



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 :
Oussama TELLI et Nassima BOUYALA

Le : mardi 28 juin 2022

Thème

Production de protéases extracellulaires de moisissures d'*Aspergillus* : purification, caractérisation et optimisation

Jury :

M.	Redouane REBAI	MCA	Université de Biskra	Président
Mme.	Fatiha BENGUERAICHI	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	Imene MERZOUGUI	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

Tout d'abord, je remercie le bon Dieu le Tout Puissant, qui m'a inspiré la force et la volonté pour élaborer ce modeste travail de recherche.

J'exprime mes sincères et chaleureux remerciements à mon encadreur Dr. Fatiha Bengueraichi, qui m'a guidé et m'a encourager tout au long de ce travail, pour la richesse et la qualité de ses remarques, conseils et orientations qui m'ont permis de réaliser ce travail, aussi pour sa disponibilité et surtout pour sa gentillesse. Je tiens à lui exprimer toutes mes gratitude.

Je remercie l'ensemble des jurys, qui ont accepté de juger mon modeste travail.

Je remercie toutes les personnes qui ont apporté leur aide, et qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail de recherche scientifique.

Enfin, je représente ici, l'expression de mes sentiments de reconnaissances, de respect et de gratitude à l'ensemble des enseignants du département des Sciences de la nature et de la vie de l'Université Mohamed Kheider pour les connaissances et le savoir qu'ils m'ont transmis tout au long de ma formation.

Dédicaces

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail :

*A ma très **cher Mère**, qui me donne toujours la force et qui n'a jamais cessé de prier pour moi, pour son amour et son sacrifice afin que rien n'entrave la poursuite de mes études.*

*A mon très **cher père**, pour son soutien et ses encouragements et pour l'affection dont il m'a toujours entourée.*

Que Dieu le tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et une longue vie pour que vous demeuriez la lumière qui éclaire le chemin de ma vie.

*A mes **chers frères**,*

*A mes **chères Sœurs**,*

*A mes meilleurs amis : **Anis, Fares, Ilyes, Khaled, Aymen, Toufik, Adel, Amine, Zaki, Salah, Riadh, Hakim.***

*À mes amies (de biologie) : **Ahmed, Islam, Zaki, Chouaib, Oum Keltoum, Ibtissem, Nezha, Nadhira.***

*À mon cher binôme : **B. Nassima** de ces efforts énormes de réaliser ce travail, je le souhaite une bonne continuation et le succès dans sa vie.*

Enfin à tous ceux qui me portent dans leurs cœurs.

Oussama

Dédicaces

A mes très chers parents, source de vie, d'amour et d'affection,

A mes chers frères, sœurs et leurs enfants, source de joie et de bonheur,

A tous mes amis, tout particulièrement meriem, sabrina et nezha,

A Oussama, chère amie avant d'être binôme.

Nassima

Table des matières

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des Abréviations.....	III
Introduction	1

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre 01. Protéases

1.1 Généralités sur les protéases	3
1.2 Classification des protéases	3
1.3 Sources des protéases	3
1.3.1 Protéases d'origine végétales	3
1.3.2 Protéases d'origine animales.....	4
1.3.3 Protéases d'origine microbiennes	4
1.4 Meilleure source de protéase	4
1.4.1 Avantages économiques	4
1.4.2 Avantages techniques	4
1.5 Applications industrielles des protéases	5
1.5.1 Industrie alimentaire.....	5
1.5.2 Usage thérapeutique	5
1.5.3 Industrie des détergents	5
1.5.4 Industrie du cuir.....	6
1.5.5 Industrie Cosmétique.....	6

Chapitre 02. Microorganismes utilisés

2.1 Moisissures	7
2.2 <i>Aspergillus</i>	7
2.3 Protéases d'<i>Aspergillus</i>	8

Chapitre 03. Fermentation

3.1 Fermentation	9
3.2 Fermentation en milieu solide (SSF)	9
3.2.1 Microorganismes utilisés.....	9
3.2.2 Substrats utilisés.....	10
3.2.3 Avantages et inconvénients	10

Chapitre 04. Matériel et méthodes

4.1	Prélèvement ou échantillonnage	11
4.2	Isolement des moisissures	11
4.3	Mise en évidence de l'activité protéolytique	12
4.4	Identification des souches isolées	12
4.4.1	Identification morphologique	12
4.4.2	Identification moléculaire	14
4.5	Préparation de l'inoculum	15
4.5.1	Préparation de la suspension de spores	15
4.5.2	Dénombrement des spores	15
4.6	Fermentation sur milieu solide (Production)	16
4.7	Optimisation de la production de protéases	16
4.7.1	pH optimal de la production	16
4.7.2	Température optimale d'incubation	16
4.7.3	Temps d'incubation	17
4.7.4	Taux d'humidité du substrat	17
4.7.5	Concentration optimale d'inoculum	17
4.7.6	Effet des sources de carbone sur la production de protéases	17
4.7.7	Effet des sources d'azote sur la production de protéases	18
4.8	Extraction et dosage de l'activité protéase	18
4.8.1	Extraction	18
4.8.2	Mise en évidence de l'activité protéase	18
4.9	Purification partielle de l'enzyme	19
4.9.1	Précipitation par sulfate d'ammonium	19
4.9.2	Precipitation par acétone	20
4.9.3	Dialyse	21
4.9.4	Chromatographie par filtration sur gel	21
4.10	Caractérisation	22
4.10.1	Détermination de pH optimal	22
4.10.2	Détermination de la température optimale	23
4.11	Application	23
4.11.1	Coagulation du lait	23

4.11.2	Action de l'extrait enzymatique brut sur la gliadine.....	23
4.11.3	Compatibilité de la protéase alcaline avec les détergents commerciaux.....	24

Chapitre 05. Résultats et discussion

5.1	Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	25
5.2	Identification des souches isolées.....	25
5.2.1	Identification morphologique.....	25
5.2.2	Identification moléculaire.....	27
5.3	Optimisation de production.....	29
5.3.1	pH optimal de production.....	29
5.3.2	Température optimale de production.....	31
5.3.3	Période d'incubation optimale de production.....	31
5.3.4	Humidité optimale de production.....	32
5.3.5	Source optimale de carbone.....	33
5.3.6	Source optimale d'azote.....	34
5.4	Purification.....	35
5.5	Caractérisation.....	38
5.5.1	pH optimal.....	38
5.5.2	Température optimale.....	39
5.6	Application.....	41
5.6.1	Coagulation du lait.....	41
5.6.2	Action de l'extrait enzymatique brut sur la gliadine.....	41
5.6.3	Compatibilité de la protéase alcaline avec les détergents commerciaux.....	43
Conclusion.....		44
Références.....		45

Annexes

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques macroscopique et microscopiques des souches fongiques.....	25
Tableau 2. Identification du champignon avec le numéro d'accès NCBI.....	29
Tableau 3. Étapes de purification de la protéase d' <i>Aspergillus brasiliensis</i> BCW2.....	36
Tableau 4. MCA et PA de l'enzyme brute de <i>A. oryzae</i> DRDFS13.....	41
Tableau 5. Activité protéasique avec différents détergents	43

Liste des figures

Figure 1. Diverses applications de protéase.-----	6
Figure 2. Schéma microscopique du genre <i>Aspergillus</i> -----	7
Figure 3. Caractéristiques microscopiques du genre <i>Aspergillus</i> -----	8
Figure 4. Arbre phylogénétique basé sur la région ITS de la souche BCW2 d' <i>A.brasiliensis</i> .-----	28
Figure 5. Effet du pH sur la production de protéases par la souche BCW2 d' <i>A.brasiliensis</i> .-----	29
Figure 6. Effet du pH sur la production de protéases par la souche d' <i>A.niger</i> .-----	30
Figure 7. Effet de la période d'incubation sur la production de protéases par la souche d' <i>A.brasiliensis</i> .-----	31
Figure 8. Effet de la teneur en humidité sur la production de protéases par <i>A. oryzae DRFFS13</i> en SSF.-----	33
Figure 9. Effet de la source de carbone sur la production de protéases par la souche d' <i>A.brasiliensis</i> .-----	34
Figure 10. Comparaison du son de blé et du son de riz pour la production de protéases par <i>A.flavus</i> .-----	34
Figure 11. Effet de la source supplémentaire de N sur la production de MCP par <i>A. oryzae DRFFS13</i> .-----	35
Figure 12. Activité de protéase alcaline dans le surnageant (clair) et le culot (foncé).-----	37
Figure 13. Activité de la protéase dans les échantillons après chromatographie par filtration sur gel-----	37
Figure 14. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la protéase purifiée (<i>A.brasiliensis BCW2</i>)-----	38
Figure 15. Effet du pH sur l'activité de la protéase alcaline d' <i>A.flavus</i> .-----	38
Figure 16. Effet du pH sur l'activité de la protéase alcaline d' <i>A.niger</i> .-----	39
Figure 17. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la protéase purifiée (<i>A.brasiliensis</i>)-----	40
Figure 18. Effet de la température sur l'activité de la protéase purifiée (<i>A.flavus</i>)-----	40
Figure 19. Effet de la température sur l'activité de la protéase purifiée (<i>A.niger</i>)-----	40
Figure 20. Activité protéolytique avec différents substrats (caséine et gliadine)-----	42
Figure 21. Compatibilité de la forme de protéase alcaline <i>A. flavus</i> avec les détergents commerciaux.-----	43

Liste des Abréviations

EC : Enzyme Commission

pH: Potentiel d'Hydrogène

FDA: Food and Drug Administration

SSF: Solid State Fermentation

PDA: Potato Dextrose Agar

SDS: sodium dodecyl sulfate

EDTA: Éthylènediaminetétraacétique

PCR: Polymerase Chain Reaction

ITS: Internal Transcribed Spacer

BLASTN: Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide.

w/v: weight per volume

TCA: TriChloroacetic Acid

NCBI: National Center for Biotechnology Information

MCA: Milk Clotting Activity

Introduction

Introduction

Les enzymes sont des biocatalyseurs essentiels à la vie qui catalysent presque tous les processus biologiques. Les enzymes protéolytiques sont présentes dans tous les organismes vivants et aident à la croissance et à la différenciation des cellules. Les protéases sont le type dominant d'enzymes protéolytiques (Sharma *et al.*, 2019). La liaison peptidique présente dans la chaîne polypeptidique des acides aminés est hydrolysée au moyen de protéases. Les protéases sont des enzymes dégradantes et font preuve de spécificité et de sélectivité dans la modification des protéines en raison de leur utilisation intensive dans les industries laitières et détergentes, l'industrie chimique, le cuir, l'alimentation, le dégommeage de la soie et les industries pharmaceutiques (Abdul Razzaq *et al.*, 2019). Les protéases sont des enzymes très importantes, représentant plus de 60% des ventes totales d'enzymes dans le monde. C'est une entité universelle présente partout, à savoir dans les plantes, les animaux et les microbes. (Sharma *et al.*, 2019).

Mais parmi les sources les plus importantes de protéases, on trouve la source microbienne, et pour être plus précis, les champignons filamenteux tels que *Aspergillus* sont la source la plus importante pour la production de la plupart des enzymes industrielles. Quatre espèces dominent le trône de la production industrielle : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus brasiliensis* du fait de leurs diverses caractéristiques : Difficile à capter sur la nutrition et s'adapte aux conditions difficiles de température et de pH (Sharma *et al.*, 2019 ; Ward, 2019).

Actuellement, le procédé de fermentation solide dans la production industrielle d'enzymes est de plus en plus une méthode que la fermentation en milieu liquide (immergée), grâce aux avantages qu'il offre : Coût, facilité, temps... (Srivastava, 2019).

Dans ce cadre, notre objectif porte essentiellement sur l'étude des quatre points principaux :

- Prélèvement, Isolement, Identification des souches de moisissures ;
- l'optimisation de la production de ces enzymes par fermentation sur milieu solide (SSF) et optimisation de sa fonction en tant qu'enzyme brute dans des conditions idéales ;

- la caractérisation physicochimique de l'extrait enzymatique brut des souches de moisissures ;
- l'extraction et purification partielle de l'enzyme ;
- Applications de la protéase.

Pour cela, nous avons mené l'étude en deux parties :

La première partie comprend une synthèse bibliographique sur les protéases en général, les sources de protéases, les espèces productrices de protéases et les procédés de fermentation sur milieux solides.

La deuxième partie est consacrée aux méthodes utilisées pour atteindre les objectifs et aux résultats obtenus et à leur discussion.

Chapitre 01. Protéases

1.1 Généralités sur les protéases

Les protéases (protéinases, peptidases ou protéolytiques) (Rawlings, 2020) sont des enzymes omniprésentes avec des rôles physiologiques importants dans la synthèse et la dégradation (Solanki *et al.*, 2021). Appartiennent au groupe des hydrolases qui représentent une large classe d'enzymes qui décomposent ou hydrolysent les protéines ou les peptides. Les protéases agissent sur les liaisons peptidiques qui rejoignent et coupent les résidus d'acides aminés adjacents dans la molécule de protéine, ce qui entraîne la formation de peptides et d'acides aminés plus courts (Abdul Razzaq *et al.*, 2019) qui rompent les liaisons dans la phase aqueuse et se synthétisent dans la phase non aqueuse (Gupta *et al.*, 2020).

1.2 Classification des protéases

Selon "*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)*", les protéases appartiennent au groupe 3 (enzymes hydrolytiques) et sous-groupe 4 (qui hydrolyse des liaisons peptidiques).

Les protéases sont classées selon plusieurs paramètres tels que la longueur de la chaîne polypeptidique, la méthode d'attaque de la chaîne (Sharma *et al.*, 2019), le pH de l'activité et la nature des résidus inclus dans le site actif (Rawlings, 2019).

1.3 Sources des protéases

Les protéases peuvent avoir différentes origines : sont extraites de plantes ainsi que d'animaux ou de micro-organismes

1.3.1 Protéases d'origine végétales

Les enzymes protéolytiques jouent un rôle clé dans la physiologie des plantes. Ils maintiennent non seulement le pool protéique de la cellule, mais participent également à divers processus intracellulaires et extracellulaires, tels que la sénescence des feuilles, le développement et la maturation des fruits, la dégradation des protéines de stockage des graines pendant la germination, la régulation et d'autres mécanismes. Mais les enzymes d'origine végétale, sont techniquement par ordre décroissant. La bromélaïne (extraite de tige de l'ananas : *Ananas comosus*), la papaïne (extraite du latex de la plante équatoriale : *Carica papaya*), la ficine (*Ficus glabrata*) et la kératinase représentent certaines des protéases d'origine végétale bien connues (Abdul Razzaq *et al.*, 2019).

1.3.2 Protéases d'origine animales

Les protéases d'origine animale (porcine et bovine) sont principalement la trypsine, la chymotrypsine, issues du pancréas et la pepsine, issue de la muqueuse gastrique. Ces trois enzymes sont des endoprotéases présentant des spécificités différentes. La trypsine a une affinité pour la lysine et l'arginine, la chymotrypsine pour les acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp) et la pepsine principalement pour les acides aminés hydrophobes, elle est l'enzyme d'origine animale la plus largement utilisée (Naveed *et al.*, 2020).

1.3.3 Protéases d'origine microbiennes

Les protéases microbiennes sont bien accueillies à tous les niveaux en raison de leurs nombreux avantages, dont la stabilité face aux changements de température et de pH, et d'autre part, ce sont toutes des propriétés recherchées dans les applications industrielles, car elles sont produites par plusieurs organismes vivants, y compris les bactéries, les champignons, les levures (Abdul Razzaq *et al.*, 2019).

1.4 Meilleure source de protéase

Les micro-organismes (Bactéries, champignons, en particulier moisissures) constituent les deux-tiers de la part des protéases commerciales dans le monde car ils constituent une meilleure source que les plantes et les animaux pour plusieurs avantages techniques et économiques, notamment :

1.4.1 Avantages économiques

- ✓ Il peut être élevé en grande quantité dans une courte période et un petit espace.
- ✓ Extraction et manipulation génétiques plus faciles.
- ✓ Exempt de problèmes éthiques entourant l'utilisation des animaux.
- ✓ La même installation peut être généralement utilisée pour la production et l'extraction.
- ✓ Les enzymes d'origine végétale et animale présentent de grandes variations de rendement. et peuvent n'être disponibles qu'à certaines périodes de l'année.
- ✓ Relativement peu coûteux (Sharma *et al.*, 2019).

1.4.2 Avantages techniques

- ✓ Sa stabilité thermique et sa capacité à conserver son activité sous haute pression et acidité.
- ✓ Utiliser des méthodes et des techniques relativement simples.
- ✓ Produit un approvisionnement continu du produit requis.

Les enzymes microbiennes d'origine fongique sont plus favorables que les bactéries en raison du mode de croissance des hyphes fongiques et de leur bonne tolérance à une faible activité de l'eau et à des conditions osmotiques élevées (Daba *et al.*, 2021).

1.5 Applications industrielles des protéases

L'intérêt pour l'étude des protéases a augmenté non seulement en raison de la régulation de différents processus métaboliques, mais également en raison de l'utilisation importante dans la communauté industrielle (Figure 1). Les protéases microbiennes ont de nombreuses applications dans différentes industries énumérées ci-dessous :

1.5.1 Industrie alimentaire

Depuis plus de 40 ans, les protéases sont couramment utilisées pour la production d'hydrolysats de protéines qui peuvent être utilisés comme additifs pour améliorer la qualité nutritionnelle des aliments et des aliments composés. Brassage de céréales, production d'hydrolysats de protéines, fabrication de fromage et cuisson modifiant les caractéristiques viscoélastiques de la pâte (Naveed *et al.*, 2020).

1.5.2 Usage thérapeutique

L'activité catalytique des protéases en fait un candidat potentiel pour l'industrie pharmaceutique. La "U.S. Food and Drug Administration (FDA)" a approuvé une variété de protéases naturelles pour le traitement de différentes conditions cliniques et de nombreuses thérapies aux protéases sont actuellement en cours d'investigation clinique. Les subtilisines immobilisées ont été développées sous forme de formules à base de gel mou, d'onguents, de gaze, de tissus non tissés et de bandages pour le traitement des brûlures et des plaies. La protéase à activité collagénase est utilisée pour traiter des affections telles que la maladie de Dupuytren, la maladie de La Peyronie, la cicatrisation des plaies, les brûlures, le glaucome, le débridement, la chéloïde, la vitrectomie et la cellulite. Plusieurs autres protéases spécifiques ont également été utilisées pour le traitement de la thrombolyse (urokinase, fibrinolytique), de l'hémophilie (facteur VIIa), de la leucémie lymphocytaire (aspaginase) (Naeem *et al.*, 2022).

1.5.3 Industrie des détergents

Dans les industries de la détergence, un total de 30 % de la production mondiale d'enzymes est réalisé par des protéases et joue un rôle de premier plan dans de nombreuses applications de la récente biotechnologie industrielle. Aux États-Unis, 25 % des détergents (en poudre), 50 %

des détergents (liquides) et environ tous les agents de blanchiment en poudre contiennent des enzymes qui sont utiles pour éliminer les taches, qui sont difficiles à éliminer avec les tensioactifs habituels seuls. Les protéases jouent un rôle important dans l'hydrolyse de la grande molécule protéique liée aux souches dures. Au cours de l'hydrolyse, les liaisons peptidiques sont rompues qui maintiennent la molécule de protéine ensemble, libérant des polypeptides et des acides aminés plus petits. Ils agissent comme des ciseaux et coupent la tension en morceaux de la surface du tissu (Naveed *et al.*, 2020).

1.5.4 Industrie du cuir

L'application accrue de protéase dans les industries émergentes du cuir est due à l'activité élastolytique et kératinolytique. Ces propriétés influentes de la protéase sont très efficaces dans les industries de transformation du cuir. Les utilisations particulières de la protéase s'avèrent pertinentes dans la phase de trempage, de confitage et d'épilation de la préparation de la peau et des cuirs (Abdul Razzaq *et al.*, 2019).

1.5.5 Industrie Cosmétique

Dans l'industrie cosmétique, les protéases catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques qui relient la kératine, l'élastine et le collagène présents dans la peau. Des protéases comme la bromélaïne, la papaïne et bien d'autres ont été utilisées pour adoucir et peler la peau. La fonction de ces protéases est associée au renouvellement cellulaire, favorisant l'élimination des cellules décédées de l'épiderme et rétablissant les cellules similaires, et exerçant une activité kératinolytique (Naveed *et al.*, 2020).

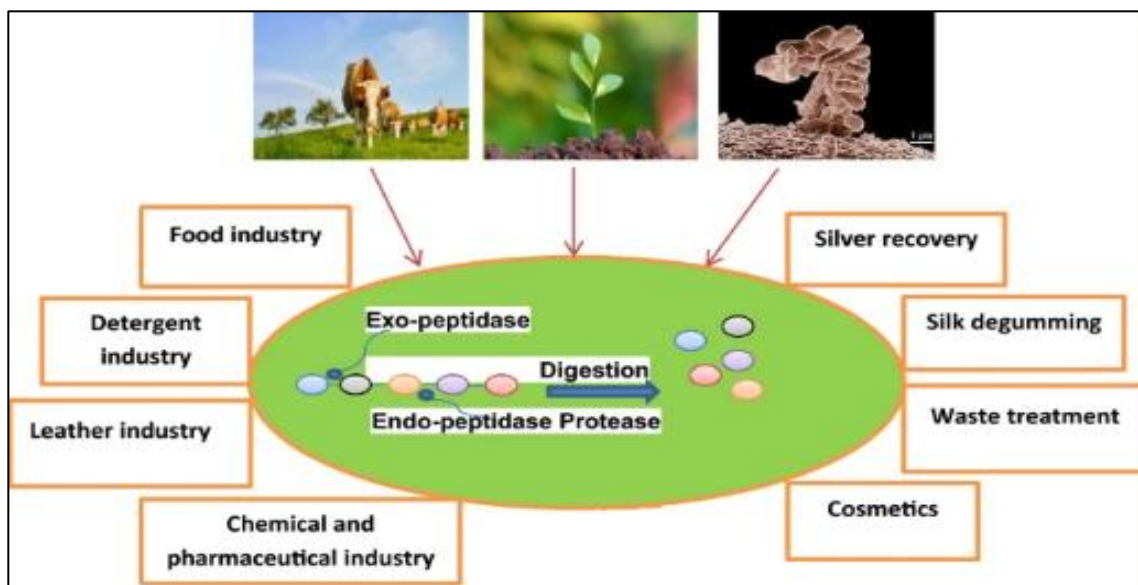


Figure 1. Diverses applications de protéase (Naveed *et al.*, 2020).

Chapitre 02.

Microorganismes

utilisés

2.1 Moisissures

La moisissure est un "champignon microscopique multicellulaire filamenteux, vert ou blanc, et des micro-organismes hétérotrophes, qui se développe sous l'influence de l'humidité", et nécessite des sources de carbone et d'azote. Moisissure peut aussi désigner le dépôt filamenteux laissé par le champignon mort (Lakhal *et al.*, 2004).

Certains types de moisissures ne sont pas des champignons et n'appartiennent pas au règne fongique, la différence essentielle entre eux et les champignons est qu'ils sont toujours multicellulaires, contrairement aux champignons possibles unicellulaires ou multicellulaires (Wijayawardene *et al.*, 2020 ; Lücking *et al.*, 2021).

2.2 *Aspergillus*

Aspergillus est un champignon filamenteux, semblable à la moisissure, avec des colonies duveteuses. Les thalles, hyalin, ont un mycélium cloisonné avec de nombreux conidiophores dressés se terminant par une vésicule (Figure 2, Figure 3). *Aspergillus* diffère de *Penicillium* en ce que l'apparence des conidies se termine par une tête enflée, alors que chez *Penicillium*, elles sont divisées en objets, donnant ainsi l'apparence de petites brosses (Abdel-Azeem *et al.*, 2019).

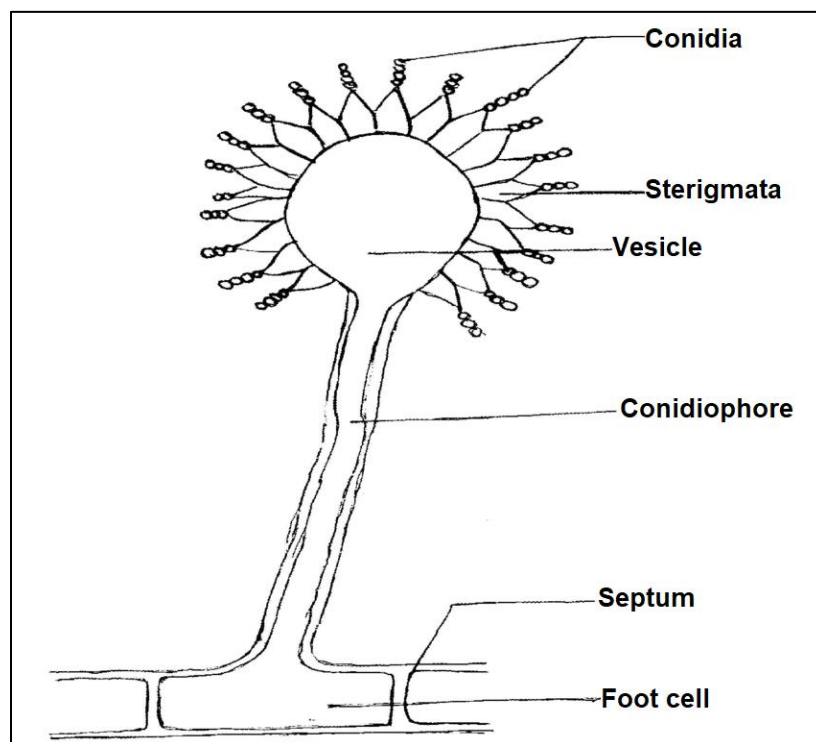
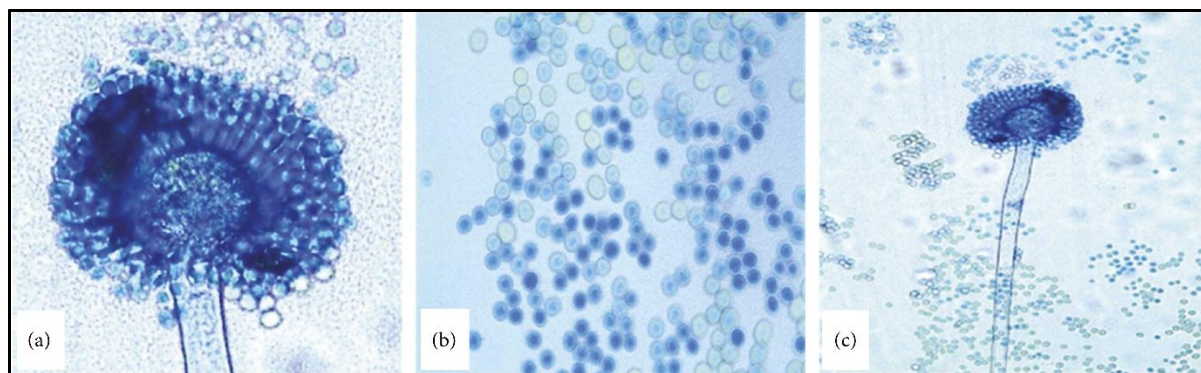


Figure 2. Schéma microscopique du genre *Aspergillus* (Kaur, 2019).



- a) Tête d'Aspergillus : phialides, conidies et vésicule.
- b) Les conidies globuleuses de tailles variables légèrement rugueuses.
- c) Conidiophore non ramifié non cloisonné, rugueux et hyaline.

Figure 3. Caractéristiques microscopiques du genre *Aspergillus* (Okayo *et al.*, 2020)

- ❖ 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*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus oryzae* ...etc (Schoch *et al.*, 2020).

2.3 Protéases d'*Aspergillus*

Les protéases peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *rhizomes*, *Geotricium*, *Fusarium*, *rhizomes* et *endothélium*, mais les espèces les plus couramment utilisées sont *Aspergillus*, en particulier : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus niger* (Saif *et al.*, 2021).

Chapitre 03.

Fermentation

3.1 Fermentation

La fermentation, du mot latin «fevere» (qui signifie "bouillir"), est l'une des technologies les plus anciennes et l'une des méthodes les plus importantes pour le traitement des aliments. Elle a récemment fait l'objet d'une grande attention en raison de son application potentielle dans la conversion d'une large gamme de substrats, comme les sous-produits agro-industriels à faible coût, en une variété de produits de valeur, tels que la biomasse microbienne ainsi que les métabolites microbiens primaires et secondaires.

Il existe deux types de procédés de fermentation : Fermentation liquide ou Fermentation Submergée (SMF) et Fermentation en milieu solide (SSF), mais nous sommes intéressés par notre travail de fermentation en milieu solide (Pérez *et al.*, 2022).

3.2 Fermentation en milieu solide (SSF)

La fermentation en milieu solide (SSF) est un processus de fermentation microbienne par lequel des micro-organismes sélectionnés (bactéries, champignons et levures) sont cultivés sur une matière organique humide, solide et non soluble qui agit comme support et source de nutriments pour la croissance des micro-organismes, dans le absence ou quasi-absence d'eau courante (Yafetto, 2022). La SSF a attiré l'attention ces dernières années en étant signalée comme une éco-technologie prometteuse qui permet d'obtenir des bioproduits d'intérêt industriel à partir de la biomasse solide : déchets et sous-produits (Cerda, 2019).

3.2.1 Microorganismes utilisés

Lors de la sélection de micro-organismes pour la production de métabolites en SSF, il faut considérer : une bonne tolérance à une faible activité de l'eau, des conditions de pression osmotique élevée et le schéma apical de croissance des hyphes donnent un avantage aux champignons filamenteux pour être mieux adaptés à ce type de procédé par rapport aux bactéries et levures (Manpreet *et al.*, 2005).

Les différents genres de champignons utilisés dans ce processus de fermentation sont : *Aspergillus*, *Rhizome*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Trichoderma* et certains types de *Penicillium* (Yafetto, 2022).

3.2.2 Substrats utilisés

Le coût et la disponibilité sont parmi les facteurs économiques et biologiques les plus importants dans le choix du substrat approprié. Par conséquent, les résidus alimentaires agricoles sont les plus intéressants, notamment pour les champignons filamenteux, pour leur pénétration facile de leur structure solide. Par contre, les bactéries et les levures se caractérisent par un développement en surface (Srivastava, 2019).

3.2.3 Avantages et inconvénients

Actuellement, le procédé de fermentation solide dans la production d'enzymes industrielles est une méthode de plus en plus utilisée par rapport à la fermentation en milieu liquide grâce aux avantages qu'elle procure, et parmi ces avantages nous avons :

- Facile à appliquer et à faible coût car il nécessite très peu de matériel.
- De plus, l'opération de mélange est facile à régler et, contrairement à la fermentation en milieu liquide, aucune mousse n'est générée lors de la SSF.
- Réduire les coûts et le temps consacrés à l'extraction et au recyclage des produits

Le substrat de culture n'a pas nécessairement besoin d'être stérilisé énergétiquement et nécessite peu d'espace et La faible teneur en humidité empêche la contamination. (Srivastava, 2019).

Bien que SSF offre des avantages uniques, il présente également des inconvénients problématiques :

- Les micro-organismes utilisés sont limités. En effet, seul qui peut être utilisé pour bien pousser dans une faible humidité, ce qui convient aux champignons filamenteux et à certaines bactéries qui aiment la sécheresse.
- Les connaissances physiologiques et techniques 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
- Le caractère solide et hétérogène des substrats utilisés complique le suivi direct des paramètres de fermentation. (Garro, 2021).

Chapitre 04.

Matériel et méthodes

4.1 Prélèvement ou échantillonnage

Quatre espèces d'*Aspergillus* ont été utilisées dans les travaux que nous étudions. Le premier échantillon a été prélevé dans le sol de la décharge dans la région de Shinko à Jimeta, dans l'État d'Adamawa, au Nigeria (Chimbekujwo *et al.*, 2020). Le deuxième échantillon a également été isolé du sol en Éthiopie (Mamo *et al.*, 2020). Le troisième échantillon a été isolé à partir d'abricots secs pré-exposés à l'air ambiant (Bougherara et Zerizer, 2021) et le quatrième échantillon a été obtenue au laboratoire de biotechnologie industrielle et environnementale, Institut universitaire de biochimie et de biotechnologie (UIBB), Université d'agriculture PMAS-Arid, Rawalpindi, Pakistan (Wajeeha *et al.*, 2020).

4.2 Isolement des moisissures

Les espèces d'*Aspergillus* obtenues à partir du sol ont été isolées par la méthode de dilution en série comme suit :

- ✓ Une truelle manuelle a été utilisée pour collecter environ 10 g de chaque sol supérieur dans un sac en plastique.
- ✓ 1 g de l'échantillon de sol a été mis en suspension dans 9 ml d'eau distillée stérile et a été bien mélangé.
- ✓ 1ml de la suspension de sol a été transféré dans 9 ml d'eau distillée stérile.
- ✓ La suspension de sol a ensuite été diluée dans sept autres 9 ml d'eau distillée stérile.
- ✓ Environ 0,1 ml de la dilution 10⁻⁵ a été étalé sur des boîtes de gélose dextrose de pomme de terre à l'aide d'un écarteur en verre, stérilisé par trempage dans de l'éthanol à 95% et flambé.
- ✓ Les boîtes ont été incubées à température ambiante pendant 5 jours. La croissance des colonies fongiques a été observée après incubation. Les colonies individuelles ont ensuite été subculturees.
- ✓ L'isolat a été maintenu sur de la gélose dextrose de pomme de terre (PDA) (voir annexe 1) à 4 °C jusqu'à son utilisation ultérieure (Oyeleke *et al.*, 2010).

Mais les échantillons prélevés sur les abricots secs ont été isolés de la manière suivante :

- ❖ Les fruits d'abricot collectés ont été soumis à un nettoyage de surface par lavage avec de l'eau distillée et des détergents.
- ❖ Il a ensuite été soumis à trois changements d'eau courante du robinet et laissé sécher.

- ❖ Une portion de 2 mm a été coupée avec un scalpel stérile. Le morceau coupé a été placé sur une boîte de PDA fraîchement préparée et incubé à 27,50 °C pendant trois (3) jours.
- ❖ Les colonies qui se sont développées ont été comptées et sous-cultivées à plusieurs reprises sur PDA pour obtenir des cultures pures (Jahun *et al.*, 2021).

4.3 Mise en évidence de l'activité protéolytique

La capacité d'une souche fongique à se développer dans un environnement de culture utilisant la protéine comme seule source d'azote et à générer des zones de protéolyse est appelée activité protéolytique (Vuorinen *et al.*, 2021).

Les colonies isolées sont ensemencées sur un milieu de lait gélosé (voir annexe 1) par culture au centre, l'incubation est réalisée en étuve à 37°C pendant 4 jours (Chimbekujwo *et al.*, 2020).

Le milieu (lait gélosé) présente de nombreux avantages tels que la simplicité de préparation, la polyvalence, la richesse en protéines et le faible coût. L'utilisation de cette méthode permet d'établir l'activité de la décomposition par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie productrice (Joshi, 2019).

La détermination de cette activité est basée sur la mesure du diamètre des anneaux transparents qui se forment autour des colonies fongiques. Le diamètre de cette zone est lié à la quantité d'enzymes extracellulaires produites par la moisissure. Les mesures sont prises du 2^{ème} au 7^{ème} jour (Colantuono *et al.*, 2020).

4.4 Identification des souches isolées

4.4.1 Identification morphologique

La détermination morphologique des isolats, fait essentiellement sur l'analyse des caractères cultureux et morphologiques, macroscopiques et microscopiques, des moisissures isolées à l'état pur.

4.4.1.1 Identification macroscopique (Caractères cultureux)

Après une culture incubée pendant 3-5 jours à 25-27°C dans PDA, les caractéristiques macroscopiques suivantes sont déterminées à l'œil nu :

- La couleur de colonies (blanc, jaune, vert, brun, noir), ces couleurs sont vérifiées du recto (surface) et en verso (verso).
- Texture (poudreuse, cotonneuse, plus ou moins aérienne).
- Taille.
- La vitesse de croissance des colonies peuvent varier considérablement, selon genres fongiques.
- L'odeur des colonies et changement de la couleur du milieu utilisé (Glampedakis *et al.*, 2020 ; Talukdar *et al.*, 2020 ; Pei *et al.*, 2021).
- La température d'incubation optimale pour sa croissance (Blaize, *et al.*, 2021).

4.4.1.2 Identification microscopique

Les études macroscopiques réalisées au préalable ont été complétées par des études microscopiques permettant d'identifier l'espèce de souche sélectionnée. Cette étude était basée sur les caractères suivants :

- Les conidies (diamètre et texture).
- Les conidiophores.
- Les phialides.
- Les hyphes.

L'identification microscopique des moisissures repose sur plusieurs méthodes dont deux sont le scotch pour les cultures filamenteuses et pulvérulentes et la méthode de coloration par le lactophénol bleu de coton (voir annexe 1).

Méthode de Scotch (technique de drapeau)

Un petit morceau de scotch est appliqué par la face de la colonie à l'aide d'une pince, puis déposé sur une lame porte –objet.

Coloration par le lactophénole bleu coton

Un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant (lactophénole bleu coton), recouvert d'une lamelle couvre-objet servant à écraser la préparation.

L'observation microscopique au microscope optique se fait à différents grossissements (X4, X10, X40, X100). Mais l'objectif x40 suffit à mettre en valeur les éléments importants (Pei *et al.*, 2021 ; Peraza-Jiménez *et al.*, 2021 ; Usman *et al.*, 2021).

4.4.2 Identification moléculaire

L'identification morphologique - macroscopique et microscopique - de la moisissure doit également être suivie d'une détermination à un autre niveau, qui est l'identification moléculaire, pour être une détermination précise.

Il existe plusieurs protocoles d'identification moléculaire, mais leurs étapes de base sont les suivantes :

1. Le bloc de mycélium a été ajouté à 500 μ L de tampon de lyse (1% SDS, 400 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 60 mM EDTA).
2. Le mélange final a été conservé pendant 10 min, puis 150 μ L d'acétate de potassium ont été ajoutés et les échantillons ont été homogénéisés pendant 1 min.
3. Suivi d'une centrifugation à 13 000 tr/min pendant 8 min, l'ADN isolé a été précipité en ajoutant un volume égal d'isopropanol et stocké pendant une nuit à - 20 °C.
4. Ensuite, le culot d'ADN obtenu après centrifugation a été lavé deux fois avec de l'éthanol à 70 % et dissous dans 50 μ L de tampon Tris-EDTA (voir annexe 2) (Talhi *et al.*, 2022).
5. Les amorces universelles utilisées pour l'amplification par PCR de la région ARNr de l'ITS étaient ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').
6. Les produits de PCR résultants ont été séquencés des deux côtés et les séquences consensus ont été analysées à l'aide de BLASTN disponible sur le site Web du National Center of Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

7. L'identité des champignons était basée sur le pourcentage d'homologie avec les séquences disponibles dans la base de données. CLUSTAL W a été utilisé pour l'alignement des séquences fongiques et celles récupérées de la GenBank.
8. Les distances ont été calculées et les arbres du maximum de vraisemblance (ML) ont été construits à l'aide du programme PhyML (Ben Mefteh *et al.*, 2019 ; Hamrouni *et al.*, 2019 ; Chimbekujwo *et al.*, 2020 ; Bezerra *et al.*, 2021).

4.5 Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum consiste à obtenir les organismes dans un état optimal compatible avec l'inoculation dans la culture cellulaire, la culture tissulaire, les milieux et les fermenteurs. L'objectif principal est généralement d'obtenir un niveau élevé de biomasse viable dans un état physiologique approprié pour être utilisé comme inoculum. Ceci a des applications en microbiologie industrielle pour obtenir des produits tels que des antimicrobiens, des enzymes, des boissons, des médicaments, des toxines, des vitamines, des acides aminés...etc (Lu-Chau *et al.*, 2019 ; Nighojkar *et al.*, 2019 ; Domínguez et MartaBerrocal, 2021).

Dans ce cas, ont été préparé un inoculum fongique pour la SSF afin de produire l'enzyme protéase. Pour cela, deux étapes sont réalisées : à savoir, la préparation de la suspension de spores, puis le dénombrement des spores :

4.5.1 Préparation de la suspension de spores

- La récupération des spores a été effectuée sur un milieu de Sabouraud (voir annexe 1) incubé à 30 °C pendant 5 jours.
- La suspension de spores fongiques a été obtenue par l'ajout d'une solution stérile de 0,1% de Tween 80 (10 ml/ Boîte de Petri).

4.5.2 Dénombrement des spores

- Après filtration, l'estimation du nombre de spores a été réalisée par mesure de l'absorbance à 650 nm.
- Les lectures photométriques ont été transformées en nombre de spores par cellule de Malassez sous microscope optique.

→ Un millilitre de la suspension de spores contenant 2×10^6 spores/ml, a été utilisé comme inoculum (Chimbekujwo *et al.*, 2020 ; Mamo *et al.*, 2020 ; Wajeeha *et al.*, 2020 ; Bougherara et Zerizer, 2021).

4.6 Fermentation sur milieu solide (Production)

- Le son de blé et le son de riz sont souvent utilisés comme milieu de production dans la SSF.
- Le son utilisé comme substrat a été broyé pour réduire la taille des particules, puis conservé dans des boîtes stériles avant utilisation.
- Cinq grammes (5 g) de son broyé complété par 4 ml d'une solution minérale (NH_4NO_3 0,5 ; KH_2PO_4 0,2 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 ; NaCl 0,1) ont été introduits dans des fioles Erlenmeyer de 250 ml.
- Après stérilisation, le milieu a été inoculé avec 1 ml de la suspension de spores fongiques à l'aide d'une pipette stérile.
- Puis incubé pendant le temps d'incubation souhaité à 28-30 °C.

4.7 Optimisation de la production de protéases

L'effet des paramètres suivants sur la production de protéase par la souche a été étudié. Chaque paramètre établi a été maintenu constant dans l'étude du paramètre suivant. Le dosage enzymatique a été effectué après 72 h d'incubation pour chaque paramètre :

4.7.1 pH optimal de la production

- ✓ En utilisant différentes gammes de pH comme 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10.
- ✓ Les ajustements du pH ont été effectués par l'addition d'acide chlorhydrique (0,1 N) et d'hydroxyde de sodium 0,1 N pour obtenir l'acidité et l'alcalinité respectivement.
- ✓ Les milieux d'optimisation avec le pH ci-dessus ont été inoculés avec l'échantillon à tester et la concentration des protéases totales de l'extrait enzymatique a été effectué après 72 h. (Muhammad *et al.*, 2019 ; Oliveira *et al.*, 2020 ; Pringgenies *et al.*, 2020 ; Usman *et al.*, 2021).

4.7.2 Température optimale d'incubation

L'effet de la température sur l'activité de la protéase a été étudié en prenant diverses plages de températures telles que 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100°C. Le milieu d'optimisation a été inoculé avec les échantillons de test à différentes températures et la concentration des protéases

totales de l'extrait enzymatique a été effectué après 72 h. (Chimbekujwo *et al.*, 2020 ; Lario *et al.*, 2020 ; Usman *et al.*, 2021).

4.7.3 Temps d'incubation

L'effet de la période d'incubation sur la protéase a été déterminé en incubant le milieu de fermentation pendant différentes périodes d'incubation en heures, c'est-à-dire 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 heures à un pH optimal et à une température optimale (Muhammad *et al.*, 2019 ; Chimbekujwo *et al.*, 2020 ; Mamo *et al.*, 2020).

4.7.4 Taux d'humidité du substrat

L'humidité initiale du substrat joue un rôle important dans la croissance des moisissures et la production d'enzymes dans la SSF. Pour déterminer l'effet de l'humidité, le substrat a été humidifié à 40, 45, 50, 55, 60 et 65% avec de l'eau distillée (Mamo *et al.*, 2020 ; Usman *et al.*, 2021).

4.7.5 Concentration optimale d'inoculum

L'effet de la taille de l'inoculum a été étudié en inoculant 0,1 (1×10^5 spores/mL), 0,5 (5×10^5 spores/mL), 1 (1×10^6 spores/mL), 2 (2×10^6 spores/mL), 3 (3×10^6 spores/mL) et 4 mL (4×10^6 spores/mL) de suspension de spores dans un milieu SSF et en testant les activités protéolytique (Elgammal *et al.*, 2020 ; Mamo *et al.*, 2020 ; Wajeeha *et al.*, 2020).

4.7.6 Effet des sources de carbone sur la production de protéases

L'effet de la source de carbone sur la production de protéase a été étudié en remplaçant le glucose dans le milieu de production par divers sucres simples et complexes dont le fructose, le maltose, le lactose, le sucrose, le glycérol, l'amidon et le galactose dont les sources étaient : le son de riz, la balle de riz, l'épi de maïs, la peau d'igname, la peau d'orange et le son de blé et le sorgho.

Un contrôle représenté par un milieu de production avec du glucose comme source de carbone a été réalisé en même temps.

Les flacons ont été inoculés avec le milieu et incubés à 35 °C pendant 48 h avec agitation à 150 rpm. L'activité enzymatique a ensuite été suivie (Chimbekujwo *et al.*, 2020 ; Mamo *et al.*, 2020 ; Wajeeha *et al.*, 2020 ; Armada *et al.*, 2021 ; Bezerra *et al.*, 2021 ; Pham *et al.*, 2021).

4.7.7 Effet des sources d'azote sur la production de protéases

L'influence de différentes sources d'azote (5,0 g) d'extrait de levure, de peptone, d'extrait de bœuf, de tryptone, de caséine (voir annexe 1) et de leurs combinaisons, d'acide glutamique, de glycine, d'acétate d'ammonium, de nitrate de sodium, de chlorure d'ammonium, de nitrate de potassium, de nitrate de sodium, de sulfate d'ammonium et de nitrate d'ammonium a été déterminée pour la production de protéase. Pour optimiser la meilleure source d'azote, différentes concentrations (1,0, 1,5, 2,0, 2,5 et 3,0 g/100 ml) ont été utilisées pour produire de la protéase (Ben Mefteh *et al.*, 2019 ; Chimbekujwo *et al.*, 2020 ; Mamo *et al.*, 2020 ; Pringgenies *et al.*, 2020 ; Wajeeha *et al.*, 2020 ; Pham *et al.*, 2021).

4.8 Extraction et dosage de l'activité protéase

4.8.1 Extraction

Après que les protéases extracellulaires sont produites par SSF, elles sont extraites par :

1. Le milieu fermenté a été repris dans 100 ml d'eau distillée dans un rapport 1:10 de solvant de son (p/v), d'une solution de NaCl 0,1 M, et d'une solution de Tween-80 (0,1%).
2. Ensuite, le mélange précédent est agité sur un agitateur rotatif : 240 rpm, 40 min, à température ambiante.
3. Le mélange a été filtré à travers un papier filtre Whatman No. 1.
4. Le filtrat a été centrifugé à 10 000g pendant 10 min à 4 °C.
5. Le surnageant récupéré, représentant l'enzyme brute, a été conservé au frais à 4 °C pour être utilisé pour le dosage de l'activité protéolytique (Lizardi-Jiménez *et al.*, 2019 ; Chimbekujwo *et al.*, 2020 ; Mamo *et al.*, 2020 ; Madhu *et al.*, 2020 ; Wajeeha *et al.*, 2020 ; Bougherara et Zerizer, 2021).

4.8.2 Mise en évidence de l'activité protéase

L'activité protéolytique est déterminée par l'effet de l'enzyme sur la caséine suivant la méthode d'Anson, (1938). Par conséquent, lorsque la caséine est hydrolysée par des protéases, une certaine quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés. La quantité de tyrosine libérée peut être directement mesurée par colorimétrie.

La tyrosine est utilisée comme étalon pour le dosage colorimétrique de l'activité protéolytique. Simplement parce qu'il s'agit d'un acide aminé présent dans toutes les protéines, et

ce dosage est effectué à l'aide du réactif Folin-Ciocalteu qui est le réactif chromophore le plus couramment utilisé pour quantifier les produits de dégradation (utilisés dans environ 40 % des études colorimétriques) et réagit avec les résidus de tyrosine. Le produit en tant que produit de dégradation par les enzymes protéases pour former le chromophore bleu. Puisqu'il réagit avec la tyrosine, la quantité de tyrosine produite pendant une certaine période de temps peut être mesurée et comparée à un étalon de tyrosine (Greenfield *et al.*, 2021).

- le mélange réactionnel contenait 1 ml de caséine à 2 % (préparée dans un tampon phosphate à pH 7,0) (voir annexe 2) et 1 ml de la solution d'enzyme brute.
- Le mélange a été incubé pendant 30 minutes à 40 °C.
- La réaction enzymatique a été arrêtée en ajoutant 2 ml de TCA (acide trichloracétique) (0,4 M) refroidi, le mélange a été centrifugé à 4500 rpm pendant 10 min à 4 °C.
- Puis (1 ml) du surnageant a été transféré dans un autre tube dans lequel 5 ml de Na₂CO₃ 0.4 M et 1 ml de réactif Folin Ciocalteu 10%, ont été ajoutés.
- Après incubation pendant 20 min à 40 °C dans l'obscurité, l'absorbance du mélange a été mesurée à 750 nm.
- Le contrôle a été préparé dans les mêmes conditions, sauf que l'acide trichloracétique a été ajouté avant le substrat. L'unité de protéase (UP) équivaut à 1 µg de tyrosine libérée par ml d'enzyme et par minute dans les conditions de l'essai (Chimbekujwo *et al.*, 2020 ; Mamo *et al.*, 2020 ; Wajeeha *et al.*, 2020 ; Bougherara et Zerizer, 2021).

4.9 Purification partielle de l'enzyme

Une purification partielle de l'enzyme peut être réalisée en précipitant les protéines avec du sulfate d'ammonium ou de l'acétone, suivie d'une dialyse sur membrane semi-perméable et d'une filtration sur gel.

4.9.1 Précipitation par sulfate d'ammonium

4.9.1.1 Principe

La précipitation au sulfate d'ammonium est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour la purification et le fractionnement des protéines à grande échelle et en laboratoire qui peuvent être utilisées pour séparer les protéines en modifiant leur solubilité en présence d'une concentration élevée en sel selon la nature de la protéine à extraire (Naveed *et al.*, 2019 ; Koteswara *et al.*, 2021).

4.9.1.2 Mode opératoire

- Les protéines de l'extrait enzymatique brut ont été purifiées en ajoutant du sulfate d'ammonium selon différents niveaux de saturation du sel, notamment 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % et 85 %.
- Les échantillons ont été laissés pendant une nuit à 4 °C.
- Ensuite, les échantillons ont été centrifugés pendant 15 minutes, à 4 °C, et à 10 000 tours/minute.
- Les sédiments ont été dissoutes dans 1,5 ml de tampon Tris-HCl (pH 8,5)(voir annexe 2). Le surnageant et la palette ont été soumis à un test de protéase. (Chimbekujwo *et al.*, 2020 ; Mamo *et al.*, 2020 ; Wajeaha *et al.*, 2020).

4.9.2 Précipitation par acétone

Mamo *et al.*, (2020) ont précipité les protéines avec de l'acétone avant de les précipiter avec du sulfate d'ammonium, ils ont mis en place le protocole décrit ci-dessous.

4.9.2.1 Principe

La précipitation au TCA/acétone, une méthode courante d'extraction et purification des protéines, minimise la dégradation des protéines et l'activité des protéases, ainsi que la réduction des contaminants tels que les sels et les polyphénols. Cependant, la méthode de précipitation TCA/acétone repose sur la pulvérisation complète et le rinçage répété de la poudre de tissu pour éliminer les substances interférentes, ce qui est laborieux et prend du temps (Mamo *et al.*, 2020 ; Niu *et al.*, 2019).

4.9.2.2 Mode opératoire

- L'extrait enzymatique brut a été précipité avec de l'acétone refroidie (acétone ou acétone à 75 %).
- Deux volumes d'acétone réfrigérée ont été lentement ajoutés à l'extrait, puis le précipité a été laissé reposer pendant 1 h à - 18 °C pour permettre une précipitation complète.
- La protéine précipitée a été séparée par centrifugation (centrifugeuse Heraeus Pico17/21, Thermo Electron Led, Allemagne) à 10000g pendant 10 min à 4 °C.
- Le culot a ensuite été séché à l'air libre pendant 30 min et dissous dans un tampon phosphate 0,02 M, pH 6,0(voir annexe 2) pour éliminer les traces d'acétone (Mamo *et al.*, 2020).

4.9.3 Dialyse

4.9.3.1 Principe

La dialyse est une méthode de séparation basée sur le mouvement des molécules du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré à travers une membrane semi-perméable. Seules les molécules de dimensions inférieures au diamètre des pores de la membrane peuvent diffuser des deux côtés et atteindre l'équilibre avec le volume total de solution dans le système, tel que le volume de solvants, de sels et de petits métabolites. En revanche, les macromolécules telles que les protéines sont non diffusibles et elles resteront dans le même compartiment membranaire qu'au début de l'expérience (Soria *et al.*, 2019 ; Rapalli et Singhvi, 2020).

4.9.3.2 Mode opératoire

La solution échantillon a été placée dans un boudin de dialyse (12 000 Da) dans lesquels les protéines précipitées en suspension dans un volume réduit de solution de citrate de sodium (0,1 M ; pH 5,2) (voir annexe 2) ont été lavées contre le même tampon, en utilisant une membrane semi-perméable sous agitation douce à 4 °C pendant 12 h avec un seul changement après 4 h.

Par la suite, la fraction protéique diluée est concentrée en recouvrant le boudin avec une solution de saccharose à 50% pendant 2h (Chimbekujwo *et al.*, 2020).

4.9.4 Chromatographie par filtration sur gel

4.9.4.1 Principe

Purification des protéines par chromatographie de filtration sur gel est basée sur la taille moléculaire et le volume hydrodynamique des composants. Lorsque les solutés traversent la phase stationnaire constituée de pores de différentes tailles et de gels ou de billes polymères réticulés, la séparation est obtenue par exclusion ou inclusion différentielle des solutés.

L'ensemble du processus de séparation dépend des différents taux de perméation de chaque molécule dissoute dans les particules de gel. Les particules de petite taille se déplacent à travers les pores et parcourent un chemin plus long et sont éluées en dernier, tandis que les particules de grande taille ne se déplacent qu'à travers quelques pores et parcourent donc un chemin plus court et sont éluées en premier (Masoodi *et al.*, 2021).

4.9.4.2 Mode opératoire

- Une chromatographie par filtration sur gel a été réalisée pour la purification de l'enzyme. La résine Sephadex G-100 (taille des billes 20 à 50 μm) a été utilisée pour la chromatographie de filtration sur gel. Elle a été placée dans une colonne de 3 cm \times 100 cm.
- Le gel a été équilibré avec un tampon tris-HCl 0,05 M (pH 8) et élué avec le même tampon à un débit de 30 mL/h.
- Au total, 30 éluats (1 ml) ont été recueillis et les cinq premières ont été rejetées et les 25 autres éluats ont été dosées pour l'activité protéase (Chimbekujwo *et al.*, 2020 ; Wajeeha *et al.*, 2020).

4.10 Caractérisation

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

4.10.1 Détermination de pH optimal

Selon Wajeeha (2020) ont mesuré le pH optimal par dosage de l'activité protéolytique à des pH variant de 6,5 à 11. Le tampon Tris-HCl a été utilisé pour maintenir le pH entre 6,5 et 8,5 et le tampon bicarbonate de sodium entre 9,5 et 11,5.

Mais dans l'étude de Bougherara et Zerizer (2021), le pH optimal a été déterminé en effectuant la réaction enzymatique dans des solutions tampons à différents pH allant de 1,0 à 10,0 : tampon HCl-KCl (0,2 M) (pH 1,0 - 2,0), tampon acide citrique - Na₂HPO₄ (0,1 M / 0,2 M) (pH 3,0, 4,0, 5,0 et 6,0), tampon phosphate (0,1 M) (pH 7,0 - 8,0) (voir annexe 2) et tampon glycine - NaOH (0,2 M) (pH 9,0 - 10,0) (voir annexe 2).

Alors que, la méthode de Chimbekujwo (2020) est comme suit : influence du pH sur l'activité enzymatique de la protéase a été déterminée avec l'azocaséine 1% (p/v) comme substrat. L'activité a été déterminée à des valeurs de pH variables allant de 4,0 à 10,0 à 40 °C pendant 10 min en utilisant différents systèmes de tampon. Les études de stabilité du pH ont été réalisées en pré-incubant l'enzyme purifiée sans substrat dans des valeurs de pH allant de 4,0 à 10,0 à 40 °C pendant 2 h et l'activité protéolytique résiduelle a été déterminée dans des conditions de test standard.

4.10.2 Détermination de la température optimale

L'effet de la température sur l'activité protéolytique a été déterminé en estimant l'activité protéolytique à un pH optimal dans une gamme de température de 30-60 °C selon Chimbekujwo et al. (2020), 25-50°C selon Wajeeha et al. (2020) et 30-80 °C selon Bougherara et Zerizer (2021) pendant 2 h en utilisant la caséine comme substrat.

4.11 Application

4.11.1 Coagulation du lait

La coagulation du lait est provoquée par la dénaturation de la caséine à partir l'extrait enzymatique.

- Dans un tube à essai de 12 ml contient 5 ml de lait écrémé reconstitué (Nestlé TM) pré-incubé à 35 °C pendant 10 min ajouté 0,5 ml de l'enzyme brute.
- La solution de lait écrémé reconstitué (Nestlé TM) est composée de 10 g de lait écrémé sec/100 ml de la solution de CaCl₂ à de 0,01 M.
- Le temps de coagulation a été quantifié en unité Soxhlet (SU) selon la formule suivante :
$$SU = (2400 * 5 * D) / (T * 0,5)$$

D : la dilution de l'enzyme brute

T : le temps de coagulation (s)

Une SU est exprimé comme la quantité d'enzyme nécessaire pour coaguler 1 ml d'une solution comprenant 0,1 g de poudre de lait écrémé et 0,01 M c'est une concentration de chlorures de calcium à 35 °C en 40 min (Mamo *et al.*, 2020).

4.11.2 Action de l'extrait enzymatique brut sur la gliadine

Extraction de la gliadine :

- 1 ml de propanol-1 à 50 % a été ajouté au blé (v/v) ; la gliadine a été extrait à partir des graines de blé (*Triticum durum* et *Triticum aestivum*).
- Après une incubation de 30 min à 65 °C avec deux tourbillons intermédiaires agités toutes les 10 min. une centrifugation finale a ensuite été effectuée à 10 000 rpm pendant 15 minutes.

- La deuxième extraction a été effectuée sans agitation intermédiaire. La fraction de gliadine présente dans le surnageant a été aspirée et évaporée à 65 °C pendant 12 h.

Incubation d'extrait enzymatique brut avec de la gliadine :

- 10 mg de gliadine ont été dilués dans 0,5 ml de tampon citrate phosphate (0,1 M, pH 7,5).
- Le mélange a été ajouté à 1 ml de l'extrait enzymatique brut, puis incubé pendant 2 h à 37 °C.
- La réaction a été arrêtée en ajoutant 2 ml d'acide trichloroacétique refroidi (0,4 M).
- L'activité protéolytique du mélange a été mesurée selon le même protocole décrit précédemment (Bougherara et Zerizer, 2021).

4.11.3 Compatibilité de la protéase alcaline avec les détergents commerciaux

- Dans l'eau distillée ont été préparées quatre solutions détergentes commerciales (7 mg/ml) Surf Excel, Ariel, Brite et Bonus.
- Après refroidissement, le mélange réactionnel a été préparé en ajoutant 5 ml de caséine à 0,65 % préparée dans un tampon tris-HCl (0,1 M, pH 7,5) et 1 ml de solution détergente.
- Après 10 min d'incubation, 1 ml de solution enzymatique a été ajouté à tous les mélanges réactionnels.
- Ceux-ci ont été maintenus à 45°C pendant 30 min. Après 30 min, la réaction a été stoppée par l'ajout de 5 ml d'une solution de TCA à 10 %.
- Le mélange a été laissé à nouveau à température ambiante (25°C) pendant 30 min et filtré à travers un papier filtre Whatman n° 1.
- Ensuite, 2 ml du filtrat ont été transférés dans un autre tube.
- 5 ml de carbonate de sodium (0,5 M) ont été ajoutés, suivis de 1 ml de réactif FC 0,5 M. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 30 min. et DO a été mesurée à 660 nm (Wajeaha *et al.*, 2020).

Chapitre 05.

Résultats et discussion

5.1 Mise en évidence de l'activité protéolytique

La première souche fongique (*Aspergillus brasiliensis*) utilisée pour cette étude a été isolée à partir d'échantillons de sol prélevés dans la décharge de la région de Shinko à Jimeta, dans l'État d'Adamawa, au Nigéria. Il a présenté une activité protéolytique en hydrolysant la caséine avec une zone de diamètre de 38,0 mm (Chimbekujwo *et al.*, 2020).

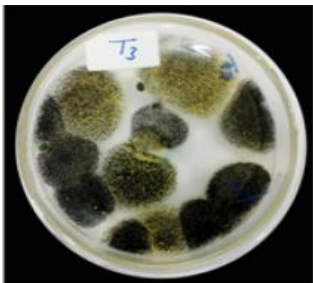
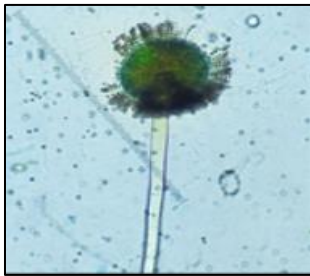
Dans le cas d'*Aspergillus oryzae* et d'*Aspergillus niger* l'activité protéolytique non déterminé et l'échantillon de laboratoire (*Aspergillus flavus*) déjà prêté.

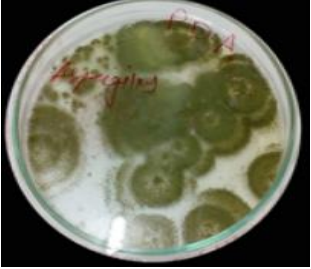

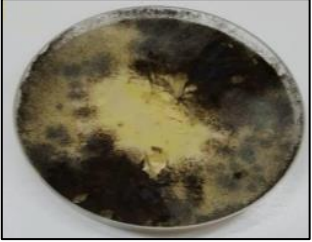
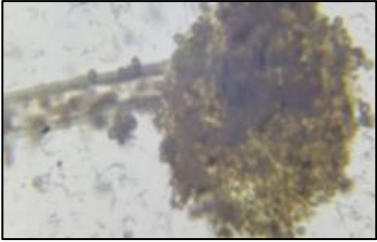
5.2 Identification des souches isolées

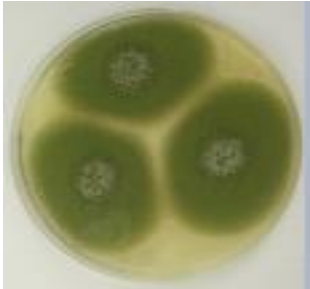

5.2.1 Identification morphologique

L'observation macroscopique et microscopique d'isolats purs de souches fongiques a permis d'identifier provisoirement l'isolat comme une espèce d'*Aspergillus* (tableau 1).

Tableau 1. Caractéristiques macroscopique et microscopiques des souches fongiques.

Echantillons fongiques	Caractérisation macroscopique	Caractérisation microscopique	Espèces probable
N°1 : échantillon de sol en Nigeria	 <p>Colonie noire avec un revers blanc à jaune, croissance modérée avec mycélium submergé (Saif <i>et al.</i>, 2021).</p>	 <p>Conidies finement ridées de 3 à 5 mm de diamètre avec une forme globuleuse/ellipsoïdale de 20 à 73 mm de didamètre de vésicule et d'ornementation verruqueuse (Saif <i>et al.</i>, 2021).</p>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>

<p>N°2 : échantillon de sol en Éthiopie</p>	 <p>couleur blanche du mycélium, la couleur des colonies : vert olive, revers: blanc à légèrement gris, pigments solubles, la tête conidiale était jaune-vert colonie était globulaire à sub-globulaire vésicules, diamètre et forme des vésicules ; 18 - 36 µm ; rayonné, et ornementation presque lisse (Saif <i>et al.</i>, 2021).</p>	 <p>vésicule globulaire avec des chaînes conidiennes allongées, conidiophores longs, issus du substrat, à parois rugueuses, tête conidienne large, rayonnante avec des conidies globulaires à subglobulaires (Daba <i>et al.</i>, 2021).</p>	<p><i>Aspergillus oryzae</i></p>
<p>N°3 : échantillon d'abricots secs</p>	 <p>-Diamètre de la colonie 15-20 mm qui peut s'étendre jusqu'à 40 mm, Croissance rapide. -Couleur : Elle était blanche au début, passait</p>	 <p>mycéliums septés, lisses, non ramifiés, conidiophores longs, larges et bruns. tête rayonnée de couleur brunâtre foncé et vésicule globulaire, phialide de petite taille par rapport à la</p>	<p><i>Aspergillus niger</i></p>

	<p>au jaune puis devenait entièrement noire après la sporulation avec un aspect granuleux. Le revers des colonies était incolore à jaune pâle (Bougherara et Zerizer, 2021).</p>	<p>métula, conidium globulaire, brun et rayonné, rugueux autour de la vésicule (Bougherara et Zerizer, 2021).</p>	
<p>N°4 : échantillon de Laboratoire de biotechnologie industrielle et environnementale</p>	 <p>Couleur : vert foncé avec revers orange Texture : mycélium aérien Taille : 500 nm T°optimale : 30 °C (Wajeaha, <i>et al.</i>, 2020). (Makhlouf <i>et al.</i>,2021)</p>	 <p>Les conidies : globuleuses et lisses Les conidiophores : longs et larges, rugueux dans la partie distale, têtes principalement bisériées avec quelques têtes unisériées (Makhlouf, <i>et al.</i>,2021).</p>	<p><i>Aspergillus flavus</i></p>

5.2.2 Identification moléculaire

L'identité des souches fongiques a été confirmée par identification moléculaire.

L'échantillon N°1 :

L'isolat fongique a été identifié à l'aide de la séquence de la région ITS de l'ADNr 18S. L'isolat a un pourcentage d'homologie similaire dans la séquence du gène avec *Aspergillus brasiliensis* (Figure 4). Par conséquent, il a été identifié comme *Aspergillus brasiliensis* BCW2 (Chimbekujwo *et al.*, 2020).

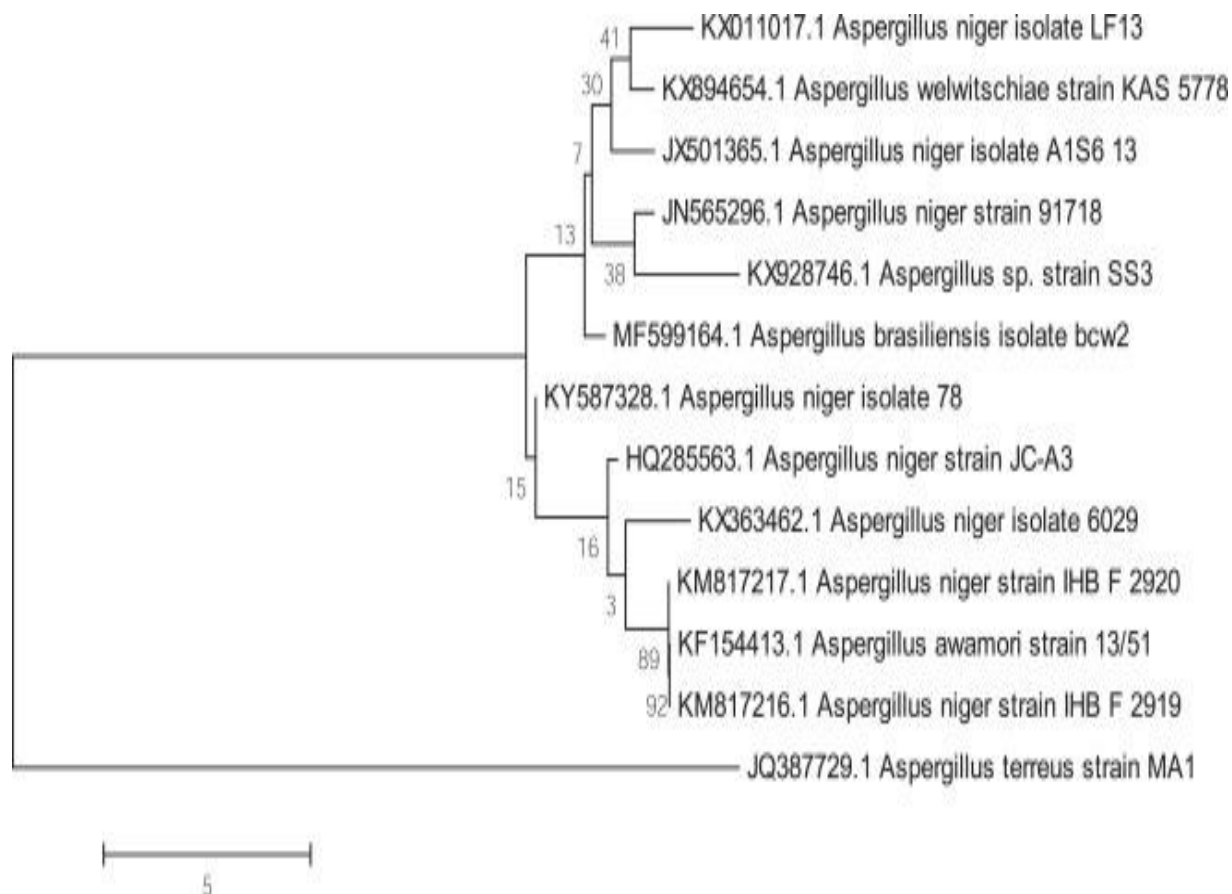


Figure 4. Arbre phylogénétique basé sur la région ITS de la souche BCW2 d'*A.brasiliensis* avec d'autres souches d'*Aspergillus sp.*

L'échantillon N°2 :

L'échantillons de sol en Éthiopie identifié comme *Aspergillus oryzae DRFFS13* à l'aide d'amorces ITS (ITS86F (F) : 5'- GTG AAT CAT CGA ATC TTT GA-3' et ITS4 (R) : 5'- TCC TCC GCT TATTGATATGC -3') à Eurofins Genomics, Allemagne (Mamo *et al.*, 2020).

L'échantillon N°3 :

L'arbre phylogénétique a révélé que l'isolat possédait une homologie maximale avec *Aspergillus niger* KF305758.1, et c'est ce que la correspondance avec BLAST a montré. En raison de l'homologie du gène de l'ARNr 5.8S, l'isolat fongique a été désigné comme *Aspergillus niger*. Des séquences consensus (ARNr 5.8S) de champignons isolés ont été présentées dans la GenBank du NCBI et les numéros d'accès trouvé pour les champignons est MH447401. 1 (Tableau 2) (Nurunnabi *et al.*, 2019).

Tableau 2. Identification du champignon avec le numéro d'accès NCBI

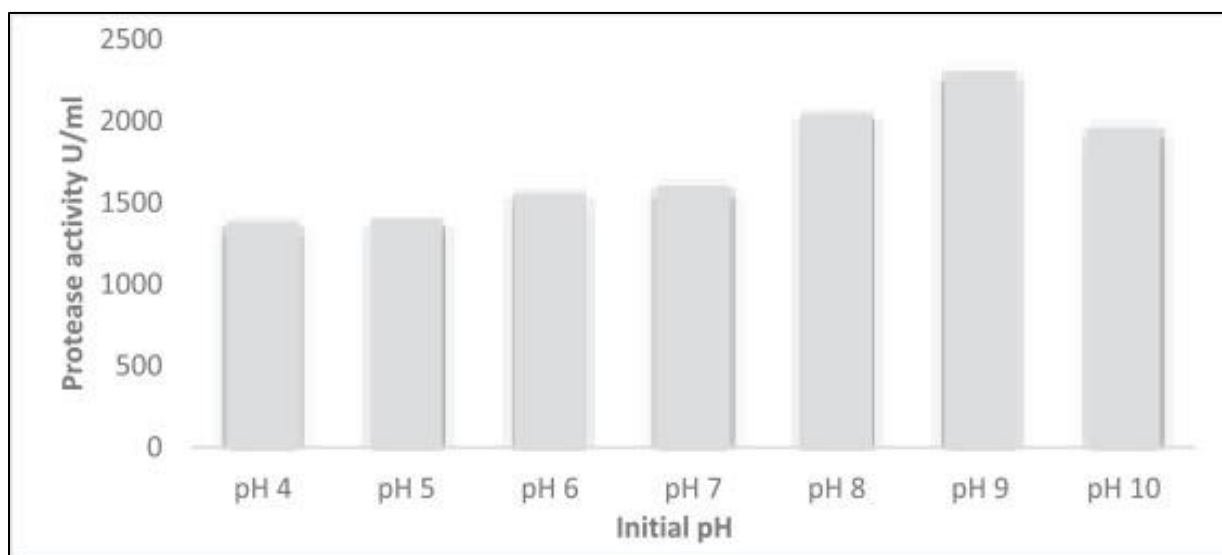
Nom du champignon	Numéro d'accès Genbank	Séquence correspondre de BLAST		
		Référence Accession	Longueur de la requête	Similarité
<i>Aspergillus niger</i>	MH447401.1	<i>Aspergillus niger</i> KF305758.1	602	100%

L'échantillon N°4 :

Pour identifier l'espèce d'*Aspergillus* en utilisant le gène ARNr 18S, la séquence partielle de 824 pb a été amplifiée, séquencée et comparée avec d'autres séquences dans GeneBank. Les relations phylogénétiques ont été établies et ont montré que l'isolat est étroitement apparenté à différentes espèces d'*Aspergillus* avec 98% d'identité à l'*A. flavus* (Derbalah *et al.*, 2020).

5.3 Optimisation de production**5.3.1 pH optimal de production**

La production optimale de protéases a été obtenue à pH 9 (2304 unités/ml) (Figure 5) pour d'*Aspergillus brasiliensis*. Des observations similaires avaient déjà été rapportées chez *A. flavus*, *A. niger* à pH 9,0. Le pH optimal de la protéase partiellement purifiée a été dosé entre pH 4 et 10. L'activité la plus élevée a été observée à pH 5 (Chimbekujwo *et al.*, 2020).

**Figure 5.** Effet du pH sur la production de protéases par la souche BCW2 d'*A. brasiliensis*.

Et pH 6.0 pour d'*Aspergillus flavus* (Wajeeha *et al.*, 2020) et aussi pour d'*Aspergillus oryzae* DRDFS13. D'autres études ont indiqué une production optimale de protéases par *A.oryzae* à pH 7,0. La production de protéases par *A. oryzae* MTCC 5341 et d'autres *Aspergillus sp* était maximale entre pH 4 et pH 5 indiquant la différence de pH optimale entre les champignons acidophiles et neutrophiles, indépendamment de leurs taxons (Mamo *et al.*, 2020) Le pH neutre aide à la croissance cellulaire, mais le pH acide et alcalin agit comme un inhibiteur de la croissance cellulaire, ce qui affectera la production d'enzymes par les cellules (Gnanadoss et Devi, 2021).

Enfin, le pH optimal d'*Aspergillus niger* est de 3,0 comme le montre la (Figure 6), aussi ont indiqué une activité protéolytique à pH neutre, mais c'était moins important, on peut suggérer que la souche produisait au moins deux protéases, un acide avec un pH optimal de 3,0 et un autre alcalin à pH 7,0. D'autres recherches ont donné un pH optimal à 4,5 à partir de l'espèce *Aspegillus niger* (Bougherara et Zerizer, 2021).

L'influence du pH sur la production de protéase pourrait être due à son effet sur la stabilité ou la conformation de la membrane plasmique qui affecte indirectement les ribosomes liés à la membrane impliqués dans la synthèse de la protéase (Gnanadoss et Devi, 2021).

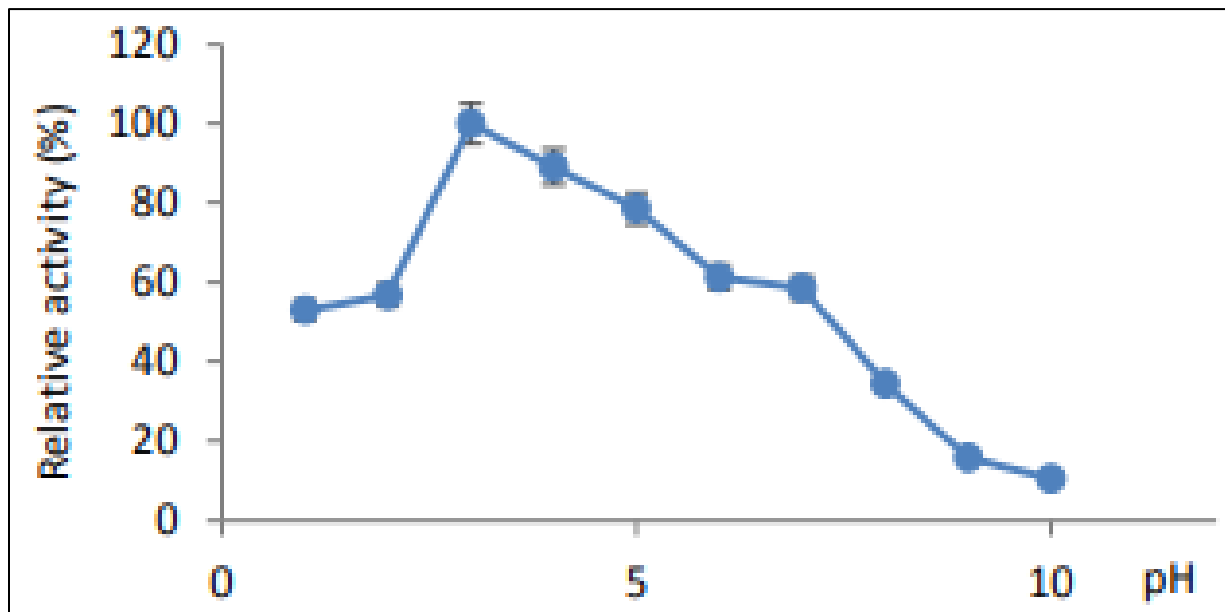


Figure 6. Effet du pH sur la production de protéases par la souche d'*A.niger*.

5.3.2 Température optimale de production

L'activité optimale de protéases a été trouvée pour toutes les souches fongiques étudiées à 30°C (2318 unités/ml). Les protéases fongiques présentent généralement une diminution et une perte d'activité à des températures élevées. Des résultats similaires ont également été rapportés par Oyeleke et al (Oyeleke *et al.*, 2010). Bien que les enzymes aient montré une légère variation, aucune différence significative n'a été observée dans leurs activités optimales de température, elles se situaient dans la température optimale de 30 ° C pour la production de ces enzymes avec SSF par d'autres champignons, montrant la nature mésophile de la souche (Mamo *et al.*, 2020). Il a été révélé que la température n'affecte pas seulement le taux de croissance de l'organisme, mais qu'elle a également une influence marquée sur le niveau de production de protéase (Ahmed, 2018).

5.3.3 Période d'incubation optimale de production

La période d'incubation pour la production de protéase par *Aspergillus brasiliensis* BCW2 était optimale à 72 h avec des activités protéolytiques de 1734 U/mL (Figure 7). L'activité enzymatique a augmenté vers 72 h et a ensuite diminué. Ce résultat est cohérent avec les rapports de Kumar (2021) d'*A. niger*.

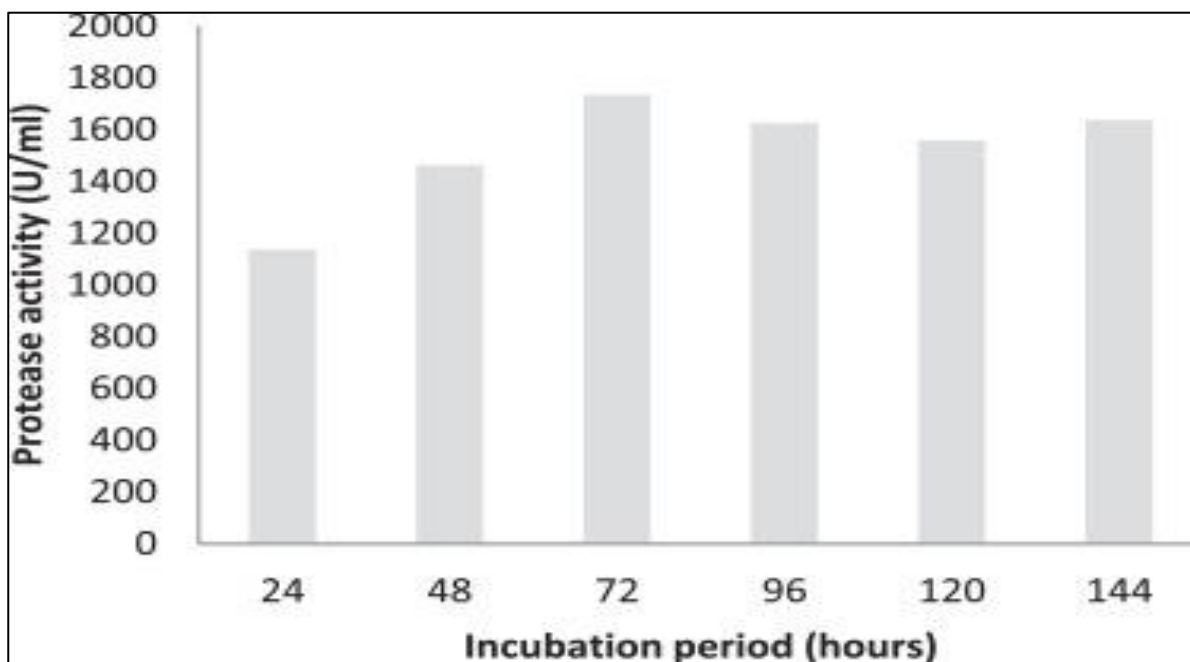


Figure 7. Effet de la période d'incubation sur la production de protéases par la souche BCW2 d'*A. brasiliensis*.

La période optimale d'incubation pour la production de protéases d'*Aspergillus oryzae* DRDFS13 est de 120 heures. Mais, la poursuite de l'incubation a montré une réduction de la production enzymatique. Des temps d'incubation plus longs montrent une diminution de la production d'enzymes. La réduction du rendement enzymatique après la période optimale était probablement due à l'épuisement des nutriments disponibles pour la croissance microbienne.

La production de protéase la plus élevée a été obtenue chez *A. niger* FFBI le 3ème jour d'incubation, et l'activité maximale de la protéase acide a été observée chez *A. oryzae* HG76 à 80 heures d'incubation, ce qui est différent de l'étude actuelle (Mamo *et al.*, 2020).

L'étude de la production de protéase par l'*A. favus* donnée une période d'incubation optimale à 84 h (Wajeelha, *et al.*, 2020). D'autres études ont indiqué une production optimale de protéases par *A. favus* à 48h (Damare *et al.*, 2020).

5.3.4 Humidité optimale de production

La meilleure teneur en humidité du substrat pour la production optimale de protéase par *Aspergillus brasiliensis* BCW2 a été observée à 60% (2214 U/mL). La teneur en humidité présentant la plus faible activité protéolytique a été observée à 20% (1268 U/mL). Et chez *Aspergillus oryzae* DRDFS13, la production optimale de protéase a été observée avec une teneur en humidité de 55%. Différentes études ont montré que différents SSF ont donné des activités de protéase optimales à diverses teneurs en humidité allant de 40 à 60 % avec divers champignons : *A. oryzae* HG76 et *A. niger* FFBI, Cela peut être lié aux différents types et à la porosité des substrats utilisés pour le SSF (Mamo *et al.*, 2020).

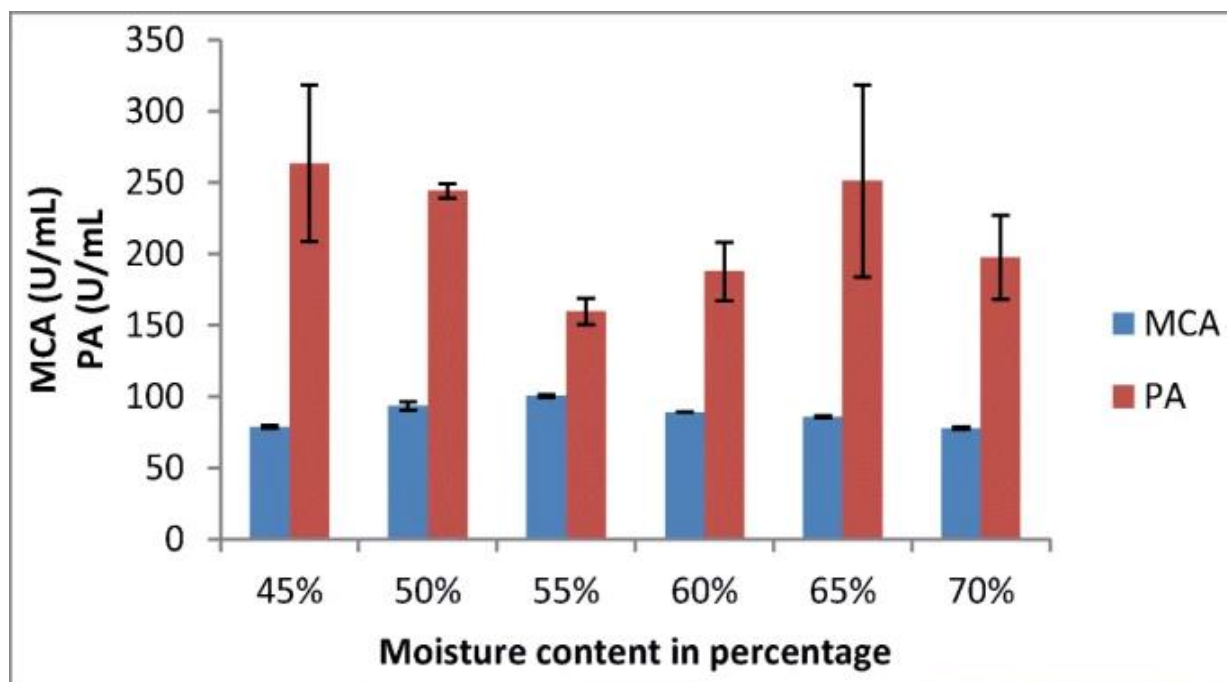


Figure 8. Effet de la teneur en humidité sur la production de protéases par *A. oryzae DRDFS13* en SSF. (MCA ou ACL) : Activité de Coagulation du Lait ; PA : Activité Protéase.

5.3.5 Source optimale de carbone

Divers substrats de carbone organique tels que le son de riz, la balle de riz, la rafle de maïs, le sorgho, la peau d'igname, la peau d'orange et le son de blé ont été évalués pour leur effet sur la production de protéase par *A. brasiliensis BCW2*. La peau d'agrumes a permis une production optimale de protéase avec une activité protéolytique de 1604 U/mL (Figure 9) et à une concentration de 10%. La quantité la plus basse de protéase produite était par le sorgho (260 U/mL).

Cette variation pourrait être attribuée à la nature de la cellulose ou de l'hémicellulose, à la présence de certains composants (activateurs ou inhibiteurs) dans ces matériaux et aux variations d'accessibilité au substrat (Chimbekujwo *et al.*, 2020).

Pour *Aspergillus flavus*, le son de blé a donné la meilleure production de protéase parmi les autres substrats solides (Figure 10), mais pour *Aspergillus oryzae DRDFS13*, le milieu de fermentation optimal composé de son de blé, de caséine (1% p/p) et de glucose (0,5% p/p). D'autres études ont également montré que la supplémentation en maltose et en lactose donne une activité productive maximale (Wajejha *et al.*, 2020 ; Mamo *et al.*, 2020). Alors que l'étude

de Salihi et al. (2017) a montré que le glucose est la meilleure source de carbone pour la croissance et la production d'enzymes de la souche *A. oryzae* IPT-301 297.

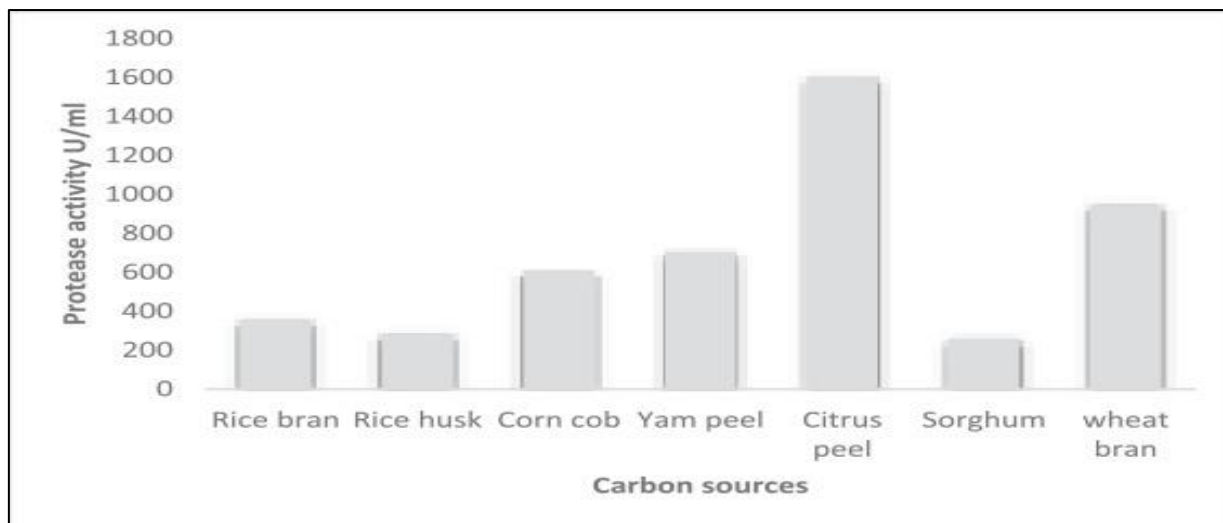


Figure 9. Effet de la source de carbone sur la production de protéases par la souche BCW2 d'*A. brasiliensis*.

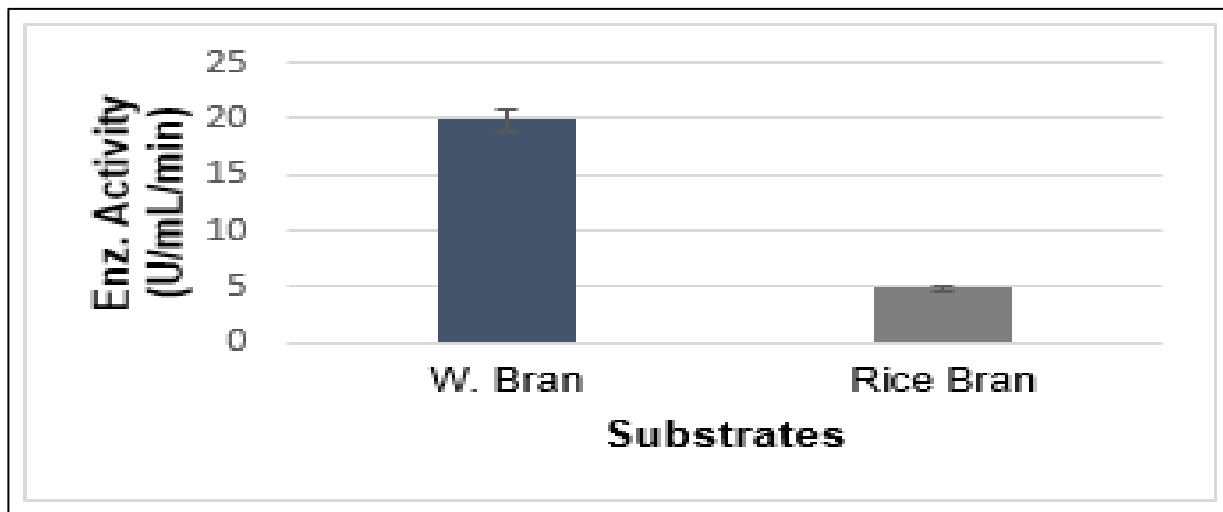


Figure 10. Comparaison du son de blé et du son de riz pour la production de protéases par *A. flavus*.

5.3.6 Source optimale d'azote

La production maximale de protéase par *Aspergillus brasiliensis* BCW2 a été observée avec l'extrait de levure avec une activité de 1515.99 U/mL à une concentration de 2% (Chimbekujwo *et al.*, 2020). et pour *Aspergillus flavus* la production optimale a été observée

avec une concentration de 0,4 % de glucose, 0,2 % de fructose, 0,35 % d'urée et 0,2 % de sulfate d'ammonium (Wajeeha *et al.*, 2020).

Pour *Aspergillus oryzae DRDFS13* Différentes sources d'azote, c'est-à-dire du lait écrémé, de la caséine, de l'extrait de levure, de l'urée, du NH_4NO_3 , du NH_4SO_4 et du NH_4Cl , ont été utilisées dans le milieu SSF pour la production de la protéase. La supplémentation en caséine (1%) comme source d'azote a entraîné une augmentation optimale de la production d'enzymes (Figure 11). Bien que l'effet d'un supplément d'azote spécifique sur la production d'enzymes diffère d'un organisme à l'autre, les sources d'azote complexes telles que la caséine et la peptone sont généralement utilisées pour la production d'enzymes (Mamo *et al.*, 2020).

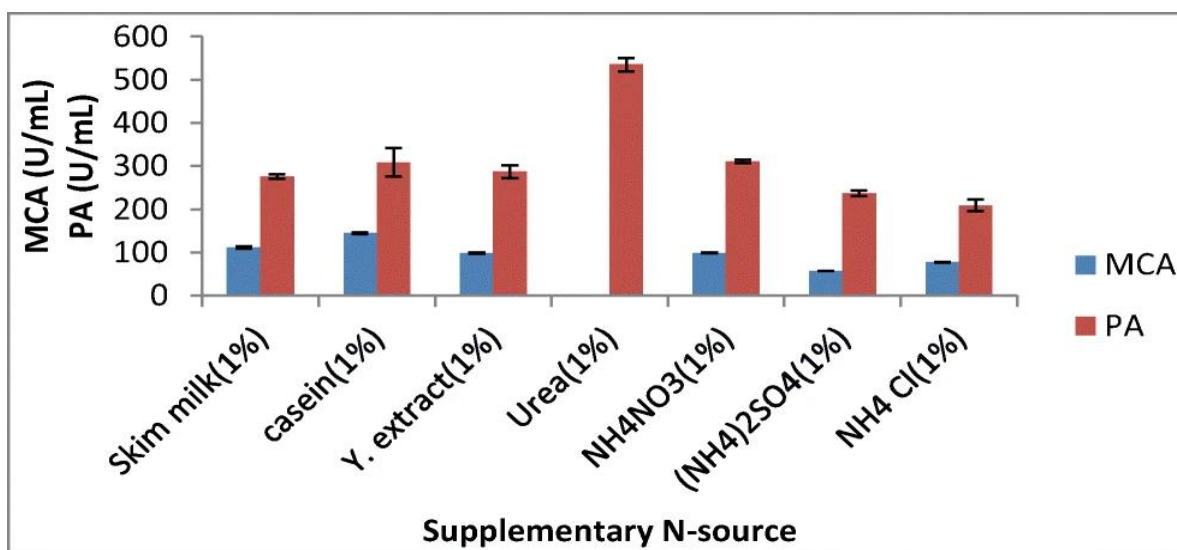


Figure 11. Effet de la source supplémentaire de N sur la production de MCP par *A. oryzae DRDFS13*. MCA : Activité de Coagulation du Lait ; PA : Activité Protéolytique.

5.4 Purification

La protéase brute produite par *Aspergillus brasiliensis BCW2* a été partiellement purifiée à l'aide de sulfate d'ammonium (80 %) et une purification supplémentaire à l'aide de Sephadex G-200 a donné 7,7 plis avec 29 % de récupération, tandis que l' α -caséine agarose a donné 13,3 plis de pureté avec 28 % de récupération de la protéase (Tableau 3). Ce résultat était plus élevé que celui rapporté par Ahmed (2018). La préparation d'enzyme partiellement purifiée a montré une bande correspondant à un poids moléculaire d'environ 68 kDa (plaque 1), ce qui est similaire au

rapport précédent d'Ahmad (2018). La différence observée pourrait être attribuée à la présence de protéines contaminantes (Ahmed *et al.*, 2015).

Tableau 3. Étapes de purification de la protéase d'*Aspergillus brasiliensis* BCW2

Étapes de purification	Activité enzymatique (mg)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement %	Pli de purification
Extrait enzymatique brut	940	304.00	3.09	100.00	1.00
Précipitation d'ammonium	682	46.50	14.67	73.00	4.70
Dialyse	578	38.00	15.21	61.00	5.00
Séphadex G-200	272	11.50	23.65	29.00	7.70
agarose α -caséine	267.5	6.50	41.15	28.00	13.30

La purification partielle de l'extrait d'enzyme brut obtenue à partir d'*A. Oryzae DRDFS13* en utilisant de l'acétone réfrigérée et 80% (NH₄)₂SO₄ a augmenté le rapport de MCA / PA tout en réduisant le MCA et l'AP. La chymosine (enzyme commerciale) a été utilisée comme contrôle positif pendant le test d'activité de lait. Le rapport de MCA / PA de l'enzyme brute a augmenté de 2,3 fois (de 0,56 à 1,3) par l'acétone et de 1,2 fois (de 0,56 à 0,65) via 80% (NH₄)₂SO₄ (tableau 3). De même, la purification partielle de la protéase d'*A. Oryzae MTCC 5341*, *A. terreus* et *P. aeruginosa* en utilisant de l'acétone réfrigérée ont augmenté la purification de 5 fois, 2,6 fois et 1,6 fois, respectivement (Mamo *et al.*, 2020).

Une purification partielle de l'enzyme (protéase d'*Aspergillus flavus*) a été effectuée à différents pourcentages de sulfate d'ammonium (10 % à 85 %) avec un volume de 2 ml d'enzyme brute pour chaque % pourcentage. Une précipitation enzymatique maximale a été observée à un niveau de saturation de 80 %. Les précipitats a montré une activité de protéase alcaline plus élevée par rapport au surnageant, indiquant la précipitation de l'enzyme par relargage (Figure 12) (Wajeeha *et al.*, 2020).

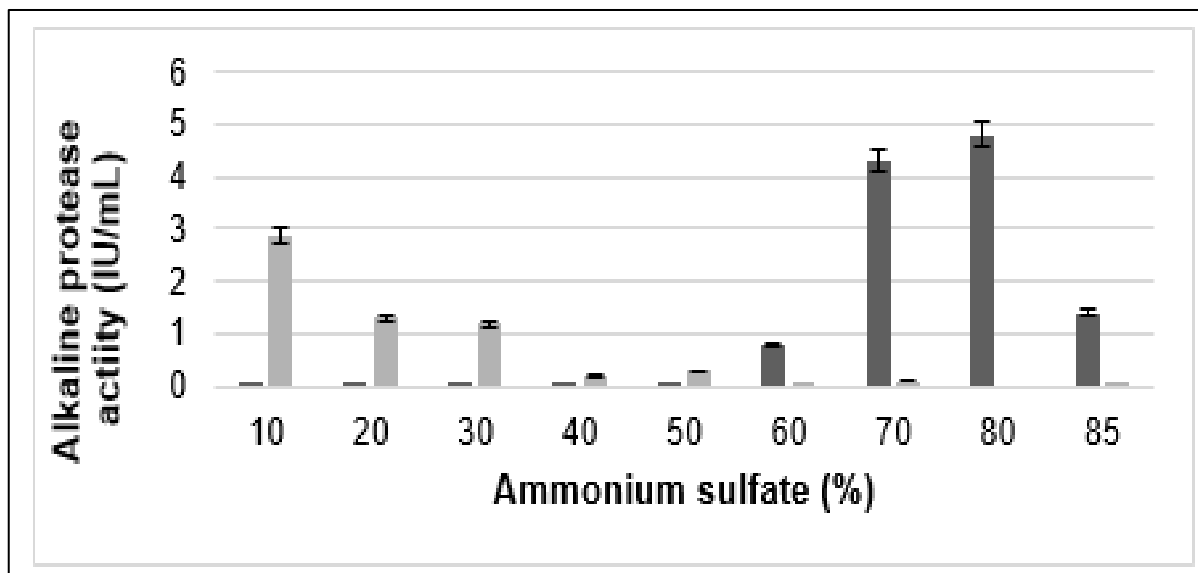


Figure 12. Activité de protéase alcaline dans le surnageant (clair) et le culot (foncé), (SD représenté par des barres)

Parmi les éluions, l'échantillon n° 6 a donné l'activité protéase alcaline la plus élevée (Figure 13) (Wajeeha *et al.*, 2020). Différentes études ont montré que l'activité enzymatique d'*A.favus* égal 31,228 ACU, avec une masse moléculaire de la protéase a été déterminée à environ 42 kDa (Damare *et al.*,2020).

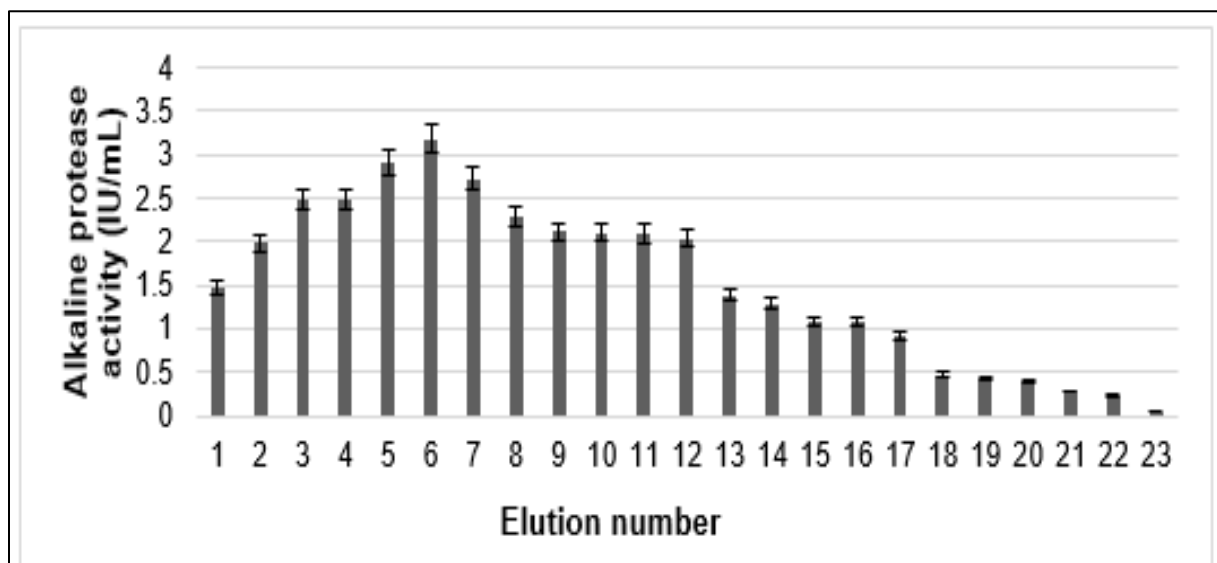


Figure 13. Activité de la protéase alcaline dans les échantillons élués après chromatographie par filtration sur gel (SD représenté par des barres)

5.5 Caractérisation

5.5.1 pH optimal

Le pH optimal de la protéase d'*A. brasiliensis* BCW2 partiellement purifiée a été testé entre pH 4 et 10. L'activité la plus élevée a été observée à pH 5 (Figure 14). La protéase produite semblait être acide, ce qui est attendu pour les protéases produites par des champignons (Chimbekujwo *et al.*, 2020). Pour *Aspergillus flavus*, l'activité protéasique la plus élevée a été mesurée à pH 7,5 (Figure 15) (Wajeeha *et al.*, 2020). La protéase d'un autre isolat d'*A. flavus* a montré une activité maximale à pH 10 (Damare *et al.*, 2020).

pH 4,0 pour *A. oryzae* DRDFS13 (Mamo *et al.*, 2020), et finalement, le pH optimal d'*A. niger* est de 3,0 comme le montre la (Figure 16) (Bougherara et Zerizer, 2021). Ces résultats sont en accord avec d'autres protéases fongiques (protéases *Aspergillus*, pH 2,5 ~ 3,08) (Shivakumar, 2012).

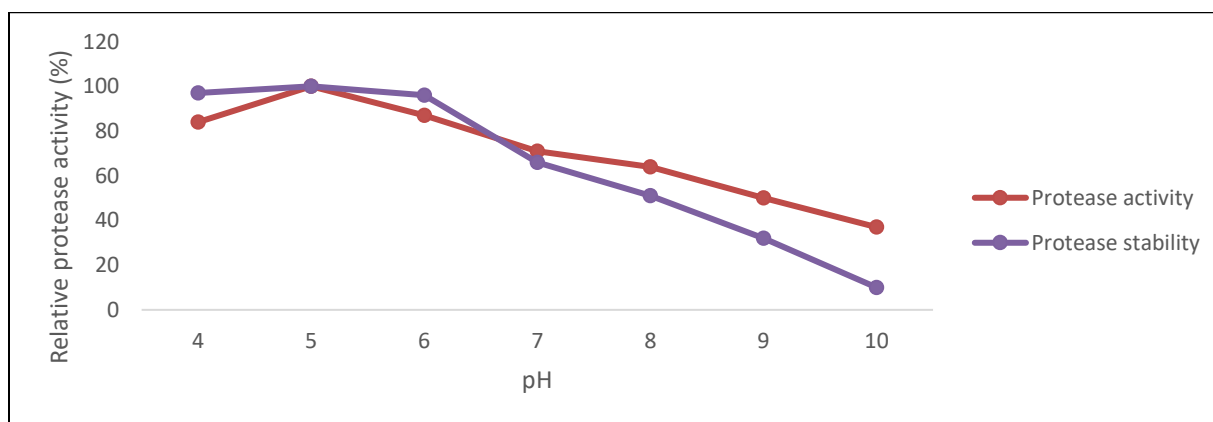


Figure 14. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la protéase purifiée (*A. brasiliensis* BCW2)

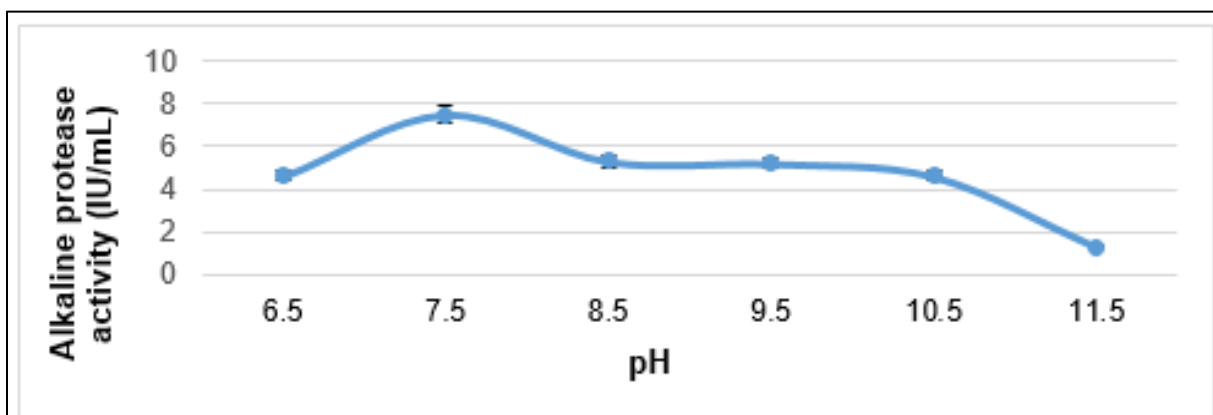


Figure 15. Effet du pH sur l'activité de la protéase alcaline d'*A. flavus*.

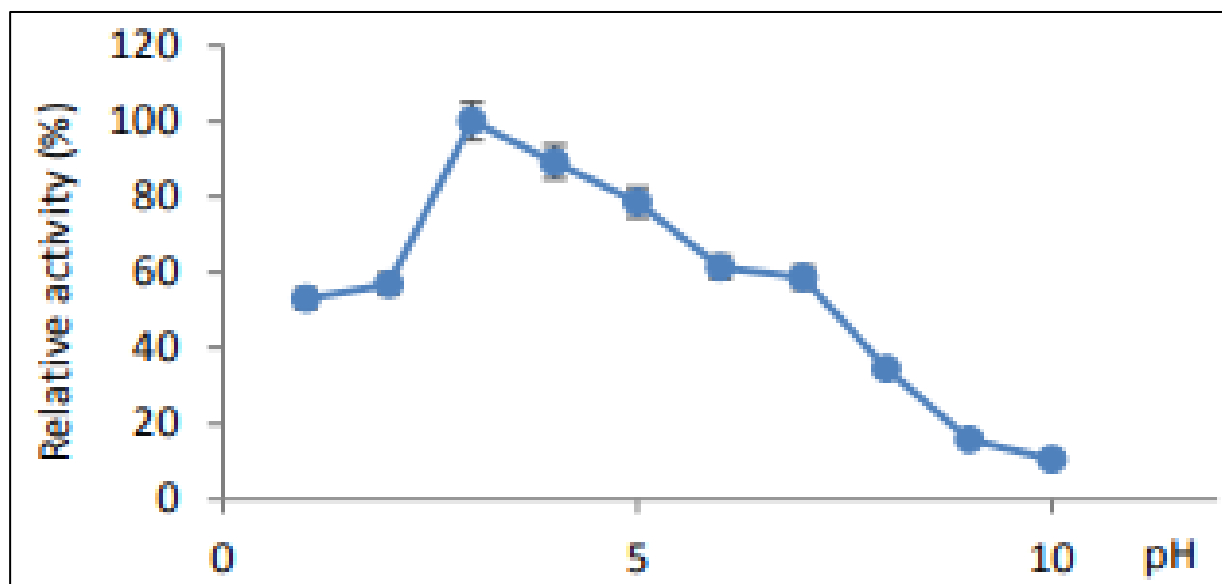


Figure 16. Effet du pH sur l'activité de la protéase alcaline d'*A.niger*.

5.5.2 Température optimale

Pour caractériser la température optimale pour *A.brasiliensis*, il a été testé à différentes températures. L'activité augmente à partir de 25 °C et atteint son maximum à 45 °C (Figure 16), Des observations similaires où une température de 40 °C était optimale pour l'activité des protéases d'*Aspergillus tamari* mais était instable à des températures supérieures à 40 °C. La stabilité à une température plus élevée de cette protéase pourrait améliorer leurs applications potentielles dans les industries (Chimbekujwo *et al.*, 2020). et 45 °C pour *A.flavus* (Figure 17) (Wajeheha *et al.*, 2020), Des résultats similaires ont été obtenus par *A.flavus*, où la valeur la plus élevée de l'activité enzymatique a été observée dans la plage de température de 45 °C (Damare *et al.*, 2020). La température d'activation maximale de 25°C pour la protéase d'*A. oryzae DRDFS13* (Mamo *et al.*, 2020), et 50°C d'*A. niger* (Figure 17), Au-dessus de cette température, on observe une diminution de l'activité protéasique. L'enzyme devient quasiment inactive, démontrant l'instabilité de sa structure (Bougherara et Zerizer, 2021).

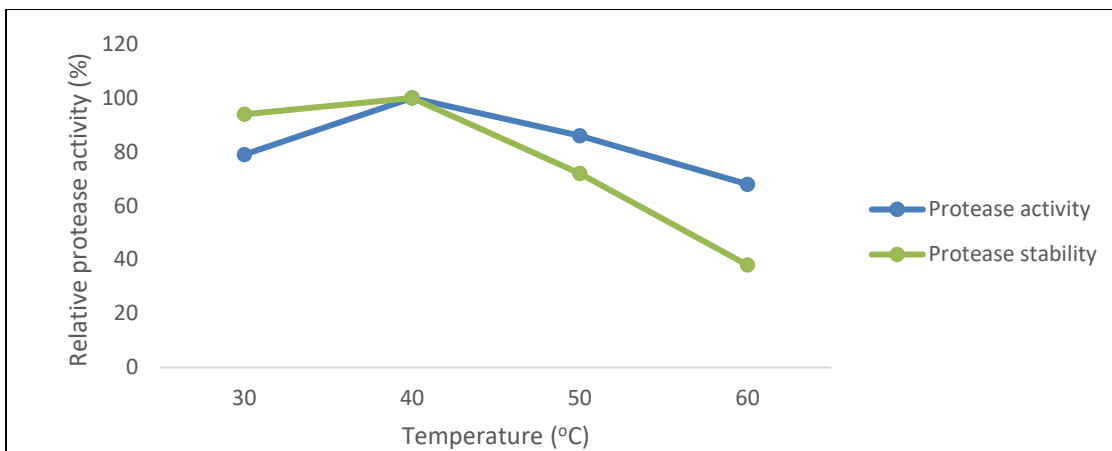


Figure 17. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la protéase purifiée (*A.brasiliensis* BCW2)

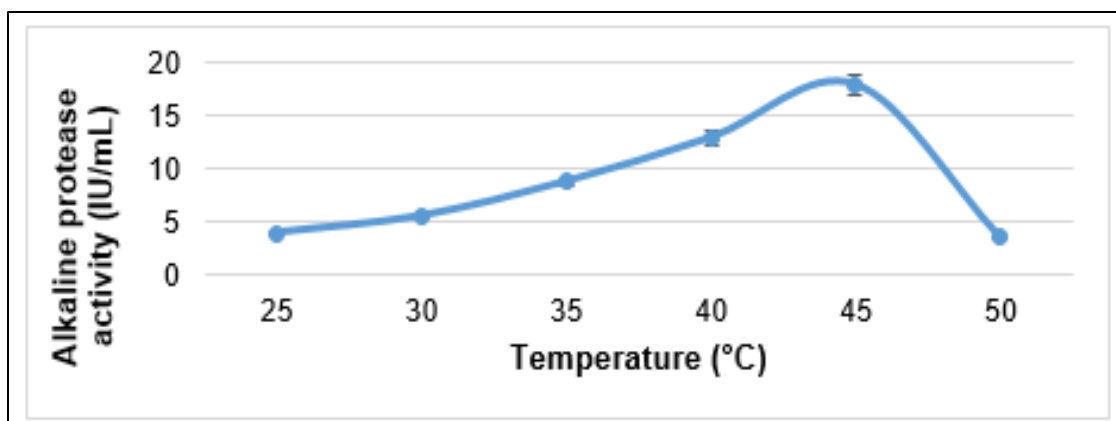


Figure 18. Effet de la température sur l'activité de la protéase purifiée (*A.flavus*)

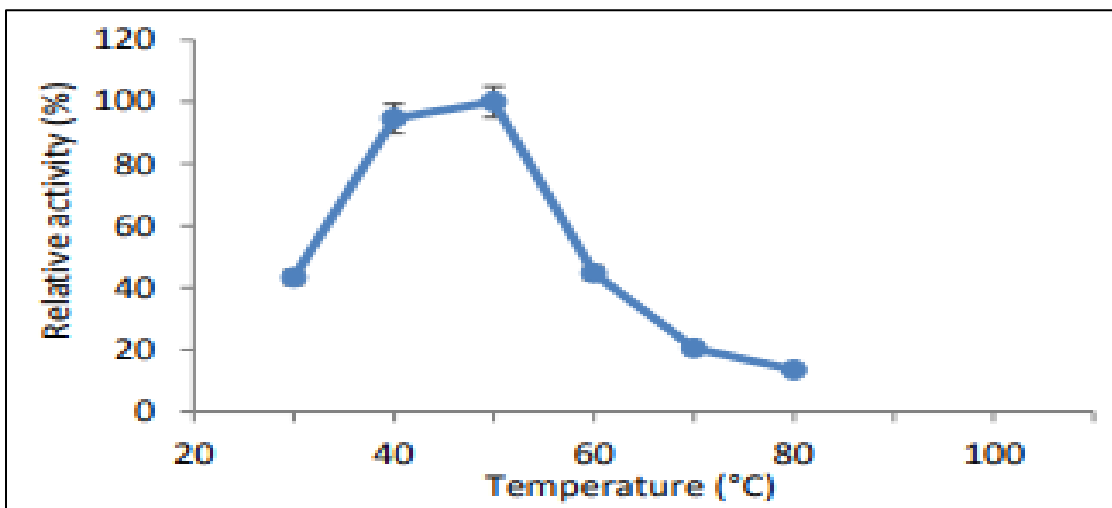


Figure 19. Effet de la température sur l'activité de la protéase purifiée (*A.niger*)

5.6 Application

5.6.1 Coagulation du lait

Le champignon se soit développé sur tous les substrats (son de blé, son de pois, pois d'herbe et son de riz) mais il n'a pas montré d'activité de coagulation du lait, sauf sur le son de blé avec une activité de coagulation du lait (MCA) de 77,74 U/mL

Tableau 4. MCA et PA de l'enzyme brute de *A. oryzae DRDFS13* (Chymosine, enzyme pure produite commercialement utilisée comme témoin positif ; ND, non déterminé (si le lait n'a pas coagulé en 40 min) ; MCA, activité de coagulation du lait (U/ml) ; SD, écart type).

Échantillon	Jour	MCA (U/ml) moyenne ±SD
Vierge	-	NDc
<i>Aspergillus oryzae DRDFS13</i>	0	NDc
	1	NDc
	2	NDc
	3	NDc
	4	63.76±6.62
	5	79.60±3.16
	6	70.20±1.20
Chymosin	-	2181.81±0.00

L'activité de coagulation du lait a été détectée après 96 h d'incubation, et la valeur maximale de MCA (79,6 U/mL) a été enregistrée à une période d'incubation de 120 h. L'activité de coagulation du lait la plus élevée a été obtenue chez *A. niger FFBI* le 3ème jour, ce qui était différent des présentes études, cela pourrait être dû au gène codant pour l'enzyme protéase aspartique qui pourrait être induite plus tard que d'autres types de protéase.

La variation enregistrée dans l'activité de coagulation du lait pourrait être due à la différence de combinaison de substrats, de suppléments minéraux, d'efficacité des espèces de champignons, de temps d'incubation et/ou de teneur en humidité utilisée dans la SSF (Mamo *et al.*, 2020).

5.6.2 Action de l'extrait enzymatique brut sur la gliadine

L'activité protéolytique de la souche *Aspergillus niger* a présenté une capacité intéressante à dégrader la gliadine par rapport à la caséine. Après 2 heures d'incubation, l'extrait enzymatique a pu dégrader respectivement 58,17 et 64,04% de la gliadine de *Triticum durum* et *Triticum aestivum*.

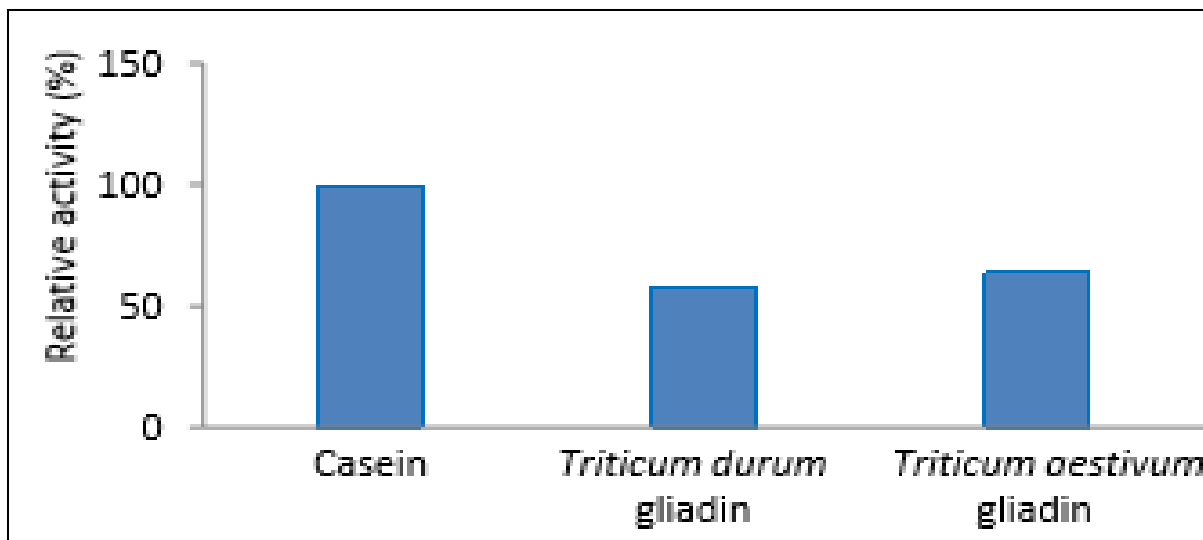


Figure 20. Activité protéolytique avec différents substrats (caséine et gliadine)

La procédure de dégradation est très difficile en raison de la complexité de la molécule de gliadine de blé, l'activité était plus importante sur la gliadine de *Triticum aestivum* que sur celle de *Triticum durum*.

Les protéases d'*Aspergillus niger* sont utilisées dans plusieurs domaines industriels, comme l'industrie pharmaceutique, où elles participent au développement de nouveaux agents thérapeutiques. Dans cette étude, l'extrait brut semble être un mélange de protéases neutres et acides qui pourraient être efficaces dans l'estomac et aussi dans les intestins. La supplémentation orale en enzymes pourrait être une méthode intéressante pour lutter contre le problème de la dégradation du gluten. Cependant, un problème semble pertinent dans l'utilisation des enzymes protéolytiques comme thérapie alternative de la maladie céliaque, est que ces enzymes ne fonctionneraient pas complètement dans les conditions de l'estomac et pourraient être dégradées par la pepsine.

La protéase de l'étude de Bougherara et Zerizer (2021) a montré une activité protéolytique optimale à pH 3,0 et serait donc fonctionnelle au pH gastrique et active dans l'estomac, Sinon, elle sera dégradé par les enzymes gastro-intestinales. L'avantage majeur de l'utilisation de cette protéase dans la détoxification du gluten, est que la production à partir de champignons est simple et peu coûteuse, mais nécessite une purification poussée à des coûts élevés pour éliminer les toxines avant d'être utilisée *in vivo*.

5.6.3 Compatibilité de la protéase alcaline avec les détergents commerciaux

La réaction enzymatique a été conduite en présence de quatre détergents différents disponibles dans le commerce.

Tableau 5. Activité protéasique avec différents détergents

Détergent	DO à 660 nm	Contrôle DO	Activité enzymatique (U/mL)	Activité conservée (%)
Contrôle	0.537	0.537	7.8	100
Brite	0.431	0.537	6.2	79.5
Bonus	0.340	0.537	4.8	61.5
Ariel	0.385	0.537	5.5	70.5
Surf Excel	0.435	0.537	6.3	80.8

L'activité enzymatique a été réduite avec Ariel et en présence de Bonus par rapport à d'activité avec Surf Excel et Brite.

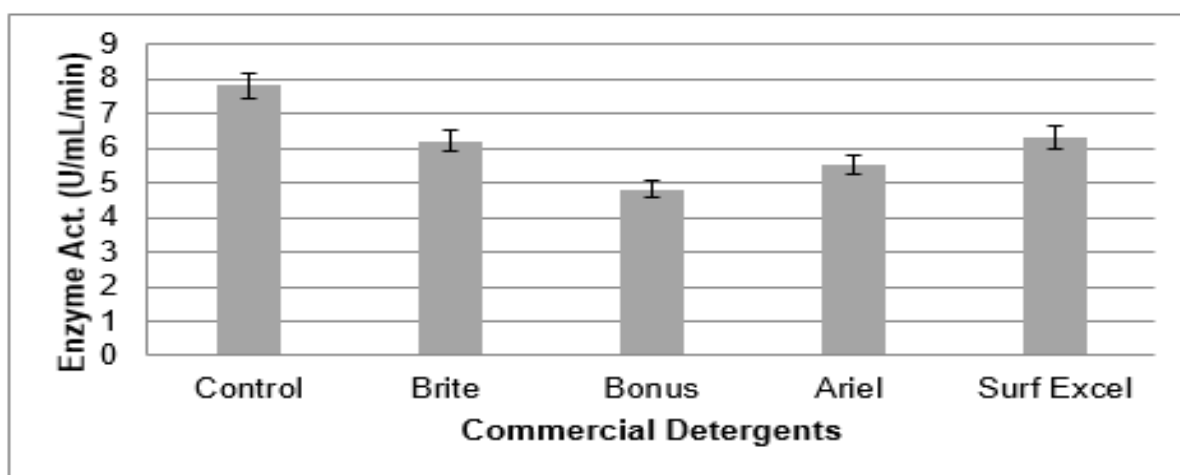


Figure 21. Compatibilité de la forme de protéase alcaline *A. flavus* avec les détergents commerciaux.

Les résultats ont montré que l'enzyme fonctionnait efficacement en présence de détergents à lessive commerciaux. Elle conservait une grande partie de son activité à température plus élevée et à pH basique.

D'autres études sont recommandées pour tester la capacité d'élimination des taches de la protéase alcaline récoltée à partir d'*A. flavus* en présence de détergents. De plus, les recherches futures pourraient inclure la modification de l'enzyme par manipulation génétique pour la faire fonctionner dans un environnement de alcalin plus élevé (Wajeeha *et al.*, 2020).

Conclusion

Conclusion

Le but de cette étude est de produire et d'optimiser des protéases à partir de moisissure filamenteuse a partir source différente (sol, fruits secs) et site de collecte différent (Nigeria, Éthiopie, Algérie, Pakistan), où les espèces étudiées étaient : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus brasiliensis* en milieu solide, car la moisissure possède plusieurs propriétés physiologiques, biochimiques, enzymatiques et croître dans des milieux d'alimentation différents et peu coûteux. C'est ce qui a fait les moisissures sont le groupe des microorganismes le plus utilisé dans la production d'enzymes, en particulier de protéases extracellulaire.

Après l'ensemencement et l'isolement, l'activité protéolytique a été mesurée. Puis les échantillons isolés ont été identifiés morphologiquement (macroscopique et microscopique) et moléculairement. L'accent a été mis sur l'optimisation de la production de protéases afin que les conditions idéales pour les quatre espèces soient les suivantes : Pour *Aspergillus brasiliensis*, le pH optimal pour la production est : 9,0 (2304 unités/ml) Quant à *Aspergillus flavus* c'était pH 6,0 et *Aspergillus niger* pH 3,0. Mais la température optimale pour la production de protéases était similaire pour toutes les espèces : 30 °C (2318 unités/ml). En plus des variables d'acidité et de température, la période d'incubation, l'humidité, la source de carbone et d'azote ont été étudiées.

Après purification partielle de la protéase par des plusieurs techniques comme : Précipitation par sulfate d'ammonium, Précipitation par acétone, Dialyse et Chromatographie par filtration sur gel. La protéase a été caractérisée de sorte qu'il a été constaté que l'acidité idéale pour que l'enzyme travaille à l'activité la plus élevée est : pH 5 pour *A.brasiliensis*, pH 7,5 pour *A.flavus*, pH 4,0 pour *A.oryzae*, pH 3,0 pour *A.niger*. Concernant la température idéale pour l'action de la protéase : 45 °C pour *A.brasiliensis* et *A.flavus*, 25 °C pour *A.oryzae* et 50 °C dans le cas d'*A. Niger*.

Pour mieux comprendre les utilisations de la protéase, trois utilisations importantes ont été discutées, à savoir son rôle dans la coagulation du lait, de sorte que la valeur de l'activité maximale de la coagulation du lait a atteint 79,6 U/mL, et son effet sur la gliadine, qui s'est avérée dégrader respectivement 58,17% et 64,04% de la gliadine de *Triticum durum* et *Triticum aestivum*. Et enfin, ses utilisations dans le domaine des détergents commerciaux.

Références

Références

1. Abdel-Azeem, A. M., Abdel-Azeem, M. A., Abdul-Hadi, S. Y., & Darwish, A. G. (2019). *Aspergillus*: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications. *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*, 121–179. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_4
2. Abdul Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>
3. Ahmed, M. E. (2018). Extraction and purification of protease from *Aspergillus niger* isolation. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 6(2). <https://doi.org/10.15406/ppij.2018.06.00162>
4. Anson M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *Journal of General Physiology*, 19: 446-459. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
5. Armada, C. D., & Simora, R. M. C. (2022). Optimization and Functional Properties of a Protease from a Fish Gut Isolate *Pseudomonas* sp. PD14 Grown on Fish Processing Wastes Substrate. *Philippine Journal of Science*, 151(1), 95-105.
6. Ben Mefteh, F., Frikha, F., Daoud, A., Chenari Bouket, A., Luptakova, L., Alenezi, F. N., ... & Belbahri, L. (2019). Response surface methodology optimization of an acidic protease produced by *Penicillium bilaiae* isolate TDPEF30, a newly recovered endophytic fungus from healthy roots of date palm trees (*Phoenix dactylifera* L.). *Microorganisms*, 7(3), 74. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030074>
7. Bezerra, V. H. S., Cardoso, S. L., Fonseca-Bazzo, Y., Silveira, D., Magalhães, P. O., & Souza, P. M. (2021). Protease Produced by Endophytic Fungi: A Systematic Review. *Molecules*, 26(22), 7062. <https://doi.org/10.3390/molecules26227062>
8. Blaize, M., Normand, A. C., Fekkar, A., & Piarroux, R. (2021). Identification des moisissures au laboratoire de routine hospitalière. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2021(529), 58–65. [https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(21\)00039-3](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(21)00039-3)
9. Bougherara C., Zerizer H. (2021). Production and characterization of proteases from *Aspergillus niger* strain isolated from dried fruit and its effect on gliadin. *Algerian*

- Journal of Nutrition and Food Sciences, 1(4), 25–29.
<https://fac.umc.edu.dz/inataa/revue/files/ajnfs0104004.pdf>
10. Cerda, A., Artola, A., Barrena, R., Font, X., Gea, T., & Sánchez, A. (2019). Innovative Production of Bioproducts From Organic Waste Through Solid-State Fermentation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00063>
 11. Chimbekujwo, K. I., Ja'afaru, M. I., & Adeyemo, O. M. (2020). Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Scientific African*, 8, 2.
<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00398>
 12. Colantuono, A., D'Incecco, P., Fortina, M. G., Rosi, V., Ricci, G., & Pellegrino, L. (2020). Milk substrates influence proteolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* strains. *Food Control*, 111, 107063. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107063>
 13. Daba, G. M., Mostafa, F. A., & Elkhateeb, W. A. (2021). The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00408-z>
 14. Damare, S., Mishra, A., D'Souza-Ticlo-Diniz, D., Krishnaswamy, A., & Raghukumar, C. (2020). A deep-sea hydrogen peroxide-stable alkaline serine protease from *Aspergillus flavus*. *3 Biotech*, 10(12), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02520-x>
 15. Derbalah, A., Khattab, I., & Saad Allah, M. (2020). Isolation and molecular identification of *Aspergillus flavus* and the study of its potential for malathion biodegradation in water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(7).
<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02869-4>
 16. Domínguez, J. A., & Berrocal, M. (2021). Application of microorganisms in forest plant. *Biofertilizers*, 265–287. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821667-5.00026-9>
 17. Elgammal EW, El-Khonezy MI, Ahmed EF, Abd-Elaziz AM. (2020). Enhanced production, partial purification, and characterization of alkaline thermophilic protease from the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* BT21. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 19(4), 338. https://doi.org/10.4103/epj.epj_31_20
 18. Garro, M. S., Rivas, F. P., & Garro, O. A. (2021). Solid State Fermentation in Food Processing: Advances in Reactor Design and Novel Applications. *Innovative Food Processing Technologies*, 165–182. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.23049-7>

19. Glampedakis, E., Erard, V., & Lamoth, F. (2020). Clinical Relevance and Characteristics of *Aspergillus calidoustus* and Other *Aspergillus* Species of Section Usti. *Journal of Fungi*, 6(2), 84. <https://doi.org/10.3390/jof6020084>
20. Gnanadoss, J. J., & Devi, S. K. (2021). Optimization of nutritional and culture conditions for improved protease production by *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 518-523. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.6.518-523>
21. Greenfield, L. M., Puissant, J., & Jones, D. L. (2021). Synthesis of methods used to assess soil protease activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 158, 108277. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108277>
22. Gupta, S., & Pathak, B. (2020). Mycoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Abatement of Environmental Pollutants*, 127–149. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818095-2.00006-0>
23. Hamrouni, R., Molinet, J., Miché, L., Carboué, Q., Dupuy, N., Masmoudi, A., & Roussos, S. (2019). Production of Coconut Aroma in Solid-State Cultivation: Screening and Identification of *Trichoderma* Strains for 6-Pentyl-Alpha-Pyrone and *Conidia* Production. *Journal of Chemistry*, 2019, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/8562384>
24. Jahun, B., Ilu, K., Yahaya, S., Ahmed, B., & Salami, K. (2021). Fungi Causing Post-Harvest Spoilage Carica papaya Linn Fruits of Two Selected Markets in Kano State, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 25(5), 727–731. <https://doi.org/10.4314/jasem.v25i5.6>
25. Joshi, P. P., & Ghike, P. B. (2019). Study of protease producing bacteria and their enzymatic activity at different parameters. *International Journal of Engineering and Technology (IRJET)*, 6(06), 2239-22.
26. Kalaskar, V. V., Kasinathan, N., Subrahmanyam, V. M., & Rao, J. V. (2021). Optimization of extracellular acid protease production from *Aspergillus niger* by factorial design. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 132-136. [10.15414/jmbfs.2014.4.2.132-136](https://doi.org/10.15414/jmbfs.2014.4.2.132-136)
27. Kaur, O. (2019). *Aspergillus* and Cervicovaginal Papanicolaou Smear: A Review. *International Clinical Pathology Journal*, 4(1). <https://doi.org/10.15406/icpj.2017.04.00086>

28. Khan, R., Mohamad Ghazali, F., Mahyudin, N. A., & Samsudin, N. I. P. (2020). Morphological Characterization and Determination of Aflatoxigenic and Non-Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* Isolated from Sweet Corn Kernels and Soil in Malaysia. *Agriculture*, 10(10), 450. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100450>
29. Koteswara, A., Philip, N. V., Aranjani, J. M., Hariharapura, R. C., & Volety Mallikarjuna, S. (2021). A set of simple methods for detection and extraction of laminarinase. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81807-2>
30. Kumar, Y. S., Gundeboina, S., Kumar, L. L., & Raju, K. T. (2021). OPTIMIZATION STUDIES ON ALKALINE PROTEASE OF *ASPERGILLUS NIGER* ISOLATED FROM SEASHORE SOIL OF BAY OF BENGAL. [10.20959/wjpps20214-19396](https://doi.org/10.20959/wjpps20214-19396)
31. Lakhal, H., Belhaine, M., Kismoune, N., & Bouldjedri, M. E. (2004). Recherche des mycotoxines dans les grains de certains légume secs (Doctoral dissertation, Université de jijel).
32. Lario, L. D., Pillaca-Pullo, O. S., Durães Sette, L., Converti, A., Casati, P., Spampinato, C., & Pessoa, A. (2020). Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528. *Biotechnology Reports*, 28, e00546. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00546>
33. Lizardi-Jiménez, M. A., Ricardo-Díaz, J., Quiñones-Muñoz, T. A., Hernández-Rosas, F., & Hernández-Martínez, R. (2019). Fungal strain selection for protease production by solid-state fermentation using agro-industrial waste as substrates. *Chemical Papers*, 73(10), 2603–2610. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00814-w>
34. Lu-Chau, T. A., García-Torreiro, M., López-Abelairas, M., Gómez-Vanegas, N. A., Gullón, B., Lema, J. M., & Eibes, G. (2019). Application of Fungal Pretreatment in the Production of Ethanol From Crop Residues. *Bioethanol Production from Food Crops*, 267–292. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813766-6.00014-x>
35. Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Aoki, T., Ariyawansa, H. A., Cardinali, G., Crous, P. W., Druzhinina, I. S., Geiser, D. M., Hawksworth, D. L., Hyde, K. D., Irinyi, L., Jeewon, R., Johnston, P. R., Kirk, P. M., Malosso, E., May, T. W., Meyer, W., . . . Schoch, C. L. (2021). Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. *Nature Microbiology*, 6(5), 540–548. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00888-x>

36. Madhu, S. N., Sharma, S., & Gajjar, D. U. (2020). Identification of Proteases: Carboxypeptidase and Aminopeptidase as Putative Virulence Factors of *Fusarium solani* Species Complex. *The Open Microbiology Journal*, 14(1), 266–277. <https://doi.org/10.2174/1874434602014010266>
37. Makhlof, J., Carvajal-Campos, A., Querin, A., Tadrist, S., Puel, O., Lorber, S., Oswald, I. P., Hamze, M., Bailly, J. D., & Bailly, S. (2019). Morphologic, molecular and metabolic characterization of *Aspergillus* section Flavi in spices marketed in Lebanon. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41704-1>
38. Mamo, J., Kangwa, M., Fernandez-Lahore, H. M., & Assefa, F. (2020). Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 51(2), 571–584. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00243-y>
39. 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*. <https://doi.org/10.21161/mjm.120501>
40. Masoodi, K. Z., Lone, S. M., & Rasool, R. S. (2021). Gel-filtration or size-exclusion chromatography. *Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology*, 147–149. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824449-4.00026-8>
41. Muhammad, A., Bokhari, S., Vernoux, J. P., Ali, M. I., Faryal, R., Desmaures, N., & Imran, M. (2019). Purification, Characterization and Thermodynamic Assessment of an Alkaline Protease by *Geotrichum Candidum* of Dairy Origin. *Iranian journal of biotechnology*, 17(2), e2042. <https://doi.org/10.21859/ijb.2042>
42. Naem, M., Manzoor, S., Abid, M.-U.-H., Tareen, M. B. K., Asad, M., Mushtaq, S., Ehsan, N., Amna, D., Xu, B., & Hazafa, A. (2022). Fungal Proteases as Emerging Biocatalysts to Meet the Current Challenges and Recent Developments in Biomedical Therapies: An Updated Review. *Journal of Fungi*, 8(2), 109. <https://doi.org/10.3390/jof8020109>
43. Naveed, A. (2019). Comparative efficiency of ammonium sulfate alone and ammonium sulfate-octanoic acid combined methods in the purification potential of antibodies. *Pure and Applied Biology*, 8(2). <https://doi.org/10.19045/bspab.2019.80113>

44. Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. (2020). Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. *Catalysis Letters*, 151(2), 307–323. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>
45. Nighojkar, A., Patidar, M. K., & Nighojkar, S. (2019). Pectinases: Production and Applications for Fruit Juice Beverages. *Processing and Sustainability of Beverages*, 235–273. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815259-1.00008-2>
46. Niu, L., Zhang, H., Wu, Z., Wang, Y., Liu, H., Wu, X., & Wang, W. (2019). Correction: Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. *PLOS ONE*, 14(1), e0211612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211612>
47. Nurunnabi, T. R., Al-Majmaie, S., Nahar, L., Nakouti, I., Rahman, S. M. M., Sohrab, M. H., ... & Sarker, S. D. (2019). Sonneratinone: a new antimicrobial benzofuranone derivative from the endophytic fungus *Aspergillus niger* isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala* Buch.-Ham. *Trends in Phytochemical Research (TPR)*, 3(3), 225-230.
48. Okayo, R. O., Andika, D. O., Dida, M. M., K’Otuto, G. O., & Gichimu, B. M. (2020). Morphological and Molecular Characterization of Toxigenic *Aspergillus flavus* from Groundnut Kernels in Kenya. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/8854718>
49. Oliveira, J. M., Fernandes, P., Benevides, R. G., & Assis, S. A. (2020). Production, characterization, and immobilization of protease from the yeast *Rhodotorula oryzzicola*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(5), 1033–1043. <https://doi.org/10.1002/bab.2023>
50. Oyeleke, S. B., Egwim, E. C., & Auta, S. H. (2010). Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 2(7), 83-87.
51. Pei, X., Tekliye, M., & Dong, M. (2021). Isolation and identification of fungi found in contaminated fermented milk and antifungal activity of vanillin. *Food Science and Human Wellness*, 10(2), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.02.011>
52. Peraza-Jiménez, K., De la Rosa-García, S., Huijara-Vasconcelos, J. J., Reyes-Estebanez, M., & Gómez-Cornelio, S. (2021). Enzymatic Bioprospecting of Fungi Isolated from a

- Tropical Rainforest in Mexico. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 8(1), 22.
<https://doi.org/10.3390/jof8010022>
53. Pérez-Alva, A., MacIntosh, A., Baigts-Allende, D., García-Torres, R., & Ramírez-Rodrigues, M. (2022). Fermentation of algae to enhance their bioactive activity: A review. *Algal Research*, 64, 102684. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102684>
54. Pham, V. H. T., Kim, J., Shim, J., Chang, S., & Chung, W. (2021). Purification and Characterization of Strong Simultaneous Enzyme Production of Protease and α -Amylase from an Extremophile-Bacillus sp. FW2 and Its Possibility in Food Waste Degradation. *Fermentation*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010012>
55. Pringgenies, D., Ari Setyati, W., Soenardjo, N., & Pramesti, R. (2020). Investigation of extra-cellular protease in indigenous bacteria of sea cucumbers as a candidate for bio-detergent material in bio-industry. *AIMS Environmental Science*, 7(4), 335–349.
<https://doi.org/10.3934/environsci.2020022>
56. Racheal, O. O., Ahmed, A. T. F., Ndigwe, E. V., & Morakinyo, S. D. (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.
[10.11648/j.ijnfs.20150402.11](https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20150402.11)
57. Rapalli, V. K., & Singhvi, G. (2020). Dermato-pharmacokinetic: assessment tools for topically applied dosage forms. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 18(4), 423–426.
<https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1856071>
58. Rawlings N. D. (2020). Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes. *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*, 1868(2), 140345. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140345>
59. Rawlings, N. D., & Bateman, A. (2019). Origins of peptidases. *Biochimie*, 166, 4–18.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.026>
60. Saif, F., Yaseen, S., Alameen, A., Mane, S., & Undre, P. (2021). Identification and characterization of *Aspergillus* species of fruit rot fungi using microscopy, FT-IR, Raman and UV–Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246, 119010. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119010>
61. Salihi, A., Asoodeh, A., & Aliabadian, M. (2017). Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International*

- journal of biological macromolecules, 94, 827-835.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.023>
62. Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy (2020) : une mise à jour complète sur la conservation, les ressources et les outils. Base de données (Oxford).
<https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
63. Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A., & Kumar, A. (2019). A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. *Industrial Biotechnology*, 15(2), 69–78. <https://doi.org/10.1089/ind.2018.0032>
64. Shivakumar, S. (2012). Production and characterization of an acid protease from a local *Aspergillus sp.* by Solid substrate fermentation. *Archives of Applied Science Research*, 4(1), 188-199.
65. Solanki, P., Putatunda, C., Kumar, A., Bhatia, R., & Walia, A. (2021). Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech*, 11(10), 428.
<https://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>
66. Soria, A., Brokł, M., Sanz, M., & Martínez-Castro, I. (2019). Sample Preparation for the Determination of Carbohydrates in Food and Beverages. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 213–243. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381373-2.00135-6>
67. Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, P., & Mishra, P. (2019). Solid-State Fermentation Strategy for Microbial Metabolites Production: An Overview. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 345–354.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63504-4.00023-2>
68. Talhi, I., Dehimat, L., Jaouani, A., Cherfia, R., Berkani, M., Almomani, F., Vasseghian, Y., & Chaouche, N. K. (2022). Optimization of thermostable proteases production under agro-wastes solid-state fermentation by a new thermophilic *Mycothermus thermophilus* isolated from a hydrothermal spring Hammam Debagh, Algeria. *Chemosphere*, 286, 131479. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131479>
69. Talukdar, D., Sharma, R., Jaglan, S., Vats, R., Kumar, R., Mahnashi, M. H., & Umar, A. (2020). Identification and characterization of cadmium resistant fungus isolated from contaminated site and its potential for bioremediation. *Environmental Technology & Innovation*, 17, 100604. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100604>

70. Usman, A., Mohammed, S., & Mamo, J. (2021). Production, Optimization, and Characterization of an Acid Protease from a Filamentous Fungus by Solid-State Fermentation. *International journal of microbiology*, 2021, 6685963. <https://doi.org/10.1155/2021/6685963>
71. Vuorinen, E., Valtonen, S., Hassan, N., Mahran, R., Habib, H., Malakoutikhah, M., Kopra, K., & Härmä, H. (2021). Protease Substrate-Independent Universal Assay for Monitoring Digestion of Native Unmodified Proteins. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6362. <https://doi.org/10.3390/ijms22126362>
72. Wajeeha, A. W., Asad, M. J., Mahmood, R. T., Zainab, T., Nazir, S., Khan, J., Shah, M. B., Ahmed, M., Shah, S. L., Ismail, M., Zaman, N., Ahmed, D., Khan, M. I., & Rizwan, M. (2020). Production, purification, and characterization of alkaline protease from *Aspergillus flavus* and its compatibility with commercial detergents. *BioResources*, 16(1), 291–301. <https://doi.org/10.15376/biores.16.1.291-301>
73. Ward O. P. (2019). Proteases. *Comprehensive Biotechnology*, 604–615. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00187-7>
74. Wijayawardene, N. (2020). Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere*, 11(1), 1060–1456. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/8>
75. Yafetto, L. (2022). Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*, 8(3), e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>

Annexe

Annexes

Annexe 1. Composition des milieux de culture et des solutions

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Pomme de terre	200 g
Agar	15 g
Glucose	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

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

Lait gélosés

Lait écrèmes	100g
Agar	20g
Eau distillé	1000 ml

Milieu Sabouraud

Glucose	20g
Peptone	10g
Agar.....	15g
Eau distillé	1000 ml

Lactophénol

Acide lactique	100 ml
Phénol	100 g
Glycérol	100 ml
Eau distillée.....	100 ml

Caséine

Caséine	2g
Tampon phosphate pH=7	98 ml

Annexe 2. Les tampons

Tampon phosphate pH 6

KH_2PO_4 (0,9073g/100 ml H_2O).....	88,9 ml
Na_2HPO_4 (0,5935g/100 ml H_2O).....	11,1 ml

Tampon phosphate pH 7

KH_2PO_4 (0,9073g/100 ml H_2O).....	41,3 ml
Na_2HPO_4 (0,5935g/100 ml H_2O).....	58,7 ml

Tampon phosphate pH 8

KH_2PO_4 (0,9073g/100 ml H_2O).....	3,7 ml
Na_2HPO_4 (0,5935g/100 ml H_2O).....	96,3 ml

Tampon glycine

Glycine.....	0,4 g
Eau distillée.....	qsp 100 ml

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

Solution A: acide citrique 21,01 g/l (0,1M), ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) **Solution B:** le dissodique 35,6 g/l (0,2M), ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

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.

Tampon tris-HCl

Tris Base.....	1.210 g/L
Sodium Azide.....	1.0 g/L
HCl.....	5M
NaOH.....	5M
Eau distillée.....	100 ml

Tampon Tris-EDTA

Tris HCl.....	1.950 g/L
Tris Base.....	0.920 g/L
EDTA, Tetrasodium.....	0.416 g/L
Glycerol.....	500 ml/L
HCl.....	5M
NaOH.....	5M
Eau distillée.....	100 ml

ملخص

مجال الأبحاث المتعلقة بالبروتياز هائل جدا. في السنوات السابقة، تم نشر في كل عام ما يقارب 8000 ورقة بحثية متعلقة بهذا المجال. لهذا فإن إنتاج البروتياز بواسطة العفن الخيطي من جنس الرشاشيات التي تعتبر أكثر السلالات شيوعا كان محل اهتمام هذه الدراسة حيث تم استخدام: *Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus*، *Aspergillus oryzae*، *Aspergillus brasiliensis* وذلك في وسط التخمر الصلب، بالإضافة إلى دراسة مختلف المتغيرات (الحرارة، الحموضة، مدة التحضين، مادة التخمر، الرطوبة ومصدر الكربون والأزوت) بهدف تحسين وضمان أفضل شروط لإنتاج البروتياز وأيضا لعمله في ظروف مثالية. حيث قادتنا النتائج أن الشروط المثالية لإنتاج البروتياز للأنواع المدروسة كان كما يلي: pH=9 بالنسبة لـ *Aspergillus brasiliensis* لمدة حضان بلغت 72 ساعة ونسبة رطوبة تقدر بـ 60% وقشور الحمضيات ومستخلص الخميرة كأفضل مصدر للكربون والأزوت بالترتيب، أما *Aspergillus flavus* فقد كانت pH=6 لمدة 120 ساعة من الحضان مع نسبة 55% من الرطوبة ونخالة القمح كأفضل مصدر للكربون والخليط (الحليب منزوع الدسم، 1% من الكازين، مستخلص الخميرة واليوريا) كأحسن مصدر للأزوت و pH=3 بالنسبة لـ *Aspergillus niger*. لكن تم ملاحظة تماثل فيما يخص درجة الحرارة المثلى لإنتاج البروتياز عند جميع السلالات: 30 درجة مئوية. وفي الأخير تم إختبار خصائص البروتياز الخام حيث أثبت فعاليته في العديد من المجالات من بينها: تخثر الحليب، تأثيره على الجليادين وأهميته كمكون أساسي في صنع المنظفات التجارية.

الكلمات المفتاحية: البروتياز، تخمر صلب، إنتاج، تحسين، عفن، الرشاشيات.

Résumé

Le domaine de la recherche lié aux protéases est très formidable. Au cours des années précédentes, environ 8 000 articles de recherche liés à ce domaine étaient publiés chaque année.

Par conséquent, la production de protéases par les moisissures filamenteuses du genre *Aspergillus*, qui est la souche la plus courante, a fait l'objet de cette étude. *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus brasiliensis* ont été utilisés dans le milieu de fermentation solide, en plus d'étudier de diverses variables (température, acidité, période d'incubation, substrat de fermentation, humidité et source de carbone et d'azote) dans le but d'optimiser et d'assurer les meilleures conditions pour la production de protéases et aussi pour son fonctionnement dans des conditions optimal. Où les conditions optimale pour la production de protéases pour les espèces étudiées étaient: pH = 9 pour *Aspergillus brasiliensis* pour une période d'incubation de 72 heures et une teneur en humidité de 60 %, les écorces d'agrumes et l'extrait de levure comme meilleure source de carbone et d'azote, respectivement. Pour *Aspergillus flavus*, pH = 6 pour 120 heures d'incubation avec 55 % d'humidité et son de blé comme meilleure source de carbone et mélange (lait écrémé, 1 % de caséine, extrait de levure et urée) comme meilleure source d'azote. pH=3 pour *Aspergillus niger*. Mais l'activité optimale de protéases a été trouvée pour toutes les souches fongiques étudiées à 30°C. Enfin, les propriétés des protéases brutes ont été testées et se sont avérées efficaces dans de nombreux domaines dont : la coagulation du lait, son effet sur la gliadine et son importance comme ingrédient essentiel dans la fabrication de détergents commerciaux.

Mots clés : protéase, moisissure, fermentation en milieu solide, production, optimisation

Abstract

The field of research related to proteases is very formidable. In previous years, approximately 8000 research papers related to this field were published each year.

Therefore, the production of proteases by filamentous molds of the genus *Aspergillus*, which is the most common strain, was the focus of this study: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus brasiliensis* were used in the medium of solid fermentation. In addition to studying various variables (Temperature, acidity, incubation period, fermentation substrate, moisture and source of carbon and nitrogen) with the aim of improving and ensuring the best conditions for the production of proteases and also for its functioning in ideal conditions. Where the optimal conditions for the production of protease for the species that were studied is: pH=9 for *Aspergillus brasiliensis* for incubation period of 72 hours and a moisture content of 60%, citrus peel and yeast extract as the best carbon and nitrogen source, respectively. As for *Aspergillus flavus*, pH=6 for 120 hours of incubation with 55% moisture and wheat bran as the best Carbon source and mixture (skimmed milk, 1% casein, yeast extract and urea) as the best nitrogen source and pH=3 for *Aspergillus niger*. However, similarities were observed regarding the optimum temperature for protease production in all strains: 30°C. Finally, the properties of crude proteases were tested and proved to be effective in many areas including: milk-clotting, its effect on gliadin and its importance as an essential ingredient in the manufacture of commercial detergents.

Keywords : protease, mold, solid-state fermentation, production, optimization