



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2021

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Biochimie Appliquée

Protéase acide extracellulaire d'*Aspergillus niger* : purification et caractérisation

Présenté et soutenu par :
MBAREK Ilham – MEDDAS Zina

Le : dimanche 13 juin 2021

Jury :

Mme. BOUCIF Asma	MCB	Université de Biskra	Président
Mme. BENGUERAICHI Fatiha	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. MERZOUGUI Imane	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire: 2020-2021

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

*Nous remercions **Allah** Tout-Puissant pour toute la volonté et le courage qu'il nous a donnés pour accomplir ce travail.*

*Tout d'abord, nous remercions Mme **BEN GUERAICHI Fatiha**, la femme au grand cœur, nous vous remercions de la confiance que vous nous avez témoignée en acceptant de superviser ce travail.*

Nous remercions également les membres du jury, le président et l'examineur, pour l'intérêt qu'ils portent à notre modeste étude et pour avoir accepté d'examiner, d'évaluer et d'enrichir cette recherche de leurs suggestions.

Enfin, nos sincères remerciements vont à tous ceux qui nous ont toujours soutenus et encouragés lors de la préparation de ce mémoire.

Merci à tous

Dédicace

*Au nom d'Allah, le Clément, le Miséricordieux .Paix et Salut soient accordés à notre Prophète Sidna **Mohammad**, à Sa Famille et à tous Ses Compagnons ; je dédie ce modeste travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement*

*À qui rien au monde ne se compare à sa miséricorde, ses soins, son amour et son souci pour moi. Je t'avais fatigué, Tu es la source de lumière dans ma vie, **Maman***

*Je tiens à honorer l'homme que tu es, et voudrais te remercier pour ta générosité, ta compréhension et tes sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation, **Papa***

Qu'Allah vous protège de tout mal.

*Mes anges gardiens et mes fidèles accompagnants dans les moments les plus délicats de cette vie, **Mes chères sœurs***

*Qui ont su m'accompagner dans cette épreuve, comme ils l'ont fait à chaque étape de ma vie. **Mes frères***

*Ma chère sœur.... **Zina**, la seule et l'unique...., mon cœur, Je t'aime de toute ma sincérité.*

*Mes Compagnons des moments difficiles et L'encouragement multiples ; les sœurs et les amies sur qui je peux compter **Amina, Manel, Bouthaina, Aya, Aimen, Marouane, Asmaa, Razika. Aicha, Ahlem, Amina, Hadiya, Djellola , Khawla, Nouha. Raihanna, et Mohamed.***

« Je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur »

Dédicace

À la plus chère personne de ma vie

Mon père (رحمه الله)

Ce travail est dédié à mon père décédé trop tôt, qui est toujours dans mon esprit...

Tu nous as quittés si vite !

Aucun mot ne serait exprimer mon profond amour, mon plus respect, mon

immense gratitude et ma considération pour les sacrifices que

vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être

Je vous remercie énormément pour toute la tendresse et l'amour que vous m'avez donné depuis mon enfance, pour la confiance que vous m'avez accordé, et pour toutes les belles moment que j'ai passé avec toi, ta présence à mes cotés a toujours été ma source de force.

Ce modeste travail est l'exaucement de votre souhait et reflète ma gratitude et mon

affection,, j'aurais tant aimé de vous soyez près de moi en ce moment,

Je prie Dieu tout-puissant de vous accueillir dans son paradis éternel.

A ma jolie famille

A ma grande mère décédée, je prie Dieu tout-puissant de vous accueillir dans son paradis À la plus chère au monde, ma mère la lumière de ma vie, qui m'as donné toute l'amour et la tendresse, et m'a toujours encouragé durant toutes mes années d'études

A ma deuxième mère Hamida qui a été toujours présente pour moi, pris soin de moi, et m'encouragé pour réussir, je t'aime infiniment...

À mes très chères sœurs Lynda Issa Ilhem Badria Ihsen qui m'ont toujours aidé et conseillé, mes accompagnants dans les moments difficiles, j'ai la chance d'être vous dans ma vie

À mes très chers frères Fayçal. Houssem. Mohamed pour leur disponibilité, générosité et leur encouragement, vous êtes la sources de mes joies, le secret de ma force, et le support de ma vie

À mon grand-père que j'aime trop, Dieu lui procure la santé, ainsi que ancle Morad l'homme au grand cœur, je te remercié pour ton amour éternel, ton soutien et ta générosité

À mes chères tantes Nadjet Samra Samiha pour toute l'aide et l'amour qu'elles mon donné

À ancle Wail qui m'a toujours aidée et m'encouragé durant mes années d'études, merci d'être avec moi et pour tout l'amour que tu m'as donné, ainsi que ancle Nadir et Djamel

A mon petit ange Iyed, qui devenu la source de notre bonheur, que dieu le garde

À mes cousins surtout Farid ainsi que mes nièces et mes neveux

À mon binôme et très chère amie qui a passé avec moi toutes les bonnes et les mauvaises moments, merci pour tous les instants inoubliables, je t'adore ma belle...

À mes très proches ami(e)s qui sont devenus mes sœurs et frères de cœur, je vous aime : Amina, Manel, Razika, Aicha, Bouthaina Meriem, Ahmed, Amine, Hamza, Hakim, Aymen

ZINA

Table de matières

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

PARTIE I. Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Protéases

1.1. Définition des protéases.....	3
1.2. Sources des protéases	3
1.2.1. Protéases d'origine végétales.....	3
1.2.2. Protéases d'origine animale	3
1.2.3. Protéases d'origine microbiennes	3
1.3. Classification des protéases	4
1.4. Application industrielle de protéases.....	4
1.4.1. Industrie alimentaire.....	4
1.4.2. Domain pharmaceutique et médical	5
1.4.3. Industrie du cuir	5
1.4.4. Détergents.....	5

Chapitre 2. *Aspergillus niger*

2.1. Généralité.....	6
2.2. Espèce <i>Aspergillus niger</i>	6
2.3. Taxonomie	6
2.4. Morphologie	6
2.5. Reproduction	7
2.6. Enzymes produites par l' <i>Aspergillus niger</i>	7

Chapitre 3. Fermentation

3.1.	Généralité.....	9
3.2.	Fermentation sur milieu solide	9
3.3.	Avantages et inconvénients	9
3.4.	Substrats utilisés	10
3.5.	Microorganismes utilisés	10
3.6.	Applications industrielles de la fermentation sur milieu solide	10

PARTIE II. Partie expérimentale**Chapitre 4. Matériel et Méthodes**

4.1.	Matériel biologique.....	11
4.2.	Mise en évidence de l'activité protéolytique	11
4.3.	Identification de la souche isolée.....	11
4.3.1.	Identification morphologique	11
4.3.2.	Identification moléculaire.....	14
4.4.	Préparation de l'inoculum	20
4.5.	Production de protéase aspartique par fermentation sur milieu solide	21
4.6.	Méthode de dosage	21
4.6.1.	Dosage des protéines (Bradford, 1976)	21
4.6.2.	Mesure de l'activité protéolytique.....	22
4.7.	Purification de l'enzyme.....	22
4.8.	SDS-PAGE	23
4.9.	Caractéristiques de la protéase aspartique	24
4.9.1.	Effet du pH sur l'activité et la stabilité	24
4.9.2.	Effet de la température sur l'activité et la stabilité.	24
4.9.3.	Paramètres cinétiques de l'enzyme.....	25

Chapitre 5. Résultats et Discussion

5.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique	26
5.2. Identification de la souche isolée.....	26
5.2.1. Identification morphologique	26
5.2.2. Identification moléculaire.....	28
5.3. Purification de la protéase aspartique d' <i>Aspergillus niger</i>	31
5.4. SDS-PAGE	33
5.5. Caractérisation de la protéase aspartique.....	35
5.5.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la protéase aspartique purifiée	35
5.5.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la protéase aspartique purifiée	37
5.5.3. Détermination de Km et Vmax	38
Conclusion.....	39
Références Bibliographiques.....	41
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1. Enzymes produites par *A. niger*.8

Tableau 2. Programme de PCR.....17

Tableau 3. Liste des séquences utilisées pour construire le cladogramme19

Tableau 5. Diamètres d'*Aspergillus niger* après 7 jours d'incubation à 25 C°26

Tableau 6. Résumé des étapes de purification de la protéase aspartique d'*Aspergillus niger*.33

Liste des figures

Figure 1. Représentation microscopique de la conidiophore d' <i>A.niger</i>	7
Figure 2 . Représentation macroscopique d' <i>A. niger</i>	7
Figure 3. Etapes d'identification morphologique de la souche <i>A.niger</i>	12
Figure 4. Schéma montrant le fragment ITS amplifié.....	16
Figure 5. Courbe d'étalonnage de la solution des protéines	21
Figure 6. Colonies d' <i>Aspergillus niger</i> sur PDA (a - d) ; MEA (b - e) ; CYA (c - f) ; Cz (g - h); (j) Têtes de conidies bisériées et globuleuses et vésicules.	28
Figure 7. Profil électrophorétique montrant le produit amplifié de fragments ITS.....	29
Figure 8. Arbre phylogénétique de la souche fongique montrant les plus proches voisins.	30
Figure 9. Purification de la protéase aspartique d' <i>Aspergillus niger</i>	32
Figure 10. Profil électrophorétique de SDS-PAGE de la protéase purifiée..	34
Figure 11. Graphique standard pour l'estimation du poids moléculaire de protéase aspartique..	35
Figure 12. Paramètres cinétiques de la protéase aspartique purifiée : le pH optimal et la stabilité...	36
Figure 13. Paramètres cinétiques de la protéase aspartique purifiée : la température optimale et la stabilité	37
Figure 14. Paramètres cinétiques de la protéase aspartique purifiée : Km et Vmax	38

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
CYA	CzapekYeastAutolysate Agar
Cz	Czapek
DEAE	DiEthylAminoEthyl
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ITS	Internal Transcribed Spacer
KBPL	Kaypeeyes Biotech Private Limited
MEA	Malt Extract Agar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAGE	Polyacrylamide Gel Électrophorèse
pb	paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	potentiel Hydrogène
SDS	Sodium Dodesyl Sulfate
SmF	Submerged Fermentation
SSF	Solid-State Fermentation
TAE	Tris-Acétate-EDTA
UV	Ultra-violet

Introduction

Introduction

Les protéases représentent l'un des trois plus grands groupes d'enzymes industrielles et représentent environ 60% du total des ventes mondiales d'enzymes. Les enzymes protéolytiques catalysent le clivage des liaisons peptidiques des protéines, elles peuvent être classées en protéase acide, neutre et alcaline en ce qui concerne leur plage de fonctionnement de pH. Ils font partie intégrante de la vie existante sur terre, comme les animaux, les plantes et les micro-organismes (Razzaq et al., 2019).

Les protéases sont importantes pour leurs avantages techniques et économiques et son application dans les industries de production. Ces enzymes sont très demandées en raison de leurs applications biotechnologiques larges et différentes, elles jouent un rôle capital dans les industries des détergents, pharmaceutiques, alimentaires, chimiques, l'industrie du cuir et de la soie ainsi que dans les applications environnement.

Les champignons filamenteux sont considérés comme les micro-organismes les plus appropriés pour la fermentation sur milieu solide (SSF), en particulier *Aspergillus niger*, qui peuvent excréter des quantités importantes d'enzymes protéase sur milieu solide car cette technique peut stimuler leur habitat naturel. Ce support solide pourrait être la source de nutriments ou de carbone utilisée par les micro-organismes pour soutenir le développement, la croissance et les activités métaboliques, et excrètent les enzymes nécessaires pour la dégradation des molécules du substrat (Ooi, et al., 2021). La SSF est une technique peu coûteuse qui utilise des déchets agro-industries (Rocha et al., 2021).

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de faire une synthèse de quelques travaux de recherches étudiant la production de protéase par l'*Aspergillus niger* par fermentation sur milieu solide. Le milieu de culture utilisé est le son de blé qui se caractérise par son faible coût, ce qui pourrait ouvrir la voie à la production d'enzymes moins chères en quantités suffisantes pour répondre aux besoins en protéases à l'échelle industrielle.

Notre recherche se divise en deux parties :

- la partie bibliographique comprend des informations générales sur les protéases dans le premier chapitre, l'*Aspergillus niger* dans le deuxième chapitre, et enfin, le troisième chapitre traite de la méthode de fermentation sur milieu solide ;

- la partie expérimentale comprend la méthodologie utilisée dans cette étude, la présentation des résultats obtenus, et enfin la conclusion générale.

PARTIE I. Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Protéases

1.1. Définition des protéases

Les protéases (peptidases ou enzymes protéolytiques) (Souza *et al.*, 2015) sont des enzymes hydrolytiques qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques dans d'autres protéines en fragments peptidiques plus petits (S.Radha *et al.*, 2012), ces enzymes sont généralement synthétisé sous forme de zymogène inactifs, ce qui permet apparemment de protéger la cellule contre tout effet désastreux (Jean, 1993).

1.2. Sources des protéases

Les protéases se trouvent partout dans la nature, à savoir dans les plantes, les animaux et les micro-organismes (Razzaq *et al.*, 2019).

1.2.1. Protéases d'origine végétales

L'utilisation de plantes comme source de protéases est régie par plusieurs facteurs tels que la disponibilité des terres pour la culture et l'adéquation des conditions climatiques pour croissance (Rao *et al.*, 1998); la papaïne, la broméline, les kératinases et la ficine sont quelques-unes des protéases bien connues d'origine végétal, cependant, leur production à partir de sources végétales est un processus qui prend du temps (Jisha *et al.*, 2013).

1.2.2. Protéases d'origine animale

Les protéases les plus connues d'origine animale sont la trypsine pancréatique, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine (Jisha *et al.*, 2013), ceux-ci sont préparés sous forme pure en grande quantités ; mais, la production de ces enzymes dépend de la disponibilité de bétail, qui est gouverné par la politique et les bris d'agriculture (Rao *et al.*, 1998).

1.2.3. Protéases d'origine microbiennes

Les micro-organismes représentent une excellente source de protéases, étant également la principale source de production (Aguilar et Sato, 2018), elles possèdent presque toutes les caractéristiques requises pour leurs applications industrielles.

De plus, les microbes nécessitent un minimum d'espace pour la culture, une croissance rapide, une productivité plus élevée à faible coût et peuvent être facilement manipulés

génétiquement pour produire de nouvelles enzymes aux propriétés modifiées (Nawab *et al.*, 2016).

1.3. Classification des protéases

Les protéases peuvent être classées en deux grands groupes : exopeptidase et endopeptidases, en raison du site d'action, ils peuvent également être regroupées en trois types selon leur pH optimal, c'est-à-dire les protéases acides: pH optimal inférieur à 7,0 (2,0–5,0), protéases alcalines: pH optimal au-dessus de 7,0 et protéases neutres: pH optimal de 7,0 (Sethi *et al.*, 2016). Les protéases sont subdivisées en quatre groupes selon leur spécificité de chaîne latérale et sur le groupe fonctionnel présent au site actif : protéases à sérine (EC.3.4.21), protéases à Cystéine (EC.3.4.22), Protéases à acides aspartiques (EC.3.4.23) et les métalloprotéases (EC.3.4.24) (Kumar *et al.*, 2008).

1.4. Application industrielle de protéases

1.4.1. Industrie alimentaire

1.4.1.1. Préparation du fromage

Les protéases sont utilisées pour la coagulation du lait, la principale étape de la production de fromage, depuis des milliers d'années (Alavi et Shima, 2020), les industries de fabrication du fromage utilisent une source microbienne de protéases, parmi plusieurs classes de protéases, les protéases aspartiques sont considérées comme les meilleures pour les industries fromagères (Goutam et Kumar, 2017).

1.4.1.2. Boulangerie

Dans l'industrie de la boulangerie, pour une préparation plus rapide de la pâte, son gluten est partiellement hydrolysé par une protéase fongique thermolabile en raison de son inactivation précoce lors de la cuisson ultérieure (Razzaq *et al.*, 2019)., le traitement enzymatique de la pâte facilite sa manipulation et son usinage et permet la production d'une plus large gamme de produits. L'addition de protéases réduit le temps de mélange et entraîne une augmentation de volumes de pain, les protéases bactériennes sont utilisées pour améliorer l'extensibilité et la force de la pâte (Rani *et al.*, 2012).

1.4.2. Domain pharmaceutique et médical

L'application médicinale de la protéase pour le diagnostic et thérapeutique est largement acceptée et plusieurs enzymes sont utilisées depuis de nombreuses années ; les protéases sont principalement associées au développement d'agents anticancéreux, anti-inflammatoires, antimicrobiens et dissolvant les caillots (Srilakshmi *et al.*, 2014), à des fins thérapeutiques.

Les protéases alcalines immobilisées isolées de *Bacillus subtilis* sont utilisées pour la composition de la pommade, les tissus non tissés, les formules médicinales en gel mou, la gaze et les nouveaux matériaux. Les protéases isolées d'*Aspergillus oryzae* ont aidé au diagnostic pour corriger certain syndrome de déficit enzymatique ; la propriété élastolytique d'une sérine protéase de *Bacillus subtilis* a été utilisée pour préparer l'élastotérase. Cette formulation est utilisée dans le traitement des abcès, des brûlures, des anthrax et autres plaies (Hira *et al.*, 2016).

1.4.3. Industrie du cuir

Les industries du cuir consomment une quantité importante de protéase pour le traitement du cuir brut. Les protéases alcalines produites par les micro-organismes sont très utiles pour l'épilation, ce qui est plus sûr que la méthode traditionnelle utilisant des produits chimiques dangereux, qui crée une pollution environnementale (Goutam et Kumar, 2017).

Les utilisations particulières de la protéase sont pertinentes dans la phase de trempage, de cuisson et d'épilation de la préparation de la peau ; Les protéases alcalines microbiennes sont devenues très populaires dans les industries du cuir (Razzaq *et al.*, 2019).

1.4.4. Détergents

L'industrie des détergents représente la plus grande application industrielle d'enzymes équivalant à 25 à 30% des ventes totales d'enzymes (Singh *et al.*, 2016).

Les Protéases obtenues à partir de *Bacillus sp.* Sont très utiles dans la fabrication de détergent à lessive. La demande de protéase compatible avec les détergents est élevée et, par conséquent, le criblage des bactéries productrices de protéase est un processus continu et leur utilisation microbienne dans la fabrication de détergents est bonne pour la santé et la nature (Banerjee et Ray, 2017).

Chapitre 2. *Aspergillus* *niger*

2.1. Généralité

Le nom *Aspergillus* a été introduit pour la première fois par Micheli en 1729 pour décrire des champignons asexués (Tsang *et al.*, 2018) ; le genre *Aspergillus* comprend environ 180 espèces (Robert et Pitt, 1989), ces espèces sont vitales pour l'industrie alimentaire et un bon nombre d'entre elles sont exploitées pour produire des aliments fermentés (Tsang *et al.*, 2018).

2.2. Espèce *Aspergillus niger*

Membres d'*Aspergillus* section *noir* auparavant *A. niger* sont distribués dans le monde entier et sont considérés comme des champignons (Abarca *et al.*, 2004).

2.3. Taxonomie

Al-Musallam en 1980 a révisé la taxonomie de ce groupe de champignons en utilisant une analyse par grappes impliquant tous les paramètres morphologiques et culturels disponibles.

Aspergillus est un groupe diversifié de champignons filamenteux et cosmopolites qui comprend des espèces importantes pour la mycologie médicale, l'alimentation, la recherche fondamentale et l'agro-industrie, ils appartiennent au sous-genre *Circumdati* qui comprend 26 espèces réparties dans les clades *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus* et *A. acualeatus* (Díaz *et al.*, 2020).

2.4. Morphologie

Les champignons filamenteux présentent une morphologie dispersée (hyphe libre ou amas lâches) ou granulée (agglomérats sphériques d'hyphes) (Salvatierra *et al.*, 2021), l'*A.niger* est caractérisé par la présence de filaments perpendiculaires (stipes) aux hyphes végétatifs, ces stipes se terminent par une vésicule supportant les cellules de la conidiogénèse : les phialides. Celles-ci, sans collerette, sont soit portées directement par la vésicule, soit séparées par des pièces intermédiaires ou métules (Morin, 2003) ; l'une des caractéristiques les plus intrigantes et souvent incontrôlables de cet organisme filamenteux est sa morphologie complexe, allant des pastilles sphériques denses aux mycéliums visqueux en fonction des conditions de culture, une productivité optimale est fortement corrélée à une forme morphologique spécifique (Wucherpfennig *et al.*, 2011)

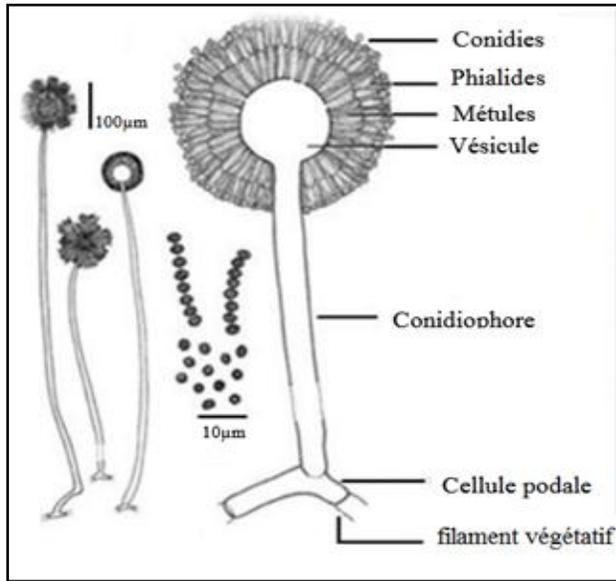


Figure 1. Représentation microscopique de la conidiochore d'*A.niger* (Pasqualotto, 2010).



Figure 2 . Représentation macroscopique d'*A. niger* (Nygren *et al.*, 2007).

2.5. Reproduction

A.niger est un champignon ascomycète connu pour se reproduire uniquement par des spores asexuées (Wadman *et al.*, 2009), le cycle asexué est le principal moyen de dispersion cellulaire et protège le génome fongique dans des conditions défavorables, et la production de métabolites secondaires est fréquemment associée à ces processus de développement. La sporulation produit des conidies contenant les spores haploïdes et asexuées uni-nucléées (Ward *et al.*, 2006).

La croissance est initiée par germination de la spore, avec formation d'hyphes tubulaires, se développant de manière apolaire par extension apicale et ramification pour former un réseau de mycélium, qui acquiert des nutriments de l'environnement (Ward *et al.*, 2006).

2.6. Enzymes produites par l'*Aspergillus niger*

Les fonctions d'*Aspergillus* ont été démontrées comme la production d'enzymes (Yan *et al.*, 2021), en raison de leur grande capacité à produire et à sécréter des enzymes extracellulaires, *Aspergillus* joue un rôle important dans la production d'enzymes industrielles (Ward *et al.*, 2006)

et sécrètent une variété d'enzymes comprenant des protéase, des cellulases, des lipases, hémicellulase, phytase et d'autres, pectinase, inulinase, glucoamylase et xylanase.

Tableau 1. Enzymes produites par *A. niger*.

Enzymes	Microorganisme	Substrat/ milieu	Référence
Protease	<i>A.niger</i>	son de blé	(Ahmed, 2018)
	<i>A.niger</i> DEF 1	effluent sous forme laitière	(Lanka <i>et al.</i> , 2017)
	<i>A.niger</i> WA 2017	alcaline tolérante aux solvants, aux sels et aux alcalins	(Wahab et Ahmed, 2018)
Cellulase	<i>A.niger</i>	un milieu Czapek-Dox supplémenté avec 1,0% (p / v) de cellulose	(Narasimha <i>et al.</i> , 2006)
Lipase	<i>A.niger</i> MYA 135	gélose au glucose et aux pommes de terre	(Salvatierra <i>et al.</i> , 2021)
Hémicellulase	<i>A. niger</i>	paille de blé	(Azzouz <i>et al.</i> , 2021)
Phytase	<i>A.niger</i> isolat no 62	son de blé /son de riz /tiges de coton fèves /tiges de coton /pulpe de grenade écorces de pois	(Ghalyorcid <i>et al.</i> , 2021)
Pectinase	<i>A.niger</i>	Chrysophyllumalbidum	(Nsude <i>et al.</i> , 2021)
Inulinase	<i>A. niger</i> A42	extrait de caroube	(Ilgin <i>et al.</i> , 2020)
Gluco amylase	<i>A.niger</i> CBS 513.88	gélose de pomme de terre dextrose (PDA)	(Cao <i>et al.</i> , 2020)
	<i>A.niger</i> VTCC-F017	Collection de cultures de type vietnamien (VTCC).	(Tuyen <i>et al.</i> , 2021)

Chapitre 3. Fermentation

3.1. Généralité

L'utilisation d'enzymes dans les processus de fermentation anciens est connue depuis l'antiquité (Sharma *et al.*, 2017) ; la production d'enzymes par fermentation peut être réalisée à la fois par fermentation submergée (SmF) et par fermentation sur milieu solide (SSF) (Alagarsamy *et al.*, 2005); la nature de la fermentation influe divers aspects de la croissance du micro-organisme ainsi que la production d'enzymes (Sharma *et al.*, 2017).

3.2. Fermentation sur milieu solide

SSF est définie comme le processus dans lequel la croissance microbienne se produit sur un support solide en l'absence ou presque d'eau libre (Rocha *et al.*, 2021); dans ce processus, le substrat solide fournit non seulement le nutriment à la culture, mais sert également d'ancrage pour les cellules microbiennes (Sharma *et al.*, 2017). La SSF est un processus hétérogène en trois phases, comprenant des solides, des liquides et phases gazeuses, qui offrent des avantages potentiels pour la culture microbienne pour les bioprocédés et le développement de produits (Thomas *et al.*, 2013).

3.3. Avantages et inconvénients

SSF offre de nombreux avantages pour la production des produits chimiques et des enzymes par rapport aux SmF, parmi ces avantages on a :

- une technique simple, peu coûteuse est utile pour produire de nouveaux biocatalyseurs et bioproduits à partir de déchets issus de l'agro-industrie ;
- le peu d'eau disponible favorise la production des métabolites, volume de réacteur plus faible requis, risques de contamination négligeables, pas de formation de mousse ;
- Le produit peut être récupéré sous une forme hautement concentrée par rapport à ceux obtenus par fermentations immergées ;
- une productivité volumétrique supérieure, des machines plus simples, l'utilisation d'un substrat peu coûteux, de faibles besoins en énergie et faible rendement des eaux usées, faible investissement en capital, niveaux inférieurs de répression des catabolites et cependant, les processus SSF présentent certains inconvénients :
- la technique SSF est principalement confinée au processus impliquant des champignons, la gamme restreinte de micro-organismes capables de croître dans des niveaux d'humidité réduits, le contrôle des conditions est encore une fois très difficile et il n'y a pas de concentration définie des composants du milieu ;

- de plus, la SSF est généralement plus lente en raison des barrières de diffusion imposées par la nature solide de la masse fermentée ;
- contrôle difficile des paramètres du processus (pH, chaleur, humidité, conditions nutritionnelles, ...) ;
- les connaissances physiologiques et technologiques des microorganismes sur milieux solides sont faibles (Sharma *et al.*, 2017; Assamoi *et al.*, 2009).

3.4. Substrats utilisés

Le coût et la disponibilité sont des considérations importantes et, par conséquent, le choix d'un substrat solide approprié joue un rôle important dans le développement de procédés SSF efficaces (Sharma *et al.*, 2017); de ce fait, les résidus agro-alimentaires semblent d'être les plus intéressants, en raison de leurs avantages potentiels surtout pour les champignons filamenteux, qui sont capables de pénétrer à l'intérieur de leur structure solide (Nigam, 2009).

3.5. Microorganismes utilisés

La sélection d'un micro-organisme approprié est l'un des critères les plus importants de la SSF. Plusieurs micro-organismes ont été utilisés dans une large gamme de procédés SSF pour divers objectifs. La culture de champignons filamenteux sur des substrats solides a été largement utilisée à différentes fins à l'échelle du laboratoire, le SSF a été le plus couramment utilisé en utilisant *A.niger* pour l'enrichissement en protéines ainsi que pour la production d'enzymes, comme la protéase (Nigam et Pandey, 2009) car ils sont les meilleurs adaptés en raison de leur capacité à s'étendre et à pénétrer à l'intérieur du substrat solide (Manpreet *et al.*, 2005).

3.6. Applications industrielles de la fermentation sur milieu solide

Bien que son intérêt se soit accru ces dernières années, l'application de la SSF pour la production de nourriture est connue depuis l'Antiquité. Fermentation alimentaire traditionnelle comme la production de fromage peuvent être considérés comme des exemples des plus anciennes applications documentées de SSF (Rosales *et al.*, 2018). SSF abouti de nouvelles applications des technologies pour la production d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires, des enzymes industrielles, denrées alimentaires enrichies, biocarburants, acides organiques et composés aromatiques (Krishna, 2005).

PARTIE II. Partie expérimentale

Chapitre 4. Matériel et Méthodes

Ce chapitre est divisé en deux parties :

- la première partie vise à l'identification morphologique et moléculaire de la souche isolée « *Aspergillus niger* » ;
- la deuxième partie vise à la production de protéase à partir de cette souche.

4.1. Matériel biologique

La culture d'*Aspergillus niger* provenait de Kaypeeyesbiotechpvt Ltd (KBPL), zone industrielle Hebbal, Mysuru, Karnataka, Inde (Purushothaman *et al.*, 2019).

Un repiquage s'effectue tous les deux mois sur le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) afin d'assurer la préservation de la vitalité de la souche (Bensmail *et al.*, 2013).

4.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique

L'activité de la protéase a été typiquement déterminée qualitativement par la capacité des isolats de culture pure à croître sur la protéine comme seule source d'azote, à développer des zones claires sur des boîtes de gélose protéique (Nygren *et al.*, 2007).

La capacité de la souche isolée, à dégrader les caséines du lait, est mise en évidence sur gélose au lait. Pour l'obtention de cette gélose à 45°C, le milieu de culture Sabouraud (voir annexe 1-a) et le lait stérile sont mélangés dans un rapport 4/1, puis versés dans des boîtes de Pétri. Après refroidissement et dans des conditions stériles la souche est déposée au milieu de la boîte et incubée à 25°C pendant 72 heures (Benlounissi, 2012).

4.3. Identification de la souche isolée

4.3.1. Identification morphologique

L'identification d'une souche fongique est effectuée par deux techniques classiques : une observation macroscopique et une étude microscopique des souches et cela en réalisant des ensemencements par touches sur des milieux d'études solides favorisant la croissance et la sporulation des moisissures.

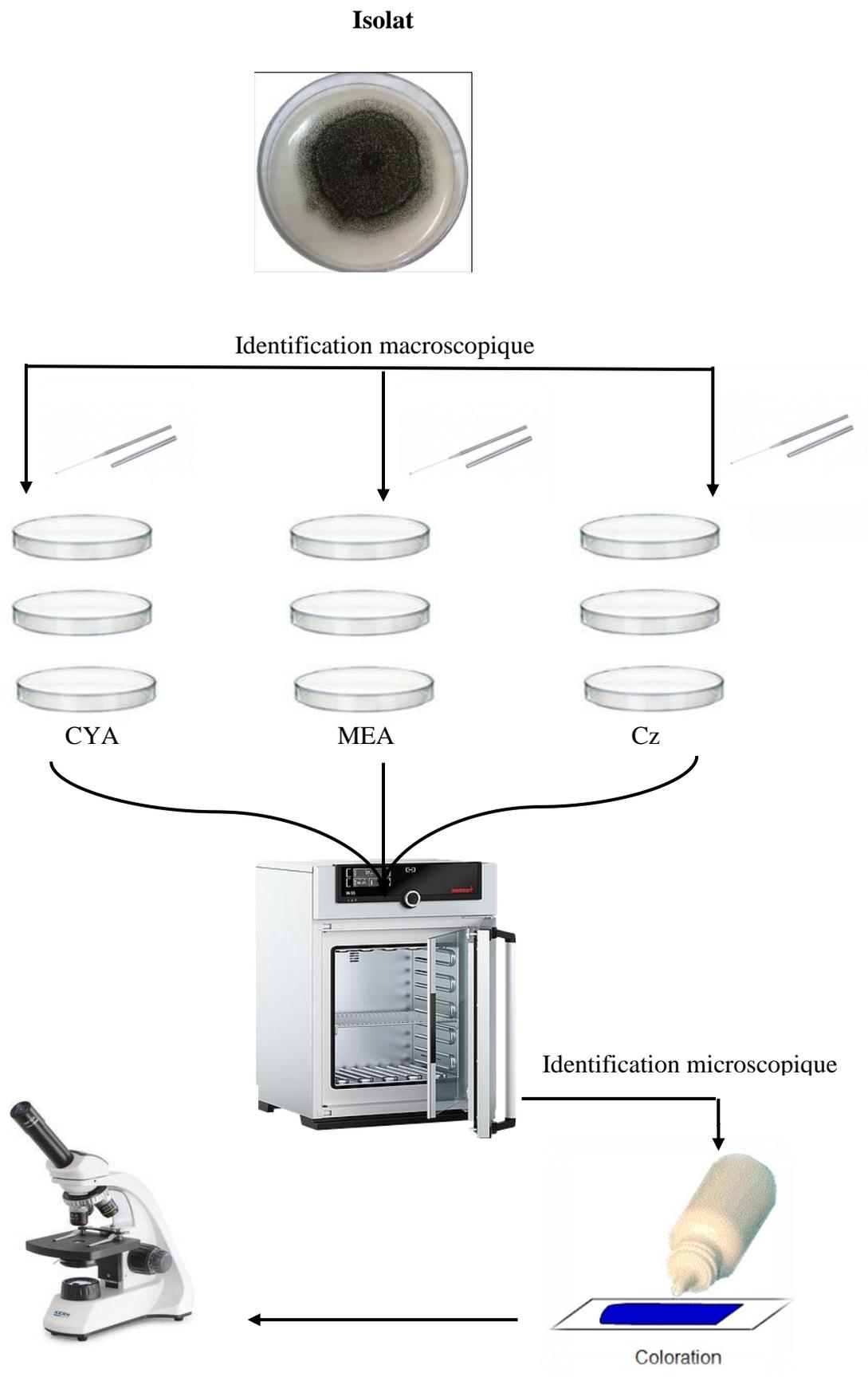


Figure 3. Etapes d'identification morphologique de la souche *A.niger*.

4.3.1.1. Identification macroscopique

L'examen macroscopique tient compte de la surface et du revers des boîtes de Pétri contenant la souche (Matotou *et al.*, 2021), après avoir obtenu la culture pure, l'isolat a été ensemencé dans des boîtes de Pétri contenant les milieux de culture suivants : Czapeck Yeast Gélose (CYA) (voir annexe 2-a), Malt Extract Agar (MEA) (voir annexe 2-b), Czapek (Cz) (voir annexe 2-c).

Après 7 jours d'incubation à 25 °C (Silva *et al.*, 2011), les critères macroscopiques ont été maintenus :

- taux de croissance : rapide, lent ou modéré, en mesurant les diamètres des colonies ;
- la détermination de la couleur de la colonie de la surface et du revers de la culture: une couleur uniforme ou une distribution fluctuante ;
- Sécrétion de pigments colorés diffusibles dans le milieu de culture ;
- la structure superficielle de la colonie : veloutée, cotonneuse, granuleuse ou lisse, plate ou surélevée à la surface du milieu ;
- la présence de gouttelettes aqueuses transpirées par le mycélium aérien (exsudats) (Sadrati, 2021).

4.3.1.2. Identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique est réalisé après prélèvement d'un ou plusieurs fragments de la culture et étalement de la préparation entre lame et lamelle.

Généralement, l'objectif x40 est suffisant pour mettre en évidence les éléments importants du diagnostic (Lahouar, 2016).

Le bleu de coton au lactophénol a été utilisé (Sigma-Aldrich, Allemagne) pour étudier les caractéristiques microscopiques des champignons.

- une goutte de solution de lactophénol a été placée sur une lame propre ;
- ensuite, les aiguilles ont été stérilisées au bec Bunsen, la petite quantité de culture fongique a été retirée du bord de la colonie avec un peu de milieu gélosé avec le champignon, puis étalée sur une lame en utilisant une deuxième aiguille afin de démêler les structures fongiques (Maitig *et al.*, 2018) ;
- à la fin, la culture fongique a été examinée au microscope pour voir les critères suivants :

- propriétés des hyphes : couleur, cloisonnés ou coenocytiques ;
- production de fructifications : sporonia, perithecia, pycnidia, sporodochia, corenia ;
- la couleur, la taille et la forme des fructifications ;
- conidiophores : absents, simples, ramifiés ;
- organes de fructification : périthèces, cléistothèces (sexué), pycnides (asexué) ;
- le mécanisme de production des spores et ses caractéristiques (Sadrati, 2021).

Et enfin pour identifier l'isolat fongique, ces critères macroscopiques et microscopiques ont été comparés à des clés d'identification.

4.3.2. Identification moléculaire

Auparavant, toute identification fongique était basée sur des critères macro et micro morphologiques. Cependant, l'identification des taxons est difficile, et a maintenant été complétée par une identification moléculaire qui compare des gènes spécifiques ou des séquences partielles nommées marqueurs moléculaires (Díaz *et al.*, 2020).

Une identification moléculaire des espèces fongiques a été réalisée en amplifiant et séquençant des régions différentes de leur ADN, pour but de confirmer l'identification morphologique de la souche fongique (Zerroug, 2021).

4.3.2.1. Extraction d'ADN

- l'isolat fongique a été cultivé sur milieu PDA pendant 7 jours à 25°C ;
- un broyeur à billes a été utilisé pour la lyse des cellules de moisissures ;
- l'ADN génomique a été extrait à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN microbien (Mo Bio Laboratories, Inc.) suivant le protocole mentionné dans le bulletin technique du fabricant.

➤ Protocole d'extraction

Le protocole mentionné dans le bulletin technique de ce kit est :

- aux tubes de solution de billes de 2 ml fournis, ajouter 0,25 à 1 g d'échantillon et vortexer doucement pour mélanger ;
- ajouter 60 µl de Solution S1 et inverser plusieurs fois ou vortexer brièvement (vérifier la solution S1. Si la solution S1 est précipitée, chauffer la solution à 60 °C jusqu'à dissolution avant utilisation);
- ajouter 200 µl de solution IRS (solution d'élimination des inhibiteurs) ;

- vortexer à vitesse maximale pendant 10 minutes ;
- centrifuger les tubes à 10 000 x g pendant 30 secondes ;
- transférer le surnageant dans un tube de prélèvement propre de 2 ml (fourni) ;
- ajouter 250 µl de Solution S2 et vortexer pendant 5 secondes, incubé à 4°C pendant 5 minutes ;
- centrifuger les tubes pendant 1 minute à 10 000 x g ;
- en évitant le culot, transférer 450 µl de surnageant dans un tube de prélèvement propre de 2 ml (fourni) ;
- agiter pour mélanger la Solution S3 avant utilisation. Ajouter 900 µl de solution S3 au surnageant et vortexer pendant 5 secondes ;
- charger environ 650 µl sur un Spin Filter et centrifuger à 10 000 x g pendant 1 minute ;
- jeter le flux et ajouter le surnageant restant au Spin Filter et centrifuger à 10 000 x g pendant 1 minute ;
- ajouter 300 µl de Solution S4 et centrifuger pendant 30 secondes à 10 000 x g ;
- jeter le liquide traversant et centrifuger à nouveau à 10 000 x g pendant 1 minute ;
- placer soigneusement le Spin Filter dans un nouveau tube collecteur de 2 ml (fourni) ;
- ajouter 50 µl de Solution S5 au centre de la membrane filtrante blanche ;
- centrifuger à 10 000 x g pendant 30 secondes et jeter le Spin Filter ;

L'ADN dans le tube est maintenant prêt pour toute application en aval (Anwar *et al.*, 2019).

➤ **Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité**

a- Estimation de la concentration de l'ADN par Nanodrop

La concentration d'ADN a été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) ;

L'absorbance à 280 nm et à 260 nm a également été mesurée et le rapport A260 / A280 a été déterminé pour évaluer la pureté de l'ADN (Das *et al.*, 2017).

b- Contrôle de la qualité d'ADN sur gel d'agarose

La préparation du gel se fait par cuisson pendant 2 min d'un mélange de 0,8 g d'agarose et de 100 ml de TAE dans un four à microondes. Le gel est coulé sur support d'une cuve horizontale. Dans chaque puits du gel, il est déposé le mélange de : 10 µl de l'ADN extrait + 4 µl de bleu de bromophéol, et un puits pour de 3 µl de marqueur de poids moléculaire. Tout le

système est soumis, par la suite, à un voltage initial de 30 V pendant 10 min puis évoluant à 100 V pendant 30 min (Lahouar, 2016).

4.3.2.2. Amplification du fragment ITS par PCR

L'amplification d'ADN est réalisée par la méthode de « Réaction en Chaîne par Polymérase », cette méthode permet d'obtenir d'importantes quantités de fragments d'ADN à partir d'une petite quantité de matériel biologique (Moussavou, 2021).

L'ADN ribosomique fongique des régions d'espaceur interne transcrit (ITS) a été amplifié par PCR conventionnelle, en utilisant la paire d'amorces suivante (Shehada *et al.*, 2021) :

- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA
- GCATTCCCAAACAACACTCGACTC.

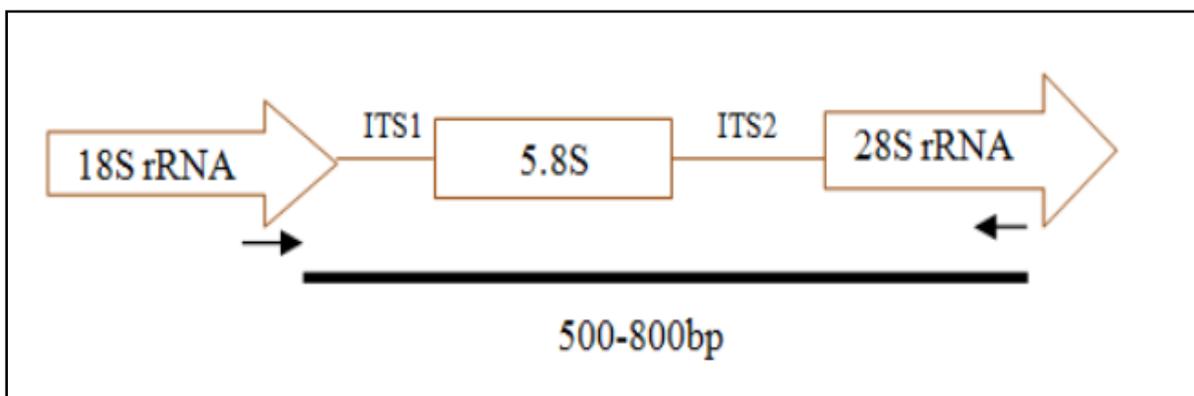


Figure 4. Schéma montrant le fragment ITS amplifié (Mkumbe *et al.*, 2018)

➤ Préparation du mix réactionnel de PCR

Dans cette étude, la PCR a été réalisée en utilisant 50 µl de mélange réactionnel :

- 25µl de mélange PCR (Bioline, Allemagne) ;
- 2,5µl d'échantillon d'ADN ;
- 2,25 µl de chaque amorce ;
- 17,5µl de dH₂O (Mkumbe *et al.*, 2018).

➤ Déroutement de la PCR

La technique PCR se réalise par le biais d'un appareil programmable appelé thermocycleur dans lequel sont placés les microtubes contenant le mélange réactionnel. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur (Magniez, 2009).

Le mélange obtenu est mis dans un thermocycleur (Applied Biosystems®), préalablement programmé pour la réalisation de l'ensemble des étapes d'une réaction de PCR, comprenant les étapes suivantes (tableau 2) :

Tableau 2. Programme de PCR (Shehada *et al.*, 2021).

Étape de la PCR	Répéter le cycle	Température (°C)	Durée
Dénaturation primaire	1	95	3 min
Dénaturation	40	95	1 min
Hybridation		58	30 secondes
Elongation		72	1min
Elongation finale	1	72	10 min

➤ Visualisation des fragments amplifiés

Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1% p/v dans TAE x1) et visualisés sur UV après coloration au Red Gel (Shehada *et al.*, 2021).

➤ Elution et purification d'ADN

Le kit « GenElute™ Gel Extraction Kit » (sigma-aldrich) a été utilisé et le protocole décrit dans le bulletin technique de ce kit a été appliqué.

Le protocole

1. À l'aide d'un scalpel Exciser le fragment d'ADN du gel d'agarose, coupez l'excès de gel pour réduire au minimum la quantité d'agarose ;
2. Dans un tube incolore taré, peser la tranche de gel ;
3. Ajouter 3 volumes de gel de « la solution de solubilisation de gel » à la tranche de gel ; (c'est-à-dire, ajoutez 300 µl de solution de solubilisation de gel pour chaque 100 mg de gel

d'agarose) ; incuber le mélange de gel pendant 10 minutes à 50-60°C, ou jusqu'à ce que la tranche de gel est complètement dissoute ; pendant la période d'incubation, vortexer le gel toutes les 2-3 minutes pour faciliter sa dissolution ;

4. Placer la colonne de liaison GenElute G dans l'un des tubes de prélèvement de 2 ml (fournis) ; ajouter 500 µl de solution de préparation de colonne à chaque colonne de liaison. Centrifuger pendant 1 minute et jeter le liquide qui s'écoule ;

5. Ajouter un volume de gel d'isopropanol à 100% et mélanger jusqu'à ce qu'il soit complètement homogène ;

6. Chargez le mélange de solution de gel solubilisé dans la colonne de liaison qui est assemblée dans un tube de collecte de 2 ml ;

7. À la colonne de liaison, ajoutez 700 µl de solution de lavage, après une minute de centrifugation, jeter le liquide qui s'écoule après avoir retiré la colonne de liaison du tube de collecte. Pour éliminer l'excès d'éthanol, remettez la colonne de liaison dans le tube de collecte et centrifuger à nouveau pendant 1 minute sans aucune solution de lavage supplémentaire ;

8. Dans un nouveau tube de prélèvement, placer la colonne de liaison. Incuber pendant 1 minute après avoir ajouté 50 µl de solution d'éluion au centre de la membrane et centrifuger pendant une minute.

4.3.2.3. Séquençage

Pour la confirmation des espèces, les fragments de la PCR contenant le locus ITS ont été séquencés en utilisant une paire d'amorces de :

- ITS1, TCCGTAGGTGAACCTGCGG ;
- ITS4, TCCTCCGCTTATTGATATGC (Shehada *et al.*, 2021).

Les réactions de séquençage ont été réalisées avec le kit « CEQ™ DTCS Quick Start » (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) en utilisant « CEQ 8000 Genetic Analysis System » (Shehada *et al.*, 2021).

4.3.2.4. Construction de l'arbre phylogénétique

L'objectif principal de cette étape est d'identifier la souche fongique isolée et de la confirmer comme *Aspergillus niger*, et la détermination a été basée sur la PCR et l'arbre phylogénétique de la région ITS (Halim et Saadon, 2020).

- Les séquences ont été excisées, assemblées et des séquences consensus ont été obtenues en utilisant le logiciel Bioedit.
- La recherche de similarité a été effectuée à l'aide de l'outil de recherche BLAST au NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>) pour comparer les séquences ITS obtenues à partir de cette étude avec les séquences de référence ITS disponibles dans la base de données pour l'identification de l'isolat (tableau 3) (Mkumbe *et al.*, 2018) .
- La construction de l'arbre phylogénétique et l'histoire de l'évolution ont été déduites en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance «maximum likelihood» et le modèle de Tamura et Nei. L'analyse évolutive a été menée dans MEGA X (Purushothaman *et al.*, 2019).

Tableau 3. Liste des séquences utilisées pour construire le cladogramme

Genre	Espèce	N° d'accession Genbank
<i>Aspergillus</i>	<i>Niger</i>	GQ229077.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Niger</i>	MN585763.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Niger</i>	MT990726.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Niger</i>	MN788108.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Niger</i>	MH095994.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Niger</i>	MN788114.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Niger</i>	MT316340.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Tubingensis</i>	EF178271.1

<i>Aspergillus</i>	<i>Tubingensis</i>	MK450659.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Tubingensis</i>	MK450658.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Awamori</i>	MG569530.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Awamori</i>	KX610171.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Awamori</i>	MG569684.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Awamori</i>	MG569617.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Brasiliensis</i>	MK450631.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Brasiliensis</i>	MK450630.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Brasiliensis</i>	MK450632.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Carbonarius</i>	JF838359.1
<i>Aspergillus</i>	<i>Carbonarius</i>	JF838358.1
<i>Penicillium</i>	<i>Expansum</i>	XM 016738295.1
<i>Penicillium</i>	<i>Expansum</i>	XM 016737567.1

4.4. Préparation de l'inoculum

La suspension de spores a été préparée dans de l'eau distillée stérile contenant environ 0,01 % (v/v) de Tween 80 (Fazilat, 2016). Cette solution a été utilisée comme source d'inoculum. La suspension a ensuite été filtrée à travers une étamine stérile à trois couches pour éliminer les fragments mycéliens (Tian *et al.*, 2018).

Après filtration, un ml de la suspension de spores contenant 2×10^6 spores/ml (concentration déterminée après dénombrement sur cellule de Malassez) a été utilisé comme inoculum (Bensmail *et al.*, 2013).

4.5. Production de protéase aspartique par fermentation sur milieu solide

La culture a été cultivée par fermentation sur solide en utilisant le son de blé comme substrat. À 100 g de son de blé, 60 ml de HCl 0,2 N contenant des oligo-éléments (voir annexe 3-d) ont été ajoutés. Du son de blé stérile a été inoculé avec une suspension de spores fongiques et incubé à 30 °C pendant 7 jours (Purushothaman *et al.*, 2019).

Après la fermentation, la protéase aspartique extracellulaire sécrétée est extraite par l'ajout d'un volume de NaCl 0,1 M, et après l'agitation, le mélange est centrifugé à 7000 x g pendant 10 min à 4°C et filtré sur papier filtre Whatman n° 1. Le surnageant clair a été utilisé comme source d'enzyme (Purushothaman *et al.*, 2019).

4.6. Méthode de dosage

4.6.1. Dosage des protéines (Bradford, 1976)

La concentration des protéines totales de l'extrait enzymatique a été déterminée selon la méthode de Bradford, (1976). Une gamme étalon est réalisée avec des quantités croissantes de sérum albumine bovine (BSA). L'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc. Les concentrations en protéine des extraits enzymatiques seront déterminées graphiquement directement à partir de cette courbe d'étalonnage (Benlounissi, 2012).

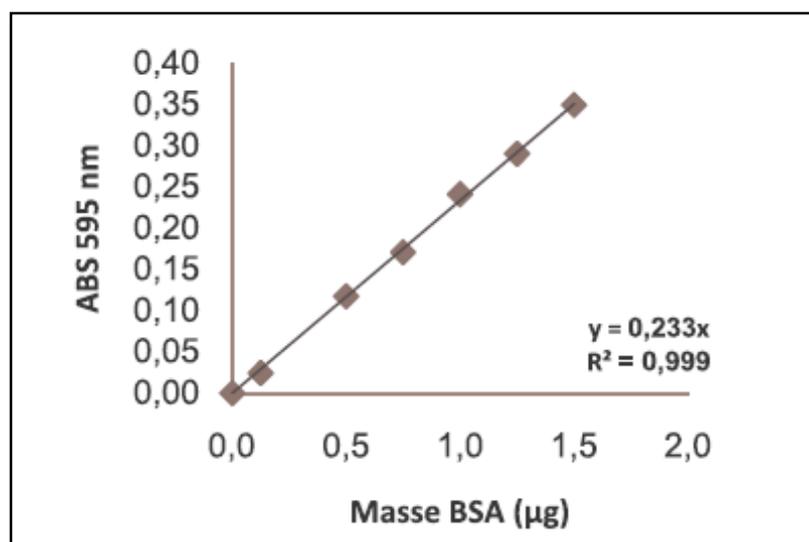


Figure 5. Courbe d'étalonnage de la solution des protéines (Benlounissi, 2012)

4.6.2. Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été dosée comme suit :

- 1 mL d'hémoglobine à 2% préparé dans un tampon acétate 0,1 M à pH 4 a été utilisé comme substrat;
- 0,4 ml d'enzyme (l'enzyme a été préparée dans un tampon d'acétate 0,2 M, pH 4 contenant 0,5 M de NaCl) a été ajouté et incubé à 60°C pendant 10 min ;
- la réaction a été arrêtée par l'ajout de 2 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 5 % et les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 20 min ;
- après 20 min, le mélange réactionnel a été filtré sur papier filtre Whatman n° 1 et l'absorbance du filtrat contenant la tyrosine libérée a été mesurée à 280 nm en utilisant un spectrophotomètre (Eppendorf BioSpectrophotometer) ;
- la quantité de tyrosine libérée a été calculée à l'aide d'un étalon de tyrosine (0 à 60 g/mL) ;
- Une unité d'activité protéasique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 ug de tyrosine par minute, dans des conditions de dosage standard (K. Purushothaman *et al.*, 2019).

4.7. Purification de l'enzyme

La purification de l'enzyme protéase aspartique extracellulaire de l'*Aspargillus niger* a été réalisée en 3 étapes :

- précipitation au sulfate d'ammonium à 60 %;
- filtration sur gel de polyacrylamide Biogel P100 ;
- chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-sépharose.

Mode opératoire

- Au surnageant de culture, le sulfate d'ammonium à 60 % a été ajouté sous agitation constante à 4°C pendant 6 h ;
- Le précipitât a été récupéré par centrifugation à 7000 x g pendant 30 min à 4°C ;
- Le culot de sulfate d'ammonium a été remis en suspension dans un tampon d'acétate de 50 mM, pH 5 contenant 0,1 M de NaCl ;
- Cet échantillon (2 ml contenant 95 mg de protéine) a été chargé sur une colonne de 1,5 cm × 78 cm remplie de 137 ml de billes de polyacrylamide Biogel P100, équilibrée

avec le tampon acétate 50 mM, pH 5 contenant 0,1 M de NaCl et éluée avec le même tampon ;

- Des fractions ont été collectées à un débit de 20 ml/h et surveillées par l'absorbance à 280 nm ;
- l'activité de la protéase est évaluée pour chaque fraction;
- Les fractions actives de la colonne Biogel ont été regroupées et chargées dans une colonne DEAE-Sepharose (2,5 cm x 8 cm, 39 ml) ;
- Un échantillon de 6 ml contenant 13,2 mg de protéine a été chargé sur la colonne préalablement équilibrée avec du tampon acétate 50 mM, pH 5 contenant 0,1 M de NaCl. La taille des fractions a été fixée à 2 ml avec un débit de 2 ml/min. L'éluion a été réalisée dans 0 à 1 M NaCl (Purushothaman *et al.*, 2019).

4.8. SDS-PAGE

La SDS-PAGE a été réalisée avec du gel de polyacrylamide à 10 % ;

- la coloration à l'argent a été utilisée pour visualiser le motif des bandes de protéines ;
- Le poids moléculaire de la protéase aspartique purifiée a été calculé en traçant les valeurs de distance de migration relative (Rf) par rapport au log du poids moléculaire ;
- Les standards de protéines utilisés sont : la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (66,0 kDa), l'ovalbumine (43,0 kDa), l'anhydrase carbonique (29,0 kDa), l'inhibiteur de trypsine de soja (20,1 kDa) et le lysozyme (14,3 kDa) ;
- Le poids moléculaire a également été confirmé par mesure à l'aide d'un logiciel de lecture de gel (Image Lab, Gel Doc EZ Imager, Bio-Rad) (Purushothaman *et al.*, 2019).

➤ Estimation du poids moléculaire par chromatographie de filtration sur gel

- Le poids moléculaire a été calculé en traçant le log du poids moléculaire en fonction de V_e/V_o obtenu à partir de la chromatographie de filtration sur gel en utilisant les standards : albumine de sérum bovin (BSA) (66 kDa), DNase I (31 kDa), trypsine (23,3 kDa) et lysozyme (14,6 kDa).
- Le tampon utilisé pour la migration et l'éluion était un tampon acétate 50 mM, pH 5 contenant 0,1 M NaCl (Purushothaman *et al.*, 2019).

4.9. Caractéristiques de la protéase aspartique

L'effet des paramètres, température et pH, est étudié sur l'activité de la protéase afin de connaître ses propriétés.

4.9.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité

Le pH optimal est mesuré par dosage de l'activité protéolytique à des pH variant de 2 à 8, sachant que les tampons utilisés sont :

- 100 mM de glycine-HCl pour pH 2 à 2,7 ;
- citrate pour pH 3 à 3,5 ;
- acétate pour pH 4 à 5,5 ;
- phosphate pour pH 6 à 8.

Le dosage a été effectué à 60°C ;

La stabilité de la protéase à différents pH a été déterminée en incubant l'enzyme dans divers tampons avec un pH allant de 2,0 à 8,0 pendant 24 h à 30 °C ;

L'activité résiduelle a été mesurée à 60 °C et comparée au témoin, qui a été considéré comme une activité de 100 % (Purushothaman *et al.*, 2019).

4.9.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité.

L'influence de la température sur l'activité de la protéase est étudiée en portant le mélange réactionnel à différentes températures de 35 à 75 °C. Le dosage a été effectué à pH 4,0.

L'activité la plus élevée obtenue a été prise comme 100 % et exprimée en % d'activité résiduelle.

La thermo-stabilité a été déterminée en présence de NaCl 0,5 M, en incubant l'enzyme à différentes températures allant de 40 à 70 °C pendant 15 min, en refroidissant immédiatement dans bain de glace pendant 5 min et en dosant les échantillons à 60 °C, pH 4,0 pour déterminer la activité résiduelle ;

Le contrôle a été pris en tant qu'activité à 100 % et les échantillons d'essai ont été exprimés en % d'activité résiduelle (Purushothaman *et al.*, 2019).

4.9.3. Paramètres cinétiques de l'enzyme.

Les valeurs K_m et V_{max} de la protéase aspartique ont été déterminées en utilisant l'hémoglobine comme substrat dans l'intervalle de concentration de 0 à 2 %. Le test a été effectué pendant 10 minutes à pH 4,0 et 60 °C ;

Le graphique Lineweaver-Burk a été utilisé pour déterminer les valeurs de K_m et de V_{max} (Purushothaman *et al.*, 2019).

Chapitre 5. Résultats et Discussion

Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus portant sur l'identification morphologique et moléculaire de la souche *A.niger* avec la conformation par un arbre phylogénétique, les résultats de l'activité protéolytique, la purification de l'enzyme, SDS-PAGE et la caractérisation de la protéase aspartique.

5.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique

La souche est capable de générer une zone de protéolyse de taille supérieure à 3 mm. Cette observation démontre clairement que, d'une part, la souche d'*Aspergillus niger* est capable d'hydrolyser la caséine du lait et d'autre part, que les enzymes responsables de cette hydrolyse sont sécrétées dans le milieu extérieur, ce qui représente un point très positif pour leur production et leur caractérisation (Benlounissi, 2012).

5.2. Identification de la souche isolée

5.2.1. Identification morphologique

En ce qui concerne l'identification morphologique, les études se sont appuyées sur les caractéristiques macro et microscopiques de la souche isolée et identifiée après la comparaison avec les clés d'identification : **Samson *et al.*, (2004) ; Chabasse *et al.*, (2002); Klich (2002), Pitt et Hocking, (1997).**

Tableau 5. Diamètres d'*Aspergillus niger* après 7 jours d'incubation à 25 C° (Nyongesa et Sheila Okoth, 2015).

Milieux	Diamètre de colonie
PDA	40 – 50 mm
MEA	45 - 55 mm
CYA	50 - 60 mm
Cz	50 - 65 mm

L'incubation à 25 °C en milieu de culture CYA est rapportée comme suit :

- l'*Aspergillus niger* produit des colonies étaient de couleur blanche à olivâtre avec un épais tapis de mycélium blanc sous les colonies formant des sillons rayonnants sur la colonie ;
- il y avait une croissance rapide des colonies, produisant des exsudats mais pas de pigments solubles ;
- le revers était brun pâle à jaune (Nyongesa et Sheila Okoth, 2015).

L'incubation à 25 °C en milieu de culture MEA est rapportée comme suit :

- l'*Aspergillus niger* produit des colonies sur MEA, étaient marron datte avec un épais tapis blanc à crème de mycélium floconneux sous les colonies et sur les bords ;
- il formait des sillons radiaux très proches les uns des autres ;
- ils manquaient de pigments solubles et d'exsudats ;
- l'envers était brun (Nyongesa et Sheila Okoth, 2015).

L'incubation à 25 °C Sur Cz est rapportée comme suit :

- les colonies étaient chamois olivâtre et viraient au brun avec l'âge ;
- ils ont produit des conidies noires au centre et des mycéliums blancs vers le bord ;
- les exsudats étaient présents ;
- le revers était grisâtre à paille ;
- les têtes de conidies étaient bisériées et de forme globuleuse avec de larges vésicules sphériques à globuleuses mesurant de 37 à 52 μm ;
- le stipe mesurait 440 - 680 \times 6 - 12 μm avec une couleur lisse et légèrement brune ;
- les conidies variaient en tailles allant de 4 à 6 μm , de texture rugueuse, globuleuses et brunes ;
- fonction de diagnostic ; ils avaient un pied grandes et large (Nyongesa et Sheila Okoth, 2015).

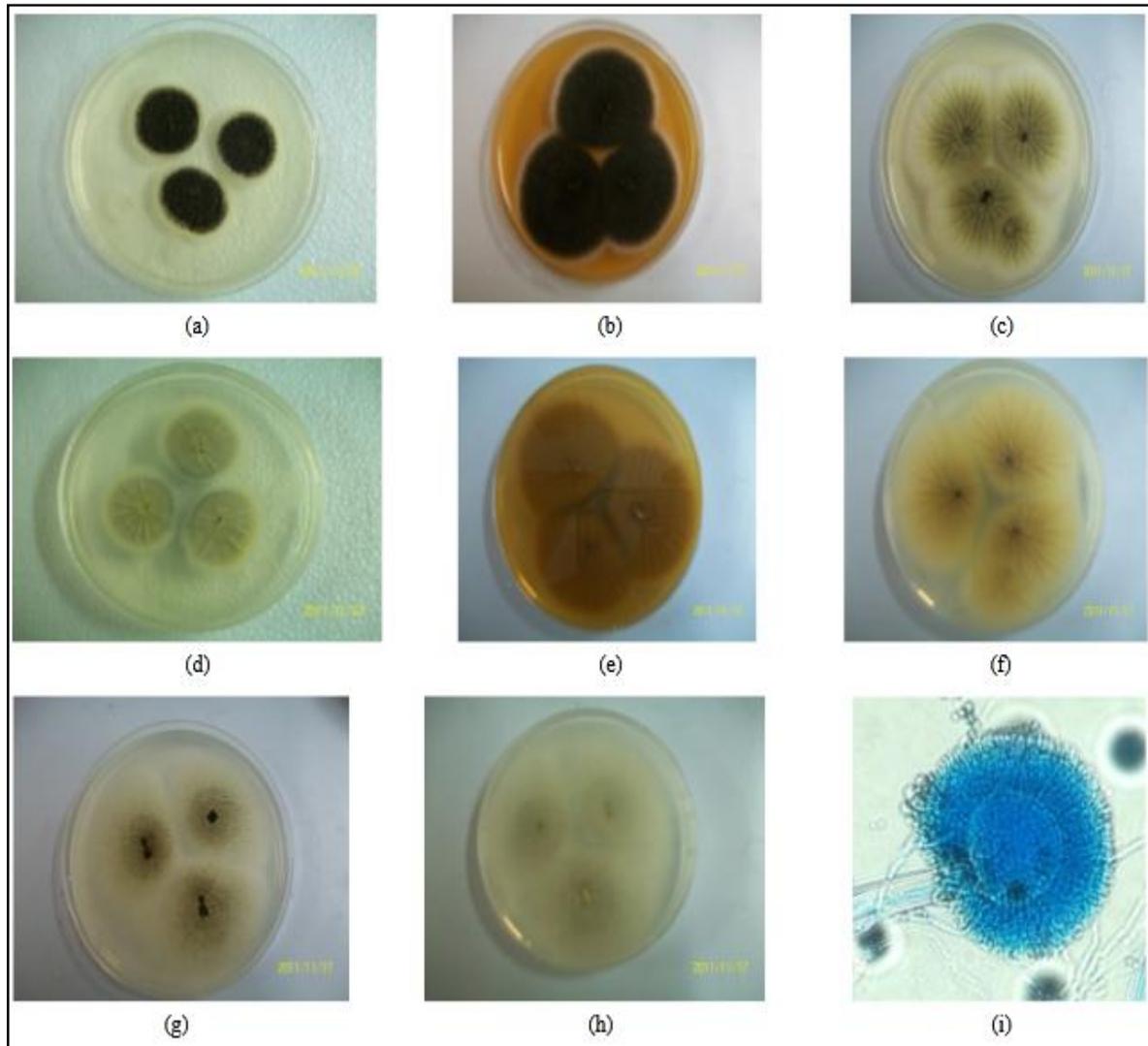


Figure 6. Colonies d'*Aspergillus niger* sur PDA (a - d) ; MEA (b - e) ; CYA (c - f) ; Cz (g - h); (j) Têtes de conidies bisériées et globuleuses et vésicules (Nyongesa et Sheila Okoth, 2015).

L'identification de ces critères macroscopiques et microscopiques de l'isolat a été identifié comme « *Aspergillus niger* groupe » par examen morphologique et maintenant seront identifiés à l'espèce *A.niger* par comparaison de séquence d'ADN (Fazouane *et al.*, 2008).

5.2.2. Identification moléculaire

5.2.2.1. Estimation de la concentration de l'ADN par Nanodrop

- Le rapport d'absorbance à 260/280 nm est de 1,8 pour un échantillon d'ADN pur et une diminution indique une contamination par (en grande partie) des protéines, tandis que la présence d'ARN augmente le rapport (au-dessus de 2,0) ;
- Le rapport A260/A230 doit être supérieur à 1,8 et le rapport A260/A270 doit être compris entre 1,2 et 1,3 dans des préparations d'ADN exemptes de contamination en polysaccharides et polyphénols respectivement (Varma *et al.*, 2007).

5.2.2.2. Visualisation des fragments amplifiés

Un fragment de la région ITS de 1500 pb a été amplifié par PCR. La ci-dessous (Shehada *et al.*, 2021). Le profil électrophorétique (figure 7) montre trois amplicons de bonne qualité et quantité.

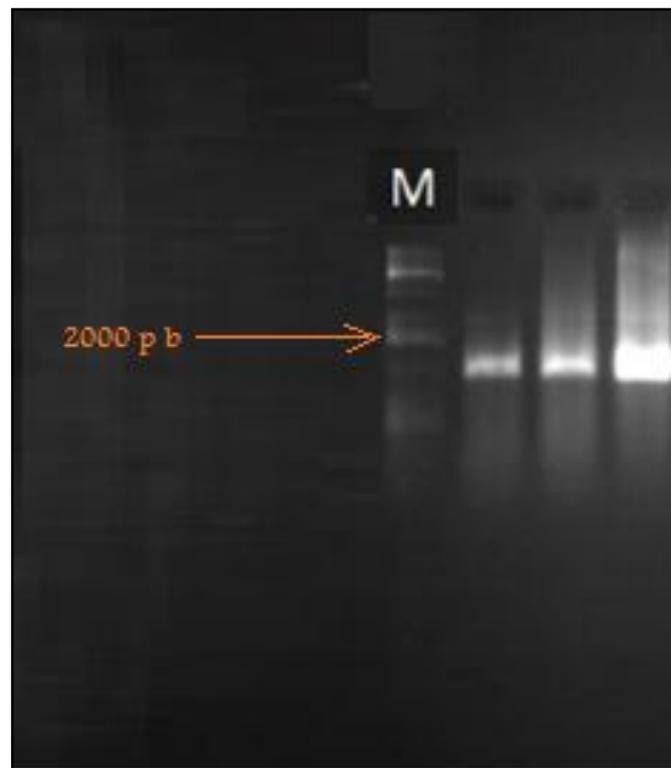


Figure 7. Profil électrophorétique montrant le produit amplifié de fragments ITS (Shehada *et al.*, 2021).

5.2.2.3. Analyse de l'arbre phylogénétique

L'analyse phylogénétique est une étape essentielle pour compléter et valider l'identification phénotypique (Ouiddir, 2019).

Nous avons utilisé 21 séquences d'ITS de l'ADNr téléchargé à partir de la base de données NCBI pour construire l'arbre phylogénétique.

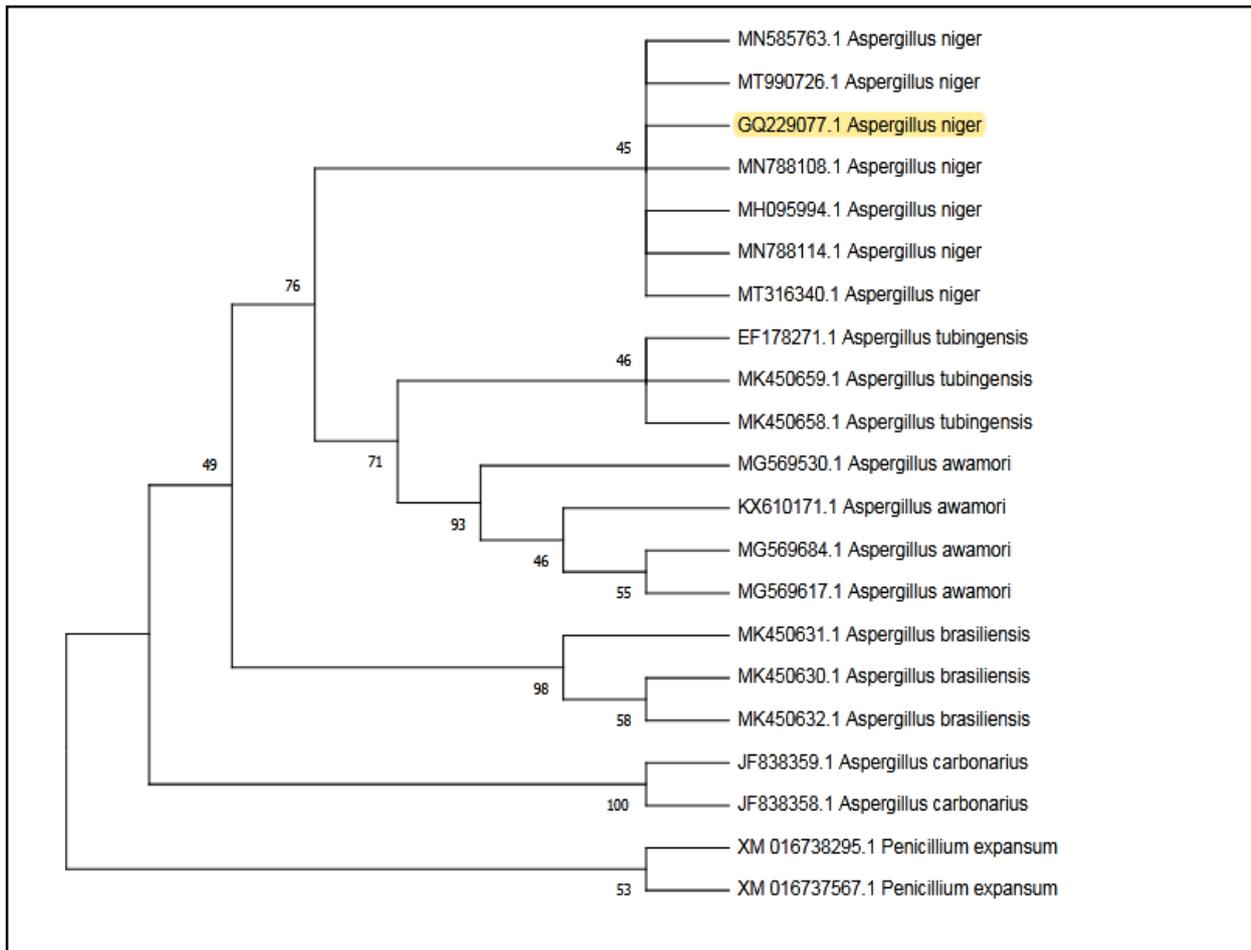


Figure 8. Arbre phylogénétique de la souche fongique montrant les plus proches voisins. La culture a été identifiée sur la base de la région « internal transcribed spacer » de l'ADN génomique. L'histoire de l'évolution a été déduite en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood*).

Le phylogramme montre 6 clades bien séparés ;

- Le clade 1 était une espèce d'*Aspergillus niger* ;
- Le clade 2 était une espèce d'*Aspergillus tubingensis* ;

- Le clade 3 était une espèce d'*Aspergillus awamori* ;
- Le clade 4 était une espèce d'*Aspergillus brasiliensis* ;
- Le clade 5 était une espèce d'*Aspergillus carbonarius*.

L'isolat a été identifié comme *Aspergillus niger* par amplification et analyse de la séquence d'ADN de la région ITS. L'analyse phylogénétique a révélé que les voisins les plus proches sont les souches *Aspergillus niger* avec les numéros d'accèsion MT990726.1 et MN788108.1 (figure 8). L'identité du champignon basée sur les caractéristiques morphologiques était en bon accord avec celle de la caractérisation moléculaire.

5.3. Purification de la protéase aspartique d'*Aspergillus niger*

- L'enzyme protéase aspartique extracellulaire de la fermentation au milieu solide a été éluée avec du NaCl 0,1 N ;
- La protéine a été précipitée en utilisant 60 % de sulfate d'ammonium (La précipitation est une technique simple qui nécessite peu d'énergie et un équipement simple et peu coûteuse) ;
- Le culot a été dissous dans un tampon acétate de 50 mM et pH 5 et résolu sur une colonne de filtration sur gel Biogel P100 suivi d'une Chromatographie d'échange d'ions DEAE-Sepharose ;
- Le profil d'éluion de l'enzyme sur Biogel P100 est montré dans la figure 9a. Les fractions actives éluant entre 25 et 30 ont été regroupées. A ce stade, l'enzyme avait une activité spécifique de 19 743 U/mg avec une pureté 5,35 fois et un rendement de 65 % ;
- La fraction regroupée depuis la colonne Biogel P 100, après résolution sur colonne DEAE-Sepharose a été éluée en utilisant un gradient de concentration en NaCl de 0 à 1 M. L'enzyme protéase active a été éluée dans 0,4 M en NaCl (Figure 9b) . Les étapes de purification, le facteur de pureté, le rendement en pourcentage et l'activité spécifique sont présentés dans le tableau 6. Dans la purification finale, une activité spécifique de 38 362 U/mg avec une pureté de 10,4 fois et un rendement de 56 % a été obtenue (Purushothaman *et al.*, 2019).

La protéase aspartique d'*Aspergillus niger* dans cette étude a donné l'activité spécifique la plus élevée par rapport à celle obtenue par **Siala et al. (2009)**, la protéase acide purifiée d'*Aspergillus niger* II a montré une activité spécifique de 13429 U/mg. L'étude de

Kalpna Devi et al. (2008) a également indiqué une activité spécifique de 165.92 U/mg de la protéase alcaline d'*Aspergillus niger*.

Ce résultat explique le choix de l'espèce *Aspergillus niger* pour la production à grande échelle des enzymes industrielles et principalement les protéases en raison de ses diverses applications dans les détergents, les industries alimentaires et pharmaceutiques...etc. Cette activité protéolytique peut être augmentée en optimisant l'extraction de la protéase par plusieurs paramètres comme: divers paramètres de culture comme le substrat, le pH, la température, temps d'incubation...etc (Benazir et al., 2011).

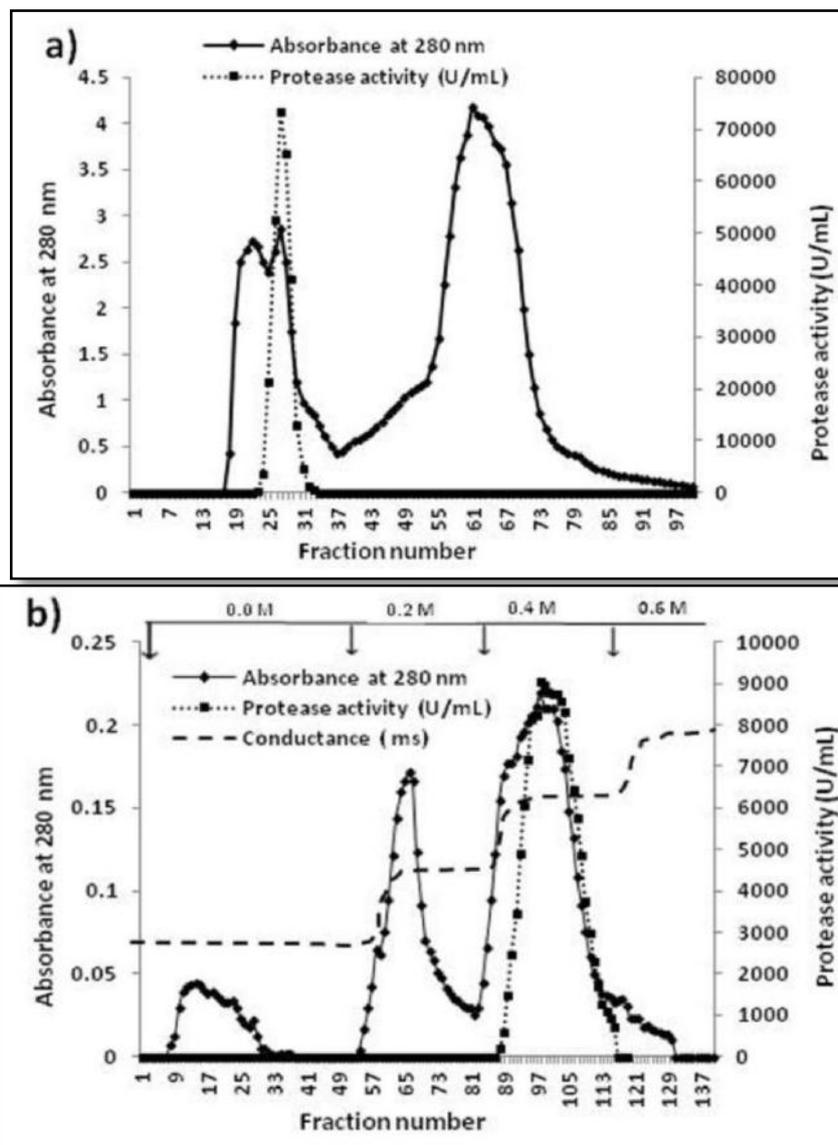


Figure 9. Purification de la protéase aspartique d'*Aspergillus niger*. a) Chromatographie par perméation de gel en utilisant Biogel P100. b) Chromatographie d'échange d'ions en utilisant du DEAE-Sepharose (K. Purushothaman et al., 2019).

Tableau 6. Résumé des étapes de purification de la protéase aspartique d'*Aspergillus niger* (Purushothaman *et al.*, 2019).

Étape de purification	Volume totale (ml)	Activité totale (Unités)	protéines totales (mg)	Activité spécifique (Unités/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	60	8,66,760	235.2	3685	1	100
Précipitation au sulfate d'ammonium	2	7,61,510	94.8	8032	2.17	87
Filtration sur gel (Biogel)	13	5,64,655	28.6	19,743	5.35	65
Échange d'ions (DEAE sépharose)	80	4,91,040	12.8	38,362	10.41	56

5.4. SDS-PAGE

- L'enzyme a été purifiée jusqu'à homogénéité apparente comme en témoigne la bande unique dans la SDS-PAGE (Figure 10);
- Les poids moléculaires de l'enzyme obtenus en mesurant la valeur Rf et en utilisant un logiciel de lecteur de gel étaient de $50,54 \pm 0,75$ kDa et $51,06 \pm 0,37$ kDa, respectivement (Purushothaman *et al.*, 2019).

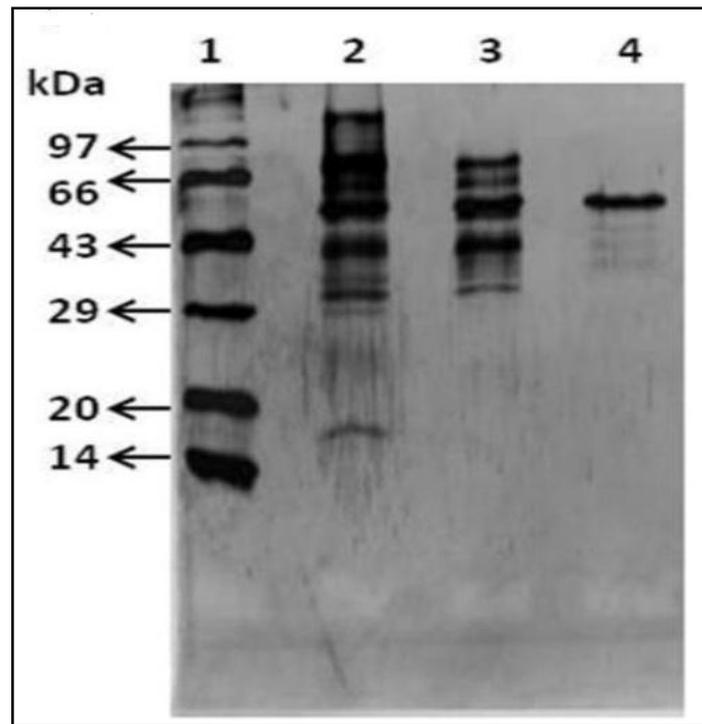


Figure 10. Profil électrophorétique de SDS-PAGE de la protéase purifiée. Un gel de polyacrylamide à 10 % a été utilisé et la révélation a été réalisée par coloration à l'argent. Puits 1 : Marqueur de poids ; Puits 2 : extrait brut ; Puits 3 : fraction de protéase Biogel PA00 ; Puits 4 : fraction de protéase DEAE-Sepharose (K. Purushothaman *et al.*, 2019).

➤ Estimation du poids moléculaire

Une Chromatographie par filtration sur gel a été utilisée pour déterminer le poids moléculaire de la protéase aspartique. En utilisant le graphique avec le log du poids moléculaire tracé en fonction de V_e/V_o , on a estimé que la protéase avait un poids moléculaire de 50 ± 1 kDa (Figure 11) (Purushothaman *et al.*, 2019).

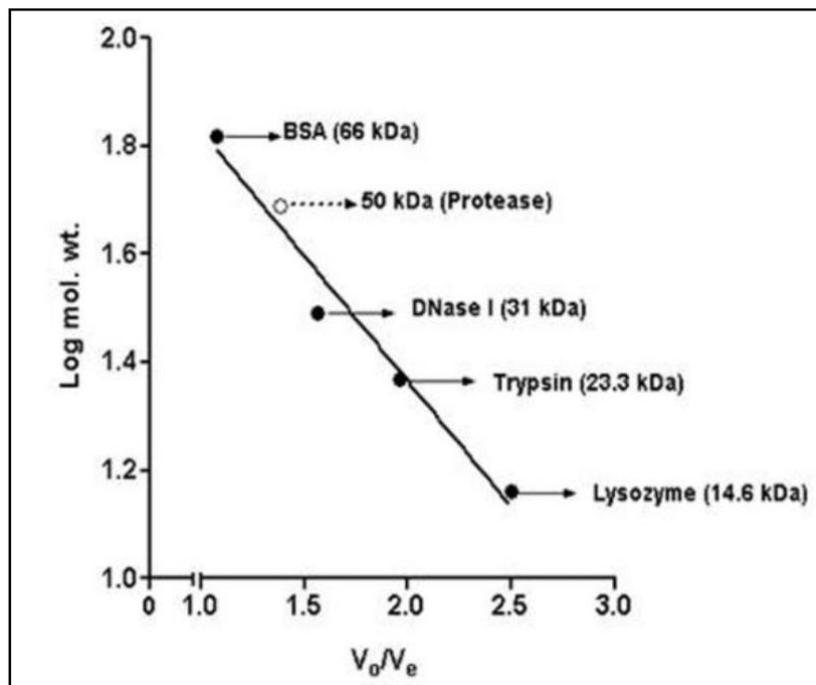


Figure 11. Graphique standard pour l'estimation du poids moléculaire de protéase aspartique. Les marqueurs de poids moléculaire utilisés sont (cercles pleins) l'albumine de sérum bovin (66 kDa), la DNase I (31 kDa), la trypsine (23,3kDa) et le lysozyme (14,6 kDa) ; Le poids moléculaire de la protéase aspartique (cercle vide, ligne pointillée) s'est avéré être d'environ de 50 kDa (K. Purushothaman *et al.*, 2019).

5.5. Caractérisation de la protéase aspartique

5.5.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la protéase aspartique purifiée

Les souches d'*Aspergillus niger* produisent différent type de protéases, selon leur pH optimal on distingue : les protéases acides, neutre et alcalines, mais leurs conditions de production et leurs activités sont très variées.

Dans cette étude **Purushothaman et al. (2019)** ont trouvé que la protéase purifiée d'*Aspergillus niger* est une protéase acide, active entre pH 3 et 4,5 avec une activité optimale à pH 3,5 (Figure 12) ; L'enzyme est stable entre pH 2,7 et pH 6,5 pendant 24 h à 30 °C.

Ces résultats sont presque semblables à ceux obtenus par **Siala et al. (2009)** qui ont montré que la protéase acide d'*A.niger* I est plus active à pH 3 et très stable à pH 3. L'étude de **Li-Jung Yin et al. (2013)** a montré que le pH optimal est de 2,5 avec une stabilité à pH 2-

4 de la protéase acide purifiée d'*Aspergillus niger* BCRC 32720. Un autre résultat de **Ahmed (2018)** a indiqué que le pH optimal est de 7.

Chaque enzyme possède un pH optimum auquel la vitesse de la réaction catalysée est maximale et ses activités ralentissent avec toute diminution ou augmentation appréciable de cette valeur, en raison des modifications de l'ionisation des groupements compris dans le site actif de l'enzyme (Mukhtar & Ul-Haq, 2009).

Les protéases acides sont les groupe de protéases le plus intéressant en ce qui concerne l'utilisation dans l'industrie alimentaire en particulier dans les industries fromagères, permettant les utiliser comme substituts de la chymosine de veau. Ils sont également exploités pour améliorer la texture de la pâte de farine et attendrir le muscle fibrillaire (Razzaq *et al.*, 2019).

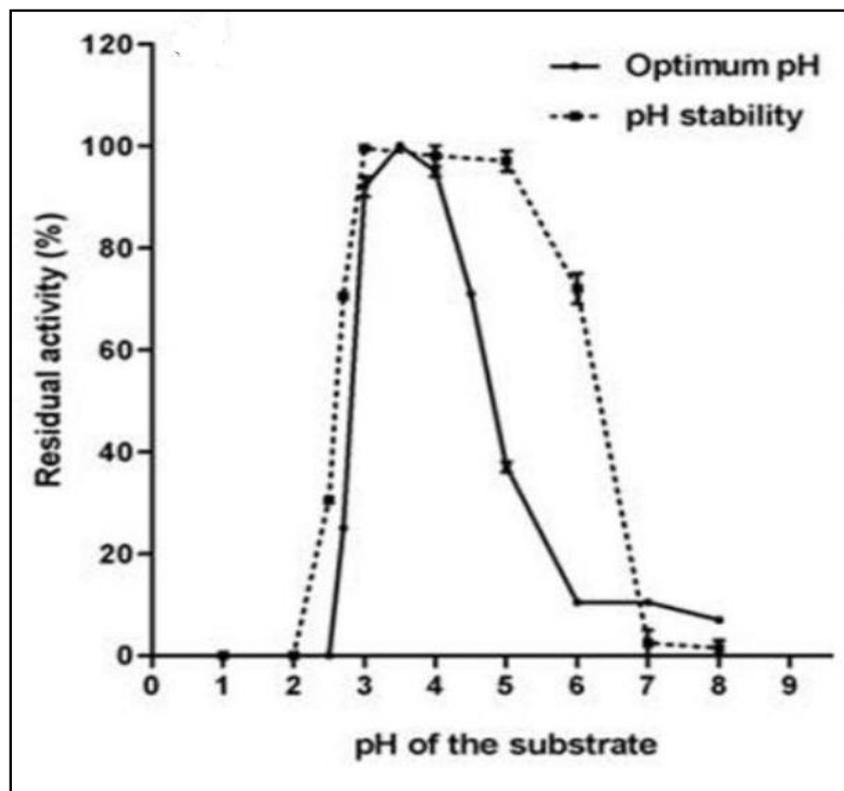


Figure 12. Paramètres cinétiques de la protéase aspartique purifiée : le pH optimal et la stabilité ont été vérifiés de pH 2 à 8 (K. Purushothaman *et al.*, 2019).

5.5.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la protéase aspartique purifiée

La température optimale varie d'un organisme à l'autre, pour cela chaque souche fongique possède une température optimale auquel l'activité de la protéase atteint leur max.

L'étude de **Purushothaman et al. (2019)** a trouvé que la température optimale de la protéase est entre 60 et 65 °C à pH 4,0 et l'enzyme conserve sa stabilité thermique à 60 °C (Figure 13).

Ce résultat est similaire à celui rapporté par **Siala et al. (2009)** d'une protéase d'*A. niger* II avec une stabilité à des températures inférieures à 40 °C. Par contre, ce résultat est supérieur à celui trouvée par **Kalpana Devi et al. (2008)** et **Olajuyigbe et al. (2003)** qui ont trouvé que la température optimale est de 35° C et 50°C respectivement pour la protéase d'*A.niger* avec une stabilité de l'activité enzymatique à une température 40 °C.

La température est un facteur critique pour une activité enzymatique maximale et c'est une condition préalable pour que les enzymes industrielles soient actives et stables à une température plus élevée (Devi *et al.*, 2008). La stabilité à des températures plus élevées a constitué une caractéristique intéressante pour une enzyme pour des applications industrielles (Purushothaman *et al.*, 2019).

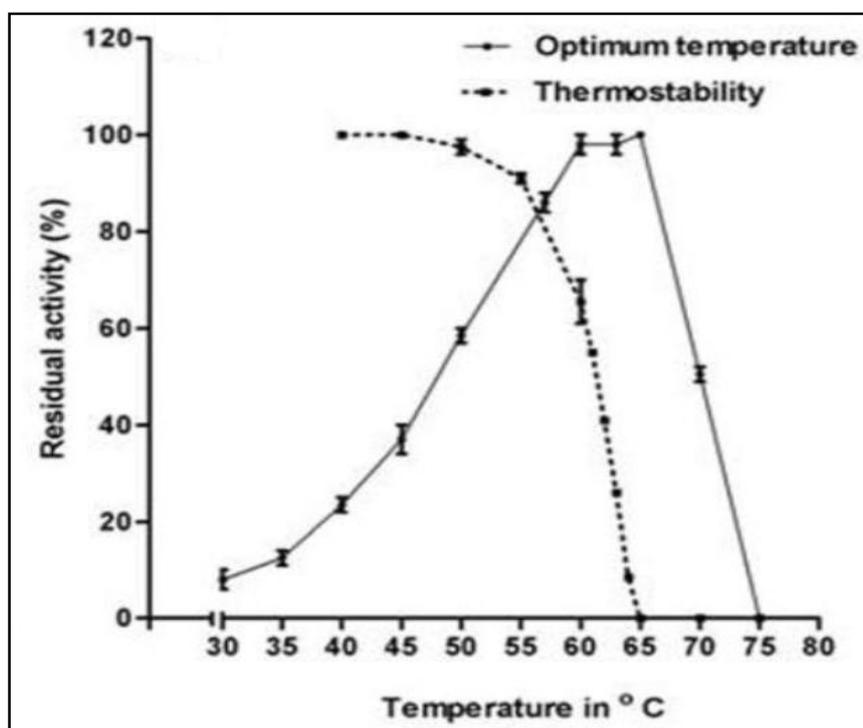


Figure 13. Paramètres cinétiques de la protéase aspartique purifiée : la température optimale et la stabilité (K. Purushothaman *et al.*, 2019).

5.5.3. Détermination de K_m et V_{max}

L'activité enzymatique est influencée à la fois par des propriétés spécifiques à l'enzyme en particulier la concentration de substrat qui possède un effet sur l'activité de la protéase et de la vitesse maximale. Le K_m est une constante caractérisant une réaction enzymatique, correspond à la valeur de la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié, plus le K_m est faible plus l'activité enzymatique maximale est atteinte pour un faible niveau de concentration de substrat, l'affinité de l'enzyme pour le substrat est forte, il s'agit en général d'enzyme sélective et/ou très active.

Dans cette étude la concentration optimale du substrat pour l'activité enzymatique de la protéase aspartique maximale a été déterminée en termes de V_{max} et de K_m à l'aide du graphique de Lineweaver-Burk en utilisant l'hémoglobine.

Purushothaman et al. (2019) ont trouvé que le K_m et V_{max} étaient de 6,3 mg/mL (98,52 M) et 50 $\mu\text{mol}/\text{min}$ respectivement (figure 14). Des valeurs différentes sont signalées par **Kalpna Devi et al. (2008)** avec V_{max} est de 85,0 U/mg de protéine et K_m de 0,8 mg/ml pour la protéase alcaline d'*Aspergillus niger* utilisant la caséine comme substrat.

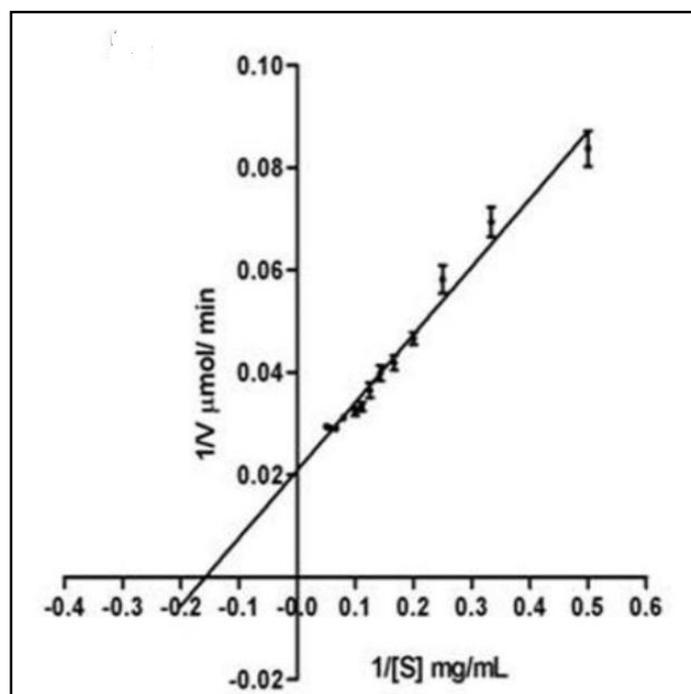


Figure 14. Paramètres cinétiques de la protéase aspartique purifiée : K_m et V_{max} de la protéase aspartique ont été déterminés avec un substrat d'hémoglobine en utilisant le graphique de Lineweaver- Burk (Purushothaman *et al.*, 2019).

Conclusion

Conclusion

Les protéases occupent une position importante parmi les enzymes industrielles en raison de leurs nombreuses applications.

Les buts de ce travail sont (i) la production de protéase aspartique par un champignon filamenteux « *Aspergillus niger* », par fermentation sur milieu solide agroalimentaire (son de blé) (ii) la purification de l'enzyme par précipitation au sulfate d'ammonium à 60%, filtration sur gel Biogel P100 et chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-sepharose (iii) détermination de ses caractéristique physico-chimique, pH optimum, température optimale, K_m et V_m .

L'isolat fongique a été identifié par deux techniques : morphologique par observation macroscopique et étude microscopique, et moléculaire, en construisant un arbre phylogénétique.

La production de protéase par l'*Aspergillus niger* a été réalisée par fermentation sur milieu solide utilisé le son de blé comme substrat qui se caractérise par son faible coût, suivie d'une purification qui comprend trois étapes essentielle : tout d'abord une précipitation au sulfate d'ammonium qui a été effectuée à 60% de saturation, ensuite une filtration sur gel Biogel P100 et enfin chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-sepharose. L'enzyme purifié montre une activité spécifique de 38 362 U/mg avec une pureté de 10,4 fois et un rendement de 56 % a été obtenu. L'activité de la protéase aspartique est élevé avec une bonne thermostabilité, pour cela elle semble être un bon candidat pour la manipulation industrielle.

L'effet de plusieurs paramètres (température, pH, K_m et V_{max}) été étudié afin de connaître les propriétés de cette protéase, les caractéristiques physico-chimique de la protéase aspartique montré que l'enzyme présent un pH acide de 3.5 et température optimale de 60°C, avec stabilité à 50 °C. Dans le même cadre de recherche les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de la protéase aspartique ont été trouvé de 6,3 mg/mL (98,52 M) et 50 $\mu\text{mol}/\text{min}$ respectivement.

La protéase aspartique a un grand potentiel dans des applications telles que la préparation d'hydrolysats de protéines, de peptides bioactifs et la modification des caractéristiques fonctionnelles de protéines comme le soja. Avec une activité catalytique et une thermostabilité élevées. Cette protéase aspartique s'est avérée être un candidat pour la

manipulation génétique pour une application biotechnologique dans les industries alimentaires et fourragères, en raison de son taux de rotation catalytique élevé et de sa thermostabilité

(Purushothaman et al., 2019).

Références Bibliographiques

Les références utilisées pour établir la partie matériel et méthodes, résultats et discussion sont :

1. Anwar, F., Zafar, M., Anwar, Z., & Mehmood, R. T. (2019). Optimization of fermentation and production of antimicrobial agents as secondary metabolites from an indigenous *Aspergillus niger*. Punjab University Journal of Zoology, 165-173.
2. Benlounissi, A. (2012). Isolement de moisissures productrices de protéases. Constantine: Université Mentouri.
3. Bensmail, s., Bouchenak, K., Fazouane, F., & Nouar, H. (2013). Etude de l'aptitude fromagere d'un extrait enzymatique coagulant produit par *Aspergillus niger* ffb1. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn., 98-119.
4. Chabasse, D., Bouchara, J.-P., Gentile, L. d., Brun, S., Cimon, B., & Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Angers cedex: Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU d'Angers.
5. Das, P., Pandey, P., Harishankar, A., Chandy, M., Bhattacharya, S., & Chakrabarti, A. (2017). Standardization of a two-step real-time polymerase chain reaction based method for species-specific detection of medically important *Aspergillus species*. Indian Journal of Medical Microbiology, 381-388.
6. Fazilat, A. (2016). Production, isolation, purification and partial characterization of an extracellular acid protease from *Aspergillus niger*. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, 32-38.
7. Lahouar, A. (2016). Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie : Incidence et profils écophysiologicals. Sousse: Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir.
8. Maitig, A. M., Alhoot, M. A., & Tiwari, K. (2018). Isolation and Screening of Extracellular Protease Enzyme from Fungal Isolates of Soil. J Pure Appl Microbiol, 2059-2067.
9. Mkumbe, B. S., Sajidan, M., Pangastuti, A., (2018). Phylogenetic analysis based on internal transcribed spacer region (ITS1-5.8S-ITS2) of *Aspergillus niger* producing phytase from Indonesia. International Conference on Science and Applied Science.
10. Nyongesa, B. W., & Sheila Okoth, V. A. (2015). Identification key for *Aspergillus species* isolated from maize and soil of nandi county, Kenya. Scientific Research Publishing, 205-229.
11. Purushothaman, K., Bhat, S. K., Singh, S. A., Marathe, G. K., Rao, A. R., (2019). Aspartic protease from *Aspergillus niger*: Molecular characterization and interaction with pepstatin A. International Journal of Biological Macromolecules, 199-212.
12. Sadrati, N. (2021). Isolement, identification et culture des champignons endophytes isolés à partir des plantes médicinales algériennes pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. sétif: Dépôt Institutionnel de l'Université Ferhat ABBAS - Sétif 1 . Consulté le avril 15, 2021, sur <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/handle/123456789/3780>

13. Shehada, W., Uraz, G., Demirel, R., Hamamcı, H., (2021). Proteolytic activity of *Aspergillus niger* strains isolated from soil. *Int.J.Curr.Microbiol.*, 67-75.
14. Silva, D. M., Batista, L. R., Rezende, E. F., Fungaro, M. H., Sartori, D., & Alves, E. (2011). Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Journal brésilien de microbiologie*, 761-773.
15. Tian, D., Jiang, Z., Jiang, L., Su, M., Feng, Z., Zhang, L., . . . Hu, S. (2018). A new insight into lead (II) tolerance of environmental fungi based on a study of *Aspergillus niger* and *Penicillium oxalicum*. *Journal of applied microbiology*, 26.
16. Varma, A., Padh, H., & Shrivastava, N. (2007). Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnology Journa*, 386–392.

Références bibliographiques

1. Abarca, M. L., Accensi, F., Cano, J., & Cabañes, F. J. (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 33–49.
2. Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 253-262.
3. Ahmed, M. E. (2018). Extraction and purification of protease from *Aspergillus niger* isolation. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 6. doi:10.15406/ppij.2018.06.00162 .
4. Aintizar Jabir Kazar, M. K. (2021). Une étude moléculaire sur les *Staphylococcus aureus* souches de SARM (HA-MRSA) isolées de patients hospitalisés présentant des lésions cutanées en Iraq: séquençage de l'ARN 16S et détection par *mecA* et *tst-1*". *Annales du RSCB*, 1329-1347 .
5. Alagarsamy, S., Sandhya, C., Sandhya, C., & Soccol, C. (2005). Production and Partial Purification of a Neutral Metalloprotease by Fungal Mixed Substrate Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 313–319.
6. Alavi, F., & Shima, M. (2020). Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in. *International Dairy Journal*, 11.
7. Al-Zahrani, H. A. (2018). Optimization conditions of alkaline protease production by *Streptomyces* sp.H1 isolated from red sea coastal region in submerged culture. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 48-54.
8. Anwar, F., Zafar, M., Anwar, Z., & Mehmood, R. T. (2019). Optimization of fermentation and production of antimicrobial agents as secondary metabolites from an indigenous *Aspergillus niger*. *Punjab University Journal of Zoology*, 165-173.
9. Arora S. (2018). Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. *Journal of Biotechnology* 269, 16-34.

10. Assamoi, A., Destain, J., & Thonart, P. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement/Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 281-294.
11. Azzouz, Z., Bettache, A., Boucherba, N., Prieto, A., Martinez, M. J., Benallaoua, S., & Eugenio, L. I. (2021). Optimization of β -1,4-endoxylanase production by an *Aspergillus niger* strain growing on wheat straw and application in xylooligosaccharides production. *Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC)*.
12. Banerjee, G., & Ray, A. k. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*.
13. Benazir, J. F., Ramasamy, S., Hari, A., & V, R. K. (2011). Bio utilization of agroindustrial waste in solid state fermentation by *Aspergillus niger* for the production of protease. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, 422-435.
14. Benlounissi, A. (2012). Isolement de moisissures productrices de protéases. Constantine: Université Mentouri.
15. Bensmail, s., Bouchenak, K., Fazouane, F., & Nouar, H. (2013). Etude de l'aptitude fromagere d'un extrait enzymatique coagulant produit par *Aspergillus niger* FFB1. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 98-119.
16. C.M.Visagie, J.Houbraken, J.C.Frisvad, S.-B.Hong, C.H.W.Klaassen, G.Perrone, . . . R.A.Samson. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 343-371.
17. Cao, W., Wang, G., Lu, H., Ouyang, L., Chu, J., Sui, Y., & Zhuang, Y. (2020). Improving cytosolic aspartate biosynthesis increases glucoamylase production in *Aspergillus niger* under oxygen limitation. *Microbial Cell Factories*.
18. Chabasse, D., Bouchara, J.-P., Gentile, L. d., Brun, S., Cimon, B., & Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Angers cedex: Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU d'Angers.
19. Chimbekujwo, K. I., InuwaJa'afaru, M., & MosesAdeyemo, O. (2020). Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Scientific African*.
20. Daiani M. Silva., Luís R Batista., Elisângela F Rezende., Maria Helena P Fungaro., Daniele Sartori., Eduardo Alves 2. (2011). Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Braz J Microbiol*, 761-773.
21. Das, P., Pandey, P., Harishankar, A., Chandy, M., Bhattacharya, S., & Chakrabarti, A. (2017). Standardization of a two-step real-time polymerase chain reaction based method for species-specific detection of medically important *Aspergillus* species. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 381-388.
22. Devi, M. K., Gnanaprabhal, G., Banu, A. R., & B.V., P. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*, 6.

23. Díaz, G. V., Coniglio, R. O., Chungara, C. I., Zapata, P. D., Villalba, L. L., & Fonseca, M. I. (2020). *Aspergillus niger* LBM 134 isolated from rotten wood and its potential cellulolytic ability. *An International Journal on Fungal Biology*.
24. Díaz, López, M., Moyano-López, F. J., Alarcón, López, F. J., García-Carreño, F. L., & Toro, M. A. (1998). Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 369-77.
25. Diba, K., Kordbacheh, SH, M., Rezaie, S., & Mahmoudi, M. (2007). Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. *Pakistan journal of medical sciences*, 867-872.
26. Dong, Z., Yang, S., & Lee, B. H. (2021). Bioinformatic mapping of a more precise *Aspergillus niger* degradome. *scientific reports*.
27. F.M.Olajuyigbe, J.O.Ajele, & Olawoye, T. (2003). some physiocochemical properties of acid protease produced during growth of *Aspergillus niger* (NNRL 1785). *global journal of pure and applied sciences* , 523-528.
28. Fazilat, A. (2016). Production, isolation, purification and partial characterization of an extracellular acid protease from *Aspergillus niger*. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 32-38.
29. fazouane, naimi, f., r, a., m, p., & s, t. (2008). Obtention et caractérisation d'une enzyme coagulant le lait d'*Aspergillus niger* isolée du sol de la région de boumerdes et identification de la souche par séquençage. *applied biology and biotechnology*, 1(1).
30. Germec, M., & Turhan, I. (2020). Enhanced production of *Aspergillus niger* inulinase from sugar beet molasses and its kinetic modeling. *Biotechnol Lett* .
31. Ghalyorcid, M., Ezzat, S., & Othman, A. M. (2021). Optimization of culture conditions for production of phytase by *Aspergillus niger*. *Covers a wide range of new and emerging technologies*. doi:10.21608/bfszu.2021.41293.1038
32. Goutam, B., & Kumar, R. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*.
33. Halim, M. H., & Saadon, A. S. (2020). Inhibition growth of *Aspergillus niger* that isolated from some fodder grains by using the pleurotus ostreatus and calcium citrate. *Al-Qadisiyah Journal of Pure Science*, 81–92.
34. Hira, S., Mukhtar, H., & Nawaz, A. (2016). Industrial applications and production sources of serine alkaline proteases: a review. *Journal of Bacteriology & Mycology*, 191-194.
35. Ilgın, M., Germec, M., & Turhan, I. (2020). Inulinase production and mathematical modeling from carob extract by using *Aspergillus niger*. *Biotechnology progress*, 36.
36. Jean, P. (1993). *Enzymes*. Paris: presses universitaires de grenoble.
37. Jens C. Frisvad., Thomas O. Larsen., Ulf Thrane., Martin Meijer., Janos Varga., Robert A. Samson., Kristian F. Nielsen., 2. (2011). Fumonisin and Ochratoxin Production in Industrial *Aspergillus niger* Strains. *PLoS ON*.

38. Jisha, V. N., Smitha, R. B., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, K. N., Sajith, S., . . . Benjamin, S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*, 39-51.
39. Kambire, O., yao, K. M., coulibly, A., boli, Z. B., koffi-nevry, R., kambire, O., . . . koffi-nevry, R. (2021). Mycoflore de trois types de "Soumbara" issus des graines de *Parkia biglobosavendus* dans les marchés de Korhogo, Côte d'Ivoire. *Afrique science*, 149-157.
40. Klich, M. A. (2002). Identification of common *Aspergillus species*. Netherlands: Centraal bureau voor Schimmel cultures.
41. Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems—An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-30.
42. Kumar, D., Savitri, Thakur, N., Verma, R., & Bhalla, T. C. (2008). Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Research Journal of Microbiology*, 661-672.
43. Lahouar, A. (2016). Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie :Incidence et profils écophysiologiques. Sousse: Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir.
44. Lanka, S., Anjali, C., & pydipalli, M. (2017). Enhanced production of alkaline protease by *Aspergillus niger* DEF 1 isolated from dairy form effluent and determination of its fibrinolytic ability. *African Journal of Microbiology Research*, 440-449.
45. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., & A L Farr, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 265-275.
46. Ma, Y., Ling, T.-j., Su, X.-q., Jiang, B., Nian, B., Chen, L.-j., . . . Zhao, M. (2021). Integrated proteomics and metabolomics analysis of tea leaves fermented by *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamaris* and *Aspergillus fumigatus*. *Food Chemistry*, 334.
47. Maitig, A. M., Alhoot, M. A., & Tiwari, K. (2018). Isolation and Screening of Extracellular Protease Enzyme from Fungal Isolates of Soil. *J Pure Appl Microbiol*, 2059-2067.
48. Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., & Banerjee, U. (2005). Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malalaysian Journal of Microbiology*, 1-9.
49. Matotou, H. R., Sangare, I., Bisseye, C., Akotet, M. K., & Bamba, S. (2021). Biodiversité de la flore fongique isolée au service de réanimation du Centre Hospitalo-Universitaire Souro Sanou de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *panafrican medical journal*.
50. Mkumbe, B. S., Sajidan, M., & Pangastuti, A. (2018). Phylogenetic analysis based on internal transcribed spacer region (ITS1-5.8S-ITS2) of *Aspergillus niger* producing phytase from Indonesia. *International Conference on Science and Applied Science*.

51. Morin, O. (2003). *Aspergillus* et *aspergillose* : biologie. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, 8-600-A-10:1-7.
52. Moussavou, I. N. (2021). Les champignons endophytes et ceux associés aux caries des arbres et du bois mort de *Julbernardia bifoliolata*, *Desbordesia glaucescens* et *Scyphocephalum ochocoa* dans les forêts du Sud-est du Gabon. canada: Université Laval.
53. Mukhtar, H., & Ul-Haq. (2009). Production of Acid Protease by *Aspergillus niger* Using Solid State Fermentation. *Pakistan J. Zool.*, vol. 41, 253-260.
54. Narasimha, G., Sridevi, A., Buddolla, V., Subhosh, C. M., & Rajasekhar, R. B. (2006). Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*.
55. Nawab, A., Ullah, N., Qasim, M., Rahman, H., Khan, S. N., Sadiq, A., & Adnan, M. (2016, april). Molecular characterization and growth optimization. *Springer Japan*, 8.
56. Nigam, P. S., & Pandey, A. (2009). Solid-State Fermentation Technology for Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*.
57. Nsude, C. A., Ujah, I. I., Ezugwu, A. L., Eze, C. W., Mbah, B. L., Nsude, C. A., . . . Mbah, B. L. (2021). African Star Apple (*Chrysophyllum albidum*) Pectin: A Potential Substrate for Enhanced Pectinase Production by *Aspergillus niger*. *Ec pharmacology and toxicology*. doi:10.13140/RG.2.2.23221.19682
58. Nygren, C. M., Edqvist, J., Elfstrand, M., Heller, G., & Taylor, A. F. (2007). Detection of extracellular protease activity in differentspecies and genera of ectomycorrhizal fungi. *Springer-Verlag*, 241–248.
59. Nyongesa, B. W., & Sheila Okoth, V. A. (2015). Identification Key for *Aspergillus Species* Isolated from Maize and Soil of Nandi County, Kenya. *Scientific Research Publishing*, 205-229.
60. O.P.Ward, W.M.Qin, J.Dhanjoon, & A.Singh, J. (2006). Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances IN Applied Microbiology*, 58, 5(8), 571–583. doi:10.1016/S0065-2164(05)58001-8
61. Ooi, C. K., Rasit, N., & Abdullah, W. R. (2021). Optimization of Protease from *Aspergillus niger* under Solid-State Fermentation Utilizing Shrimp Shell Substrate. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 14809 -14824.
62. Ouiddir, M. A. (2019). Etude del'activité antifongique des bactéries lactiques etdela biopréservation des aliments. Oran: Université Oran.
63. Papadaki, E., N.Kontogiannopoulos, K., N.Assimopoulou, A., & Th.Mantzouridou, F. (2020). Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. *Bioresource Technology*, 309.
64. Pasqualotto, A. C. (2010). *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. New York: Ed Springer Science & Business Media.

65. Penninckx, M., Kebbouche-Gana, S., & A., N. (2008). Obtention et Caractérisation d'une Enzyme Coagulant le Lait d'*Aspergillus Niger* Isolée du Sol de la Région de Boumerdes et Identification de la Souche par Séquençage. *applied biology and biotechnology*.
66. Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*. Cambridge: Chapman & Hall.
67. Prévot, F. (2015). Valorisation de déchets végétaux pour la bioproduction de poly(acide lactique). France: université de Strasbourg.
68. Purushothaman, K., Bhat, S. K., Singh, S. A., Marathe, G. K., Rao, A. R., Purushothaman, K., . . . Rao, A. R. (2019). Aspartic protease from *Aspergillus niger*: Molecular characterization and interaction with pepstatin A. *International Journal of Biological Macromolecules*, 199-212.
69. Rani, K., Datt, S., & Rana, R. (2012, january). Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Sciences -*, 12– 18.
70. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998, septembre). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 597-635.
71. Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). *Microbial Proteases Applications*. *Front. Bioeng. Biotechnol*.
72. Robert, A. S., & Pitt, J. (1989). *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*. Baarn and Amsterdam: NATO ASI Series. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3579-3_1
73. Rocha, L. M., Campanhol, B. S., Bastos, R. G., Rocha, L. M., Campanhol, B. S., & Bastos, R. G. (2021). Solid-state cultivation of *Aspergillus niger* *Trichoderma reesei* from sugarcane bagasse with vinasse in bench packed-bed column bioreactor. *applied biochemistry and biotechnology*, 12.
74. Rosales, E., Pazos, M., & Sanromán, M. Á. (2018). *Solid-State Fermentation for Food Applications*. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*.
75. S.Radha, R. B., Sridevi, A., Prasad, N. B., & Narasimha, G. (2012). Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for improved production of acid protease in submerged and solid state fermentation. *European Journal of Experimental Biology*, 1517-1528.
76. Sadrati, N. (2021). Isolement, identification et culture des champignons endophytes isolés à partir des plantes médicinales algériennes pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. sétif: Dépôt Institutionnel de l'Université Ferhat ABBAS - Sétif 1 . Consulté le avril 15, 2021, sur <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/handle/123456789/3780>
77. Salvatierra, H. N., Regner, E. L., Baigorí, M. D., & Pera, L. M. (2021). Orchestration an extracellular lipase production from *Aspergillus niger* MYA 135: biomass morphology and fungal physiology. *Open Access*.

78. Sambrook, J. e. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. USA: Cold Spring Harbor, NY.
79. Samson, R. A., Houbraeken, J. A., Kuijpers, A. F., Frank, J. M., & Frisvad, J. C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in mycology*, 45–61.
80. Sethi, B. K., Jana, A., K.Nanda, P., Mohapatra, P. K., & L.Sahoo, S. (2016, novembre). Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels. *Journal of Taibah University for Science*, 13.
81. Sharma, K. M., Kumar, R., Panwar, S., & Kumar, A. (2017). Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 115–126.
82. Shehada, W., Uraz, G., Demirel, R., Hamamcı, H., (2021). Proteolytic Activity of *Aspergillus niger* Strains Isolated from Soil. *Int.J.Curr.Microbiol.*, 67-75.
83. Shishtawy, H., & A.Ageez. (2021). isolation and identification of a cellulolytic fungus from animal manure. *international journal devoted to geneticaland cytological sciences*.
84. Siala, R., Sellami-Kamoun, A., Hajji, M., Abid, I., Gharsallah, N., & Nasri, M. (2009). Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* II: purification and characterization. *African Journal of Biotechnology*, 4582-4589.
85. Silva, D. M., Batista, L. R., Rezende, E. F., Fungaro, M. H., Sartori, D., & Alves, E. (2011). Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Journal brésilien de microbiologie*, 761-773.
86. Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., & Mehta, P. K. (2016). Microbial Proteases in Commercial Applications. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological*, 365-374.
87. Souza, P. M., Bittencourt, M. L., Caprara, C. C., Freitas, M. d., Almeida, R. P., Silveira, D., . . . Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 337-346.
88. Srilakshmi, J., Madhavi, J., S, L., & K, A. (2014). Commercial Potential of Fungal Protease: Past, Present and Future. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 218-234.
89. Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 81, 146-161.
90. Tian, D., Jiang, Z., Jiang, L., Su, M., Feng, Z., Zhang, L., . . . Hu, S. (2018). A new insight into lead (II) tolerance of environmental fungi based on a study of *Aspergillus niger* and *Penicillium oxalicum*. *Journal of applied microbiology*, 26.
91. Tsang, C.-C., Y.M.Tang, J., K.P.Lau, S., & C.Y.Woo, P. (2018). Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. *Computational and Structural Biotechnology*, 197-210.

92. Tuyen, D. T., Cuong, N. T., Thanh, N. S., Thao, N. T., Hoang, L. T., Trang, N. T., . . . Anh, D. T. (2021). Cloning, expression, and characterization of xylanase G2 from *Aspergillus oryzae* VTCC-F187 in *Aspergillus niger* VTCC-F017. *BioMed Research International*.
93. Varma, A., Padh, H., & Shrivastava, N. (2007). Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnology Journa*, 386–392.
94. Wadman, M. W., Vries, R. P., Kalkhove, S. I., Veldink, G. A., & Vliegenthart, J. F. (2009). Characterization of oxylipins and dioxygenase genes in the asexual fungus *Aspergillus niger*. *BMC Microbiology*. doi:10.1186/1471-2180-9-59
95. Wahab, W. A., & Ahmed, S. A. (2018). Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger* WA 2017. *International Journal of Biological Macromolecules*, 447-458.
96. Wucherpennig, T., Hestler, T., & Krull, R. (2011). Morphology engineering - Osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity. *Microbial Cell Factories*(58).
97. Yin, L.-J., Hsu, T.-H., & Jiang, S.-T. (2013). Characterization of Acidic Protease from *Aspergillus niger* BCRC 32720. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 662–666.
98. Zerroug, A. (2021). Champignons endophytes des plantes médicinales de la région de Sétif :Isolement, Identification et activités biologiques. sétif: Université Ferhat Abbas Sétif1Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Sites Web :

1. Magniez. (2009, Février 24). biotechnologie. Récupéré sur the biotechnological site for the future: <http://www.technobio.fr/page/5>

Annexe

Annexe 1 « REACTIFS »

Annexe 1-a. tableau de la composition de BD Sabouraud Glucose Agar
(Benlounissi, 2012).

Bactonéopeptone	5,0 g
Glucose (dextrose)	40,0 g
Gélose	15,0 g
1 Litre d'eau distillé	

Annexe 2« MILIEUX »

- **Annexe 2-a.** Tableau de la composition de milieu CYA - CzapeckYeast Gélose (Diba *et al.*, 2007).

K ₂ HPO ₄	1,0 g
concentré de Czapek	10,0 ml
Extrait de levure	5,0 g
Agar	15,0 g
Eau distillée :1 litre	
Concentré de Czapek	
NaNO ₃	30,0 g
KCl	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O,	5.0g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,05 g
Eau distillée : 100 ml	

- **Annexe 2-b.** Tableau de la composition de milieu MEA -Malt Extract Agar (Diba *et al.*, 2007)

Pepton	1,0 g
Glucose	30,0 g

Agar	20,0 g
Eau distillée : 1 litre	

- **Annexes 2-c.** Tableau de la composition de milieu czapekdox agar (Cz) (Diba *et al.*, 2007).

Czapek concentration	10.0ml,
K ₂ HPO ₄	1.0gr
Saccharose	30.0gr
Gélose	17.5gr
eau distillée :1.0 lit	

- **Annexe 2-d.** Tableau de la composition de milieu oligo-éléments(K. Purushothaman *et al.*, 2019).

oligo-éléments	
CuSO ₄	70 mg
ZnSO ₄	70 mg
FeSO ₄	70 mg
100 ml de 0,2 NHCl	

Résumé

ملخص

يعتبر البروتياز حالياً أحد الانزيمات الصناعية الأكثر استخداماً ويحتل المركز الأول في السوق العالمية. تحقيقاً لهذه الغاية، سلالة الرشاشيات السوداء التي تم تعريفها بنويها وجزئياً، زرعت على بقايا الاغذية الزراعية (نخالة القمح الغير مكلفة) عن طريق التخمير في وسط صلب من اجل انتاج البروتياز. بعد انتاج البروتياز خارج الخلية، تم استخدام تقنية الاستشراب التقليدي لتنقيته. الانزيم المنقى الذي تم الحصول عليه بوزن جزيئي 50 ± 0.5 كيلو دالتون. وكانت درجة الحموضة ودرجة الحرارة المثلى لهذا الانزيم المنقى 3.5 و 60 درجة على التوالي، اما فيما يخص استقرار بروتياز الاسبارتيك فقد كان لمدة 60 دقيقة عند 50 درجة مئوية والنشاط الخاص بالإنزيم المنقى بلغ 38362 وحدة في المليغرام.

الكلمات المفتاحية: الرشاشيات السوداء، بروتياز الاسبارتيك، التخمير في وسط صلب، تنقية، نشاط خاص.

Résumé

Les protéases sont actuellement l'une des enzymes industrielles les plus utilisées et occupe la première place sur le marché mondial. Dans cet objectif une souche *Aspergillus niger*, identifiée par étude morphologique et moléculaire, a été cultivée sur un résidu agroalimentaire (son de blé peu couteux) par fermentation sur un milieu solide afin de produire des protéases. Après la production de la protéase aspartique extracellulaire, des techniques chromatographiques conventionnelles ont été appliquées pour purifier cette enzyme. L'enzyme obtenue a un poids moléculaire de $50 \pm 0,5$ kDa. Le pH et la température optimaux de la protéase purifiée sont respectivement de 3,5 et 60 °C. L'enzyme est stable pendant 60 min à 50 °C. L'enzyme purifiée avait une activité spécifique de 38 362 U/mg.

Mots clés : *Aspergillus niger*, protéase aspartique, SSF, purification, activité spécifique.

Abstract

Protease is currently one of the most widely used industrial enzymes and occupies the first place in the world market. For this purpose, an *Aspergillus niger* strain, identified by morphological and molecular study, was cultivated on an agro-food residue (inexpensive wheat bran) by solid-state fermentation medium in order to produce proteases. After the production of the extracellular aspartic protease, conventional chromatographic techniques were employed to purify this enzyme. The enzyme obtained has a molecular weight of 50 ± 0.5 kDa. The optimum pH and temperature for the purified aspartic protease was found to be 3.5 and 60 °C respectively. The enzyme was stable for 60 min at 50 °C. The purified enzyme had a specific activity of 38,362 U / mg.

Key words: *Aspergillus niger*, aspartic protease, SSF, purification, specific activity.