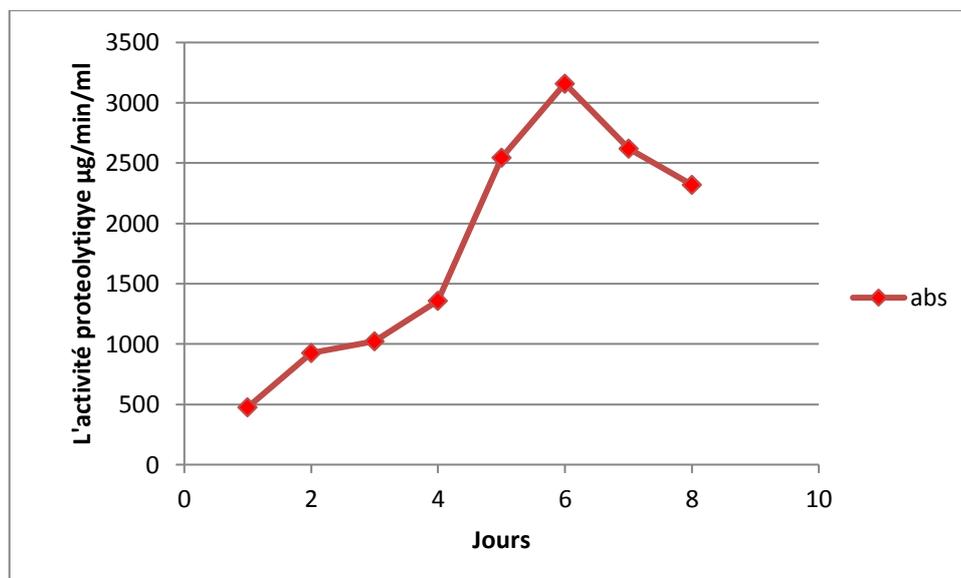
Selon (**Azzouz, 2015**) L'*Aspergillus sp* (BG) présente une meilleure activité avec le son de blé, Les activités maximales observées chez cette souche sont de 0,314, 0,602, 0,462 UI/ml avec respectivement la paille, le son de blé et le grignon d'olive. Ainsi,

chaque enzyme produite s'adapte probablement et dégrade un substrat disponible dans un environnement particulier et à un moment donné (Paes, Berrin, and Beaugrand 2012).

### IV. Cinétique de production de la protéase

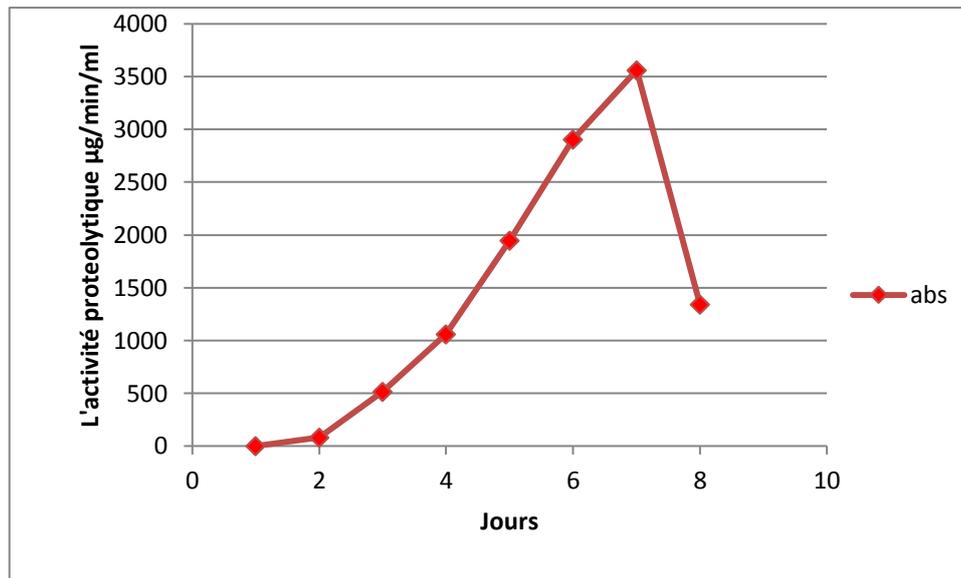
Pour déterminer le temps d'incubation optimal pour la production de protéase par l'*Aspergillus sp*, les cultures fongiques ont été incubées à différents temps allant de 1 à 8 jours.

La cinétique d'évolution de l'activité protéolytique des deux souches, durant le temps d'incubation dans un milieu solide à base de son de blés ont représentées dans les figures suivantes :



**Figure 10** : Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche 1 dans le milieu de fermentation solide (son de blé).

❖ La souche 1 : L'activité protéolytique testée dans le milieu de fermentation solide (son de blé) a montré que cette dernière a été détectée dans le filtrat de culture dès le premier jour, durant cette période l'activité est très faible. La production maximale de l'enzyme est obtenue après six jours de fermentation (3160µg/min/ml), au-delà de 6 jours, la production montre un déclin du rendement en production d'enzyme dans le milieu de culture, ce qui peut être dû à la diminution de nutriment dans le milieu de culture et l'accumulation des métabolites toxiques (Mukhtarand UI-Haq, 2009).



**Figure 11** : Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche 2 dans le milieu de fermentation solide (son de blé).

❖ Souche 2 : L'activité protéolytique testée dans le milieu de fermentation solide (son de blé) a montré que cette dernière a été détectée dans le filtrat de la culture dès le deuxième jour, durant cette période l'activité est très faible. La production maximale de l'enzyme est obtenue après sept jours de fermentation ( $3562\mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$ ), au-delà de 7 jours puis la production d'enzyme a progressivement diminué.

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

Une diminution progressive de l'activité protéolytique a été signalée avec l'augmentation du temps d'incubation, suggérant clairement le rôle d'enzyme en tant qu'un métabolite primaire, produit pendant la phase logarithmique de la croissance du champignon afin d'utiliser les nutriments (protéines) présents dans le substrat solide.

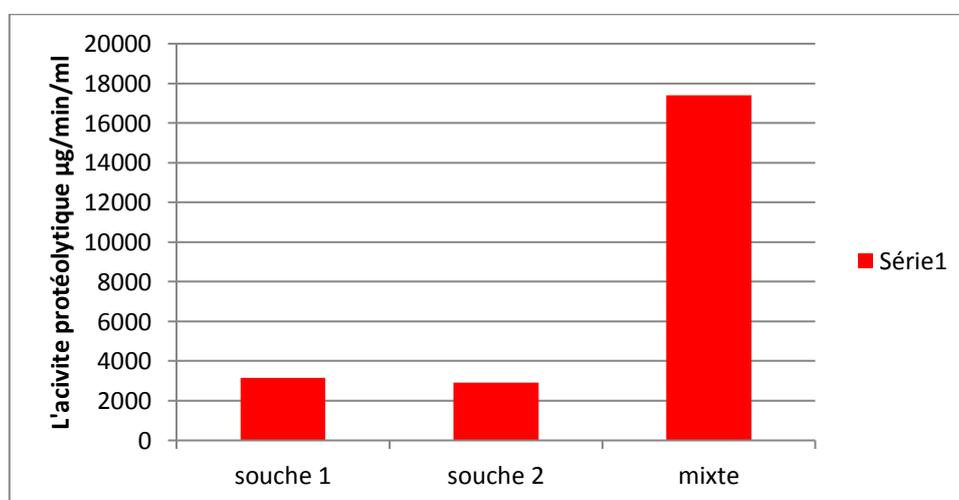
L'incubation au-delà de cette période optimale a montré un déclin rapide dans le rendement d'enzyme. Cette diminution était probablement due à l'épuisement des éléments nutritifs, l'inactivation d'enzyme par d'autres métabolites toxiques libérés dans le milieu (Sumantha et al., 2006). Par ailleurs, (Battaglino et al., 1991) indiquent un intervalle de temps de 72-96 heures nécessaire pour la production d'une activité maximale de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* cultivée sur le son de blé comme unique source de carbone en fermentation solides.

D'après ces résultats on trouve que l'activité protéolytique variée d'une souche à l'autre suivant la durée d'incubation dont la meilleure production de protéase est obtenue avec la souche 1 identifiée comme *Aspergillus* sp avec une valeur minimale de 476  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$  observé au premier jour et une valeur maximale de 3160  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$  au sixième jour d'incubation. (Hamaili et Benkerrou (2012)), ont rapporté une croissance significative dès le 1er jour avec *Trichoderma reesei* cultivée sur son de blé; cela est dû probablement à la composition du son de blé qui est variable notamment plus riche en vitamines, et en sels minéraux. La production de protéase la plus élevée a été obtenue en utilisant du son de blé comme substrat à 96 h de fermentation. Les résultats pour la composition chimique ont montré que les substrats à plus forte teneur en protéines induisaient la production de protéases au cours des 48 premières heures de fermentation (Castro et al., 2014). 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 (Rauf et al., 2010).

### V. Fermentation mixte

Le son de blé est utilisé comme substrat complexe des fermentations en milieu solide. La production de protéase avec les deux souches mixées est comparée avec les fermentations des deux souches séparées. Les activités protéolytiques sont mesurées après 6 jours d'incubation.

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures suivantes :



**Figure 12 :** Production de protéases par fermentation mixte sur le milieu solide après 6 jours d'incubation avec son de blé comme substrat.

D'après la figure 5, la production de protéases est meilleure en fermentation mixte solide par rapport à l'utilisation des deux souches séparément. Une activité maximale de 17400  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$  a été enregistrée. Dans la fermentation solide de la souche 1, l'activité est de 3167 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$  et concernant la souche 2, est de 2907 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$ . D'après les résultats de (Azzouz et al., 2020), les meilleurs rendements de production d'enzymes sont obtenus avec les fermentations solide, et que les meilleurs activité xylanasiqne et CMCasiqne sont obtenue avec la fermentation solide mixte. Selon (Hu et al.,2011) cette performance des cultures mixte s'explique par le fait que dans la nature, la biodégradation de la biomasse lignocellulosique est réalisée avec la synergie d'une variété de micro-organismes.

Ce résultat explique aussi le choix de l'espèce *Aspergillus* sp 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).

# **Conclusion**

Les enzymes fongiques peuvent être utilisées afin d'atteindre des buts souvent très différents les uns des autres. Elles sont utilisées dans l'industrie des pâtes et papiers, dans les textiles, dans les détergents, dans les tanneries, dans l'industrie alimentaire, dans celle des alcools, dans les boulangeries, dans les confiseries, dans l'industrie laitière ainsi que pharmaceutique.

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 produit par le genre *Aspergillus*, ce genre fongique est caractérisé par leur adaptation à la culture solide à base de substrat bon marché.

Le but de cette étude est la production de protéases par des champignons filamenteux du genre *Aspergillus* sur le milieu à base de son de blé. Le son de blé est un excellent substrat pour la production des protéases fongiques par fermentation solide.

L'identification des deux souches obtenues étant basée essentiellement sur les clés de détermination décrites par la littérature, en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies ou spores (cloisonnement du mycélium, forme des spores, forme des organes de fructification, etc.). Les deux souches appartiennent au genre *Aspergillus*.

Nos résultats montrent que la protéase acide produite par *Aspergillus* sp isolée possède les caractéristiques d'une enzyme intéressante à des applications industrielles.

Le dosage de l'activité protéolytique a montré que le son de blé est un milieu favorable à la production des protéases, pour la souche 01 est de 3160  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$  et concernant la souche 02 est de 3562  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$ , en effet elles produisent une activité très élevée en protéase acide pour la souche 01 est de 80.23 U/ml et 167,86 U/ml pour la souche 02.

# **Références bibliographiques**

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

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

**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.

**Azzouz. Z. (2021).** Production de cellulases et de xylanases fongiques par fermentation solide ; optimisation, caractérisation, synergies enzymatiques et saccharification de coproduits lignocellulosique. Thèse de doctorat. Université A. MIRA-BEJAIA.

**Azzouz.Z.(2015).** Production de cellulases et de xylanases fongiques par Fermentation solide et liquide à base de paille et de son de blé. Université A. MIRA-BEJAIA. Algérie .181.

**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.

**Bergmeyer, H.U., & Gawekn, K. (1979).** Principes de l'analyse enzymatique. Paris : Edition Tech et Doc. Lavoisier.

**Bettache. A. (2013).** Isolement et sélection d'actinomycètes producteurs d'enzymes cellulolytiques. Thèse de doctorat. Université A. MIRA-BEJAIA. Algérie .191.

**Blandeau E. (2012).** Etat des lieux du potentiel anticancéreux de neuf champignons macroscopiques.

**Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J. P., Reymond P., Sanglier J. J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2<sup>ème</sup> édition. Masson. Paris.

**Boucherba. N. (2011).** Production, purification et caractérisation d'une endoxylanase produite par une souche de *Jonesia denitrificans*. Thèse de doctorat. Université A. MIRA

**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. 2<sup>ème</sup> Ed. Masson. Paris. Millan. Barcelone. Mexico.

**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.

**Chutmanop. J. S., Chuichulcherm Y., Chisti et P. Srinophakun. (2008).** Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J. ChemTechnol. Biotechnol.* 83: 1012–1018.

**Coral, G., Arikan, B., Unaldi, M. N., & Guvenmez, H. (2003).** Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of microbiology*, 53(4), 491- 498.

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

**Frazier W. C. (1967).** Food microbiology. Academic Press. London. P: 3-429.

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

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

**Guiraud, J. P. (1998).** *Microbiologie alimentaire*. Paris: Edition Dunod.

**Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(1), 15-32.

**Hernández M. S., Marilú R., Nelson P. G. et 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.

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

**Kumar S., Sharma N.S., Saharan M. R. and Singh R. (2005).** Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*. purification and characterization. *Process Biochemistry*. 40. 1701-1705.

**Kumar, C.G., & Takagi, H. (1999).** Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 17: 561-594.

**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.

**Lecellier A. (2013).** Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Reims : Université de Reims Champagne-Ardenne, 195. P 9-27.

**Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O., & Turunen, O. (2001).** Industrial use of enzymes laboratory bioproc. Eng., Helsinki University of Technology, Finland.

**Mala, B. (1998).** Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol and Molecular Biology Reviews.*, 62 (3), 597–635.

**Mathieu, D. (2005).** Etude de la production des protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maitrise. INRS-Eau Université du Québec, Canada.

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

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

**Penasse, L. (1974).** Les enzymes cinétiques et mécanisme 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.

- Peppler, H. J., & Perlman, D. (1979).** Microbial technology. Academic press. San Francisco. P.42-60.
- Pol, D. (1996).** Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire. Ellipses edition marketing S.A, Paris.
- Prescott; Woolverton C.J; Sherwood L.M; Willey J.M. (2013).** Microbiologie. 4e édition. P 600-606.
- Radha, S. (2012).** Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid-state fermentation.
- Rahardjo Y. S. P., Tramper J., Rinzema A. (2006).** Modeling and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. Biotechnology Advances [enligne]. Vol. 24. n°2. p. 161-179.
- 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.
- 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(8), 2689-2694.
- Scriban, R. (1999).** Biotechnologie. 5eme édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (ed.). Paris.p : 401-409.
- Scriban. R. 1999.** Biotechnologie. 5eme édition technique et documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.
- Sethia, K. (2016).** Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus*. Journal of Taibah University for Science., 10(15), P 571–583.
- Souza, M. (2014).** A biotechnology perspective of fungal proteases. Brazilian Journal of Microbiology., 46, (2), 337-346.

**Sumantha A., Larroche C. and Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food- grade proteases. A perspective. Food Technology and Biotechnology. 44(2). 211-220.

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

**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.

**Tortora G.J., Funke B.R., and Case C.L. (2003).** Le métabolisme microbien. Introduction à la Microbiologie, 7, 124-168. p378-400.

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

**Verscheure M., Lognay G., and Marlier M. (2002).** Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. Biotechnologie, agronomie, société et environnement, 6(3), p132.

**Vishwanatha K. S., Appu Rao A. G. et Singh S. A. (2009).** Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114: 402-407.

**Wang, Q. (2008).** Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. Process Biochemistry.,(43), 280-286.

# **Annexes**

## Annexe N° 01 : Milieu de culture

### 1. Potato dextrose agar (PDA) (Guiraud, 1998)

#### Compositions

- Pomme de terre .....200 g
- Glucose .....20 g
- Agar .....20 g
- Eau distillée.....1000 ml

#### Protocole

- ✓ Mesuré par une balance, 200 g de la pomme de terre lavées et pelées.
- ✓ Couper en cubes dans 1000 ml d'eau distillée.
- ✓ Utilisé la plaque chauffante pendant 30 à 45 min.
- ✓ Filtrer par une passoire pour obtenir le filtrat.
- ✓ On ajoute de l'eau distillé pour un volume final de 1000 ml.
- ✓ Puis on ajoute 20g du glucose et 20g d'agar.
- ✓ Stériliser par autoclavage à 120° C pendant 20 min.

## Annexe N° 02 : Dosage des protéines (Bradford, 1976)

### Protocole

Les protéines ont été dosées par la méthode de **Bradford (1976)**, où le bleu de Coomassie forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595 nm. La coloration très sensible peut être effectuée très rapidement et reste stable pendant 30 min, le Sérum Albumine Bovine (BSA) est utilisé comme standard.

### Préparation de bleu de Coomassie :

- 50 mg bleu de Coomassie dissous dans 50 ml de méthanol à 95 %
- On ajoute 100 ml d'acide phosphorique à 85 % ;
- On complète le volume jusqu'à 1L par l'eau distillée.
- Agitation à froid pendant 24h.

## Annexe N°03 : Préparation de TCA (0.4 M)

### Composition

- 200 ml d'eau distillé
- 13.06g TCA (0.4 M)

### Protocole

- ✓ Mesuré par une balance 13.06g de TCA
- ✓ On fait dissoudre le TCA dans 200 ml d'eau distillé
- ✓ Faire une agitation à froid jusqu'à obtenir un mélange homogène

### **Annexe N°04 : Préparation de la solution substrat (caséine 2.5%)**

#### Composition

- 2.5g caséine
- 100 ml tampon Tris-Hcl (0.1M) pH =8

#### Protocole

- ✓ Mesure par une balance 2.5 g caséine
- ✓ Puis en dissoudre la caséine dans 100 ml tampon Tris-Hcl

### **Annexe N°05 : Préparation de la solution Tyrosine**

#### Composition :

- 4 mg Tyrosine
- 10 ml eau distillé

#### Protocole

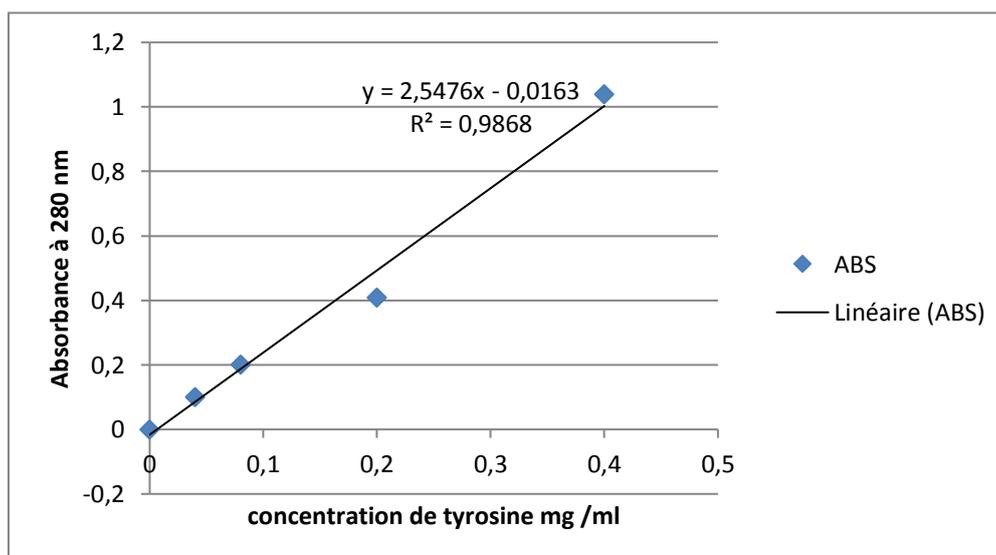
- ✓ Mesurer 4 mg de tyrosine.
- ✓ Dissoudre la tyrosine dans 10 ml d'eau distillé.

**Annexe N° 06 : Préparation de la courbe d'étalonnage de tyrosine**

La gamme étalon est préparé à partir d'une solution mère de tyrosine dont des concentrations sont comprise entre 0 et 0.4 mg/ml, comme indiqué dans le tableau suivant :

<b>Concentration (mg/ml)</b>	0	0.04	0.08	0.2	0.4
<b>Absorbance (280 nm)</b>	0	0.101	0.202	0.410	1.04

Après une agitation au VORTEX, laisser reposer 30 min à température ambiante. L'absorbance lue à 280 nm permet de tracer la courbe étalon suivante :



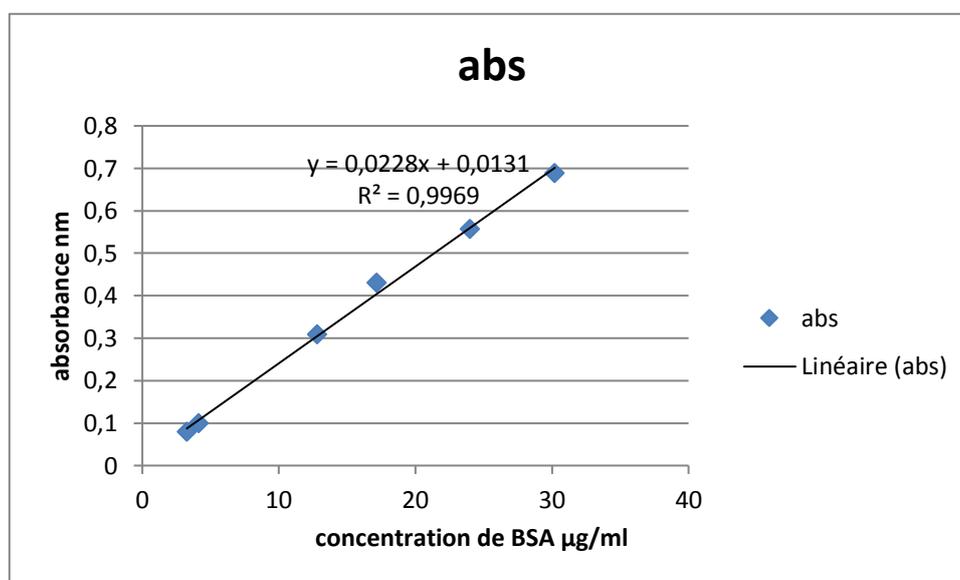
**Figure 11:** Courbe d'étalonnage de la tyrosine.

## Annexe N° 07 : Préparation de la courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines

Solution utilisées :

- Solution mère : BSA (Bovine Sérum Albumine)
- Réactif de Bradford

<b>Concentration <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	3.26	4.13	12.82	17.17	24	30.21
<b>Absorbance 595nm</b>	0.08	0.1	0.309	0.430	0.557	0.689



**Figure 12** : courbe étalon pour le dosage des protéines.

### **Annexe N° 08 : Préparation de l'eau tweenee**

#### Composition

- 1ml du tween 80
- 100 ml d'eau distillée

#### Protocole

- ✓ 1 ml de tween 80 additionné de 100 ml de l'eau distillée
- ✓ Autoclave à 121 °C pendant 20 min.

### **Annexe N° 09 : Préparation de LA solution M 9 (Tunga et al., 1998)**

#### Composition

- 01 g /l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- 0.8 g /l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .
- 0.4 g /l de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 05 g /l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.3 g/l de  $\text{NaCl}$
- 01 g/l de  $\text{NH}_4\text{Cl}$

#### Protocole

- ✓ Mesure par une balance chaque élément
- ✓ Faire dissoudre les éléments dans 2000 ml d'eau distillée
- ✓ Faire une agitation à froid.

## Résumé

Les protéases occupent la première place dans le marché mondial des enzymes, particulièrement par leur rôle potentiel dans la biotechnologie. Dans cet objectif une production de protéases par deux souches fongiques isolée à partir d'un fromage expiré a été réalisée. L'identification présomptive basée sur l'étude macroscopique et microscopique a montré que les deux souches appartiennent au genre *Aspergillus*. Les fermentations ont été réalisées sur milieu solide et submergés, les résultats montrent que la fermentation à état solide a donné les meilleurs rendements d'activités protéasiques par rapport aux fermentations liquide, et que le son de blé est marqué comme un bon substrat de fermentation. La fermentation mixte en présence des deux souches à base de son de blé donne une excellente production de protéase (17000 µg/min/ml). La production de l'enzyme est estimée par le dosage de l'activité protéolytique. Les résultats obtenus ont révélé que la souche 1 qui appartient au genre *Aspergillus* a donné une meilleure activité, qui est de 3160 µg/min/ml au bout du sixième jour d'incubation, par la fermentation solide (SSF) sur un résidu agroalimentaire peu couteux (son de blé) comme un excellent substrat. De ce fait, le son de blé représente un substrat très favorable pour la production des protéases acides vu sa richesse en protéines.

**Mots clés :** Protéases, Identification, *Aspergillus* sp, fermentation solide, son de blé.

## Abstract

Proteases occupy the first place in the world market for enzymes, particularly through their potential role in biotechnology. For this purpose, a production of proteases by two fungal strains isolated from an expired cheese was carried out. Presumptive identification based on macroscopic and microscopic study showed that the two strains belong to the genus *Aspergillus*. The fermentations were carried out on solid medium and submerged, the results show that solid state fermentation gave the best yields of protease activities compared to liquid fermentations, and that wheat bran is marked as a good fermentation substrate. The mixed fermentation in the presence of the two strains based on wheat bran gives an excellent production of protease (17000 µg/min/ml). Enzyme production is estimated by assaying proteolytic activity. The results obtained revealed that strain 1, which belongs to the genus *Aspergillus*, gave better activity, which is 3160 µg/min/ml at the end of the sixth day of incubation, by solid fermentation (SSF) on a slightly expensive (wheat bran) as an excellent substrate. Therefore, wheat bran represents a very favorable substrate for the production of acid proteases given its high protein content.

**Key words:** Proteases, Identification, *Aspergillus* sp, solid stat fermentation, wheat bran.

## ملخص

تحتل البروتياز المرتبة الأولى في السوق العالمية للأنزيمات، لا سيما من خلال دورها المحتمل في التكنولوجيا الحيوية. لهذا الغرض تم إنتاج البروتياز بواسطة سلالتين فطريتين معزولتين من جبن منتهي الصلاحية. أظهر التحديد الافتراضي القائم على الدراسة المجهرية والميكروسكوبية أن السلالتين تنتمي إلى جنس الرشاشيات. تم إجراء التخمير على وسط صلب ومغمور، وأظهرت النتائج أن تخمير الحالة الصلبة أعطى أفضل إنتاجية لأنشطة الأنزيم البروتيني مقارنة بالتخمير السائل، وأن نخالة القمح تتميز بأنها ركيزة تخمير جيدة. يعطي التخمير المختلط في وجود السلالتين المعتمدتين على نخالة القمح إنتاجًا ممتازًا للبروتياز (17000 ميكروغرام / دقيقة / مل). يتم تقدير إنتاج الإنزيم عن طريق فحص نشاط التحلل. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن السلالة 1 التي تنتمي إلى جنس الرشاشيات أعطت فعالية أفضل بلغت 3160 ميكروغرام / دقيقة / مل في نهاية اليوم السادس من ذلك، تمثل نخالة القمح ركيزة مواتية جدًا للحضانة، عن طريق التخمير الصلب على (نخالة القمح) كركيزة ممتازة (أرخص)، لإنتاج البروتياز الحمضي نظرًا لمحتواها العالي من البروتين.

**الكلمات المفتاحية:** البروتياز، التحديد، الرشاشيات، التخمير الصلب، نخالة القمح.