

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Université Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre.....

N° de série.....

## *mémoire*

En vue de l'obtention du diplôme de Magister  
en Biochimie-Microbiologie appliquées

Présenté par : *Dendouga Wassila*

### *Thème*

*Isolement et identification de moisissures productrices de  
protéases à partir de milieux extrêmes.  
Extraction et étude des propriétés de la protéase produite*

Directeur de la thèse : *Mechakra. A*

Année Universitaire : 2006

# Introduction

Au cours des deux dernières décennies, le développement de la microbiologie a abouti à l'obtention de matériels biologiques très divers, modifiés génétiquement ou non et susceptibles d'être utilisés dans des procédés de production de vitamines, d'hormones, de vaccins et d'enzymes. Les enzymes d'origine microbienne, présentent des propriétés et des spécificités diverses. Ces propriétés reflètent de plus en plus leurs utilisations dans divers domaines d'applications, tels que l'industrie alimentaire humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (Botton *et al*; 1999). La culture des champignons pour la production d'enzymes s'effectue soit sur substrat solide, soit en culture submergée comme c'est le cas pour la production de la plupart des métabolites d'origine microbienne. Au cours des trente dernières années, un nombre important de ces fermentations est réalisé sur des déchets agroalimentaires pour produire principalement des hydrolases.

De nombreux sous-produits rejetés par l'industrie alimentaire peuvent être récupérés et utilisés dans différents secteurs industriels et agricoles, selon leurs caractéristiques et les possibilités des marchés (alimentation animale et humaine). La valorisation des déchets agroalimentaires par les microorganismes (valorisation biotechnologique) permet la création d'emplois, de nouvelles sources de profits et une avancée technologique. En France, l'industrie laitière rejette à elle seule 780 000 tonnes/an de lactosérum (Nakais et Modler, 2000). Par sa composition biochimique, celui-ci peut être un milieu favorable à la production d'enzymes, en particulier les protéases.

C'est cette caractéristique que nous avons exploité dans ce travail dans le but d'étudier la production des protéases par des moisissures locales isolées de milieux extrêmes. Pour cela nous nous sommes fixés plusieurs objectifs, réalisés en 5 étapes.

La 1<sup>ère</sup> étape est l'isolement des moisissures sur différents milieux, puis la sélection des souches protéolytiques à l'aide d'un milieu gélosé au lait (lait gélosé).

La 2<sup>ème</sup> étape est l'étude de la composition chimique du lactosérum (milieu de fermentation).

La 3<sup>ème</sup> étape est la production des protéases par les souches sélectionnées dans l'étape précédente sur deux milieux de fermentations, l'un synthétique et l'autre naturel, chacun à trois pH différents.

La 4<sup>ème</sup> étape porte sur le dosage de l'activité protéasique exocellulaire et endocellulaire des souches sélectionnées, dans le but de déterminer la souche la plus performante et le milieu favorable à la production des protéases.

La 5<sup>ème</sup> étape enfin, consiste en une extraction de l'enzyme par précipitation, suivie de l'étude de ses caractéristiques physicochimiques et cinétiques.

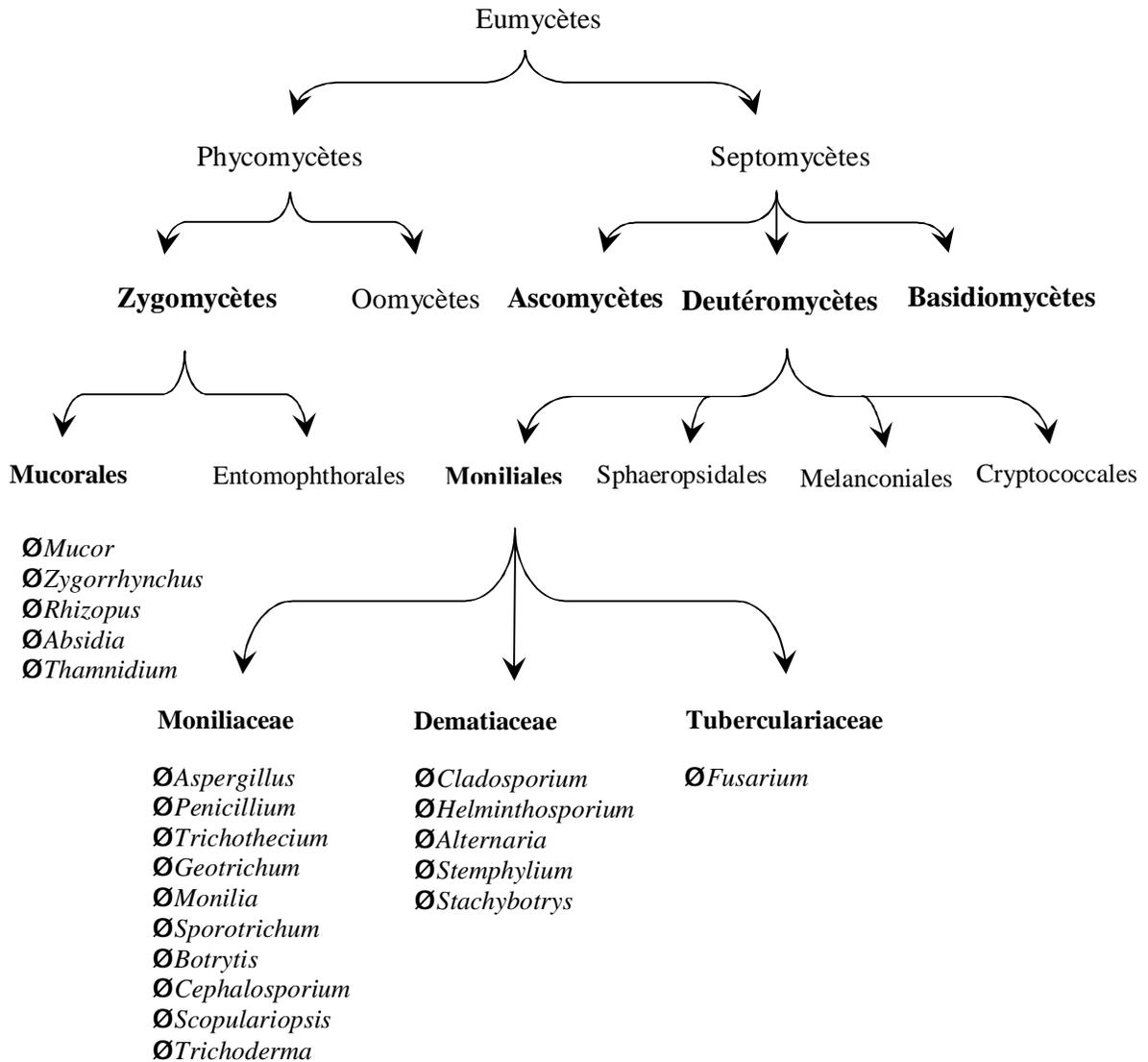


Fig. 01 : Principales classes des moisissures (Frazier, 1967).

## 1. Moisissures

### 1.1. Généralités

Les moisissures peuvent être définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (Nicklin et *al.*, 2000). Certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres enfin sont des saprophytes se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois, 1989 ; Leveau et Bouix, 1993). Les moisissures possèdent un appareil végétatif constitué par un thalle filamenteux, le mycélium, dont les filaments s'appellent des hyphes. Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores (Bourgeois, 1989).

### 1.2. Classification

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (Davet, 1996). Les Eumycètes (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures (Bourgeois, 1989), à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (voir fig. 01).

- **Zygomycètes**

Ces moisissures possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée (Guiraud, 1998). La famille la plus importante dans cette classe est celle de Mucorales qui comprennent un grand nombre de moisissures saprophytes mais aussi quelques espèces parasites des champignons, des animaux et des hommes (mucormycoses) et surtout des contaminants de nombreux produits alimentaires (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Certaines Mucorales sont parfois utilisées industriellement en raison de leurs activités enzymatiques (amylase, protéase,...) comme *Rhizopus* et *Mucor* (Guiraud, 1998).



*Aspergillus*

*Penicillium*

*Cladosporium*

*Mucor*



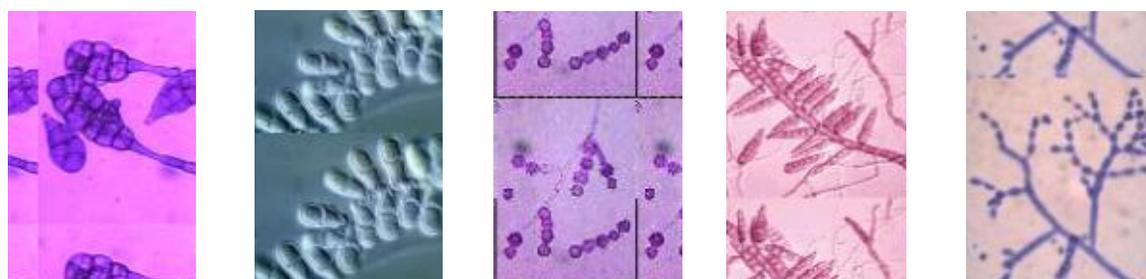
*Acremonium*

*Trichoderma*

*Stachybotrys*

*Fusarium*

*Geotrichum*



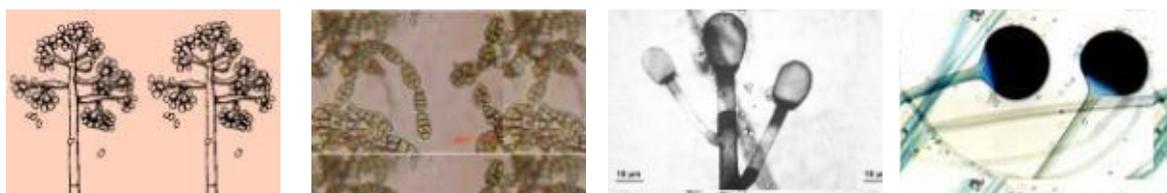
*Alternaria*

*Trichothecium*

*Scopulariopsis*

*Helminthosporium*

*Neurospora*



*Botrytis*

*Cephalosporium*

*Rhizomucor*

*Rhizopus*

Fig. 02 : Quelques champignons filamenteux (voir annexe 07 ).

- **Ascomycètes**

Les Ascomycètes sont définis comme des champignons à thalle mycélien cloisonné, dont le mode de reproduction est sexué avec des spores endogènes (ascospores). Cette classe regroupe de nombreux parasites des végétaux mais aussi de nombreuses moisissures (Guiraud, 1998). Elles sont cependant plus particulièrement nombreuses dans l'ordre des Eurotiales, des Microsciales et des Sphaeriales. Dans cette classe, le genre le plus connu est *Endothia* et *Neurospora* (Bourgeois, 1998).

- **Basidiomycètes**

Elles regroupent seulement certaines moisissures parasites. Elles sont caractérisées par un thalle à mycélium septé et une reproduction sexuée avec la formation de spores exogènes (basidiospores), c'est le cas de *Agaricus* et *Coprinus* (Botton et al., 1999).

- **Deutéromycètes**

Egalement appelés champignons imparfaits, les Deutéromycètes sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium (Boiron, 1996). Ces moisissures constituent la majeure partie des Hyphales ; elles sont classées en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes. Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires : *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, cette classe regroupe aussi les *Penicillium* et les *Aspergillus* (Frazier, 1967; Punt et al., 2002). La fig. 2 montre des exemples de quelques genres appartenant à ces différentes classes.

### **1.3. Mode de reproduction**

Les moisissures produisent des organes de reproduction que l'on appelle de façon générale spores et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative. Les spores d'origine sexuelle résultent d'une fécondation (zygospores et oospores) ou d'une méiose (ascospores ou basidiospores) alors que les spores d'origine végétative résultent d'une simple mitose que l'on appelle fréquemment conidies. Elles assurent la reproduction et la dissémination chez les

espèces de formes imparfaites, mais on les trouve également chez les autres groupes où elles coexistent au côté des formes de reproduction sexuée et leur type varie selon les moisissures

- Les thallospores sont formées aux dépens du thalle par transformation d'éléments préexistants.

- Les sporangiospores sont des cellules flagellées ou non ne provenant pas d'une fraction préexistante du thalle.

- Les conidiospores sont des cellules qui ne sont pas issues directement d'une portion préexistante du thalle. Ces spores toujours terminales naissent d'un filament appelé conidiophore (metulae, phialide, etc.) (Guiraud, 1998).

## **1.4. Conditions de croissance**

### **1.4.1. Eléments nutritifs**

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Les moisissures possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes. Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (Davet, 1996).

#### **• Source de carbone et d'énergie**

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin et *al.*, 2000). Certaines d'entre elles produisent des lipases extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et acides gras qui peuvent être assimilés par beaucoup d'espèces fongiques, alors que seulement certaines espèces utilisent les acides organiques et l'éthanol (Boiron, 1996).

- **Source d'azote**

La plupart des moisissures assimilent l'ammoniaque sous forme de sels ( $\text{NH}_4^+$ ) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines). L'ammoniaque est transformé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination (Boiron, 1996), alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (Punt et *al.*, 2000).

- **Eléments minéraux**

La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (Uchicoba et *al.*, 2001). Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, etc. (Boiron, 1996).

#### **1.4.2. Facteurs physicochimiques**

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination, nous examinerons successivement quelques paramètres importants.

- **Température**

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois, 1989). La plupart des moisissures sont mésophiles avec des optima de croissance de 25 à 35°C (Botton et *al.*, 1999 ; Julien, 2002). Quelques espèces sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au dessus de 50°C) avec une croissance optimale aux environs de 20 à 25°C, *Aspergillus fumigatus* en est un bon exemple (Botton et *al.*, 1999 ; Nicklin et *al.*, 2000). D'autres sont des psychrophiles ou psychrotolérantes se développant à basses températures

(entre -5 et 10°C) tels que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et *Cladosporium herbarum*, ces espèces peuvent survivre même à -60°C, on les rencontre dans des entrepôts frigorifiques (Davet, 1996 ; Botton *et al.*, 1999).

#### • Humidité

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes (Davet, 1996). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (Bourgeois, 1989).

Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation ; leur développement cesse lorsque le potentiel hydrique descend au dessous de - 4 MPa (méga pascal). Les moisissures à mycélium cloisonné supportent en moyenne jusqu'à - 10 MPa. Cependant, les *Aspergillus* et les *Penicillium* peuvent en général se développer à des potentiels hydriques de l'ordre de - 20 MPa (Davet, 1996).

#### • pH

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 – 8.0 (Botton *et al.*, 1999), bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acide .C'est le cas de *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum* et *Aspergillus oryzae*. (Urbanek *et al.*, 1984 ; Delgado-Jarana *et al.*, 2002). Cependant, les enzymes extracellulaires produites dans des milieux complexes peuvent avoir des optima de pH d'activité très différents (plus acides ou plus basiques) (Botton *et al.*, 1999).

Le pH influe sur la croissance de ces microorganismes soit indirectement en agissant sur la disponibilité des éléments nutritifs (à pH acide, le fer reste sous forme d'ions ferreux assimilable), soit directement par action sur la membrane cellulaire. Par ailleurs, les champignons modifient souvent le pH du milieu par absorption sélective et échange d'ions, production de CO<sub>2</sub> ou de NH<sub>3</sub> ou par production d'acides (Boiron, 1996).

- **Oxygène**

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix* (Bourgeois, 1989 ; Botton et al., 1999).

- **Lumière**

Les radiations du spectre visible (380 – 720) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leurs spores (Botton et al., 1999).

### **1.5. Intérêt industriel des moisissures**

Actuellement, les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications ; elles sont utilisées dans les industrie alimentaires, chimiques, la biolixiviation et la biotransformation, etc. Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (Boiron, 1996). Leur intérêt économique repose sur leur activité biologique dans la production d'une grande diversité de molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par l'industrie pharmaceutique et en médecine (Larpend-Gourgaud et Sanglier, 1992).

#### **1.5.1. Intérêt alimentaire**

Les champignons filamenteux sont des producteurs importants d'acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide acétique et l'acide citrique (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Ce dernier est notamment produit par *Aspergillus niger*, où 60% de sa production est destinée au secteur alimentaire (Botton et al., 1999).

La production de biomasse peut être une source importante pour l'alimentation animale et même humaine, en servant de complémentation des produits céréaliers. Quelques espèces fongiques ont un grand usage, c'est le cas d'*Aspergillus niger*, de *Fusarium graminearum* et de *Trichoderma harzianum* (Botton et al., 1999 ; Larpent- Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Delgado-Jarana et al., 2002)

Les enzymes fongiques restent toujours les outils clés de la biotechnologie et reflètent de plus en plus l'importance et le rôle infini des moisissures dans les différentes applications alimentaires. *Aspergillus niger* est un bon exemple, il produit la cellulase, l'amylase, l'invertase et la pectinase, employées principalement comme des catalyseurs biologiques en gluconerie, brasserie et pour la fabrication des boissons. Cette moisissure secrète aussi des protéases, des lipases et des estérases utilisées dans différentes applications alimentaires (Kosikowski, 1988 ; Scriban, 1999).

### 1.5.2. Intérêt chimique

Il s'agit essentiellement de l'utilisation des protéases alcalines d'*Aspergillus oryzae* et de *Stachybotrys chartarum* dans les détergents (Miller, 2002).

La production de cellulase par *Aspergillus niger* et *Trichoderma harzianum* présente une diversité d'applications industrielles, où 48% de sa production par ces deux espèces fongiques et le genre *Penicillium* est utilisée pour l'industrialisation des papiers et les textiles (Delgado-Jarana et al., 2002).

Certains genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Mucor* et *Penicillium* sont capables de produire des lipides en quantités importantes et constituent une source potentielle d'utilisation chimique (Botton et al., 1999).

En biolixiviation seules les bactéries présentent un intérêt industriel. Cependant, certaines moisissures possèdent d'intéressantes propriétés ; *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium funiculosum* et *Rhizopus arrhizus* sont capables d'absorber de l'uranium du minerai. Les milieux de culture carencés en facteurs de croissance et en sels minéraux, diminuent le taux de croissance, mais stimulent ce phénomène (Boiron, 1996 ; Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Botton et al., 1999).

En biotransformation les moisissures ont une zone étroite d'application. Un exemple remarquable est l'hydrolyse enzymatique de la pénicilline V par *Penicillium chrysogenum* et *Fusarium* entraînant la formation d'acide amino-6-pénicillanique qui est un intermédiaire important de la production de pénicillines semi synthétiques telles que l'ampicilline et l'amoxycilline (Durand et Monson, 1988).

### **1.5.3. Intérêt pharmaceutique**

La production industrielle en vitamines se limite à une partie de la synthèse de la riboflavine produite spécialement par *Eemothecium ashbyii* cultivé en milieu agité et supplémenté en lipides. La vitamine A pourrait faire l'objet d'une production microbiologique par les champignons notamment les espèces de l'ordre des mucorales (Botton et *al.*, 1999).

Les champignons filamenteux sont des grands producteurs d'antibiotiques tel que la pénicilline produite par le genre *Penicillium* et la céphalosporine produite par *Cephalosporium* (Larpend- Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Botton et *al.*, 1999). Cependant les acides organiques d'origine fongique n'ont pas une application pharmaceutique importante (Divies, 1984).

### **1.5.4 Intérêt médical**

Les premiers produits d'origine fongique en médecine sont les alcaloïdes de l'ergot de seigle (ergotamine), utilisés en gynécologie et pour diverses autres indications (Boiron, 1996 ; Botton et *al.*, 1999).

La découverte de la cyclosporine, puissant agent immunodépresseur, puis la mise en évidence de corrélation entre l'activité de certaines enzymes et diverses pathologies ont permis de donner un grand essor aux sciences médicales et pharmaceutiques (Botton et *al.*, 1999 ; Richard, 2005).

## **1.6. Isolement des moisissures**

La plupart des milieux naturels air, sol, eau et matières premières alimentaires peuvent servir de matériel de départ pour l'isolement des moisissures (Clark et *al.*, 1985 ; Karam,

2000 ; Julien, 2002), ces échantillons naturels contiennent aussi plusieurs espèces bactériennes et des levures. L'élimination de ces microorganismes pour l'isolement sélectif des champignons filamenteux est réalisé en le combinant traitement des milieux de cultures par un antibiotique avec le choix et le contrôle des conditions de culture. Il est important du choisir un échantillon aussi important que le permet la mise en évidence du microorganisme désiré (Ulacio et *al.*, 1997).

### **1.6.1. Choix d'échantillons naturels**

Le choix de l'échantillon naturel est déterminant pour la mise en évidence du microorganisme recherché. Initialement, les souches microbiennes ont souvent été isolées du sol ou d'éléments naturels (Julien, 2002). Généralement, les microorganismes producteurs des hydrolases sont localisés là où ces substances sont abondantes. Par exemple, les microorganismes sécrétant des cellulases sont nombreux dans les sols des forêts (Scriban, 1999) tandis que les espèces protéolytiques, elles sont localisées dans les débris de fromageries (Peppler et Perlman, 1979 ; Fuke et Matsuoka, 1993 ; Punt et *al.*, 2002).

### **1.6.2. Addition des antibiotiques**

L'isolement des moisissures est réalisé le plus souvent à partir de produits contenant également des bactéries et des levures, donc il est nécessaire d'employer des inhibiteurs spécifiques pour les détruire. L'addition d'antibiotiques aux milieux de cultures est utilisée pour empêcher le développement des bactéries. Les antibiotiques utilisés sont : le chloramphénicol 0,5 mg/ml, l'oxytétracycline 0,1 mg/ml, la streptomycine 30 à 40 µg/ml, la colistine 0,08 mg/ml, la novobiocine 0,1mg/ml ou des colorants (rose Bengale 35 à 67mg/l, cristal violet 10mg/l) (Guiraud, 1998). En raison de leur stabilité, la gentamycine et la chloramphénicol peuvent être stérilisés avec le milieu ; leurs larges spectres d'action en font des antibiotiques très utilisés (Botton et *al.*, 1999).

Lorsque les levures sont très abondantes dans le milieu, il est parfois possible d'utiliser de l'actidione mais à faible concentration de façon à ne pas inhiber la croissance des champignons filamenteux recherchés (concentration < 2 mg/l) (Guiraud, 1998 ; Waller, 2004).

### **1.6.3. Choix des milieux de cultures sélectifs**

Le choix des milieux de cultures est également déterminant dans l'isolement des moisissures (Harrigan et McCance, 1976). Les milieux d'isolement de base (et de numération des spores) sont souvent communs à ceux décrits pour les levures tels que Czapek, le milieu malté (voir annexe 01) (Chakraborty *et al.*, 1995 ; Biezen *et al.*, 1977) ou le milieu de Mossel (Botton *et al.*, 1999). Lors des isollements, ce dernier inhibe la prolifération des bactéries en raison de leur acidité.

### **1.6.4. Conditions d'isolement**

Pour permettre l'expression la plus complète possible des microorganismes recherchés, il convient de retenir au laboratoire les facteurs et paramètres de l'environnement naturel qui ont pu favoriser l'implantation d'une flore particulière. La plupart des moisissures requièrent pour leur développement de l'oxygène et croissent bien en l'absence de lumière. Leur tolérance à l'égard du pH est souvent étendue mais avec généralement une préférence pour les pH légèrement acides. Concernant la température, leur gamme compatible avec la croissance est très large et diffère selon les espèces (Botton *et al.*, 1999 ; Julien, 2002 ; Coulibaly et Agathos, 2003).

### **1.6.5. Sélection des moisissures protéolytiques**

La mise en évidence de l'activité protéolytique chez divers microorganismes nécessite un milieu de culture protéiné, où les protéines jouent le rôle d'une source azotée et même d'une source du carbone. Parfois, elles constituent un inducteur de la synthèse de protéases par les microorganismes (Durand et Monson, 1998). Les différentes protéases peuvent présenter une spécificité vis-à-vis de certaines protéines natives ou dénaturées telles que l'albumine, la caséine, la globuline, l'élastine, l'insuline, etc. L'observation d'une zone claire autour de la colonie microbienne prouve la production d'une ou de plusieurs protéases (Colwell et Grigorova, 1989 ; Richard, 2005).

## 2. Activité protéolytique

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques. Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique, elles scindent les protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés, offrant une multitude de structures (Frazier, 1967 ; Scriban, 1999).

Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux. L'activation du zymogène en enzyme active nécessite une modification covalente irréversible. La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysate de protéines ou d'un mélange d'acides aminés (Pelmont, 1995 ; Scriban, 1999).

### 2.1. Protéases d'origine végétale

Les protéases sont présentes chez toutes les espèces vivantes. Les végétaux ont, avant les microorganismes, été l'objet de recherche en vue d'isoler des enzymes protéolytiques, c'est le cas de la bromélaïne extraite de tige de l'ananas (*Ananas comosus Merr*), la ficine issue du figuier (*Ficus glabrata*) (Alais, 1975 ; Scriban, 1993 ; Moodie, 2001) ces deux enzymes sont proches de la papaïne ; extraite du latex d'une plante équatoriale et tropicale (*Carica papaya*), qui, à elle seule, peut rompre des liaisons peptidiques que la trypsine et la pepsine rompent séparément. Il en est probablement de même pour les préparations enzymatiques provenant de chardons, d'artichauts, de gaillets, de courges, etc (Alais, 1975). La kératinase, une autre protéase qui dégrade les cheveux et les laines est produite par quelques groupes de plantes (Rao et *al.*, 1998).

### 2.2. Protéases d'origine animale

Seules les protéases sécrétées par l'estomac des ruminants présentent un intérêt industriel ; la présure préparée à partir du quatrième estomac des veaux est la plus répandue et la plus ancienne ainsi que les pepsines bovines et porcines. L'activité non spécifique des enzymes pancréatiques, trypsine et chymotrypsine, les rendent moins importantes que les

enzymes gastriques (McKenzie, 1971 ; Alais, 1975 ; Scriban, 1999). Des études récentes permettent aussi l'identification des protéases chez les helminthes : *Schistosoma* sp ; *Fasciola* sp ; *Taenia* sp et *Haemonchus* sp, où elles apparaissent comme cibles potentielles majeures en thérapie et vaccination antiparasitaire (Trap et Boireau, 2000).

### **2.3. Protéases d'origine microbienne**

Les protéases peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries.

#### **2.3.1. Protéases des moisissures**

Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondial des enzymes industrielles. Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc. Ce groupe d'enzymes dispose de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement elles sont de plus en plus utilisées en boulangerie, dans l'industrie alimentaire humaine et animale, dans les détergents pour lessives, dans l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique (Frazier, 1967 ; Ul-haq et al., 2003).

#### **2.3.2. Protéases des levures**

Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, produit trois types de protéases ; une aspartylprotéase, une sérine protéase et une métalloprotéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (Kresze, 1991 ; Boiron, 1996).

#### **2.3.3. Protéases des bactéries**

Il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et résiste bien à l'action des détergents. Par ailleurs, elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa

purification (Calk et *al.*, 2000 ; Frazier, 1967). Les bactéries psychrotrophes du lait et en particulier, *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* produisent des métalloprotéases thermorésistantes utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage du fromages. Ces bactéries sont détruites par la pasteurisation mais les protéases extracellulaires qu'elles produisent ne sont que partiellement inactivées (Cousin et *al.*, 1982). Les protéases extracellulaires de *Streptococcus lactis* jouent un rôle très important dans l'affinage des fromages (Desmazeaud, 1978).

## **2.4. Classification et nomenclature**

Selon la nomenclature de l'union internationale de biochimie et biologie moléculaire (IUBMB, 1998), les protéases sont classées dans le sous groupe 4 du groupe 3 (hydrolases). Cependant, elles ne se soumettent pas facilement dans ce système de classification à cause de la complexité de leur structure et de leur mécanisme d'action ; leur classification se base sur plusieurs critères tels que la longueur de la chaîne polypeptidique, le mode d'attaque de la chaîne, le pH d'activité et la nature de résidu impliqué dans le site actif (Colwell et Grigorova, 1989 ; Rao et *al.*, 1998).

### **2.4.1. Selon longueur de la chaîne polypeptidique**

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

### **2.4.2. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique**

En fonction de leur mode d'attaque, les peptidases sont subdivisés en deux classes ; les endopeptidases et les exopeptidases (Scriban, 1999 ; Moodie, 2001). Ces dernières sont elles-mêmes subdivisées en deux sous-classes les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Les aminopeptidases commencent leur action par l'extrémité NH<sub>2</sub> libre du polypeptide et leur activité dépend souvent de la présence d'ion métallique ; les carboxypeptidases commencent leur attaque par l'extrémité COOH libre du polypeptide (voir fig. 03) (Scriban, 1999 ; Trap

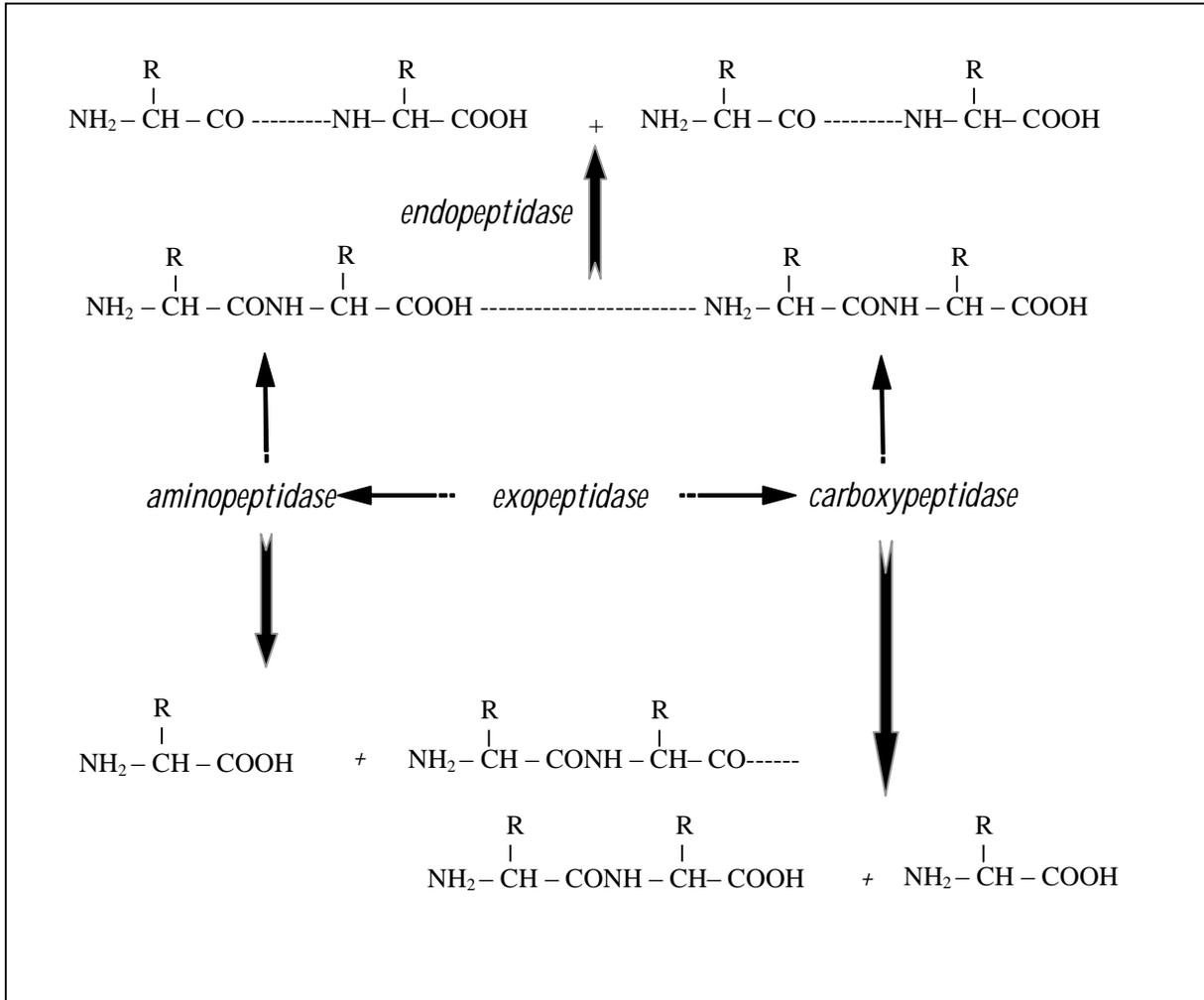


Fig. 03 : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (Scriban, 1999).

et Boireau, 2000). L'activation de ces différentes enzymes conduit à la libération de di et tripeptides qui sont ensuite hydrolysés en acides aminés (Scriban, 1999).

### **2.4.3. Selon le pH d'activité**

Selon ce paramètre, les enzymes protéolytiques de différentes origines sont classées en trois groupes : des protéases acides ; neutres et alcalines (Hartely, 1960 ; Martinelli et Kinghorn, 1994). Dans ce contexte, les moisissures représentent un groupe de microorganismes physiologiquement différents des autres groupes, elles possèdent une gamme d'enzymes actives à des pH différents, c'est le cas des protéases produites par *Aspergillus oryzae*, *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti*. Certaines protéases fongiques ont des optima de pH très acides de 2.5 à 5.0 (Botton et al., 1999 ; Auberger et al., 1985 ; Mechakra et al., 1999).

### **2.4.4. Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif**

Les séquences primaires et la spécificité des acides aminés de leur site actif ont permis la classification des endopeptidases en quatre grandes familles, les sérilylprotéases, les cystéylprotéases, les aspartylprotéases et les métalloprotéases (IUBMB, 1998).

#### **• Sérilylprotéases**

Les protéases à sérine sont très répandues dans la nature, aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Elles forment une famille d'enzymes apparentées entre elles ainsi qu'avec certaines estérases ; leur mécanisme catalytique implique l'intervention d'un résidu sérine. Parmi ces protéases, on trouve la chymotrypsine, la trypsine, l'élastase et la subtilisine (Reginald et al., 1975 ; Kortt et al., 1994 ; Pelmont, 1995 ; Trap et Boireau, 2000).

#### **• Cystéylprotéases**

C'est également une grande famille de protéases, leur activité catalytique nécessite la présence d'histidine, d'aspartate et la cystéine. Elles comprennent entre autres la papaine, la

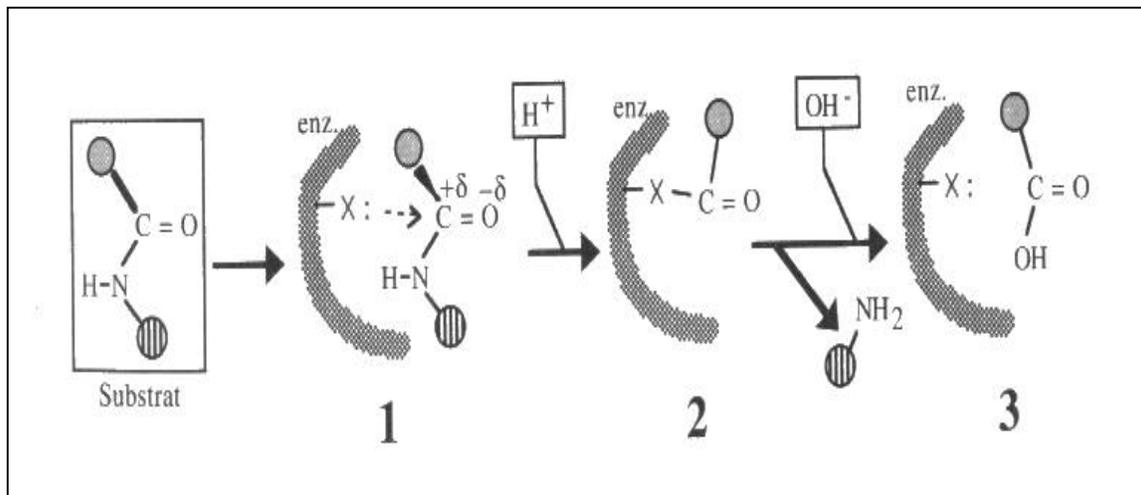


Fig. 04 : Mécanisme d'action des protéases (Pelmont, 1995).

bromélaïne, la ficine et les cathepsines (B, L et H) du complexe lysosomal qui participent au renouvellement des protéines dans la cellule (Kresze, 1991 ; Pelmont, 1995).

- **Aspartylprotéases**

Les protéases à aspartate sont des enzymes répandues chez les eucaryotes des champignons aux vertébrés, elles fonctionnent de préférence en milieu acide. Certaines sont élaborées par des rétrovirus (sarcome de Rous). La pepsine et la chymosine (rénine) appartiennent aussi à cette famille. Toutes ces enzymes sont caractérisées par la présence de deux résidus essentiels d'aspartate et sont inhibées par la pepstatine ou par des époxydes (Pelmont, 1995 ; Rao *et al.*, 1998).

- **Métalloprotéases**

Ce sont des hydrolases qui contiennent des cations métalliques dans leur site actif, généralement du zinc. Le métal est un agent électrophile qui exacerbe la réactivité de l'eau avant son attaque nucléophile sur le carbonyl de la liaison peptidique à rompre. Les exemples les plus remarquables sont la thermolysine et les endopeptidases de la brosse intestinale de la famille des astacines (Pelmont, 1995 ; Jakubowski, 2001).

## **2.5. Mode d'action**

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

- Dans les deux premières étapes, l'enzyme déforme la liaison peptidique et renforce la polarité du carbonyl, qui facilite son attaque nucléophile conduisant à la formation d'une liaison covalente transitoire entre le morceau portant le carbonyl du substrat et l'enzyme avec la libération de l'autre morceau (le premier produit) protoné par un proton cédé d'un résidu enzymatique.
- Dans la troisième étape, une nouvelle substitution nucléophile est exercée par le OH d'une molécule d'eau et libère le deuxième produit de la réaction, où le site actif de l'enzyme se trouve régénérer par un proton (de l'H<sub>2</sub>O) (Pelmont, 1995).

## 2.6. Propriétés analytiques

L'activité protéolytique, comme toute réaction enzymatique, dépend fortement du pH et de la température. Pour la plupart des enzymes, on distingue facilement une étroite zone dite de pH optimum et de température optimale où la vitesse de réaction est la plus grande. La vitesse des réactions enzymatiques dépend aussi de la présence de certains activateurs ou des inhibiteurs (Penasse, 1974).

Tableau n°1 : Propriétés analytiques de quelques enzymes protéolytiques (Deymié et *al.*, 1981).

Classe	Exemple	Origine	pH <sub>Optimal</sub>	T <sub>Optimale</sub>	Inhibiteur
Seryl protéases	chymotrypsine	pancréas	8.0 - 8.5	35	nombreux aa PPN ou OP α TSF inhibiteurs naturels PMSF nombreux aa
	trypsine	//	7.5 – 8.0	45	
	subtilisine	<i>B .subtilis</i>	7.4	60	
		<i>B.licheniformis</i>	10	56	
		<i>B.amyloliquefaciens</i>	10	60	
	p.extracellulaire	<i>Fusarium culmorum</i>	8.3 – 9.6	50	
	endopeptidase	<i>Trichoderma viride</i>	7.0 – 8.0	40	
Cystéylprotéase	papaïne	Carica papaya	8.0 – 8.5	35	Hg EDTA oxydants agents chélateurs // et EDTA
	ficine	Ficus glabrata	4.0 – 6.0	35	
	protéase neutre	<i>Geotrichum candidum</i>	7.0	42	
	aminopeptidase	<i>Lactobacillus helveticus</i>	7.0	37	
	streptopain	<i>Streptococcus sp</i>	7.2	37	
	cathepsineK	cellules animales	6.5	37	
Aspartylprotéases	pepsine A	estomac	1.5 – 2.5	40	alcools pepstatine des époxydes ( EPNP et le DAN)
	chymosine	estomac de veau	4.0 – 4.5	40 – 42	
	cathepsine D	cellules animales	2.5 – 3.5	37	
	p.extracellulaire	<i>Trichoderma harzianum</i>	4.5	40	
	//	<i>Aspergillus niger</i>	4.6	50	
Métalloprotéases	carboxypeptidaseA	l'intestin grèl des vertébrés	7.5	37	certains aa certains aa agents chélateurs
	carboxypeptidaseB	//	8.0	37	
	P.bactérienne	<i>Micrococcus caseolyticus</i>	7.4	50	
	collagénase	Cellules animales	7.4	38	

Tableau n°2 : Quelques protéases fongiques et leurs applications industrielles.

Genre	Espèce	Type d'enzyme	Applications industrielles	Références
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	p.ac	aide digestive, préparation des souces de soja et panification	Jernejc et Cimerman, 2001.
	<i>oryzae</i>	p.ac, p.n et p.al	attendrissage des viandes, aide digestive, détergents, brasserie	Rugsaseel et al., 1995.
	<i>melleus</i>	p.al	détergents pour lessives	Davidson et al., 1975.
	<i>candidus</i>	//	//	Haussnert et al., 1996.
	<i>flavus</i>	//	clinique	Dahot, 1987
	<i>saitoi</i>	p.ac	Affinage des fromages	Jernejc et Cimerman, 2001
	<i>parasiticus</i>	p.al	détergents pour lessives	//
	<i>sojae</i>	p.al	préparation des souces de soja	Dahot, 1987
				Botton et al., 1990
<i>Endothia</i>	<i>parasitica</i>	p.ac	Coagulation du lait et l'affinage des fromages	Durand et Monson, 1982
<i>Fusarium</i>	<i>culmorum</i>	p.ac p.al	Médicale (phytopathologie) Hydrolyse des protéines céréales	Urbanek et Yirdaw, 1984 Pekkarinen et al., 2002
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	p.n	Affinage des fromages	Boiron, 1996
<i>Mucor</i>	<i>bacilliformis</i> <i>miehei</i> <i>pusillus</i>	p.ac	Coagulation du lait	Fernandez-Lahore et al., 1998 Durand et Monson, 1982
<i>Penicillium</i>	<i>camemberti</i>	p.ac, p.n et p.al	Industrie laitière (affinage des fromages et la coagulation du lait)	Auberger et al., 1985
	<i>expansum</i>	p.ac		Dahot, 1987
	<i>requaforti</i>	p.ac, p.n et p.al		Dai et al., 2004. Modler et al., 1974. Sodek et Hofmann, 1970
	<i>tanthinellum</i>	p.ac		
<i>Rhizomucor</i>	<i>miehei</i>	p.ac	Coagulation du lait et l'attendrissage des viandes	Boiron, 1996
<i>Rhizopus</i>	<i>oligosporus</i>	p.ac	Hydrolyse des protéines destinées à l'industrie alimentaire	Ul-Haq et al., 2003
<i>Stachybotrys</i>	<i>chartarum</i>	p.al	Détergents	Miller, 2002
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	p.ac	Applications alimentaire et médicale	Delgado-Jarana et al., 2002
	<i>viride</i>	p.n		Uchicoba et al., 2001

## **2.7. Applications industrielles des protéases**

La naissance de l'industrie des enzymes a coïncidé avec le début du vingtième siècle et avec l'apparition des premières enzymes microbiennes, essentiellement des amylases. Aujourd'hui, l'application de différentes enzymes a connu un grand essor dans des domaines extrêmement variés. Les principales industries utilisatrices de protéases sont les détergents pour lessives, la tannerie, la biosynthèse industrielle, la laiterie, la panification, la brasserie et l'application médicale et pharmaceutique (voir tableau n° 2) (Durand et Monson, 1982 ; Siezen , 1988 ; Rao, 1998).

### **2.7.1. Applications chimiques**

Les détergents constituent l'application industrielle la plus importante des enzymes, les protéases représentent environ 60% du marché mondial où elles jouent un très grand rôle dans l'amélioration du pouvoir détergent d'une lessive ; elles sont capables de dissoudre les taches protéiques à basse température contrairement aux produits chimiques qui ne possèdent pas des propriétés équivalentes même à haute température (Garicia- Conesa et *al.*, 1999). Dans ce contexte, la subtilisine de *Bacillus* est l'une des enzymes les plus étudiées et les mieux connues, 80% de sa production étant dévolue à ce secteur. Plus de 50 de ces enzymes ont été identifiées et la séquence primaire de 40 d'entres elles est connue (Heslot, 1996 ; Garicia-Conesa et *al.*, 1999).

Dans les tannerie, les protéases alcalines d'*Aspergillus* et de *Bacillus* remplacent de plus en plus fréquemment les substances chimiques et toxiques employées au cours de la production (confitage, l'épilage et le reverdissage des peaux). De cette façon, on économise de vastes quantités de chaux, de sulfure de sodium, de solvants divers et surtout de sels chromiques toxiques, réduisant ainsi considérablement la pollution des eaux et le travail des décharges (Rao ,1998).

### **2.7.2. Applications médicales et pharmaceutiques**

Les protéases sont impliquées dans des nombreuses fonctions des cellules eucaryotes. De plus, elles jouent un rôle critique dans la virulence des agents pathogène (Colwell et

Grigorova, 1989) et plus particulièrement des parasites. L'ensemble des rôles clés protéolytiques dans la virulence parasitaires en font des cibles potentielles en thérapie et vaccination antiparasitaire. Des essais vaccinaux contre la leishmaniose utilisant la gp63, une métalloprotéase à zinc, ont été réalisés, cette molécule étant impliquée dans les stades précoces de l'invasion parasitaire. Plusieurs cystéylprotéases de trématode *Fasciola hepatica* semblent être de bons candidats pour l'immunodiagnostic. De même des protéases identifiées chez différents parasites et utilisées comme vaccin recombinant font actuellement l'objet d'études (Trap et Boireau, 2000).

En dehors de la vaccination antiparasitaire, des inhibiteurs spécifiques des protéases virales ont actuellement un grand intérêt comme médicaments potentiels, car ils sont susceptibles de bloquer la production de virus à partir d'une cellule déjà infectée (Heslot, 1996).

Les enzymes protéolytiques d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme des aides digestives pour compenser certaines carences pathologiques (Haussner et al., 1996 ; Rao et al., 1998) la collagénase de *Clostridium* ou la subtilisine sont employées en combinaison avec des antibiotiques pour traiter des brûlures et des blessures (Rao, 1998).

### **2.7.3. Applications alimentaires**

L'application des protéases à l'industrie alimentaire n'est pas récente. Pour la fabrication des fromages, seules les enzymes coagulantes fongiques ont donné de bons résultats, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure et la pepsine bovine et porcine. Cependant, la majorité des préparations coagulantes provenant du règne végétal ont donné des résultats décevants car elles possèdent le plus souvent une activité protéolytique très élevée, qui se traduit par l'apparition d'inconvénients technologiques majeurs (Alais, 1975 ; Pepler et Perlman, 1979)

En panification, l'action protéolytique d'*Aspergillus oryzae*, de la papaïne ou de la bromélaïne sur le gluten améliore la manipulation de la pâte et augmente le volume de la mie en réduisant le temps de pétrissage (Durand et Monson, 1982 ; Moodie, 2001).

L'enzyme bactérienne, la subtilisine est utilisée comme additif dans les conserves alimentaires pour détruire les spores des germes *Clostridium* (Rao et *al.*, 1998 ; Durand et Monson, 1982).

La papaine et certaines enzymes protéolytiques microbiennes, telle que la protéase alcaline d'*Aspergillus oryzae*, sont employées comme des additifs pour augmenter la digestibilité des aliments et l'attendrissage des viandes. La protéase neutre de la même espèce est utilisée pour l'affinage des fromages (Fedrick et *al.*, 1986 ; Durand et Monson, 1982 ; Frazier, 1967 ; Haussner et *al.*, 1996).

En brasserie, l'action protéolytique de la papaine donne à la bière finie une bonne stabilité colloïdale à froid (Durand et Monson, 1982).

### **3. Lactosérum**

#### **3.1. Définition**

C'est un produit laitier liquide de couleur jaune obtenu durant la fabrication du fromage, de la caséine ou de produits similaires, par séparation du caillé après coagulation du lait et/ou des produits dérivés du lait. Le caillé représente l'ensemble des protéines non solubles et la matière grasse alors que le lactosérum contient toutes les substances solubles du lait (lactose, protéines et minéraux solubles, un peu de matière grasse) (Dion et *al.*, 1978 ; Luquet et Bonjean-Linczowski, 1985).

#### **• Lactosérum doux**

C'est un coproduit des fromages à pâte cuite, à pâte pressé et de la caséine, obtenu après le traitement du lait par voie enzymatique, généralement par la présure, avec un pH variant entre 5,7 et 6,5.

• **Lactosérum acide**

C'est la phase aqueuse résultant de la fabrication des fromages à pâtes molles ou fraîches ou de caséines, pour lesquels le caillage à lieu sans emprésurage c'est-à-dire par acidification (coagulation lactique) d'où leur nom. Le pH du lactosérum acide varie entre 4 et 5 (Imbert-pondaven, 1977 ; Alais, 1975, Luquet et Bonjean-Linczowski, 1985).

**3.2. Composition chimique**

La composition chimique du lactosérum varie considérablement selon la source du lait, les différents traitements que l'on fait subir pour le transformer en produits consommables et les procédés de fabrication (Laplanche, 2004).

Tableau n°3 : Composition chimique des deux types du lactosérum en g/l (Alais, 1975).

<b>composant chimique</b>	<b>Lactosérum doux</b>	<b>Lactosérum acide</b>
Matière sèche	55 à 75	55 à 65
Lactose	40 à 57	38 à 55
Lipides	0 à 5,0	0 à 2,0
Matières azotées totales	7,0 à 11,0	4,8 à 10,5
Cendres	4,0 à 6,0	6,0 à 8,0
Calcium	0,4 à 0,6	1,2 à 1,4
Phosphore	0,4 à 0,7	0,5 à 0,8
Potassium	1,4 à 1,6	1,4 à 1,6
Chlorure	2,0 à 2,2	2,0 à 2,2
Acide lactique	0 à 0,3	7,0 à 8,0

Tableau n°4 : Activité biologique des protéines et des peptides du lactosérum (McIntoch, 1998 ; Berry, 2000).

Protéine ou peptide	Activité probable
Protéines du lactosérum brut	Anti-cancérogène Stimule le système immunitaire Prolonge la durée de vie Réduit le cholestérol
<i>b</i> lactoglobuline <i>b</i> lactorphine <i>a</i> lactalbumine <i>a</i> lactorphine	Facilite la digestion Augmente le contrôle de la douleur Anti-cancérogène Augmente le contrôle de la douleur
Lactoferrine  lactoferricine	Antimicrobien (antibactérien/antiviral) Contrôle le transport du fer Stimule le système immunitaire Anti-inflammatoire Favorise la croissance des cellules Anti-cancérogène Antimicrobien
immunoglobuline	Immunité passive
lactoperoxydase	Antibactérien
Sérum-albumine sérorphine	Augmente le contrôle de la douleur
glycomacropéptide	Facilite la digestion

### **3.3. Intérêt industriel du lactosérum**

Il n'y a pas si longtemps, le lactosérum liquide était souvent traité comme un déchet tandis qu'aujourd'hui on le considère comme un sous-produit utile de la production laitière. Les produits à base de lactosérum constituent un segment relativement neuf des marchés laitiers mondiaux. Depuis 1994, le commerce international du lactosérum a connu une hausse annuelle de près de 25% (Nakais et Modler, 2000).

#### **3.3.1. Intérêt alimentaire**

Une quantité considérable de lactosérum est utilisée dans l'alimentation animale, et le marché international de l'alimentation animale et des ingrédients connexes est en pleine expansion. De plus, il constitue un ingrédient alimentaire à valeur ajoutée, utilisé dans une vaste gamme d'aliments et de boissons (Granger et Jean-Blain, 1982 ; Lowisfert, 1994 ; Dryer et *al.*, 2001).

#### **3.3.2. Intérêt médical**

Actuellement, les scientifiques évaluent les effets bénéfiques des fractions de protéines de lactosérum et leur intérêt qui pourraient offrir des avantages fonctionnels en matière de santé. L'utilisation de ces fractions est fort prometteuse pour ce qui est d'offrir, aux secteurs de l'alimentation et de la nutrition, des occasions de développer de nouveaux produits vraiment efficaces contre les maladies du cœur (réduction du cholestérol et de la tension artérielle), les ulcères, les cancers, etc. (voir tableau 04) (Girard, 2000 ; Berry, 2000).

#### **3.3.3. Intérêt biotechnologique**

En biotechnologie, le lactosérum par sa composition biochimique possède d'intéressantes propriétés comme milieu de fermentation pour plusieurs microorganismes assimilants le lactose comme source de carbone et d'énergie. Il s'agit des levures de boulangerie telles que *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr* et *Kluyveromyces fragilis* (Metz et *al.*, 1968 ; Ecalard, 1990 ; Gana et Touzi, 2001), cette dernière est cultivée sur le lactosérum doux déprotéiné et enrichi par des facteurs de croissance dans le but de produire de la biomasse (Gana et Touzi, 2001). L'utilisation du lactosérum comme milieu de culture

est également favorable au développement de moisissures. *Penicillium camemberti* a permis la production des protéases acides, neutres et alcalines en utilisant plusieurs facteurs de croissance sélectionnés par des méthodes statistiques (Jollivet et Belin, 1993 ; Mechakra et al., 1999 ; Benlounissi, 2004). Ce coproduit laitier a été utilisé aussi pour la fermentation de *Mucor miehei* et *Endothia parasitica* produisant des aspartylprotéases (Saint-Paul et al., 1984 ; Seker et al., 1999). Le lactosérum déprotéiné a servi comme milieu de base pour la production de la cellulase par la moisissure *Aspergillus niger* (Leghlimi, 2004). Certaines espèces bactériennes comme *Lactobacillus bulgaricus* fermentent sur des milieux de cultures à base de lactosérum pour la production d'acides organiques et de différentes enzymes (Jannot et al., 1984 ; Ecalard, 1990 ; Miyakawa et al., 1992).

## 1. Méthode d'isolement des moisissures productrice des protéases

### 1.1. Prélèvement

Des prélèvements ont été réalisés à partir de quatre sites différents de la *Sebkh*a d'une ville saharienne « *El-Mghair* » (qui se trouve à 140 Km au sud de *Biskra*), dans le but d'isoler des souches productrices d'enzymes protéolytiques thermostables. Tous les prélèvements (du sol et de l'eau) sont réalisés dans des conditions d'aseptie rigoureuse et récupérés dans des flacons et sachets stériles et paraffinés. L'échantillonnage a été fait à différents niveaux comme suit :

- A. Au niveau du lac principal à une distance de 5 m du bord et à une profondeur de 50 cm sous l'eau.
- B. Dans une flaque d'eau avoisinant le lac à une profondeur de 15 à 20 cm.
- C. Du sol avoisinant le lac à une profondeur de 20 cm
- D. Du sol des palmeraies distantes de 30 m du lac à une profondeur de 50 cm (sol).

Après la récupération des échantillons, des suspensions du sol sont préparées à partir d'une simple dilution puis le pH de tous les échantillons mesuré tel que préconisé dans la bibliographie (Harrigan et McCance, 1976).

### 1.2. Milieux d'isolement

Trois milieux synthétiques sont employés pour l'isolement des moisissures (Harrigan et McCance, 1976) :

- l'Agar blanc (voir annexe 01)
- le milieu Czapek Dox (voir annexe 02)
- le PDA (potato dextrose agar) (voir annexe 03)

La croissance bactérienne est inhibée par l'addition de gentamycine aux milieux de culture avant leur stérilisation à une concentration de 5 mg/l (Botton et *al.*, 1999).

### 1.3. Méthode d'isolement

Pour préparer les suspensions du sol, 1g de chaque échantillon est dilué dans 9 ml d'eau distillée stérile (Clark et *al.*, 1985 ; Ulacio et *al.*; 1997), puis une série de dilutions décimales

est effectuée sur les deux types d'échantillons. Pour les deux échantillons d'eau, la dilution est de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  et pour les deux suspensions du sol la dilution est à partir de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-10}$  (Ulacio et al ; 1997). Après la préparation des dilutions, une agitation vigoureuse avec le Vortex permet l'homogénéisation des milieux. A chaque échantillon, il a été attribué un code désignant son origine et son degré de dilution.

Par ailleurs, les milieux sont ensemencés dans des boîtes de Pétri à raison de 1ml par dilution (Ikasari et Mitchell, 1994). Les boîtes sont incubées à 30°C et sont observées quotidiennement pendant deux semaines. Les moisissures développées sur le premier milieu (Agar blanc) sont repiquées individuellement sur Czapek Dox puis sur PDA. Après leur incubation dans les mêmes conditions et leur purification, elles sont ensemencées sur le milieu sélectif.

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

Les colonies appartenants aux champignons filamenteux sont ensemencés sur le milieu sélectif (lait gélosé) (voir annexe 04) par un repiquage au centre ; l'incubation à lieu dans une étuve à 30°C. Le lait gélosé est préparé à trois concentrations en lait écrémé : 10%, 20% et 30% (Harrigan et McCance, 1976).

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

A partir du deuxième jour et jusqu'au septième, des mesures sur le diamètre de chaque colonie et sa zone d'hydrolyse sont effectuées. Celles-ci permettent de sélectionner les souches protéolytiques les plus performantes. Chaque opération (repiquage et mesure) est réalisée en triple. Toutes les moisissures qui ont développé une zone d'hydrolyse sont observées au microscope optique (objectif  $\times 25$  et  $\times 40$ ) dans le but de les identifier.

### **3. Méthodes d'identification**

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères culturaux (identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique), rarement à des propriétés biochimiques (Botton et *al.*, 1999).

#### **3.1. Identification microscopique**

Toutes les moisissures protéolytiques isolées sont soumises à une identification morphologique réalisée par une étude microscopique. Cette dernière est effectuée par un prélèvement soigneux d'un petit fragment de la flore microbienne (quelques spores et un fragment mycélien à la marge du thalle) à l'aide d'une anse en platine stérile. Ce fragment est ensuite transféré sur une lame, en lui ajoutant comme diluant du lactophéno-bleu coton (voir annexe 05), l'observation microscopique est réalisée au grossissement  $\times 25$  et  $\times 40$  et  $\times 100$ . Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation,...) et des spores (forme, couleur, texture des parois,...) (Harrigan et McCance, 1976 ; Oteng-Gyang, 1984 ; Guiraud, 1998).

#### **3.2. Identification macroscopique**

La moisissure sélectionnée après fermentation (voir ci-dessus ) est soumise à une identification macroscopique par un examen de la culture sur cinq milieux gélosés; Czapek, CYA, malt-agar, MEA et PDA (voir annexe 06, 07 et 08) (Ottaviani et *al.*, 1988 ; Botton et *al.*, 1999 ; Jernejc et Cimerman, 2001). L'examen permet de déterminer les quatre caractères culturaux suivants : la vitesse de croissance, la texture et la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture et l'odeur (Harrigan et McCance, 1976 ; Rinaldi et *al.*, 1998 ; Botton et *al.*, 1999). Cette étude est réalisée en triple.

### **4. Conservation**

Les moisissures sont conservées par la méthode la plus simple et la plus communément utilisée au laboratoire qui consiste à repiquer ces souches à la fin de leur croissance en tubes sur gélose inclinée (Botton et *al.*, 1999), en utilisant comme milieu de conservation le CYA.

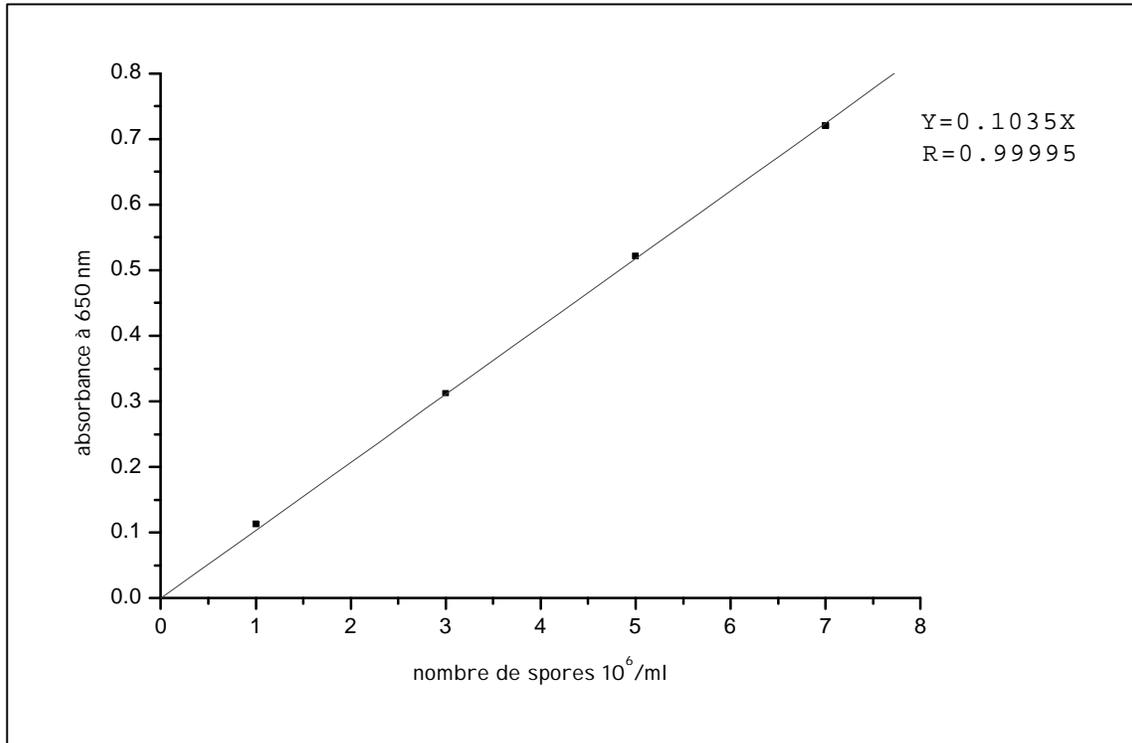


Fig. 5 : La courbe d'étalonnage des spores d'*Aspergillus sp. A 09*.

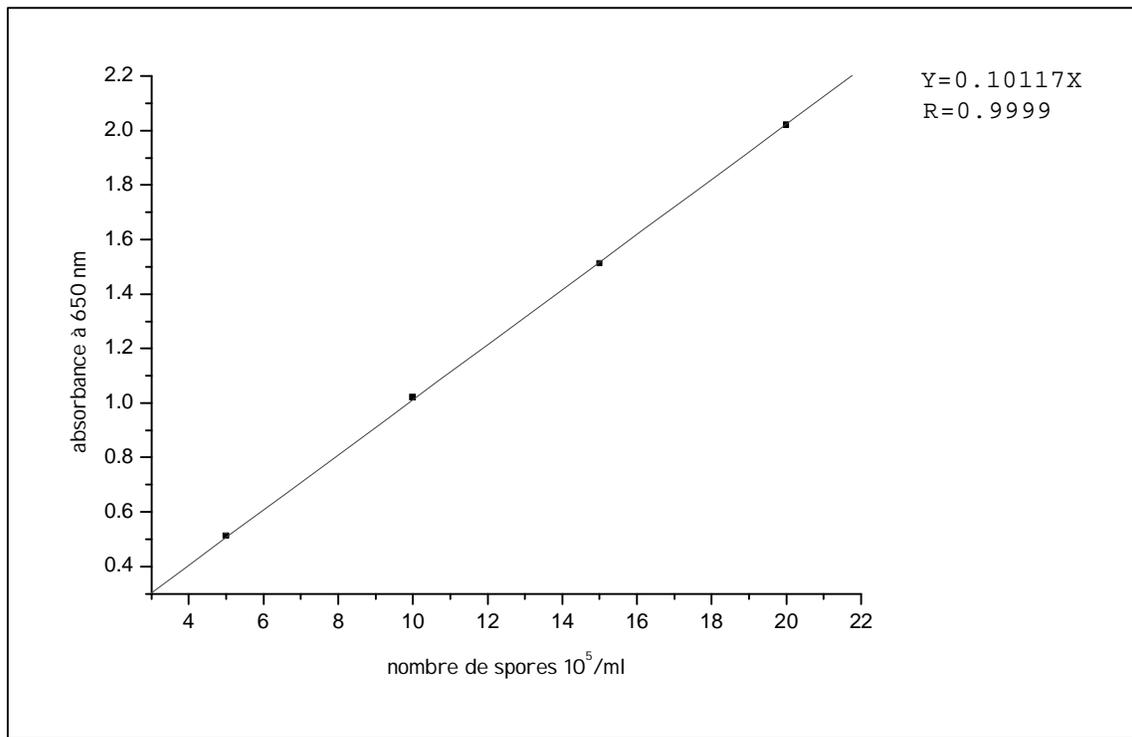


Fig. 6 : La courbe d'étalonnage des spores de *Stachybotrys sp. C 01*.

(Parks, 1997). Après une semaine d'incubation à 30°C, les cultures sont conservées à 4°C (Botton *et al.*, 1999).

## **5. Méthodes de production des protéases**

Les moisissures retenues d'après les diamètres de leurs zones d'hydrolyse sont utilisées pour la production des protéases. Pour cela, elles sont préparées afin d'obtenir un inoculum.

### **5.1. Préparation de l'inoculum**

#### **5.1.1. Préparation des suspensions des spores**

La sporulation des cinq moisissures est réalisée sur milieu PDA (potato dextrose agar) réparti dans des erlenmeyers de 250 ml à raison de 40 ml/ flacon. L'incubation a lieu à température ambiante. Après une semaine, les spores sont récupérées par addition de 50 ml d'eau distillée stérile et une agitation vigoureuse (200 rpm) (Seker, Beyenal et Tanyolaç, 1999 ; Mechakra *et al.*, 2002).

#### **5.1.2. Dénombrement des spores**

Le comptage de spores des différentes suspensions est estimé par mesure de l'absorbance à 650 nm par un spectrophotomètre de type Lambda EZ 150. Les lectures photométriques sont traduites en nombre de spores à l'aide des courbes d'étalonnage établies par dénombrement au microscope (objectif × 40) à l'aide d'une cellule de comptage (la cellule de thomas) (Lenoir et Choisy, 1971 ; Mechakra *et al.*, 2002) (voir fig. 5 et 6)..

### **5.2 Méthode de culture**

Les cultures ont pour but de sélectionner la moisissure produisant l'activité protéolytique la plus élevée. Pour cela, nous avons réalisé des fermentations de deux milieux, l'un synthétique (Czapek modifié) et l'autre naturel (à base de lactosérum)

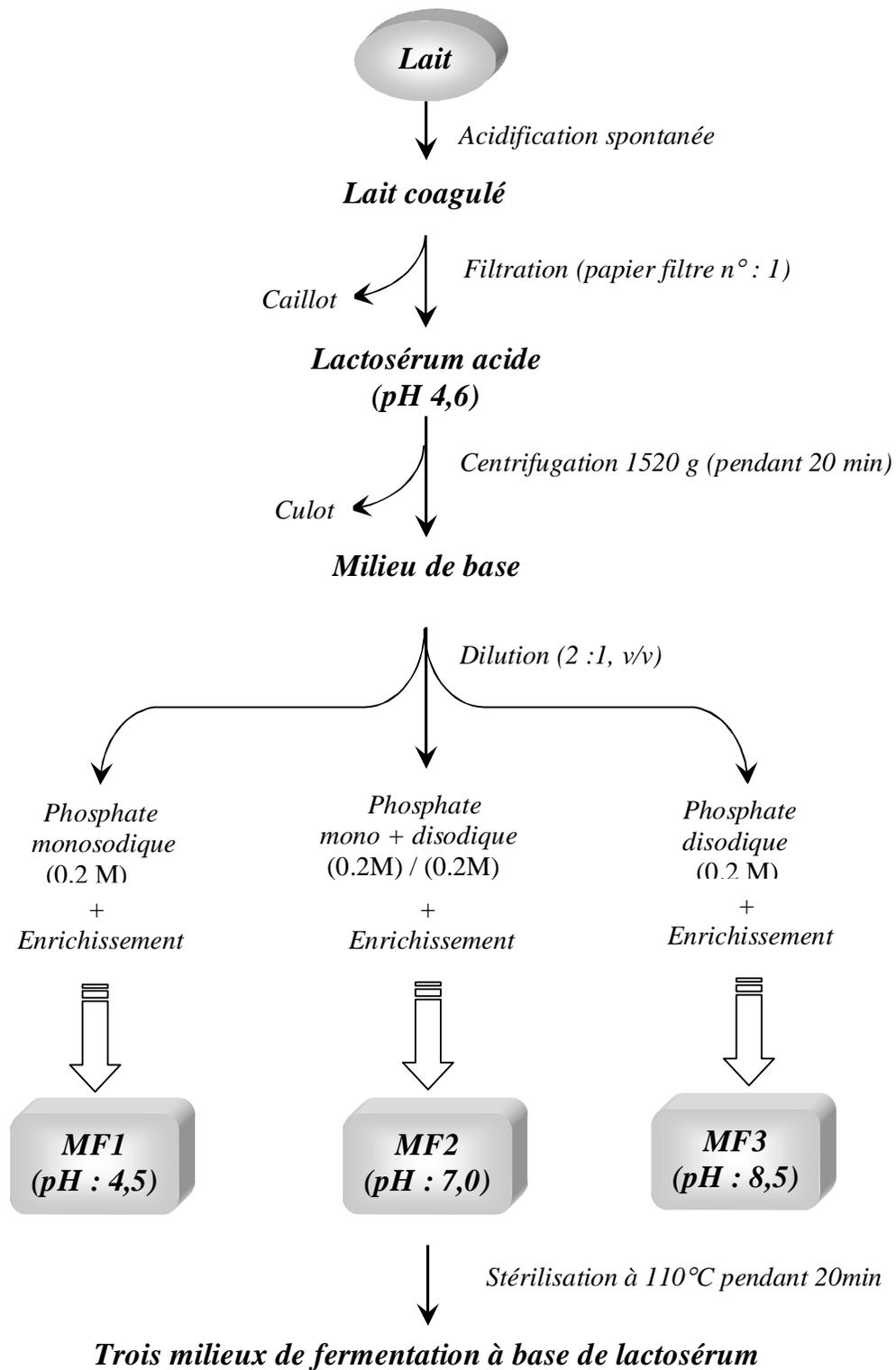


Fig. 07 : préparation du milieu de fermentation à base de lactosérum.

### 5.2.1. Préparation des milieux de fermentation

- **Milieu synthétique (Czapek modifié)**

Ce milieu utilisé est dérivé du milieu de Czapek (bouillon) mais sa teneur en glucose est ramenée à 10 g/l et le nitrate est remplacé par 10 g/l de peptone tryptique (pour la composition chimique complète du milieu voir annexe 09) (Auberger et *al.*, 1995 ; Guiraud, 1998). Le milieu a été préparé à trois pH différents ; le pH de 4,5 est obtenu par addition de phosphate monosodique (0,2 M), le pH 7,0 en utilisant le phosphate mono et disodique (0,2 /0,2 M) et le pH 8,5 en ajoutant le phosphate disodique (0,2 M) (Auberger et *al.*, 1995). Les milieux sont versés dans des erlenmeyers de 250 ml à raison de 50 ml de milieu de production par erlen, puis stérilisés à 110°C pendant 20 min.

- **Milieu à base de lactosérum**

Le milieu de base est le lactosérum acide obtenu par coagulation spontanée du lait semi-écrémé commercial « *Dialy* » produit localement, puis filtration sur papier filtre n° : 1 (à ce niveau le pH est de 4,6). Le filtrat est alors centrifugé à 1520 g pendant 20 min. Le surnageant obtenu est partagé en trois parties, chacune est additionnée d'un tampon différent (2 :1, v/v) (voir ci-dessus), permettant l'obtention de milieux de base à trois pH différents (4.5 ; 7.0 ; 8.5) (voir fig. 07). Les milieux ainsi préparés sont enrichis par deux facteurs (trypticase et les sels MgSO<sub>4</sub> et le FeSO<sub>4</sub>) (pour la composition chimique complète du milieu voir annexe 10) sélectionnés dans le cadre d'une étude précédente par optimisation en utilisant un plan factoriel fractionné (Mechakra et *al.*, 1999). Les niveaux optima de ces deux facteurs ont été déterminés à l'aide d'un plan composite centré (Benlounissi, 2004).

Les réactions enzymatiques ont été effectuées dans les mêmes conditions dans tous les erlenmeyers tout le long du travail avec une série de trois répétitions. Pour chaque erlen l'activité enzymatique endocellulaire et exocellulaire est la moyenne de trois dosages.

### 5.2.2. Conduite de la fermentation

Les souches sélectionnées ont été cultivées sur les deux milieux (Czapek modifié et le lactosérum) aux trois pH différents 4,5, 7,0 et 8,5. Chaque milieu estensemencé par un

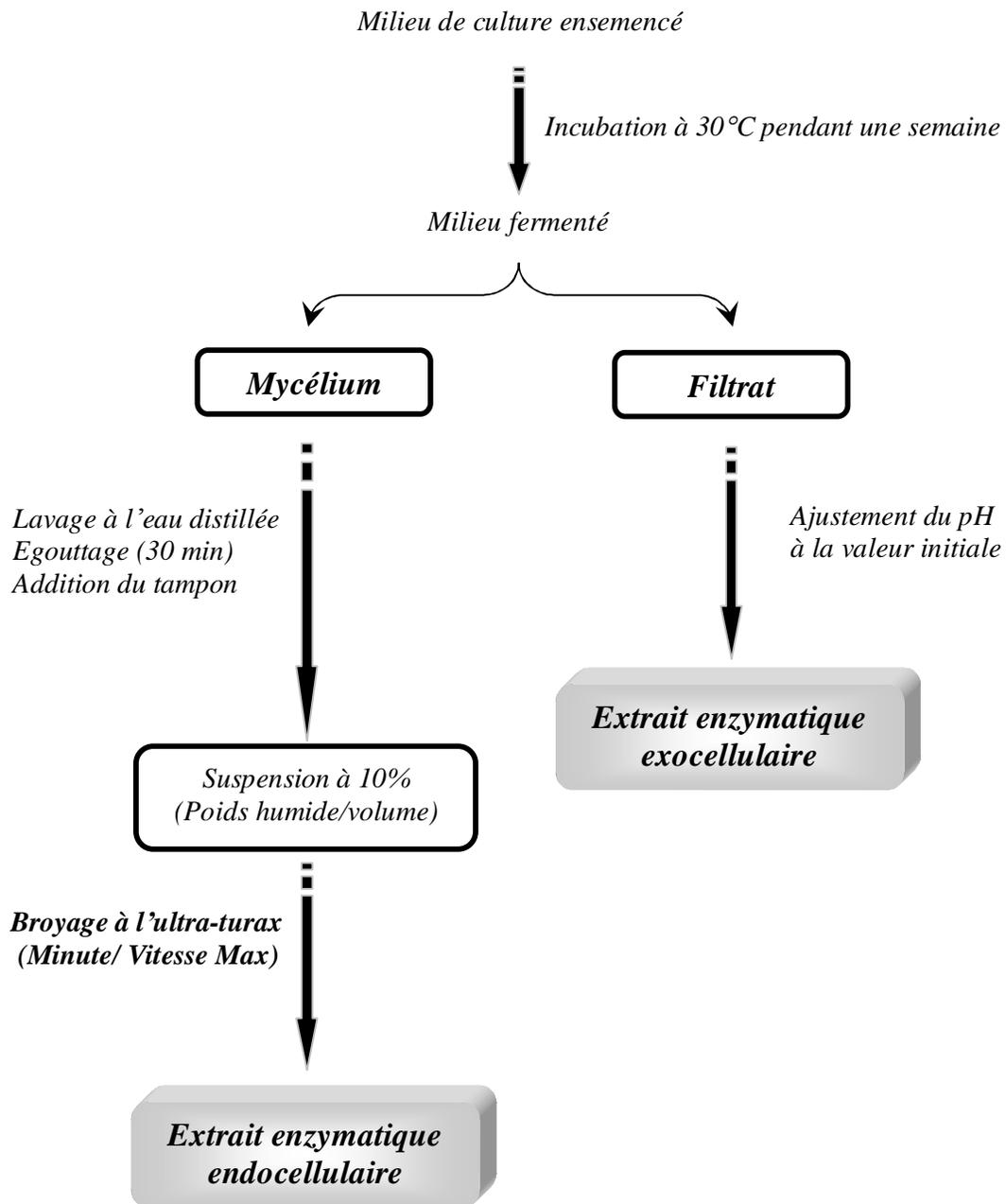


Fig. 08 : préparation des extraits enzymatiques.

volume déterminé d'une suspension de spores de l'une des cinq souches après mesure de l'absorbance à 650 nm et par référence à la courbe d'étalonnage, de manière à avoir un taux de  $10^5$  spores par ml de milieu (Chakraborty, Srinivasan et Raghavan, 1995 ; Auberger, Lenoir et Bergère, 1999). Les milieuxensemencés sont incubés à 30°C pendant sept jours sous agitation à environ 100 rpm. Les expérimentations sont réalisées en triple.

## **6. Etude de l'activité protéolytique produite**

### **6.1. Préparation des extraits enzymatiques**

Après les fermentations, le mycélium développé est séparé du milieu par filtration sur papier filtre n° : 1. Le filtrat de culture, dont le pH est ajusté à la valeur initiale, représente la préparation exocellulaire. Le mycélium est rincé à l'eau distillée, égoutté sur linge propre pendant 30 min, puis pesé. Une suspension du mycélium à 10% (poids humide/volume) dans le tampon voulu est soumise à un broyage à l'ultra-turax pendant une minutes à la vitesse maximale en présence de Triton  $\times 100$  à 1%. Le broyat représente l'extrait endocellulaire (voir fig. 08) (Auberger et *al.*, 1995; Mechakra et *al.*, 1999).

### **6.2. Méthode de dosage de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique est dosée selon la même méthode décrite par Auberger et *al.*, 1995 et modifiée par Mechakra et *al.*, 1999.

#### **• Principe**

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines et des polypeptides pour les transformer en fragments protéiques, en peptides simples et en acides aminés libres, La précipitation par le TCA permet de récupérer les fragments solubles dans le filtrat. La présence des groupements tyrosine dans le filtrat est traduite en activité protéolytique (exprimé par heure d'hydrolyse et par ml de milieu) par un dosage colorimétrique à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu. Celui-ci réagit avec ces groupements et avec le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu.

### • Réaction enzymatique

L'activité protéolytique est déterminée par utilisation de la caséine comme substrat. Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

- 1 ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage.
- 0,5 ml du tampon (pour chaque pH, en ajoute un tampon spécial).
- 2,5 ml de la solution de caséine dans le citrate de sodium (0,02 M) à pH 7,0.

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

### • Protocole de dosage

Les composés azotés non protéiques présents dans le filtrat sont dosés selon la méthode d'Anson, (1938) selon le protocole ci-dessous.

On mélange :

- 1 ml du filtrat.
- 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 15% dans le NaOH (0,1N).

On agite et on laisse incuber pendant 15 min à température ambiante, puis en ajoute 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10<sup>ème</sup>, et 6,5 ml d'eau distillée. Après agitation vigoureuse, on laisse reposer 5 heures à température ambiante à l'obscurité, en enfin on lit l'absorbance à 750 nm, les valeurs obtenues sont converties en activité à l'aide d'une courbe étalon préalablement établie. L'unité protéolytique est définie par la concentration de tyrosine en µg résultant de l'hydrolyse enzymatique dans un ml de milieu et pendant une heure du temps.

### • Préparation de la courbe d'étalonnage

La gamme-étalon est établie à partir d'une solution mère de tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 100 µg /ml selon le même protocole décrit précédemment pour le dosage de l'activité. Cependant, l'extrait enzymatique est remplacé par la solution de tyrosine comme l'indique le tableau suivant :

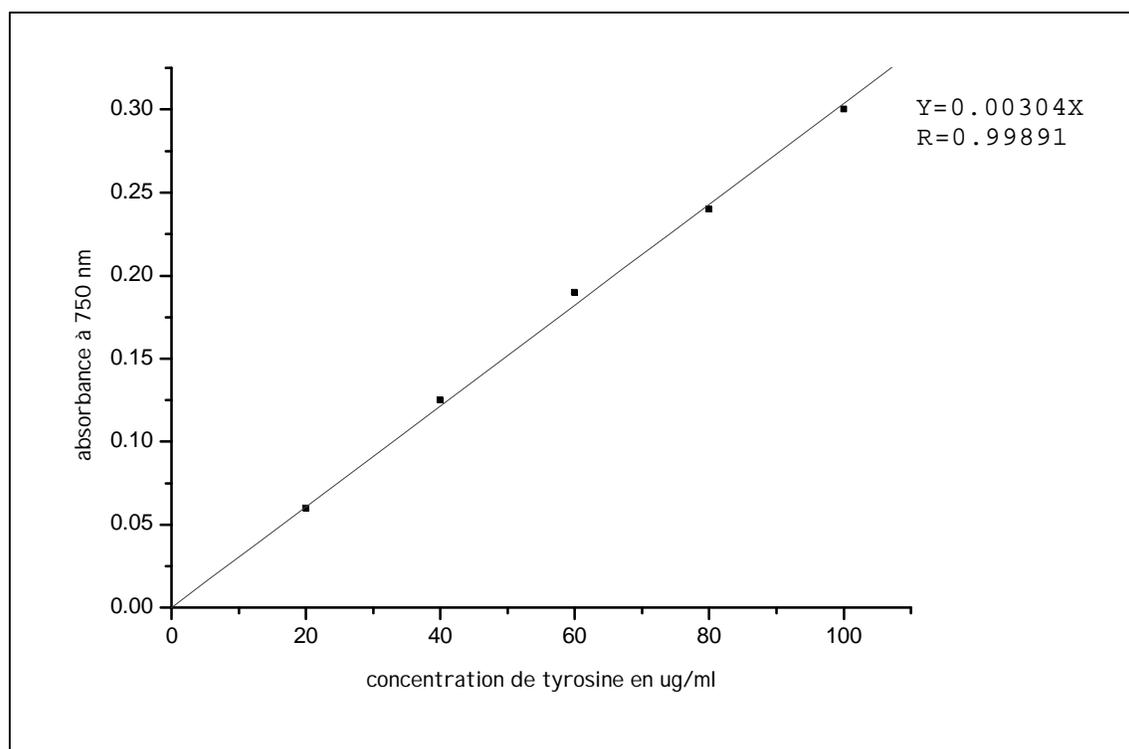


Fig. 09 : La courbe d'étalonnage de la tyrosine.

<b>Concentration en tyrosine (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>
<b>Solution mère de tyrosine (ml)</b>	<b>0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>1</b>
<b>TCA (ml)</b>	<b>1</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>	<b>0</b>
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ml)</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Folin-Ciocalteu (ml)</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>
<b>Eau distillée (ml)</b>	<b>6,5</b>	<b>6,5</b>	<b>6,5</b>	<b>6,5</b>	<b>6,5</b>	<b>6,5</b>

Les lectures au spectrophotomètre à 750 nm des différentes concentrations ont permis de tracer la courbe d'étalonnage (voir figure n°9).

Les résultats des dosages de l'activité protéolytique des cinq souches ont permis la rétention d'une seule souche, celle ayant donné la meilleure activité. Après la filtration du milieu de production sur papier Whatman n° 1, le filtrat est centrifugé à 4°C pendant 10 min à 1140 g. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut (Benlounissi, 2004).

### **6.3. Méthode d'extraction de l'enzyme par le sulfate d'ammonium**

#### **• Principe**

L'addition de sulfate d'ammonium à une solution protéique aqueuse entraîne une diminution de la constante diélectrique, donc de la stabilité des protéines, ce qui conduit à leur précipitation (Osterlund et Janson, 1997). Après la séparation de précipité par centrifugation, les protéines et en particulier l'enzyme à étudier subissent une dialyse.

#### **• Protocole de précipitation**

Le sulfate d'ammonium est utilisé à différentes concentrations 30%, 60% et 85%. Pour cela, on a préparé une solution mère saturée de 85%, cette dernière est refroidie puis rajoutée à l'extrait enzymatique brut jusqu'à la concentration désirée (concentrations ascendantes). Après l'agitation du mélange dans un bain de glace ( $T \leq 4^\circ$ ) pendant 2 heures au moins, on centrifuge le mélange à 2280 g pendant 20 min à 4°C. Le culot est remis en solution dans

un petit volume de tampon phosphate 0.1M (10 ml) à pH 4.5. Le surnageant est repris pour la deuxième phase de précipitation selon la même méthode qu'avec la première concentration. Le culot résultant après chaque centrifugation est également redissout dans le même tampon. Après chaque précipitation on détermine l'activité protéasique et la concentration en protéines totales (Desmazeau et Hermier, 1968).

#### • Dialyse

L'extrait enzymatique obtenu après chaque précipitation est dialysé dans un boudin en cellophane (260CO30) (pour sa préparation voir annexe 11) contre un grand volume (un litre) de tampon phosphate (0.1M) à pH 4.5, sous agitation pendant 24 h à 4°C.

### 6.4. Etude des propriétés de l'enzyme

#### • Influence de pH

L'influence de pH sur l'activité enzymatique est estimée par l'addition (au mélange réactionnel) de tampons afin d'obtenir différentes valeurs de pH, c'est-à-dire des pH compris dans l'intervalle [2 – 9]. Pour cela, on ajoute les systèmes tampons suivants :

- Pour l'intervalle [2 – 5] : citrate (0,1 M)/ phosphate monosodique (0,1M) (avec des variations de 0.5 unités).
- Pour l'intervalle [5 – 7] : phosphate monosodique (0,2 M)/ phosphate disodique (0,2 M) (avec des variation de 0.5 unités).
- Pour l'intervalle [7 –9] : phosphate disodique (0,2M)/NaOH (1N) (avec des variations de 0.5 unités).

#### • Influence de la température

L'effet de la température d'incubation est déterminé par mesure de l'activité protéasique de l'extrait brut incubé pendant 1 heure à des températures variant de 20°C à 90°C avec un incrément de 5°C, à pH optimal.

- **Stabilité thermique**

L'étude de la stabilité thermique à 60°C, 70°C, 80°C et 90°C a été réalisée par dosage de l'activité enzymatique après chaque incubation du mélange réactionnel pour un intervalle de temps allant jusqu'à 120 min, avec des prélèvements toutes les 10 minutes.

- **Mesures des paramètres cinétiques**

Dans le but de déterminer les constantes cinétiques de l'enzyme ( $V_m/K_M$ ), l'activité enzymatique est mesurée aux optima de pH et de température en présence de différentes concentrations de caséine soluble variant entre 0,5% et 5% avec un intervalle de variation de 0,5%.

## **7. Etude de la composition chimique du lactosérum**

### **7.1. Dosage des protéines**

- **Principe**

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et *al.*, (1965) dont le principe de base est fondé sur la résultante de deux réactions. Dans le premier temps, la présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin entraîne la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et la liaison peptidique avec l'apparition d'une coloration violette proportionnelle à la quantité d'acides aminés présents dans le milieu (réaction de Biuret). La deuxième réaction résulte de la réduction de tyrosine et tryptophane présents dans les protéines par le constituant actif du réactif de Folin-Ciocalteu l'acide phosphomolybdotungstique pour donner naissance à un complexe bleu.

- **Réactifs**

- Solution A :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 2% dans le NaOH (0,1N).
- Solution B : tartrate double de sodium et de potassium à 2% dans l'eau distillée.
- Solution C :  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à 1% dans l'eau distillée.

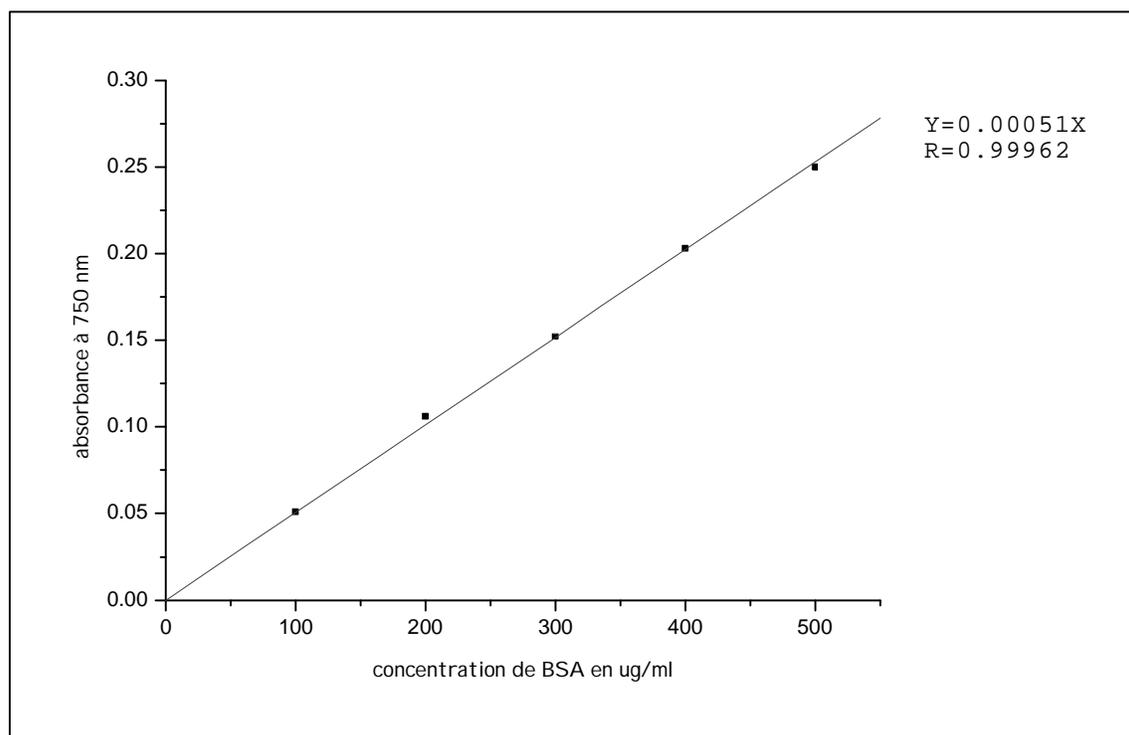


Fig. 10 : La courbe d'étalonnage des protéines.

- Solution E : réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10<sup>ème</sup>.
- Solution F : solution mère de BSA (sérum albumine bovine) à 500 µg/ml pour la courbe d'étalonnage.

#### • Protocole

En ajoute à 1 ml du lactosérum 1ml de la solution D. Le mélange est laissé pendant 15 min à température ambiante, ensuite en ajoute au mélange 3 ml de la solution E. Après agitation rigoureuse, l'échantillon est incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 45 minutes. L'absorbance est lue à 750 nm.

#### • Préparation de la courbe d'étalonnage

La gamme-étalon est établie à partir d'une solution mère de BSA dont les concentrations sont comprises entre 0 et 500 µg/ml. Le mélange réactionnel de différentes concentrations est préparé selon le même protocole décrit ci-dessus et comme l'indique le tableau suivant :

Concentration de BSA (µg /ml)	0	100	200	300	400	500
Solution F (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Solution D (ml)	1	1	1	1	1	1

La lecture des absorbances de différentes concentrations, a permis de tracer la courbe d'étalonnage (voir figure n° 10).

## 7.2 Dosage des sucres

#### • Principe

La détermination de la concentration des sucres est réalisée par la méthode de Dubois et *al.*, (1956) dont le principe repose sur la réaction suivante : L'acide sulfurique concentré provoque à chaud le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthylfurfural (HMF) dans le

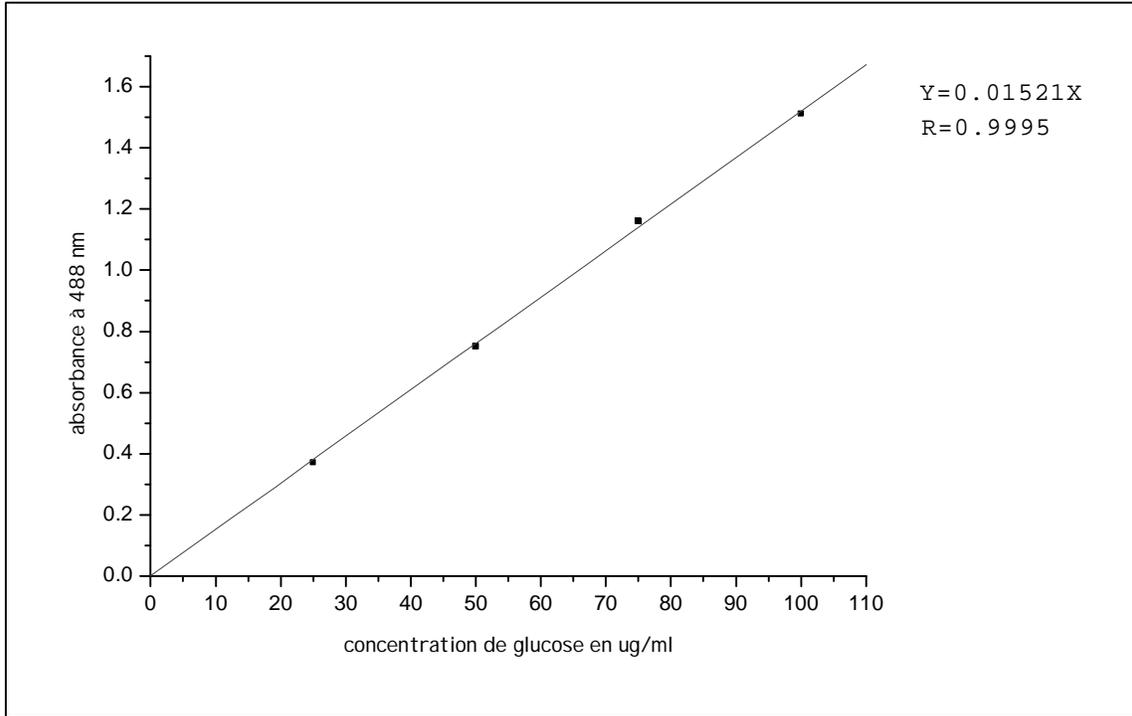


Fig. 11 : La courbe d'étalonnage de glucose.

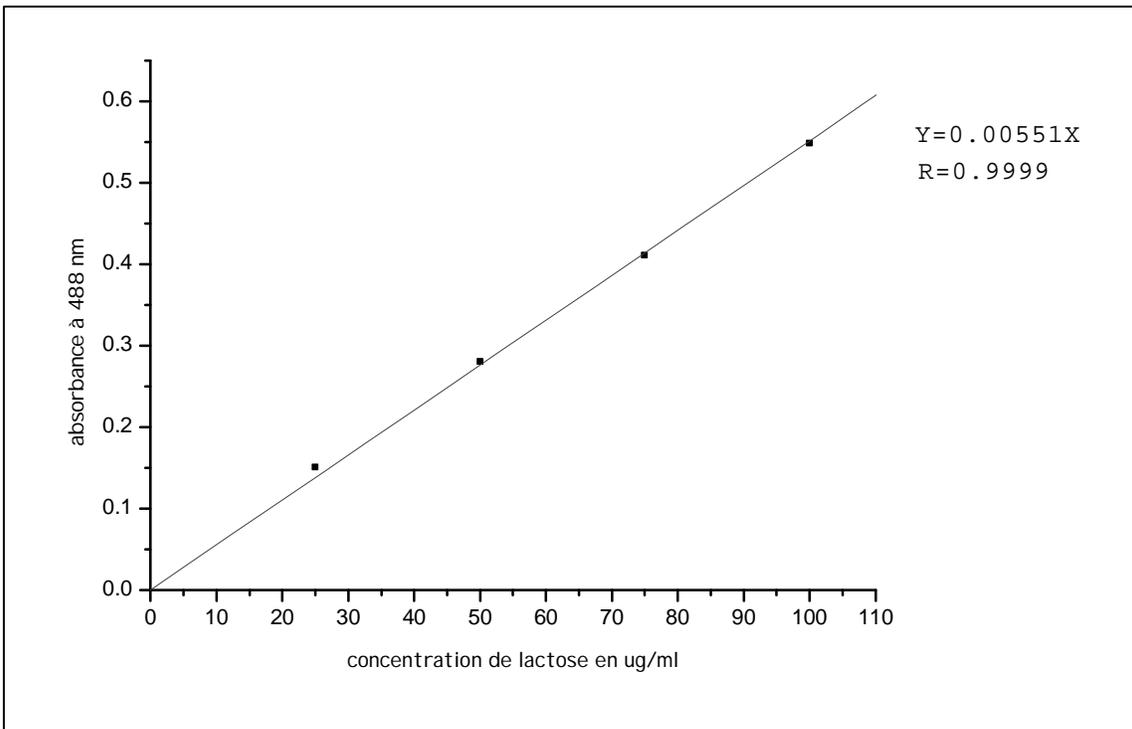


Fig. 12 : La courbe d'étalonnage du lactose.

dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la coloration des oses présents dans l'échantillon à doser.

• **Réactifs**

- Solution mère de lactose à 100 µg/ml pour la courbe étalon du lactose.
- Solution mère de glucose à 100 µg/ml pour la courbe étalon de glucose.
- Solution de phénol à 5% dans l'eau distillée.
- Acide sulfurique à 95% de pureté et de densité  $d=1,83$ .

• **Protocole**

Ce dosage permet la détermination des concentrations de glucose et du lactose dans le lactosérum. Pour cela à 1ml de l'échantillon dilué, on ajoute 1ml du phénol à 5% puis 5 ml d'acide sulfurique. Après agitation, on laisse le mélange réactionnel reposer 10 min à température ambiante, puis on l'incube au bain Marie à 30°C pendant 30 min. Après la lecture des absorbances au spectrophotomètre (Lambda EZ150) à 488 nm, les valeurs obtenues sont traduites en concentrations de glucose et lactose par référence à des courbes d'étalonnage préalablement établies.

• **Préparation de la courbe d'étalonnage**

La gamme-étalon des deux courbes a été établie à partir des deux solutions mères, l'une de glucose et l'autre de lactose à des concentrations comprises entre 0 et 100 µg/ml dans les deux cas (voir fig. n° 11 et 12).

<b>Concentration des sucres (µg/ml)</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>
<b>Solution mère (ml)</b>	<b>0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>1</b>
<b>Eau distillée (ml)</b>	<b>1</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>	<b>0</b>
<b>Phénol à 5% (ml)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Acide sulfurique (ml)</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

### 7.3. Détermination de la matière sèche

La méthode consiste à faire dessécher un échantillon (10 ml de lactosérum) introduit dans une capsule préalablement séchée et tarée dans une étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (plus de 5 heures), cette opération est réalisée en plusieurs séries et les résultats sont exprimés en mg au litre. Ils sont calculés par la formule suivante (Afnor, 1986) :

$$MS = (M2 - M1) \times (100/V) \quad \text{mg/l}$$

M1 : masse en gramme de la capsule vide.

M2 : masse en gramme de la capsule et du résidu.

V : volume de l'échantillon en ml.

MS (%) = 100% - H (%). /H : humidité.

### 7.4. Détermination des cendres

Les cendres sont déterminées par incinération. La prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche (à 105°C pendant 20h) est suivie par une calcination au four à moufle à 550°C pendant 5h, les cendres exprimées en pourcentage de masse sont données par la formule (Audigié et *al.*, 1984)

$$C\% = (M0 - M1 / M2 - M1) \times 100(\%)$$

M0 : masse de la capsule et les cendres

M1 : masse de la capsule vide

M2 : masse de la capsule et la prise d'essai.

## 1. Isolement

Les cultures des prélèvements sur milieu d'Agar blanc ont permis l'isolement de quarante huit souches différentes. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 5 ; ils font apparaître la répartition du nombre de colonies appartenant aux champignons filamenteux apparus dans chaque échantillon.

Tableau n° 5 : Isolement des moisissures sur l'Agar blanc.

Echantillon	Origine	pH	Nombre de colonies
A	Lac principal	7,39	20
B	Flaque d'eau avoisinant le lac	7,43	15
C	Sol avoisinant le lac	6,89	9
D	Sol des palmeraies	7,28	4

L'emploi de l'Agar blanc au cours de l'isolement est fondé sur l'inhibition de l'implantation rapide des microorganismes et en particulier les bactéries. Ce milieu a permis aussi d'inhiber l'envahissement des moisissures qui se caractérisent par leur prolifération très rapide, même sur des milieux à basse valeur nutritive (Weiser *et al.*, 1971 ; Tucker et Thomas, 1992). L'envahissement est dû à une panoplie enzymatique extrêmement riche des moisissures par rapport aux bactéries et aux levures (Davet, 1996 ; Waites et Morgan, 2001).

Toujours dans le but d'empêcher la prolifération bactérienne, on a procédé à l'addition de gentamycine avec une concentration de 5 mg/l. Selon la littérature (Jarvis, 1973 ; Iwahashi *et al.*, 1987 ; Botton *et al.*, 1999) et les expériences réalisées au laboratoire, la gentamycine est l'un des antibiotiques typiques et ce grâce à sa stabilité vis-à-vis de la température et la pression (conditions de stérilisation) ; il se caractérise ainsi par leur larges spectres d'action. Ces derniers sont prouvés par les résultats obtenus lors de l'isolement. Le pouvoir inhibiteur de la gentamycine et l'utilisation de l'Agar blanc comme milieu d'isolement ont permis de réduire l'apparition des bactéries. Le nombre réduit des colonies levuriennes a évité l'utilisation d'un antilevurien.

Les petites colonies filamenteuses apparues ont été prélevées de l'Agar blanc et repiquées sur le milieu Czapek Dox. Le développement rapide des colonies sur ce milieu reflète sa richesse en éléments nutritifs indispensables. Cette opération est suivie par des repiquages successifs sur PDA et sur Czapek Dox qui ont permis d'obtenir quarante huit moisissures pures.

## 2. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Le choix des milieux de culture est déterminant dans l'isolement et le dénombrement des microorganismes ; il l'est aussi dans la mise en évidence de l'activité enzymatique et surtout dans le choix de la substance protéique employée comme substrat pour la production des protéases (Clarke et Steel, 1966). Pour cela, on a utilisé le milieu au lait gélosé (la gélose au lait) comme milieu sélectif.

Les résultats obtenus après l'ensemencement des laits gélosés donnent des zones d'hydrolyse de dimensions similaires dans les trois concentrations (10%, 20% et 30%), ce qui indique le peu d'effet de la concentration du lait sur la croissance et sur la production des protéases. Cependant les zones d'hydrolyse apparues prouvant la production des protéases sont plus claires avec les concentrations de 20% et 30% par rapport à 10%.

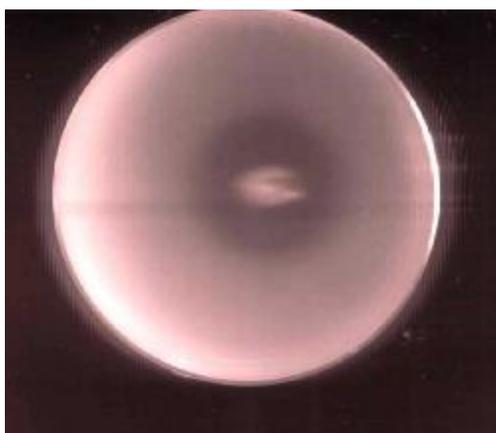
Les tests de protéolyse sont réalisés sur le lait gélosé à 30% ; ils ont permis la mise en évidence de l'activité protéolytique chez quinze moisissures parmi quarante huit souches différentes. Six souches sont caractérisées par des zones d'hydrolyse très faibles (< 2 mm) (juste autour de leurs mycélium). Alors que les autres souches, neuf moisissures ; sont caractérisées par des zones d'hydrolyse, dont le diamètre varie de 2 à 11 mm. Ces résultats permettent de considérer ces souches comme des moisissures productrices de protéases exocellulaires (Smith et *al.*, 1952 ; Duce et Thomas, 1959). Cette étape conduit à retenir les neuf souches (voir tableau n°6). Parmi lesquelles, cinq ont un diamètre supérieur à 5 mm ; elles sont sélectionnées pour les fermentations. Les mesures sont effectuées à partir du deuxième jour jusqu'au septième. L'envahissement de ce milieu par la majorité des moisissures étudiées a limité les mesures à une semaine d'incubation.



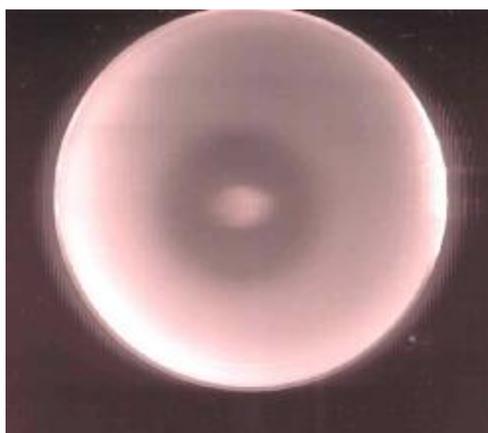
*Fig. 13: Stachybotrys sp. C 01*



*Fig. 14 : Geotrichum sp. B 12*



*Fig. 15 : Aspergillus sp. A 34*



*Fig. 16 : Aspergillus sp. A 39*



*Fig.17: Aspergillus sp. A 09*

Il est à noter que même en absence d'une activité protéolytique exocellulaire, on observe un envahissement du milieu par les moisissures. Ceci indique une utilisation des sucres totaux présents dans le lait comme source de carbone et d'énergie ou par la production d'une activité protéolytique endocellulaire.

Tableau n° 6 : Mise en évidence de l'activité protéolytique exocellulaire sur le lait gélosé à 30%

espèces jours	diamètre de la colonie (mm)						diamètre de la zone d'hydrolyse (mm)					
	2 <sup>eme</sup>	3 <sup>eme</sup>	4 <sup>eme</sup>	5 <sup>eme</sup>	6 <sup>eme</sup>	7 <sup>eme</sup>	2 <sup>eme</sup>	3 <sup>eme</sup>	4 <sup>eme</sup>	5 <sup>eme</sup>	6 <sup>eme</sup>	7 <sup>eme</sup>
<i>Aspergillus sp</i> A 39	11	25	29	38	47	*	3	6	10	11	<b>11</b>	*
<i>Aspergillus sp</i> A 09	16	20	32	47	63	*	/	2	4	7	<b>10</b>	*
<i>Aspergillus sp</i> A 34	13	28	42	57	*	*	/	3	7	<b>10</b>	*	*
<i>Geotrichum sp</i> B 12	10	16	20	27	30	32	2	4	5	6	7	<b>8</b>
<i>Stachybotrys sp</i> C 01	05	08	13	20	27	31	/	1	2	4	5	<b>6</b>
<i>Aspergillus sp</i> B 06	16	23	52	*	*	*	/	3	4	*	*	*
<i>Fusarium sp</i> A 08	08	15	17	20	23	25	/	1	1	2	3	3
<i>Penicillium sp</i> A 13	09	18	28	39	41	53	/	2	2	3	3	3
<i>Geotrichum sp</i> C 25	15	19	21	23	36	39	/	1	1	2	2	2

\* : envahissement du milieu. / : absence de la zone d'hydrolyse.

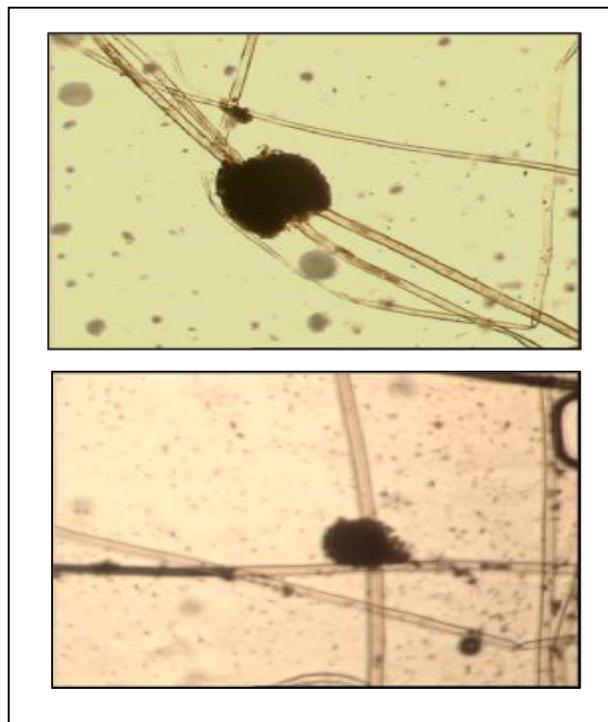


Fig. 18 : Photos. Microscopiques d'*A. niger* isolé ( $\times 10$ ).



Fig. 19 : Photo. Microscopique des spores d'*A. niger* isolé ( $\times 10$ ).

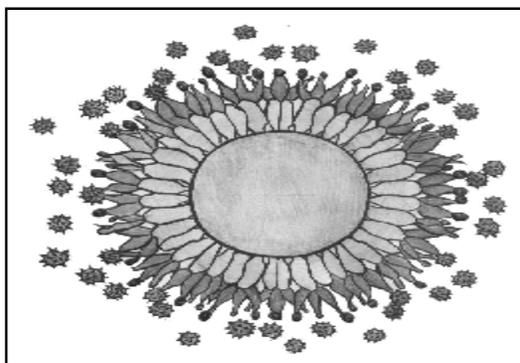


Fig. 20 : *Aspergillus niger* (Botton et al., 1999).

### 3. Identification

#### 3.1. Identification microscopique

L'observation microscopique au grossissement  $\times 25$  et  $\times 40$  a permis l'identification des genres des différentes souches protéolytiques isolées. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau n° 6.

L'identification microscopique des espèces repose sur des critères morphologiques et sur l'ontogénie des spores, c'est-à-dire la conidiogénèse (aspect, couleur et structure des conidiophores). L'étude microscopique de la souche *Aspergillus* A 09 (sélectionnée par rapport à sa production en protéases exocellulaires après les fermentations) est réalisée au grossissement  $\times 100$ . Les résultats sont similaires à ceux décrits dans la bibliographie (Jackson, 1962 ; Weiser *et al.*, 1971 ; Bennett, 1985 ; Dai *et al.*, 2004) à savoir :

- des filaments mycéliens septés.
- des conidiophores lisses, non ramifiés, longs, larges, à parois épaisses et bruns.
- une tête Aspergillaire brunâtre foncé, rayonnante et la vésicule terminale globuleuse et bisériée.
- des phialides de petites tailles par rapport aux metules.
- des conidies globuleuses, noires, échinulée à très verruqueuses.

#### 3.2. Identification macroscopique :

L'étude microscopique réalisée préalablement est complétée par une étude macroscopique dans le but de déterminer l'espèce de la souche sélectionnée (*Aspergillus sp* A09). Ce type d'étude est primordial pour l'identification de la moisissure (aspect de la colonie, couleur, revers et la vitesse de croissance,...). Dans ce cas *Aspergillus sp* A 09 est incubé à 30°C pendant une semaine sur cinq milieux nutritifs gélosés. L'étude macroscopique est réalisée par des observations à l'œil nu et des mesures quotidiennes. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau n°7.

Tableau n°7 : Identification macroscopique de la souche A 09.

<b>milieu</b>	<b>diamètre de la colonie (mm)</b>	<b>vitesse de croissance</b>	<b>Couleur de la colonie</b>	<b>revers</b>
<b>Czapek DOX</b>	32	lente	noire	incolore
<b>CYA</b>	55	rapide	noire	pale jaune
<b>Malt Agar</b>	39	rapide	blanche au début et entièrement noire après la sporulation	jaune
<b>MEA</b>	40	rapide	blanche au début et entièrement noire après la sporulation	incolore
<b>PDA</b>	56	rapide	blanche au début et entièrement noire après la sporulation	pale jaune

D'après la bibliographie, ces résultats indiquent que la souche examinée correspond à l'espèce *Aspergillus niger* (Raper et Fennell, 1965 ; Ottaviani et *al.*, 1988 ; Botton et *al.*, 1999 ; Guiraud, 1998 ; Jernejc et Cimerman, 2001). L'analyse du tableau permet la conclusion suivante :

- La souche identifiée pousse rapidement sur la plupart des milieux utilisés,
- La colonie est granuleuse de teinte noirâtre sur les différents milieux,
- Le revers de la colonie est incolore à jaune.

#### 4. Composition chimique du lactosérum

Le milieu de fermentation est préparé à partir de lactosérum acide préparé au laboratoire par fermentation spontanée. L'étude de la composition chimique de ce lactosérum a donné les résultats résumés dans le tableau n°8.

Tableau n° 8 : composition chimique du lactosérum (g/l)

Paramètre mesuré	Valeur obtenue
pH	4,6
matière azotée totale	01,24
sucres totaux	49,66
lactose	39,67
matière sèche	62,91
cendres	07,37

L'analyse de ces résultats fait apparaître des teneurs en sucres totaux représentant 79% de la matière sèche totale du lactosérum, dont 63% correspondent au lactose, ce qui est en fait un aliment très énergétique et qui constitue la source principale de carbone et d'énergie pour plusieurs microorganismes possédant le système *b*-galactosidase (Luquet et Boudier, 1984 ; Kosikowski, 1988 ; Trystram et *al.*, 1991 ; Lejeune et Baron, 1995)

La teneur en lactose concorde avec celle rapportée par Alais (1975), soit environ 40 g/l. Notons que au cours de la coagulation une partie de lactose a été transformée en acide lactique, ce qui justifie sa teneur réduite dans ce type du lactosérum par rapport au lactosérum doux qui contient en moyenne 48 g/l (Alais, 1975).

Les protéines représentent une valeur de 1,24 g/l pour un litre du lactosérum, cette valeur est inférieure à celle rapportée par la bibliographie (Alais, 1975 ; Luquet et *al.*, 1985 ; Assenat, 1985). Cette faible teneur en protéine s'explique par la méthode de préparation du

Tableau n°9 : Activité protéolytique exocellulaire des cinq souches sur les différents milieux.

Souche isolée	activité protéolytique sur le lactosérum (µg/ml/h)			activité protéolytique sur Czapek modifié (µg/ml/h)			diamètre d'hydrolyse (mm)
	pH acide	pH neutre	pH alcalin	pH acide	pH neutre	pH alcalin	
<i>Aspergillus niger</i> A 09	4325	1933	/	4667	2053	/	10
<i>Aspergillus sp</i> A 39	/	422	3918	/	468	4015	11
<i>Aspergillus sp</i> A 34	/	/	3176	/	/	3181	10
<i>Geotrichum sp</i> B 12	/	2683	629	/	2630	707	08
<i>Stachybotrys sp</i> C 01	/	/	215	/	/	1028	06

lactosérum. Les valeurs mentionnées dans la bibliographie correspondent à des lactosérums industriels contenant beaucoup de perte, alors que notre lactosérum subit une filtration sur papier filtre suivie d'une centrifugation permettant une bonne séparation du caillé.

La carence en matière azotée totale est corrigée par l'addition d'une source protéique exogène ; la trypticase avec une concentration de 11,4 g/l, afin d'obtenir un milieu de culture équilibré (Benlounissi, 2004).

Par ailleurs, le lactosérum contient des teneurs en matière minérale plus élevées que celles décrites par Alais (1975) et Luquet et *al.*, (1985). La teneur en matière sèche est légèrement inférieure à celle annoncée par Alais (1975), alors que la valeur du pH est similaire de celle décrite par Luquet et Bonjean-Linczowski (1985).

## 5. Fermentations

A partir du travail d'optimisation à l'aide d'un plan factoriel fractionné réalisé par Mechakra et *al.*,(1999), nous avons retenu les trois facteurs ayant donné la meilleure production de la protéase acide, à savoir la trypticase ; les sels minéraux (magnésium et fer) et le lactose. Les niveaux optima de ces deux facteurs et de lactose ont été déterminés à l'aide d'un plan composite centré.

Les résultats des différents dosages (exocellulaires) sur les différents milieux de fermentation (Czapek modifié et le lactosérum, chacun à trois pH différents) sont réunis dans le tableau n° 9.

### 5.1 Comparaison de l'activité protéolytique exocellulaire et endocellulaire des cinq souches sur les deux milieux de fermentation

L'analyse des résultats et la comparaison des activités protéolytiques sur les différents milieux (deux milieux avec trois pH différents) indiquent que les productions des protéases exocellulaires par les trois espèces d'*Aspergillus* A 09, A 34 et A 39 et par *Geotrichum sp* B 12 obtenues sur les deux types de milieux sont très proches pour un même pH. Par ailleurs, on remarque que les différentes souches ne produisent pas le même type d'activité. Pour la souche A 09, la meilleure activité est obtenue à pH acide pour les deux milieux (4325 U sur le

lactosérum et 4667 U sur le Czapek). Pour la souche B 12, la production de protéase est favorisée par le pH neutre (2683 U sur lactosérum et 2630 U sur Czapek). Pour les deux autres souches d'*Aspergillus* (A 39 et A 34) la meilleure production est obtenue à pH alcalin (environ 4000 U pour la 1<sup>ère</sup> et 3200 U pour la 2<sup>ème</sup>). Quant à la 5<sup>ème</sup> souche, C 01 correspondant à *Stachybotrys*, la production de protéase exocellulaire est meilleure obtenue à pH alcalin ; elle est par ailleurs meilleure sur milieu de Czapek (1028 U contre 215 U pour le lactosérum).

Ces résultats permettent de considérer le lactosérum comme un milieu favorable à la production des protéases par les genres *Aspergillus* et *Geotrichum* isolés au cours de cette étude. Ces résultats sont similaires à ceux décrits par la littérature (Duce et Thomas, 1956 ; Clarke et Steel, 1966 ; Shahani et al., 1973).

Par ailleurs, les résultats des activités sur les différents milieux montrent que seuls *Geotrichum* B 12 et *Aspergillus* A 39 possèdent des protéases endocellulaires par rapport aux autres moisissures. Elles sont cependant beaucoup plus faibles que les activités exocellulaires (voir tableau n° 10).

Tableau n° 10 : Activité protéolytique endocellulaire.

Souche isolée	activité protéolytique endocellulaire sur le lactosérum (µg/ml/h)			activité protéolytique endocellulaire sur Czapek modifié (µg/ml/h)		
	pH acide	pH neutre	pH alcalin	pH acide	pH neutre	pH alcalin
<i>Aspergillus sp</i> A 39	/	/	142	/	/	105
<i>Geotrichum sp</i> B 12	/	332	257	/	468	169

Tableau n° 11 : Résultats des précipitations et des dialyses.

<b>préparation</b>	<b>Activité protéolytique totale (U)</b>	<b>Protéines totales (mg)</b>	<b>Activité spécifique (U/mg)</b>	<b>Facteur de purification</b>	<b>Rendement (%)</b>
<b>Extrait enzymatique brut</b>	4105	09,32	440,45	1	100
<b>Précipité à 30%</b>	4023	03,20	1257,18	02,85	98,00
<b>Précipité à 65%</b>	3973	01,95	2037,43	04,62	96,78
<b>Précipité à 85%</b>	2691	01,11	2424,32	05,50	65,55
<b>Dialyse du précipité à 30%</b>	3625	01,40	2589,28	05,87	88,30
<b>Dialyse du précipité à 65%</b>	2419	0,90	2687,77	06,10	58,92
<b>Dialyse du précipité à 85%</b>	1887	0,51	3700	08,40	45,96

## 5.2. Sélection de la souche la plus performante sur le lactosérum

Les résultats mentionnés dans le tableau n°9 permettent la sélection de la souche A 09 comme étant la plus performante par rapport à la production en protéase exocellulaire. Cette moisissure produit une activité de 4325 U à pH acide, contre 2683 U pour *Geotrichum sp* B 12 à pH neutre et 3918 U, 3176 U pour les deux espèces d'*Aspergillus* A 39 et A 34 respectivement, tout les deux à pH alcalin. *Stachybotrys sp* C 01 donne la plus faible activité sur le lactosérum par rapport aux autres moisissures.

*Aspergillus niger* A 09 possède une activité de 4325 U dans un pH acide contre 1933 U dans un pH neutre avec une absence d'activité dans le pH alcalin. Donc, il est clair que cette souche produit une protéase acide et une protéase neutre. Ces résultats sont proches des résultats trouvés déjà dans différentes recherches (Kumagai et *al.*, 1981 ; Dal Degan et *al.*, 1992 ; Singh et *al.*, 1994).

Les activités obtenues par fermentations des différents milieux confirment les résultats obtenus sur laits gélosés.

## 6. Extraction de la protéase acide produite par la souche sélectionnée

### 6.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium

L'analyse des résultats résumés dans le tableau n°11 fait apparaître que la précipitation par le sulfate d'ammonium avec les deux concentrations de saturations de 65% et 85% a permis d'accroître l'activité spécifique de près de cinq fois. Alors que la première fraction précipitée à 30%, a été augmentée de seulement trois fois. Ces résultats se rapprochent de ceux rapportés par la bibliographie (Desmazeaud et Hermier, 1968 ; Davidson et *al.*, 1975 ; Fuk et *al.*, 1988 ; Furukawa, 2003).

Le rendement de la purification qui présente la proportion en pourcentage de l'activité de l'enzyme purifiée qui reste par rapport à l'activité enzymatique initiale est de 98% pour la fraction de 30%. La deuxième fraction de 65% donne un rendement enzymatique égal à 97%, le rendement de la dernière fraction 85% est de 66%. On peut traduire la diminution du

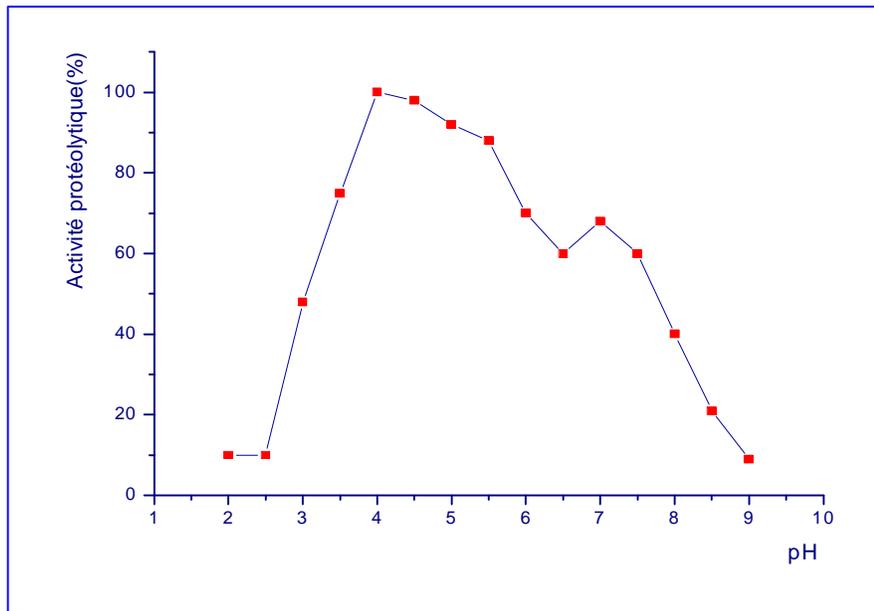


Fig. 21 : Effet du pH sur l'activité de l'enzyme.

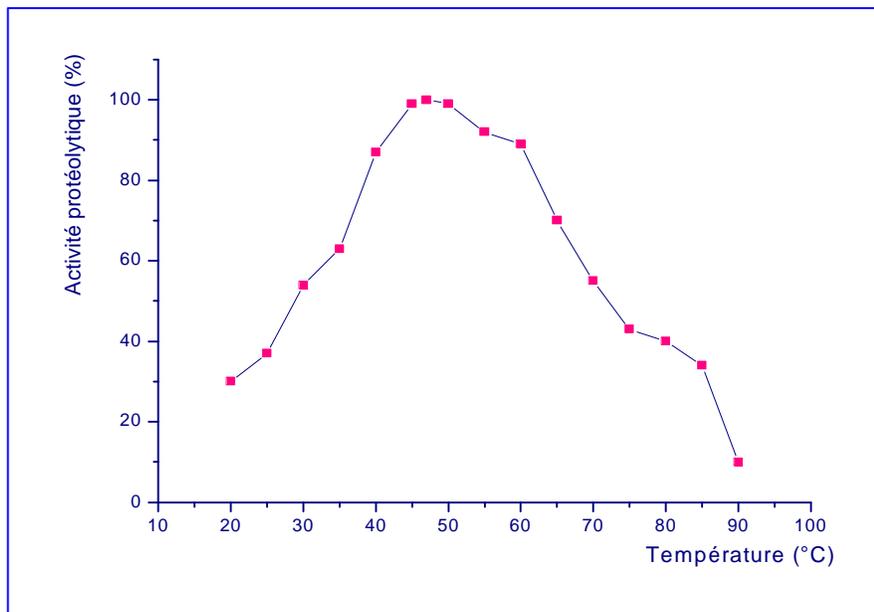


Fig. 22 : Effet de la température sur l'activité de l'enzyme.

rendement par une perte de matériel biologique à chaque étape de purification, où cette dernière augmente. Le facteur de purification est de plus en plus élevé au fur et à mesure des étapes, cela reflète l'approche de plus en plus d'une enzyme pure.

## **6.2. Dialyse**

La dialyse a permis d'accroître l'activité spécifique presque huit fois, cela est réalisé par l'élimination de sulfate d'ammonium et des impuretés.

## **7. Etude des caractéristiques de la protéase acide de la souche sélectionnée**

### **7.1. Effet du pH sur l'activité protéasique**

D'après la figure 21, on note l'augmentation de l'activité protéolytique du pH 2,5 jusqu'à pH 4,0, où elle garde une activité importante jusqu'à pH 5,5. Au delà de cette valeur, l'activité diminue. A pH 6,5 l'enzyme a perdu environ 40% de son activité.

La même figure indique que la souche sélectionnée présente également une activité protéasique à pH neutre, mais cette activité est moins importante que la première. Cette moisissure produit donc au moins deux protéases, l'une ayant un pH optimum de 4,0 et l'autre un pH optimum de 7,0. Les deux types de protéase se dénaturent aux pH alcalins. Les résultats obtenus se rapprochent de ceux rapportés par Singh et *al.*, (1994) par rapport à la protéase acide.

### **7.2. Effet de la température sur l'activité protéasique**

La figure 22 montre que l'activité enzymatique croît régulièrement dans la zone de température de 20 à 50°C pour atteindre le maximum d'activité dans un intervalle de 45 à 50°C. Ce résultat est proche de celui rapporté par plusieurs références bibliographiques (Singh et *al.*, 1994 ; Moreira et *al.*, 2001). A 60°C, l'enzyme conserve une activité résiduelle jusqu'à 90% après une heure d'incubation.

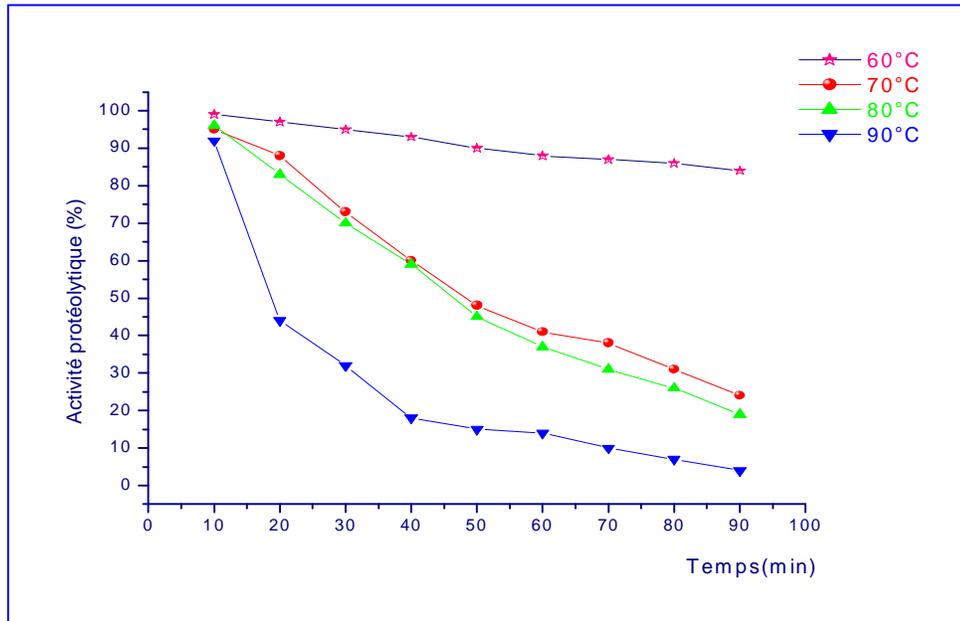


Fig. 23 : Etude de la thermostabilité de l'enzyme.

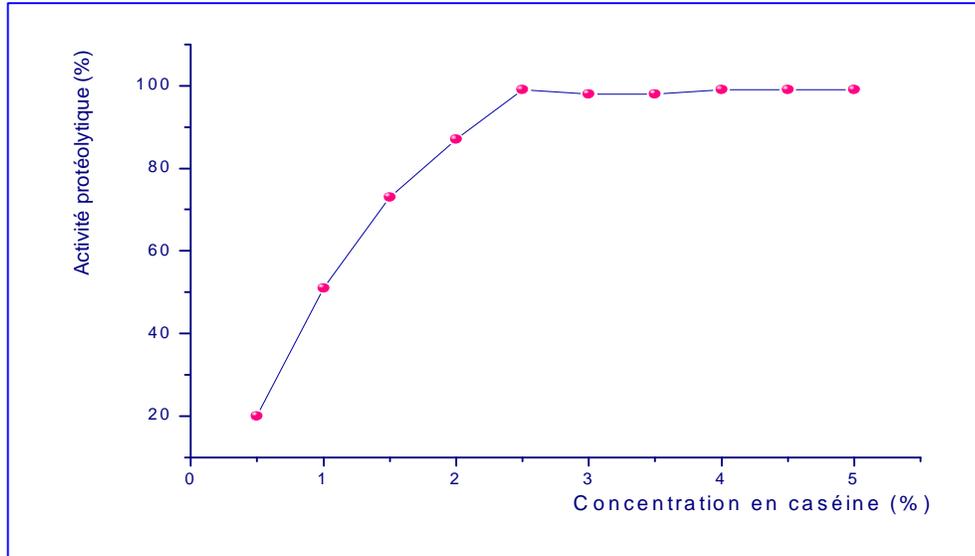


Fig. 24 : Effet de la concentration du substrat sur l'activité de l'enzyme.

Toutes les réactions enzymatiques nécessitent une reconnaissance du site actif par l'enzyme et le substrat, cette approche est assurée, exclusivement, et au hasard par l'agitation moléculaire, cette dernière augmente avec l'élévation de la température qui accroît ainsi le nombre de collisions (Penasse, 1974).

### **7.3. Etude de la thermostabilité**

L'examen de la figure 23 montre que la protéase acide d'*Aspergillus niger* A 09 est très stable à 60°C, où l'enzyme garde presque 84% de son activité après 90 minutes. L'activité résiduelle atteint 60% à 70°C et 80°C pour un temps d'incubation de 40 minutes. Après 60 minutes d'incubation l'enzyme perd 63% de son activité à 80°C. Par contre, elle perd seulement 40% de son activité à 70°C. A 90°C et lorsque le temps d'incubation est de 30 min, l'activité résiduelle atteint 33%, par contre elle représente 20% après 60 min d'incubation. C'est-à-dire que notre enzyme a perdu environ 80% de son activité à cette température.

### **7.4. Effet de la concentration du substrat sur l'activité protéasique**

L'activité enzymatique est mesurée à différentes concentrations de caséine. La figure 24 indique que l'activité maximale est obtenue pour une concentration en substrat de 2,5%. Elle fait apparaître une courbe hyperbolique indiquant que la cinétique est de type michaelien. La représentation graphique suivant la méthode de Lineweaver et Burk a permis de calculer la constante cinétique de Michaelis ( $K_M=0,01$  g/ml) et la vitesse maximale  $V_m=5,6$  µg/ml/min.

## Conclusion

Dans le cadre de la recherche des enzymes protéolytiques élaborées par des moisissures locales, quatre prélèvements ont été effectués à partir d'eau de *Sebkha* et du sol environnant d'une ville saharienne Algérienne « *El-Mghair* ». Les cultures des prélèvements sur l'agar blanc ont permis l'isolement des quarante huit moisissures différentes. Le pouvoir inhibiteur de la gentamycine et l'utilisation de l'agar blanc au cours de l'isolement ont permis de réduire l'apparition des bactéries. L'étude de l'activité protéasique sur les laits gélosés à trois concentrations en lait écrémé a révélé la production des protéases chez quinze souches. Neuf souches ont une activité protéolytique importante (le diamètre de leurs zones d'hydrolyse est supérieur à 2 mm).

Pour l'identification des moisissures protéolytiques isolées, une étude microscopique est effectuée. Cette dernière a permis de déterminer les genres soit, 4 *Aspergillus*, 2 *Geotrichum*, 1 *Fusarium*, 1 *Penicillium* et 1 *Stachybotrys*. Cette étape est complétée par une étude macroscopique réalisée sur quatre milieux gélosés différents dans le but d'identifier l'espèce de la souche A 09 sélectionnée après les fermentations. L'étude macroscopique a confirmé l'espèce ; il s'agit d'*Aspergillus niger*.

L'étude de la composition chimique du lactosérum acide a révélé sa richesse en sucres totaux en particulier en lactose qui peut servir de source de carbone et d'énergie. Cette étude a montré également sa richesse en sels minéraux et sa carence en protéines. Pour cela, l'emploi du lactosérum comme milieu de fermentation nécessite son enrichissement, particulièrement en source azotée, dans ce cas, la trypticase.

Le dosage de l'activité protéolytique exocellulaire et endocellulaire a montré que le lactosérum est un milieu favorable à la production des protéases par les genres *Aspergillus* et *Geotrichum*. Il montre également que *Aspergillus niger* A 09 est la souche la plus performante par rapport à sa production en protéase exocellulaire, en effet elle produit une activité très élevée en protéase acide (4325 U).

L'extraction de l'enzyme par le sulfate d'ammonium à 85% de saturation a permis l'obtention d'un rendement de 66% et un degré de purification supérieur à 5. La dialyse du

précipité à 85% a entraîné un accroissement de l'activité spécifique de huit fois avec un rendement en activité de 46%. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par les travaux du laboratoire.

Afin de mieux connaître la protéase produite, nous avons étudié ses propriétés ce qui permet de connaître les éventuelles applications. Cette étude a donné un pH optimum de 4.0 et une température optimale comprise entre 45°C et 50°C. La stabilité thermique de l'enzyme est reflétée par une activité résiduelle de 30% à 90°C pendant 30 minutes.

Tous ces résultats montrent la richesse de nos milieux extrêmes en moisissures et les possibilités offertes pour la recherche de nouvelles espèces hyperproductrices d'enzymes ayant un intérêt industriel.

- Alais C. (1975).** Sciences du lait. Principes et techniques laitières. Masson. Paris. P. 108-645.
- Anagnostakis D. & Hankin A. (1975).** Enzymes tests in bacterial identification. *Biochem. J.* **312**: 543-583.
- Assenat L., Boudier J.F., Cottier M., Goursaud J., Lejaouen J.C., Lemens P., Mahieu H. & Rotereau J.C. (1985).** Laites et produits laitiers. Vache. Brebis. Chèvre. Lavoisier. Paris. P. 1-10.
- Auberger B., Lamberet G. & Lenoir J. (1985)** Les activités enzymatiques de *Penicillium camemberti*. *Le lait.* **59** : 244-268.
- Auberger B., Lenoir J. & Bergere J. L. (1995).** Caractérisation de l'activité carboxypeptidasique de *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments.* **15** : 273-28
- Audigié C. L. Fagerella J. & Zonszain F. (1984).** Manipulation d'analyse biochimique. Doin. Paris. P. 270.
- Benlounissi A. (2004).** La protéase acide de *Penicillium camemberti*. Production sur lactosérum, précipitation par le sulfate d'ammonium et action sur le lait de chèvre. Thèse de magistère. Université Mentouri. Constantine.
- Bennett J.W. (1985).** Taxonomy of fungi and biology of the *Aspergilli*. *Appl. Microbiol.* **28**: 362-365.
- Berry D. (2000).** Ingredients foods. *Dairy Foods.* **101** (4) : 32.
- Biezen C. Raper K. Fennel R. (1977).** The genus *Aspergillus* in food. *Indian phytopathol.* **35**: 153-155.
- Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.

**Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P. 12-426.

**Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. (1989).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P. 216-244.

**Calk P., Takaç S., Calk G. & Ozdamar T. H. (2000).** Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enz. Microbiol. Technol.* **26** (1): 45-60.

**Chakraborty R., Srinivasan M. S. & Raghavan S. K. (1995).** Production of acid proteases by a new *Aspergillus niger* during solid substrate fermentation. *J. Biotechnol.* **10**: 17-30.

**Clark H. E., Geldriche E. F. B., Kabler P. W. & Huff C. B.(1985).** Identification of Industrial microorganismes. *Appl. Microbiol. Process Biochem.* **30**: 723-727.

**Clarke P.H. & Steel K.J. (1966).** Rapide and simple biochemical tests for bacterial identification. Academic press. London. P.111

**Colwell R.R. & Grigorova. R. (1989).** Methods in microbiology. (Ed) St E dimundsbert press limited. Great Britain. P. 133-138.

**Coulibaly L. & Agathos S.N. (2003).** Transformation kinetics of mixed polymeric substrates under transitory conditions by *Aspergillus niger*. *African J. Biotechnol.* **2** (11): 438-443.

**Cousin D., Matagne A., Laemmli U. K. & Stewart D. J. (1982).** The purification of neutral bacterial proteases *Pseudomonas fluorescens* . *Biochem. Mol. Biol. Int.* **34**: 1157-1166.

**Dahot M. O. (1987).** Studies on proteolytic enzyme. Part I. Characteristics of protease synthesis by *Penicillium expansum*. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* **30** (3): 194-196.

**Dai Z., Mao X., Magnuson J. K. & Lasure L. L. (2004).** Identification of genes associated with morphology in *Aspergillus niger* by using suppression subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (4): 2474-2485.

**Dal Degan F., Ribadeau-Dumas B. & Breddam K. (1992).** Purification and characterization of two serine carboxypeptidases from *Aspergillus niger* and their use in C-terminal sequencing of proteins and peptides synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (7) : 2144-2152.

**Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52-57.

**Davidson R., Gertler A. & Hofmann T. (1975).** *Aspergillus oryzae* acid proteinase. Purification and properties, and formation of pi-chymotrypsin. *Biochem. J.* **147** (1):45-53.

**Delgado-Jarana J., Rincon A. M. & Benitez T. (2002).** Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology.* **148**: 1305-1315.

**Desmazeaud M. & Hermier J. (1968).** Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* **8** (4) : 565-577.

**Desmazeaud M. (1978).** Enzymes des microorganismes intervenant dans l'affinage des fromages. XXème Cong. Intern. Lait. Paris.

**Deymié B., Multon J.L. & Simon. D. (1981).** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. APRIA. Paris. P. 238-241.

**Divies K., Jost R., Mahadevan J. & Monti J. C. (1984).** Utilisation de la méthodologie expérimentale pour la production des acides organiques par les bactéries acétiques. *J. Milk Dairy.* **35** : 292-297.

**Dion S., Elda R., Kaczorek D. & Hermier J. T. (1978).** Milk clotting by enzymes from mould and yeast. *J. Biochem.* **32** : 471-478.

- Dryer J. (2001).** La grande diversité du lactosérum. *Dairy foods* .**102** (5) : 35.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. & Smith F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28** (3): 350-356.
- Duce R. G. & Thomas S. B. (1959).** The microbiological examination of Butter. *J. Appl. Dact.* **22**: 52.
- Durand G. & Monson P. (1982).** Les enzymes: production et utilisations industrielles. Bordas. Paris. P. 36-153.
- Ecalard J.P. (1990).** Lait et biotechnologie. *New Zealand J. Dairy. Sci. Technol.* **21** (3): 29-34.
- Fedrick I. J., Aston J.W., Nottingham S. M. & Dulley J.R. (1986).** The effect of a neutral fungal protease on cheddar cheese ripening. *New Zealand J. Dairy Sci Technol.* **21**: 9-19.
- Fernandez-Lahore H.M., Fraile E. R. & Cascone O. (1998).** Acid protease recovery from a solid fermentation system. *J. Biotechnol.* **62**: 83-93.
- Frazier W.C. (1967).** Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429.
- Fuke Y., Kaminogawa S., Matsuoka H. & Yamauchi K. (1988).** Purification and properties of aminopeptidase from *Penicillium caseicolum*. *J. Dairy Sci.* **71** (6): 1423-1431.
- Fuke Y. & Matsuoka H. (1993).** The purification and characterization of prolyl aminopeptidase from *Penicillium camemberti*. *J. Dairy Sci.* **76** (9): 2476-2484.
- Furukawa M., Yamashita K., Kanasugi Y., Kawabata C., Hiranos K., Andos K. & Ichishima E. (2003).** Acid proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Biochem. J.* **371**: 541-548.
- Gana S. & Touzi A. (2001).** Volarisation du lactosérum par la production de levures lactiques avec les procédés de fermentation discontinue et continue. *Rev. Energ. Ren* : 51-58.

**Garcia-Conesa M.T., Kroon P.A., Ralph J., Mellon F.A., Colquhoun I.J., Saulnier L., Thibault J.F. & Williamson. G. (1999).** Acinamoyl esterase from *Aspergillus niger* can break plant cell wall cross-links without release of three diferulic acids. *Eur. J. Biochem.* **266**: 644-652.

**Girard D. (1982).** Le lactosérum et l'industrie. *Food technology.* **56** (4) : 32-44.

**Granger D. & Jean-Blain C. L. (1982).** Utilisation du lactosérum dans l'alimentation des vaches laitières. *Rev. Med. Vet.* **133** (7) : 472-479.

**Guiraud J. P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. P. 7-330.

**Harrigan W.F. & McCance M.E. (1976).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London. P. 21-277.

**Hauschner K., Hilgendor P., Hofbauer C., Demeester J. & Lauwers A. (1996).** New international F.I.P. method for the determination of the activity of *Aspergillus oryzae* proteases. *Pharmazie.* **51** (12): 946-50.

**Heslot H. (1996).** L'ingénierie des protéines et ses applications. Lavoisier. Paris. P. 160-495.

**Ikasari L. & Mitchell D. A. (1994).** Proteases production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10** : 320-324.

**Imbert-Pondaven A. (1977).** Etude de l'évolution de la composition des lactosérums au cours de leur conservation. *J. Dairy Sci.* **568**: 521-546.

**Iwahashi K., Matsuda Y., Yamada K., Kase H., Nakanishi S., Takahashi M., Murakata C., Sato A & Kaneko M. (1987).** K- 252 compounds, novel potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**: 436-440.

**Jackson C.R. (1962).** *Aspergillus* crown rot of peanuts in Georgia, seed treatment fungicide for control of seedborne fungi in peanut. *Plant Disease Reporter*. **46**: 888-892.

**Jakubowski. (2001).** Proteinase chemistry and molecular biology. *J. Biochem.* **23** (5). 1825-1827.

**Jannot P., Luu Tien H., Divies C. & Cachia J. P. (1984).** Utilisation de la méthodologie expérimentale pour quantifier l'action des facteurs du milieu sur la croissance et l'activité microbienne. Cas des bactéries lactiques. *Sci. Aliments*. **4** : 55-59.

**Jarvis B. (1973).** Comparison of an improved rose Bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in foods. *J. Appl. Bact.* **36**: 723.

**Jernejc K. & Cimerman A. (2001).** Morphological characteristics, extracellular and intracellular protein and enzyme patterns of five *Aspergillus* species. *Food Technol. Biotechnol.* **39** (4): 333-340.

**Jollivet N. & Belin J.M. (1993).** Comparison of volatile flavor compounds produced by ten strains of *Penicillium camemberti* thom. *J. Dairy Sci.* **76**: 1837-1844.

**Julien R. (2002).** Les moisissures parlons-en. *Objectif prevention*. **25** (4): 7-8.

**Kamoun P. (1991).** Appareils et méthodes en biochimie. *Flammarion Médecine Sciences*. Parie. P. 80-84.

**Karam H. & Karam N-E. (2000).** Isolement et identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle. *XIIèmes Journées Nationales de Microbiologie*. Constantine.

**Kortt A. A., Burns J. E., Vaughan J. A. & Stewart D. J. (1994).** Purification of the extracellular acidic proteases of *Dichelobacter nodosus*. *Biochem. Mol. Biology Int.* **34** (6): 1157-1166.

**Kosikowski F. V. (1988).** Dairy foods research papers. Enzyme behavior utilization in dairy technology. *J. Dairy Sci.* **71**: 557-573.

**Kresze G. B. (1991).** Proteases during purification. *Bioprocess-technol.* **12** : 85-120.

**Kumagai I. Yamasaki M. & Ui N. (1981).** Isolation purification and some chemical properties of an acid carboxypeptidase from *Aspergillus niger* var *Macrosporus*. *Biochem. Biophys. Acta.* **659** (2): 334-343.

**Laplanche J. (2004).** Système d'épuration du lactosérum d'alpage par culture fixée sur lit de compost. *Revue suisse Agric.* **36** (5) : 220-224.

**Larpent-Gourgaud M. & Sanglier J. J. (1992).** Biotechnologies. Principes et méthodes. Doin. Paris. P. 574-587.

**Leghlimi H. (2004).** Optimisation de la production de la cellulase d'*Aspergillus niger* ATCC 16 404 cultivé sur un milieu à base de lactosérum : étude comparative entre *Aspergillus niger* ATCC 16 404 et *Aspergillus niger* O.Z isolée localement. Thèse de magistère. Université Mentouri. Constantine.

**Lejeune R., Baron G. V. (1995).** Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 249-258.

**Lenoir J. & Choisy C. (1971).** Aptitude de l'espèce de *Penicillium caseicolum* à la production d'enzymes protéolytiques. *Le lait.* **503** :138-159.

**Leveau S. B. & Bouix M. (1993).** Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier Apria. P. 110-163.

**Lowisfert S. (1994).** Recyclage du lactosérum issu de la transformation fromagère dans l'alimentation animale. *Bulletin technique UC AAB.* **2** : 11-17.

**Lowry O. H., Rosebroughi N. J., Farr A. L. & Randall R. J. (1965).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1) : 265-275.

**Luquet F. M. & Boudier J. F. (1984).** Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. *Apria*. **21** : 1-7.

**Luquet F. M. & Bonjeau-Linczowski Y. (1985).** Lait et produits laitiers vache – brebis - chèvre. 2 les produits laitiers transformation et technologie. APRIA. Paris. P. 1-108.

**McIntoch G.H. (1998).** Whey proteins as functional food ingredients. *Dairy J.* **8**: 425-434.

**McKenzie H.A. (1971).** Milk proteins chemistry and molecular biology. (Ed) Berkeley square. London. P. 246-249.

**Martinelli S. D. & Kinghorn J. R. (1994).** *Aspergillus*: 50 years on. Elsevier. Amsterdam. P. 586-649.

**Mechakra A., Auberger B., Remeuf F. & Lenoir J. (1999).** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*. **19** (6) : 663-675.

**Mechakra-Maza A., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z. & Boussaboua H. (2002).** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger*. *Sci. Technol.* 59-63.

**Metz J., Zalusky R. & Herbert V. (1968).** Folic acid binding by serum and milk. *Amer. J. clin. Nutr.* **21**: 289-297.

**Miller J. D. (2002).** Enzymic hydrolysis of protein by various enzyme preparations. *J. Ferment. Technol.* **54**: 872-884.

**Miyakawa H., Kobayashi A., Shimamura S. & Tomita M. (1992).** Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511. *J. Dairy Sci.* **75**:27-35.

**Modler H. W., Brunner J. R. & Stine C. M. (1974).** Extracellular protease of *Penicillium roqueforti*. Production and characterization of crude enzyme preparation. *J. Dairy Sci.* **57** (5): 523-543.

**Moodie P. (2001).** Traditional baking enzymes-proteases. *Enzyme Development Corporation.* **212** :736-1580.

**Moreira K. A. Cavalcanti M. T. Simoes Duarte H. Tambourgi E. B. Magalhaes E.H. Silva V. L. Figueiredo-Porto A.L. & Lima-Filho J. L. (2001).** Partial characterization of proteases from *Streptomyces clavuligerus* using an inexpensive medium. *Braz. J. Microbiol.* **32** (3): 1834-1841.

**Nakais S. & Modler H. W. (2000).** Processing applications milk. *Ameri. J. clinical nutrition.* **59**: 929-934.

**Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T. & Killington R. (2000).** L'essentiel en microbiologie. Berti. Paris. P. 210-216.

**Osterlund B. & Janson J. C. (1997).** A strategic Approach to protein purification. *Pharmacia. Biotechnol.* **2** (3): 8-10.

**Oteng-Gyang K. (1984).** Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chaud. Lavoisier. Paris. P. 26-42.

**Ottaviani F., Disegna L. & Spolaor D. (1988).** Yeasts and identification in food industry. *Microbiologie- Aliments- Nutrition.* **6**: 221-226.

**Parks C.L. (1997).** Hand book of microbiological media. Second edition by CRC. P. 339-400.

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

**Penasse. L. (1974).** Les enzymes cinétiques et mécanisme d'action. Masson. Paris. P. 58-86.

**Peppler H. J. & Perlman D. (1979).** Microbial technology. Academic press. San Francisco. P.42-60.

**Perkkarién A., Jones B. L., Niku-Paalova M. L. (2002).** Purification and properties of an alkaline proteinase of *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Biochem.* **269**: 798-807.

**Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J. & Van den Hondel C. (2002).** Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* **20** (5): 200-206.

**Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M.S. & Deshpande V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biology Rev.* **62** (3): 597-635.

**Raper K.B. & Fennell. (1965).** The genus *Aspergillus*. *Food Microbiol* **5**: 163-176.

**Reginald T., Monod M. A., Faith Y. K. & Jatón-Ogay R. (1975).** The secreted protease of *Aspergillus* and their possible role in virulence. *Can. J. botany.* **73** (1): 1081-1086.

**Richard K. F. (2005).** Génomique fonctionnelle in vivo de l'oxydoréductase PA3498 chez *Pseudomonas aeruginosa*. Université Laval, Québec.

**Rinaldi C., Sutton A. & Fothergill S. R. (1998).** The morphology of fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 123-129.

**Rugsaseel S., Morikawa S., Kirimura K. & Usami S. (1995).** Stimulation of citric acid production in *Aspergillus niger* by addition of viscous substances in shake culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42** : 839-843.

**Saint-Paul F., Humbert G., Paquet D. & Linden G. (1984).** Hydrolyse enzymatique de protéines laitières industriellement : incidences sur leur solubilité. *Sci. Aliment.* **4** : 259-264.

**Siezen R. J. (1988).** Enzyme engineering in de zuivel. *Nizo-Nieuws.* **22** (10): 21-25.

**Scriban R. (1993).** Biotechnologie. 4<sup>ème</sup> édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P. 30-695.

**Scriban R. (1999).** Biotechnologie. 5<sup>ème</sup> édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.

**Seker S., Beyenal H. & Tanyolaç A. (1999).** Modeling milk-clotting activity in the continuous production of microbial rennet from *Mucor miehei*. *J. food sci.* **64** (3): 525-529.

**Shahani K.M., Harper W.J., Jensen R.G., Parry R.M. & Zittle C.A. (1973).** Enzyme in bovine milk. *J. Dairy Sci.* **56**:531-543.

**Singh A., Ghosh V. K. & Ghosh P. (1994).** Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Lett. Appl. Microbiol.* **18** (3): 177-180.

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

**Sodek K. J & Hofman T. (1970).** Large-scale preparation and some properties of penicillopepsin, the acid proteinase of *Penicillium janthinelum*. *Can. J. Biochem.* **48**: 425-431.

**Trap C. & Boireau P. (2000).** Les protéases chez les helminthes. *Vet. Res.* **31** : 461-471.

**Trystram G., Guennegues P., Pigache S., Brenon M. & Bimbenet J.J. (1991).** Optimisation du procédé industriel de fermentation continue de levures sur lactosérums. *E.N.S.I.A. - BEL Industrie - Biology.* **108**.

**Tucker K.G. & Thomas C.R. (1992).** Mycelial morphology the effect of spore inoculum level. *Biotechnol. Lett.* **14**: 1071-1074.

**Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa H. & Kaneda M. (2001).** Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.* **382**: 1509-1513.

**Ul-Haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A. & Quadeer M. A. (2003)** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology* **2** (1): 30-36.

**Ulacio D., Perez C., Pineda Y.J. (1997).** Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in Portuguesa state, Venezuela. *Bioagro.* **9** (1): 3-11.

**Urbanek H., Yirdaw G. (1984).** Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and its possible role in phytopathogenesis. *Acta Microbiol. Pol.* **33** (2): 131.

**Waites M. J., Morgan N. L. (2001).** Industrial microbiology. *Academic press*. New York. P. 134-141.

**Waller J. (2004).** Physiologie de l'infection par les dermatophytes. *Med. Vet. Res.* **56** (4). 101-106.

**Weiser H.H., Mountney G.J., Gould W.A. (1971).** Practical food microbiology and technology. The Avic Publishing Company, Inc. England. P. 25-125.

## ملخص

تم عزل 48 فطر مختلف من أربع عينات طبيعية متحصل عليها من سبخة "المغير". بينت دراسة نشاط التحلل البروتيني على الحليب الجيلوزي بثلاث تراكيز من الحليب متزوع الدسم 10، 20 و 30 % بان 6 فطريات لها مناطق تحليل جد ضعيفة ( $mm^2 <$ )، غير أن 9 فطريات أخرى أعطت مناطق تحليل ذات أقطار تتراوح بين 2 و 11 مم. من بين هذه الأخيرة، 5 فطريات (القطر  $> 5$  مم) تم اختيارها. اوضح التحليل الكيميائي لمصل الحليب غناه بالسكريات (49.60 غ/ل)، خاصة الأكتوز (39.67 غ/ل)، الأملاح المعدنية (7.37 غ/ل) وفقره من البروتينات (1.24 غ/ل). تم إنتاج protéase من قبل الفطريات الخمس المنتقاة على وسطين مختلفين Czapek modifié ومصل الحليب المثرى. بين تقدير نشاط التحلل البروتيني الداخلى والخارج خلوي بأن مصل الحليب وسط ملائم للإنتاج protéase من قبل الأنواع الفطرية المدروسة (مثله مثل الكزباك). هذا التقدير اوضح أيضا بأن الفطر A 09 هو الأكثر نشاطا تبعا لإنتاجه من protéase خارج خلوي، حيث يقدر نشاطه ب: U 4325 في pH حامضي مقابل U 2683 بالنسبة لـ *Geotrichum sp B 12* في pH معتدل و U 3198 و U 3176 بالنسبة للوعين *Aspergillus A39* و *A 34* على الترتيب، كل منهما في pH قاعدي. *Stachybotrys sp C01* أعطت النشاط الأضعف في كلا الوسطين. تم تحديد نوع الفطر الأكثر نشاطا وهو *Aspergillus niger*. استخلاص protéase الحامضي المنتج من قبل هذه الأخيرة تم على مرحلتين؛ عن طريق الترسيب بسولفات الامنيوم بتركيز 85% و الميز. أعطى المستخلص مردودا يقدر ب: 46% ودرجة نقاوة اكبر من 8. الدراسة الحركية لـ protéase الحامضي لـ *A. niger* المعزولة أعطت  $V_m = 5.6$   $\mu\text{g/ml}$  الدقيقة و  $K_M = 0.01$  غ/مل درجة حرارة مثلى تتراوح بين 45 و 50 درجة مئوية و pH لنشاط أعظمي يساوي 4. يحافظ الإنزيم على 30% من نشاطه الكلي في 90 درجة مئوية خلال 30 دقيقة.

**الكلمات المفتاح :** protéase، الفطريات المحللة للبروتين، السبخة، الحليب الجيلوزي، *Aspergillus niger*،

مصل الحليب

## Abstract

48 different strains are isolated from four natural samples picked from the lack of “*El-Mghair*”. The study of the proteolytic activity produced on skim milk Agar with three skim milk concentrations 10, 20 and 30% showed that 6 strains have a very weak hydrolysis zones (< 2 mm), whereas 9 have given a hydrolysis zones whose diameters vary from 2 to 11 mm. Among this last, 5 strains (the diameter > 5mm) were selected. The chemical analysis of the whey showed its heigh content in total sugars (49.60 g/l), in particular in lactose (39.67g/l), in mineral salt (7.37 g/l) and its proteins deficiency (1.24 g/l). The proteinase production by the 5 selected moulds was carried out in two different mediums; the Czapek and the enriched whey. The dosages of the proteolytic activity exocellular and endocellular showed that the whey is a favourable medium for protease production by the studies species (as much the Czapek). This dosage shows equally that the strain A 09 is the most perforate compared to its production in exocellular protease. This strain produces an activity of 4325 U at acid pH against 2683 U for *Geotrichum sp B 12* at a neutral PH and against 3918 U and 3176 U for the two species of *Aspergillus A 39* and *A 34* respectively, both at alkaline PH. *Stachybotrys C 01* gives the weakest activity on the two mediums. The identification of the most perforate mould revealed that is *Aspergillus niger*. The acid proteinase produces by this last was extracted in tow operations; precipitation with the ammonium sulphate at 85% and dialysis. The extract gives an output of 46% and a purification rate higher than 8. The kinetic study of the protease of *A. niger* gives a  $V_m = 5.6 \mu\text{g/ml/min}$  and  $K_M = 0.01\text{g/ml}$ . An optimal temperature varies between 45 and 50°C with an optimum pH of 4.0. It keeps 30% of the total activity at 90°C during 30 min.

**Key words:** protease, proteolytic mould, extreme mediums, skim milk Agar, *Aspergillus niger*, whey.

**Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite.**

**Résumé**

48 souches différentes sont isolées à partir de quatre échantillons naturels prélevés de Sebkhah d'El-Mghair. L'étude de l'activité protéolytique produite sur les laits gélosés à trois concentrations en lait écrémé 10%, 20% et 30% a montré que 6 souches ont donné des zones d'hydrolyse très faibles (<2mm), alors que 9 souches ont donné des zones d'hydrolyse ayant des diamètres variant entre 2 et 11mm. Parmi ces dernières, 5 souches (un diamètre > 5mm) ont été sélectionnées. L'analyse chimique du lactosérum a montré sa richesse en sucres totaux (49,60 g/l), en particulier en lactose (39,67 g/l) ; en sels minéraux (7,37 g/l) et une carence en protéines (1,24 g/l). La production des protéases par les 5 moisissures sélectionnées a été réalisée sur deux milieux différents, le Czapek modifié et le lactosérum enrichi. Le dosage de l'activité protéolytique exocellulaire et endocellulaire montre que le lactosérum est un milieu favorable à la production des protéases par les espèces étudiées (autant que le Czapek), ce dosage montre également que la souche A 09 est la plus performante par rapport à sa production en protéase exocellulaire. Cette souche produit une activité de 4325 U à pH acide contre 2683 U pour *Geotrichum sp* B 12 à pH neutre et 3918 U et 3176 U pour les deux autres espèces d'*Aspergillus* A 39 et A 34 respectivement, tous les deux à pH alcalin. *Stachybotrys* C 01 donne la plus faible activité sur les deux milieux. L'identification de la souche la plus performante a révélé qu'il s'agit de l'espèce *Aspergillus niger*. La protéase acide produite par cette dernière est extraite en deux opérations ; précipitation au sulfate d'ammonium à 85% et dialyse. L'extrait donne un rendement de 46% et un taux de purification supérieur à 8. L'étude cinétique de la protéase acide d'*A. niger* 09(A) isolé a donné une  $V_m = 5,6 \mu\text{g/ml/min}$  et un  $K_M = 0,01\text{g/ml}$ . Sa température optimale varie entre 45 et 50°C avec un pH optimum de 4,0. Elle garde 30% de l'activité totale à 90°C pendant 30 min.

**Mots clés** : Protéase, moisissures protéolytiques, milieux extrêmes, lait gélosé, *Aspergillus niger*, lactosérum.

**Laboratoire de recherche** : Laboratoire de génie enzymatique et biotechnologie, département des sciences de la nature et de la vie, Faculté des sciences.