

*N° d'ordre : 155/TS/2012*

*N° de série : 04/MIC/2012*

## **THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES**

*Option : Biochimie et Microbiologie appliquées*

***Isolement de moisissures productrices de protéases  
coagulantes. Production et purification des enzymes et  
étude de leur effet sur la coagulation de lait***

***BENLOUNISSI Aïcha***

### **Composition du jury de soutenance**

- Présidente :** *Mme MERAIHI Zahia Prof Université Mentouri, Constantine1.*
- Directrice de Thèse :** *Mme MECHAKRA-MAZA Aïcha Prof Université Mentouri, Constantine1.*
- Co-Directeur de Thèse :** *M. MARQUETTE A. Christophe, Dr Université Claude Bernard, Lyon1, France.*
- Examineurs :** *Mme FAZOUANE-NAIMI Fathia, Prof Université M'Hamed Bougara, Boumerdès.*  
*Mme DJEGHRI Baïda, Prof ENSSMAL, Alger*  
*M. KARAM Nouredine, Prof Université d'Oran.*

*À la mémoire de Papa et grand-mère « Mama » ;*



## Dédicace

*Ce travail est dédié à :*

*Ma mère Akila, qui n'a jamais manqué à son devoir de mère et d'amie, qui m'a soutenue et me soutient toujours ;*

*« Que serais-je sans toi ? »*

*Mon bout de chou Mouni*

*Mon frère Hassane, qui a supporté longtemps ma mauvaise humeur,*

*Mon grand petit frère Mohamed Tahar*

*Mes belles-sœurs Houda et Cindy*

*Mes neveux et nièces Yanis, bébé, Warda et Yasmine*

*Ma tante Hlima, Ami Brahim, Sofiane et Radja, Seddik, Mostefa*

*Et toute ma famille.*

## *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à adresser toute ma gratitude au professeur Mechakra-Maza Aïcha, ma directrice de thèse pour sa disponibilité pendant la thèse mais aussi pendant toutes les années d'études et sa participation active lors de la rédaction du manuscrit.*

*Je remercie mon co-directeur de thèse, Docteur Christophe A. Marquette qui a accepté ma demande de stage au sein du laboratoire de Génie Enzymatique, Membrane Biomimétique et Assemblages Supramoléculaires, Université Claude Bernard, Lyon1, France. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour sa disponibilité, ses conseils et sa participation active lors de la rédaction des articles à publier.*

*J'exprime également mes remerciements et toute ma reconnaissance au professeur Loïc J. Blum directeur du laboratoire de génie enzymatique pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je le remercie pour sa confiance et sa gentillesse.*

*Je tiens à remercier très sincèrement les membres du jury, en premier lieu, le Professeur Meraihi Zahia qui me fait l'honneur de présider ce jury et Les professeurs Fazouane Fathia, Karam Noureddine et Djaghri Baida, examinateurs de cette thèse, qui me font l'honneur de juger ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent au Docteur Sébastien Vacher, Directeur de CONIDIA qui a porté un intérêt tout particulier à mon travail et a identifié les souches utilisées dans cette étude.*

*Je remercie très sincèrement Mme Monique Perruset (Vaugneray, France) qui nous a fourni tout le lactosérum utilisé dans cette thèse.*

*Je tiens à remercier toute l'équipe GEMBAS et toutes les personnes avec qui j'ai partagé de très bons moments et qui ont rendu plus agréable mon séjour au sein du laboratoire, en particulier Agnès Degiuli et Béatrice Leca-Bouvier.*

*Un grand merci à Frédérique Depierre pour son aide.*

*Je remercie énormément Agnès Girard-Egrot et Bastien Doumèche pour leur sympathie et leur présence au laboratoire à des heures tardives pour que je puisse finir mes manipulations.*

*Un grand merci à Mourad Bekouche pour son aide précieuse et ses conseils, à Sofiène, Mohssine, Aurélie, Françoise, Cyrielle, Chloé, Gaëlle, Céline, Anne, et Benjamin pour leur sympathie.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement Fatima pour les merveilleux moments qu'on a passé ensemble en particulier « les pauses café ».*

*Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe ODMB, en particulier le professeur Olivier Marcillat pour son aide et sa disponibilité, le professeur Karim Abousalham pour sa sympathie et le Docteur Alexandre Noiriel pour son aide.*

*Merci à Mme Mouasse Nardjess de CirtaLab pour son aide.*

*Le plus grand merci s'adresse à tous mes enseignants de l'université Mentouri, qui m'ont formée et beaucoup appris, en particulier ceux qui m'ont facilité le travail au sein des laboratoires du Biopôle de Chaâbet Errassas en m'autorisant à y accéder pendant les vacances et jours fériés.*

*Que tous ceux que je viens de citer soient assurés de ma profonde reconnaissance.*

## Abréviations utilisées

*A. awamori* : *Aspergillus awamori*

*A. flavus* : *Aspergillus flavus*

*A. niger* : *Aspergillus niger*

*A. tamarii* : *Aspergillus tamarii*

*A. tubingensis* : *Aspergillus tubingensis*

Act. Enz. : Activité enzymatique

Act. Coag. : Activité coagulante

Biom. : Biomasse

EDTA : Acide Éthylène Diamine Tétracétique

EPNP : 1,2-Epoxy-3-(4-Nitrophenoxy)Propane

F. Coag.: Force coagulante

MEAc : Malt Extract Agar avec chloramphénicol

*P. pinophilum*: *Penicillium pinophilum*

PDA: Potatoes Dextrose Agar

rpm: rotations par minute

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate

Taux prot.: Taux de protéines

T.C.L.C: Temps de Coagulation du Lait de Chèvre

T.C.L.V: Temps de Coagulation du Lait de Vache

T.C.L.V.F : Temps de Coagulation du Lait de Vache Frais

U : Unité

UHT : Ultra Haute Température

U.P : Unité Présure

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b>	Structure d'un mycélium .....	5
<b>Figure 2:</b>	Fructification asexuée du genre <i>Aspergillus</i> .....	8
<b>Figure 3:</b>	Vue de l'appareil de reproduction asexuée d' <i>A. niger</i> (partiellement lyophilisé) sous microscope à balayage électronique.....	9
<b>Figure 4:</b>	Vue de l'appareil de reproduction asexuée de <i>A. flavus</i> sous microscope à balayage électronique.....	10
<b>Figure 5:</b>	Vue de l'appareil de reproduction asexuée de <i>A. awamori</i> .....	10
<b>Figure 6:</b>	Vue de l'appareil de reproduction asexuée d' <i>A. tubingensis</i> .....	11
<b>Figure 7:</b>	Vue microscopique de l'appareil de reproduction d' <i>A. tamaritii</i> .....	11
<b>Figure 8:</b>	Fructification asexuée du genre <i>Penicillium</i> .....	12
<b>Figure 9:</b>	Organisation des pinceaux de <i>Penicillium</i> et classement en sous-genres.....	13
<b>Figure 10:</b>	Vue de l'appareil de reproduction de <i>P. pinophilum</i> .....	13
<b>Figure 11:</b>	courbe de croissance bactérienne.....	14
<b>Figure 12:</b>	Coupure protéolytique d'une chaîne peptidique.....	16
<b>Figure 13:</b>	Comparaison de l'action de différentes protéases.....	19
<b>Figure 14:</b>	Représentation de la micelle de caséine.....	20
<b>Figure 15:</b>	Tamassage moléculaire.....	25
<b>Figure 16:</b>	Résine échangeuse de cations.....	25
<b>Figure 17 :</b>	Résine échangeuse d'anions.....	26
<b>Figure 18:</b>	Les étapes de la chromatographie d'affinité.....	26
<b>Figure 19:</b>	Voltmètre (a) avec électrode (b) TACUSSEL électronique polarostate Type PRGE couplé à un enregistreur (c) SERVOTRACE SEFRAM type PE.....	33
<b>Figure 20:</b>	Tracé obtenu grâce à l'enregistreur.....	34
<b>Figure 21:</b>	Courbe d'étalonnage du lactose.....	34
<b>Figure 22:</b>	Courbe d'étalonnage des protéines.....	35
<b>Figure 23:</b>	L'évaporateur rotatif utilisé.....	35
<b>Figure 24:</b>	Le montage de la chromatographie d'exclusion moléculaire : La colonne est reliée à la pompe et à l'enregistreur couplé au détecteur UV .....	43
<b>Figure 25:</b>	Tubes Eppendorf, 3KD (a) et 30 KD (b).....	44
<b>Figure 26:</b>	Gels et détergent (Acrylamide et SDS) .....	45
<b>Figure 27:</b>	Dispositif d'électrophorèse.....	46
<b>Figure 28:</b>	Activité protéolytique des souches isolées sur la caséine de lait .....	49
<b>Figure 29:</b>	Vue macroscopique des souches isolées.....	50
<b>Figure 30:</b>	Vue microscopique des souches isolées (grossissement X630) .....	51
<b>Figure 31:</b>	Séquence ITS d' <i>Aspergillus niger</i> .....	52
<b>Figure 32:</b>	Évolution de la biomasse et de l'activité enzymatique (a), des protéines et des taux de lactose (b) d' <i>A. niger</i> , de <i>P. pinophilum</i> et d' <i>A. flavus</i> .....	74
<b>Figure 33:</b>	Évolution de la biomasse et de l'activité enzymatique (a), des protéines et des taux de lactose (b) d' <i>A. awamori</i> , <i>A. tubingensis</i> et <i>A. tamaritii</i> .....	76
<b>Figure 34:</b>	Profils d'élution sur colonne d'exclusion Sephadex G-25 M des filtrats issus des cultures de : <i>Aspergillus niger</i> , <i>P. pinophilum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. awamori</i> , <i>A. tubingensis</i> et <i>A. tamaritii</i> .....	79
<b>Figure 35:</b>	Profil d'élution sur colonne échangeuse d'ions DEAE-Sepharose de la fraction active d' <i>Aspergillus niger</i> .....	81
<b>Figure 36:</b>	L'allure de la courbe d'élution des protéines par chromatographie d'affinité pour <i>Aspergillus niger</i> .....	83

<b>Figure 37:</b>	SDS-PAGE d' <i>Aspergillus niger</i> : a- marqueur de PM, b- Extrait Brut, c- fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire, d- Fractions issues de Pepstatin A-agarose.....	86
<b>Figure 38:</b>	SDS-PAGE de <i>Penicillium pinophilum</i> : a- marqueur de PM, b- Extrait Brut, c- fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire, d- Fractions issues de Pepstatin A-agarose.....	86
<b>Figure 39:</b>	SDS-PAGE d' <i>Aspergillus flavus</i> : a- marqueur de PM, b- Extrait Brut, c- fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire, d- Fractions issues de Pepstatin A-agarose.....	87
<b>Figure 40:</b>	SDS-PAGE d' <i>Aspergillus awamori</i> : a- marqueur de PM, b- Extrait Brut, c- fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire, d- Fractions issues de Pepstatin A-agarose.....	87
<b>Figure 41:</b>	SDS-PAGE d' <i>Aspergillus tubingensis</i> : a- marqueur de PM, b- Extrait Brut, c- fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire, d- Fractions issues de Pepstatin A-agarose.....	88
<b>Figure 42:</b>	SDS-PAGE d' <i>Aspergillus tamarii</i> : a- marqueur de PM, b- Extrait Brut, c- fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire, d- Fractions issues de Pepstatin A-agarose.....	89
<b>Figure 43:</b>	Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité d' <i>Aspergillus niger</i> .....	91
<b>Figure 44:</b>	Stabilité de l'activité enzymatique d' <i>A. niger</i> à différentes températures.....	91
<b>Figure 45:</b>	Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité de <i>Penicillium pinophilum</i> .....	92
<b>Figure 46:</b>	Stabilité de l'activité enzymatique de <i>P. pinophilum</i> à différentes températures.....	93
<b>Figure 47:</b>	Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité d' <i>Aspergillus flavus</i> .....	94
<b>Figure 48:</b>	Stabilité de l'activité enzymatique d' <i>Aspergillus flavus</i> à différentes températures.....	94
<b>Figure 49:</b>	Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité d' <i>Aspergillus awamori</i> ...	95
<b>Figure 50:</b>	Stabilité de l'activité enzymatique d' <i>Aspergillus awamori</i> à différentes températures.....	95
<b>Figure 51:</b>	Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité d' <i>Aspergillus tubingensis</i>	96
<b>Figure 52 :</b>	Stabilité de l'activité enzymatique d' <i>Aspergillus tubingensis</i> à différentes températures.....	96
<b>Figure 53:</b>	Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité d' <i>Aspergillus tamarii</i> .....	97
<b>Figure 54:</b>	Stabilité de l'activité enzymatique d' <i>Aspergillus tamarii</i> à différentes températures.....	97
<b>Figure 55:</b>	<i>A. niger</i> : Aspect du caillé après coagulation.....	101
<b>Figure 56:</b>	<i>P. pinophilum</i> : Aspect du caillé après coagulation.....	101
<b>Figure 57:</b>	<i>A. flavus</i> : Aspect du caillé après coagulation.....	102
<b>Figure 58:</b>	<i>A. awamori</i> : Aspect du caillé après coagulation.....	102
<b>Figure 59:</b>	<i>A. tubingensis</i> : Aspect du caillé après coagulation.....	103
<b>Figure 60:</b>	<i>A. tamarii</i> : Aspect du caillé après coagulation.....	103
<b>Figure 61:</b>	Aspect du caillé après coagulation avec l'enzyme des six souches .....	104
<b>Figure 62:</b>	Aspect des caillés coagulés à la présure, a : Lait de vache frais, b : lait de chèvre UHT et c : lait de vache UHT.....	105
<b>Figure 63:</b>	Hydrolyse de la caséine totale par les différentes enzymes ; M- marqueur de PM ; CT-caséine totale P1-protéase d' <i>A. niger</i> ; P2-protéase de <i>P. pinophilum</i> ; P3- protéase d' <i>A. flavus</i> ; P4-protéase d' <i>A. awamori</i> ; P5-protéase d' <i>A. tubingensis</i> ; P6-protéase d' <i>A. tamarii</i> .....	106

<b>Figure 64:</b>	Hydrolyse de la caséine alpha par les différentes enzymes ; M- marqueur de PM ; P1-protéase d' <i>A. niger</i> ; P2-protéase de <i>P. pinophilum</i> ; P3- protéase d' <i>A. flavus</i> ; P4-protéase d' <i>A. awamori</i> ; P5-protéase d' <i>A. tubingensis</i> ; P6-protéase d' <i>A. tamarii</i> .....	<b>107</b>
<b>Figure 65:</b>	Hydrolyse de la caséine bêta par les différentes enzymes ; M- marqueur de PM ; P1-protéase d' <i>A. niger</i> ; P2-protéase de <i>P. pinophilum</i> ; P3- protéase d' <i>A. flavus</i> ; P4-protéase d' <i>A. awamori</i> ; P5-protéase d' <i>A. tubingensis</i> ; P6-protéase d' <i>A. tamarii</i> .....	<b>108</b>
<b>Figure 66:</b>	Hydrolyse de la caséine kappa par les différentes enzymes ; M- marqueur de PM ; P-présure ; P1- protéase d' <i>A. niger</i> ; P2-protéase de <i>P. pinophilum</i> ; P3-protéase d' <i>A. flavus</i> ; P4-protéase d' <i>A. awamori</i> ; P5-protéase d' <i>A. tubingensis</i> ; P6-protéase d' <i>A. tamarii</i> .....	<b>109</b>



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b>	Principales caractéristiques des moisissures et leurs définitions.....	4
<b>Tableau 2:</b>	Quelques espèces des genres <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> et leurs toxines....	7
<b>Tableau 3:</b>	Classes des protéases et modes d'action.....	17
<b>Tableau 4:</b>	Les différentes formes de caséines de lait de vache .....	20
<b>Tableau 5:</b>	Les constituants majeurs de la protéine de lait de vache .....	21
<b>Tableau 6:</b>	Composition chimique du lactosérum.....	22
<b>Tableau 7:</b>	Générateurs des matrices d'Hadamard pour N=8, 12, 16, 20 et 24 essais...	28
<b>Tableau 8:</b>	Matrice d'expériences de Plackett et Burman pour k=11 et N=12.....	38
<b>Tableau 9:</b>	Les facteurs et leurs niveaux.....	39
<b>Tableau 10 :</b>	Matrice d'expérience de Box et Wilson pour X=3.....	40
<b>Tableau 11:</b>	Matrice d'expérience de Box et Wilson pour X=2.....	41
<b>Tableau 12:</b>	Pourcentage d'acrylamide et gamme de séparation en KDa correspondante	45
<b>Tableau 13:</b>	Composition chimique du lactosérum utilisé pour la réalisation de toutes les fermentations.....	53
<b>Tableau 14:</b>	Résultats du plan d'expérience de Plackett et Burman pour la souche <i>Aspergillus niger</i> .....	53
<b>Tableau 15:</b>	Résultats du plan d'expérience de Plackett et Burman pour la souche <i>Penicillium pinophilum</i> .....	54
<b>Tableau 16:</b>	Résultats du plan d'expérience de Plackett et Burman pour la souche <i>Aspergillus flavus</i> .....	54
<b>Tableau 17:</b>	Résultats du plan d'expérience de Plackett et Burman pour la souche <i>Aspergillus awamori</i> .....	55
<b>Tableau 18:</b>	Résultats du plan d'expérience de Plackett et Burman pour la souche <i>Aspergillus tubingensis</i> .....	55
<b>Tableau 19:</b>	Résultats du plan d'expérience de Plackett et Burman pour la souche <i>Aspergillus tamaritii</i> .....	56
<b>Tableau 20:</b>	Paramètres de supplémentation du milieu de culture de base des différentes souches sélectionnés par le plan statistique de Plackett et Burman.....	59
<b>Tableau 21:</b>	<i>Aspergillus niger</i> : Les facteurs sélectionnés par le Plan de Plackett et Burman et leurs niveaux respectifs (concentrations exprimées en g/l) .....	60
<b>Tableau 22:</b>	<i>Aspergillus niger</i> : Résultats des fermentations selon le plan composite centré de Box et Wilson.....	60
<b>Tableau 23:</b>	<i>Penicillium pinophilum</i> : Les facteurs sélectionnés par le Plan de Plackett et Burman et leurs niveaux respectifs (concentrations exprimées en g/l)....	62
<b>Tableau 24:</b>	<i>P. pinophilum</i> : Résultats des fermentations selon le plan composite centré de Box et Wilson.....	62
<b>Tableau 25:</b>	<i>Aspergillus flavus</i> : Les facteurs sélectionnés par le Plan de Plackett et Burman et leurs niveaux respectifs (concentrations exprimées en g/l).....	63
<b>Tableau 26:</b>	<i>A. flavus</i> : Résultats des fermentations selon le plan composite centré de Box et Wilson.....	64
<b>Tableau 27:</b>	<i>Aspergillus awamori</i> : Les facteurs sélectionnés par le Plan de Plackett et Burman et leurs niveaux respectifs (concentrations exprimées en g/l).....	65
<b>Tableau 28:</b>	<i>Aspergillus awamori</i> : Résultats des fermentations selon le plan composite centré de Box et Wilson.....	65
<b>Tableau 29:</b>	<i>Aspergillus tubingensis</i> : Les facteurs sélectionnés par le Plan de Plackett et Burman et leurs niveaux respectifs (concentrations exprimées en g/l)....	66



<b>Tableau 30:</b>	<i>Aspergillus tubingensis</i> : Résultats des fermentations selon le plan composite centré de Box et Wilson.....	<b>67</b>
<b>Tableau 31:</b>	<i>Aspergillus tamarii</i> : Les facteurs sélectionnés par le Plan de Plackett et Burman et leurs niveaux respectifs (concentrations exprimées en g/l).....	<b>68</b>
<b>Tableau 32:</b>	<i>Aspergillus tamarii</i> : Résultats des fermentations selon le plan composite centré de Box et Wilson.....	<b>69</b>
<b>Tableau 33:</b>	Les positions des extremums pour chaque souche.....	<b>70</b>
<b>Tableau 34 :</b>	Concentrations des différents paramètres pour chaque souche.....	<b>71</b>
<b>Tableau 35 :</b>	Résultats des fermentations.....	<b>78</b>
<b>Tableau 36:</b>	Résultats des différentes étapes de purification de <i>A. niger</i> , <i>P. pinophilum</i> et <i>A. tubingensis</i> .....	<b>84</b>
<b>Tableau 37:</b>	Résultats des différentes étapes de purifications de : <i>A. flavus</i> , <i>A. awamori</i> et <i>A. tamarii</i> .....	<b>85</b>
<b>Tableau 38:</b>	pH optimums et températures optimales d'activité des différentes souches.	<b>98</b>
<b>Tableau 39:</b>	Temps de coagulation du lait de chèvre UHT, activités coagulantes et forces coagulantes des différentes souches.....	<b>99</b>
<b>Tableau 40:</b>	Temps de coagulation du lait de vache UHT, activités coagulantes et forces coagulantes des différentes souches.....	<b>100</b>
<b>Tableau 41:</b>	Temps de coagulation du lait de vache frais, activités coagulantes et forces coagulantes des différentes souches.....	<b>104</b>
<b>Tableau 42:</b>	Effet des protéases P1, P2, P3, P4, P5 et P6 sur les caséines de lait.....	<b>109</b>
<b>Tableau 43:</b>	Poids moléculaire des différentes caséines de Lait.....	<b>110</b>

## SOMMAIRE

<b>Abréviations utilisées</b> .....	<b>i</b>
<b>Lite des figures</b> .....	<b>ii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>v</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique</b>	
<b>1. Moisissures</b> .....	<b>4</b>
1.1. Généralités.....	<b>4</b>
1.1.1. Organisation et structure des moisissures.....	<b>4</b>
1.1.2. Développement des moisissures.....	<b>5</b>
1.1.3. Identification des moisissures.....	<b>5</b>
1.2. Les genres <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> .....	<b>6</b>
1.2.1. Le genre <i>Aspergillus</i> .....	<b>7</b>
1.2.1.1. <i>Aspergillus niger</i> .....	<b>8</b>
1.2.1.2. <i>Aspergillus flavus</i> .....	<b>9</b>
1.2.1.3. <i>Aspergillus awamori</i> .....	<b>10</b>
1.2.1.4. <i>Aspergillus tubingensis</i> .....	<b>11</b>
1.2.1.5. <i>Aspergillus tamaraii</i> .....	<b>11</b>
1.2.2. Le genre <i>Penicillium</i> .....	<b>12</b>
1.2.2.1. Généralités.....	<b>12</b>
1.2.2.2. L'espèce <i>Penicillium pinophilum</i> .....	<b>13</b>
1.3. Intérêt économique des moisissures.....	<b>14</b>
<b>2. Cinétique de croissance des microorganismes et de production des enzymes</b> .....	<b>14</b>
2.1. Phases de croissance .....	<b>14</b>
2.2. Modes de biosynthèse des métabolites par rapport à la croissance du microorganisme.....	<b>15</b>
<b>3. Enzymes protéolytiques</b> .....	<b>16</b>
3.1. Définition .....	<b>16</b>
3.2. Les différentes classes des protéases.....	<b>17</b>
3.3. Spécificité des protéases.....	<b>17</b>
3.4. Propriétés technologiques des protéases.....	<b>18</b>
3.4.1. Les différents rôles des protéases.....	<b>18</b>
3.4.2. Les protéines du lait.....	<b>19</b>
3.4.3. Le lactosérum.....	<b>22</b>
3.5. Action des effecteurs sur les protéases.....	<b>23</b>
3.5.1. Température.....	<b>23</b>
3.5.2. pH.....	<b>23</b>
3.5.3. Inhibiteurs.....	<b>24</b>
<b>4. Techniques de purification des enzymes</b> .....	<b>24</b>
4.1. Chromatographie d'exclusion moléculaire.....	<b>24</b>
4.2. Chromatographie échangeuse d'ions.....	<b>25</b>

4.3. Chromatographie d'affinité.....	26
4.4. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	27
<b>5. Optimisation et modélisation de la production d'enzymes par les microorganismes.....</b>	<b>27</b>
5.1. Matrices d'expériences de Plackett et Burman .....	28
5.2. Plan composite centré.....	29
 <i>Chapitre 2: Matériel et méthodes</i>	
<b>6. Matériel biologique.....</b>	<b>32</b>
6.1. Méthode d'isolement des souches.....	32
6.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique des souches sur la caséine du lait.....	32
6.3. Identification des souches.....	32
6.4. Réactivation et sporulation des souches.....	33
<b>7. Méthodes de dosage.....</b>	<b>33</b>
7.1. Dosage du lactose.....	33
7.2. Dosage des protéines.....	35
7.3. Détermination de la matière grasse.....	35
7.4. Détermination de la matière sèche.....	36
7.5. Détermination de la matière minérale.....	36
7.6. Détermination des chlorures.....	37
7.7. Détermination du phosphore.....	37
7.8. Détermination du calcium et magnésium.....	37
<b>8. Méthodes d'optimisation de la production des protéases.....</b>	<b>38</b>
8.1. Plan d'expériences de Plackett et Burman.....	38
8.2. Plan composite centré de Box et Wilson.....	39
<b>9. Méthodes de culture.....</b>	<b>41</b>
9.1. Préparation des milieux de culture .....	41
9.2. Ensemencement et conditions de culture.....	42
<b>10. Suivi de la cinétique de croissance des souches et fermentations.....</b>	<b>42</b>
<b>11. Extraction des enzymes protéolytiques.....</b>	<b>42</b>
11.1. Préparation des extraits bruts.....	42
11.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-25.....	43
11.3. Chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-Sepharose.....	43
11.4. Chromatographie d'affinité sur pepstatine-A agarose.....	43
11.5. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	44
<b>12. Propriétés technologiques des protéases.....</b>	<b>46</b>
12.1. Tests de coagulation.....	46
12.2. Comparaison des résultats de la coagulation avec celle réalisée avec la présure.....	47
12.3. Effet des enzymes produites sur les caséines de lait .....	47

**Chapitre 3: Résultats de l'isolement, de l'identification des moisissures et de l'optimisation de la production**

<b>13. Résultats de la détermination de l'activité protéolytique des souches sur la caséine de lait.....</b>	<b>49</b>
<b>14. Identification des souches isolées.....</b>	<b>50</b>
14.1. Observation macroscopique des souches .....	50
14.2. Observation microscopique des souches.....	51
14.3. Identification des souches par biologie moléculaire.....	51
<b>15. Optimisation du milieu de culture.....</b>	<b>52</b>
15.1. Détermination de la composition du lactosérum.....	52
15.2. Résultats de l'optimisation du milieu de culture par la méthode de Plackett et Burman.....	53
15.3. Effets des différents composés sur la biomasse, le taux des protéines et l'activité enzymatique.....	56
15.4. Résultats de la détermination des optima par la méthode de Box et Wilson.....	59

**Chapitre 4: Résultats de la production des enzymes**

<b>16. Résultats des cinétiques.....</b>	<b>73</b>
16.1. <i>Aspergillus niger, Penicillium pinophilum et Aspergillus flavus..</i>	73
16.2. <i>Aspergillus awamori, Aspergillus tubingensis et A. tamarrii.....</i>	77
16.3. Résultats des fermentations.....	77
<b>17. Extraction et purification des protéases.....</b>	<b>78</b>
17.1. Chromatographie d'exclusion moléculaire.....	78
17.2. Chromatographie échangeuse d'ions.....	81
17.3. Chromatographie d'affinité.....	83
17.4. Électrophorèse SDS-PAGE .....	85

**Chapitre 5: Résultats des propriétés physicochimiques et technologiques des enzymes produites.**

<b>18. Propriétés physicochimiques</b>	<b>91</b>
18.1. Effet du pH et de la température.....	91
18.1.1. <i>Aspergillus niger</i> .....	91
18.1.2. <i>Penicillium pinophilum</i> .....	92
18.1.3. <i>Aspergillus flavus</i> .....	93
18.1.4. <i>Aspergillus awamori</i> .....	95
18.1.5. <i>Aspergillus tubingensis</i> .....	96
18.1.6. <i>Aspergillus tamarrii</i> .....	97
18.2. Activité coagulante sur différents laits.....	98
18.2.1. Action sur le lait de chèvre UHT.....	98
18.2.2. Action sur le lait de vache UHT.....	100
18.2.3. Action sur le lait de vache frais.....	101
<b>19. Comparaison des résultats avec ceux obtenus avec la présure .....</b>	<b>105</b>

<b>20. Effet des enzymes sur les caséines de lait .....</b>	<b>106</b>
20.1. Effet sur la caséine totale.....	106
20.2. Effet sur la caséine $\alpha$ .....	107
20.3. Effet sur la caséine $\beta$ .....	108
20.4. Effet sur la caséine $\kappa$ .....	108
<b>Conclusion.....</b>	<b>112</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>115</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>I</b>
<b>Annexe 1.....</b>	<b>I</b>
<b>Annexe 2.....</b>	<b>III</b>
<b>Annexe 3.....</b>	<b>XI</b>
<b>Résumés</b>	

# *Introduction*

## Introduction

La fabrication des fromages par la méthode classique consiste à coaguler le lait par voie enzymatique à l'aide de la présure, mais une production limitée d'enzymes de coagulation liée à une industrie fromagère de plus en plus croissante, a poussé de nombreux chercheurs à s'intéresser à d'autres sources enzymatiques répondant aux critères de la présure.

Certains sont arrivés à produire des enzymes de coagulation à partir de champignons comme *Mucor miehei*; (**Ottesen et Rickert, 1970**) *Mucor pusillus* (**Somkuti et Babel, 1968 ; Arima et al., 1968**) ou encore de champignon parasite tel que *Cryphonectria parasitica* (anciennement *Endothia parasitica*) (**Alais et Novak, 1968; Larson et Whitaker, 1970**). D'autres ont pu extraire une enzyme de coagulation à partir de proventricules de poulet (**Green et Llewelin, 1973**), ou encore, à partir de poissons (**Cuvellier, 1999 ; Haard et al., 1982**).

Tous ces travaux de recherche ont montré que de nombreuses molécules enzymatiques peuvent coaguler le lait, mais peu d'entre elles sont utilisées comme substitut de la présure (**Ramet, 1997**), car la coagulation à elle seule ne suffit pas mais la fabrication des fromages prend en considération d'autres caractéristiques.

Les années 90 ont vu naître de nouvelles générations d'enzymes obtenues par génie génétique, les chymosines fermentaires, qui permettent la production d'environ 40 % des fromages dans le monde. Celles-ci peuvent être obtenues, par modifications génétiques de souches microbiennes afin de fabriquer des fromages tout à fait comparables aux produits traditionnels.

La maîtrise des fermentations et des microorganismes a permis l'isolement de plusieurs enzymes permettant la transformation d'un substrat biochimique bien défini en un produit spécifique. plusieurs espèces des genres *Penicillium* (**Chrzanowska et al., 1993**) et *Rhizopus* (**Farley et Ikasari, 1992**) sont connus comme très bons producteurs de protéases selon ces processus fermentaires. Pour cela, les industries utilisent différents milieux à base de déchets agro-industriels, mélasses de betteraves, déchets de tomates, déchets de dates, lactosérum... (**Sidrach et al., 2005**).

L'Algérie étant le plus important consommateur de lait et produits laitiers au Maghreb avec une consommation moyenne de 110L par habitant et par an (Aïssaoui, 2009). Elle reste dépendante vis-à-vis des pays étrangers en matière d'approvisionnement en agents de coagulation nécessaires pour la fabrication des fromages. Ceci a poussé de nombreux laboratoires à s'orienter vers cet axe, à savoir, la recherche de substituts de présure, ayant un intérêt pour l'industrie fromagère locale. En effet, la production d'enzymes de coagulation du lait permet de résoudre plusieurs problèmes, en particulier:

- Réduction des frais d'importation de matières premières ;
- Disponibilité locale des enzymes;
- Valorisation des sous-produits des industries agro-alimentaires par leur utilisation comme substrat de fermentation.

Dans cet objectif, nous nous proposons de produire des protéases coagulantes par des moisissures isolées localement tout en valorisant un déchet agroalimentaire, le lactosérum. Ce dernier, déversé dans les cours d'eau, est à l'origine de pollutions graves dues à la fermentation de ses matières organiques et à la diminution de la teneur en oxygène dissous dans l'eau au dessous d'un seuil acceptable. Pour ce faire, nous avons divisé cette étude en trois grandes parties :

1. Isolement et identification des moisissures productrices de protéases coagulantes;
2. Production et purification de l'enzyme (avec optimisation du milieu de culture);
3. Étude des propriétés technologiques de l'enzyme (coagulation des laits et effet sur caséines).



# **Chapitre 1**

## ***Synthèse Bibliographique***

## 1. Moisissures

### 1.1. Généralités

Le terme "Moisissure" désigne tous les champignons microscopiques eucaryotes, filamenteux et pluricellulaires du règne des mycètes. Dépourvus de chlorophylle, les moisissures sont hétérotrophes et doivent tirer leur énergie des composés organiques puisés dans le milieu extérieur (**Regnault, 1990**).

Elles possèdent plusieurs caractéristiques (**Tableau 1**) et sont capables de se développer sur n'importe quel milieu, en particulier sur la matière organique en décomposition (**Figarella et al., 2004**). Ces champignons présentent un très grand intérêt industriel car, à partir de plusieurs substrats il est possible d'obtenir une très grande variété de substances organiques complexes: alcools, acides organiques, enzymes, pigments, antibiotiques, vitamines, etc... (**Scriban, 1993 ; Perry et al., 2004**).

**Tableau 1:** Principales caractéristiques des moisissures et leurs définitions. (**Lecomte, 2009**)

Caractères	Définitions
Eucaryotes	Un (des) noyau (x) bien individualisé (s) dans les cellules
Hétérotrophes	Vis-à-vis du carbone par absence de pigments assimilateurs
Absorbotrophes	Digestion extracellulaire suivie de l'absorption des nutriments
Thallophytes	Constitué de filaments, c'est un appareil végétatif ramifié diffus et tubulaire
Cryptogames	Reproduction par spores
Paroi cellulaire	chitineuse

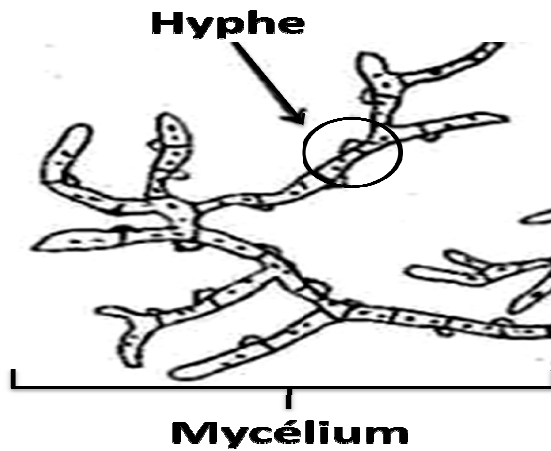
#### 1.1.1. Organisation et structure des moisissures

Les moisissures sont filamenteuses, leurs filaments sont appelés Hyphes et l'ensemble de ces hyphes forme une structure appelée mycélium (**Schaechter et al., 2005**). (**Figure 1**)

Les hyphes contiennent les éléments de structure observés dans une cellule eucaryote, à savoir:

- Des noyaux bien identifiés entourés d'une membrane ; une membrane plasmique ; un cytoplasme avec des mitochondries, des ribosomes et des substances de réserve (en particulier du glycogène).

Ils peuvent être cloisonnés ou non cloisonnés et sont entourés d'une paroi constituée essentiellement de chitine (Figarella et al., 2004).



**Figure 1** : Structure d'un mycélium  
(Ross, 2010)

### 1.1.2. Développement des moisissures

Le développement des moisissures comprend une phase végétative de croissance<sup>1</sup> et une phase reproductive au cours de laquelle se forment les spores qui assurent la dispersion (Moreau, 1978).

Elles se développent, dans un premier temps en occupant la surface du milieu sur lequel elles poussent en le recouvrant d'un réseau dense de filaments, puis apparaissent des filaments verticaux dressés sur les précédents et se terminant parfois par des boules, ces filaments jouent un rôle essentiel dans la reproduction asexuée (Figarella et al., 2004).

### 1.1.3. Identification des moisissures

Pendant longtemps, l'identification des moisissures s'est basée exclusivement sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce, mais grâce à la biologie moléculaire de nouveaux outils d'aide ont été proposés.

#### 1.1.3.1. Identification morphologique

C'est l'analyse des critères cultureux tels que la température, la vitesse de croissance et les milieux favorables, et des critères morphologiques constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies et de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides,...) (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

---

<sup>1</sup> Prolongement apical des hyphes formant le mycélium

### ❖ Critères d'identification macroscopique

Les critères d'identification macroscopique peuvent être résumés comme suit:

- L'aspect des colonies: laineux, cotonneux, velouté, poudreux, duveteux, granuleux et parfois même glabre.
- Le relief des colonies: plissé ou plat
- La taille des colonies: variable en fonction du genre fongique (petite, étendue, envahissante)
- La couleur des colonies: les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge, le bleu, le vert, le gris et le brun allant jusqu'au noir.
- Les structures de fructification: présence ou absence au centre de la colonie de structures de fructification sexuée ou asexuée.

### ❖ Critères d'identification microscopique

L'identification microscopique est basée sur l'observation du thalle, des spores et de leurs aspects, du mode de formation et groupement des conidies ainsi que le mode d'implantation des cellules conidiogènes. La présence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée et également, la présence des chlamydospores (éléments de résistances) aide à l'identification des moisissures.

#### 1.1.3.2. Identification génétique

L'identification moléculaire permet une différenciation rapide des espèces fongiques (Dial, 2007), à l'heure actuelle elle est surtout appliquée en mycologie médicale pour différencier les espèces d'intérêt et est basée sur l'amplification par PCR de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 28S ribosomale (région D1-D2) et des régions ITS1 et ITS2 (Hinrikson et al., 2005).

#### 1.2. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium*

Depuis des siècles, plusieurs genres de moisissures sont retrouvés sur divers aliments, les plus fréquents sont : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Mucor*. Ils sont rencontrés principalement dans les fruits et légumes, viandes, confitures, céréales, laits, produits laitiers et boissons (El Atyqy, 2010).

Certaines espèces produisent des mycotoxines dont l'ingestion en quantité importante provoque une intoxication chez l'individu. (**Tableau 2**)

**Tableau 2** : Quelques espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* et leurs toxines (**Pfohl-Leszkowicz, 1999**)

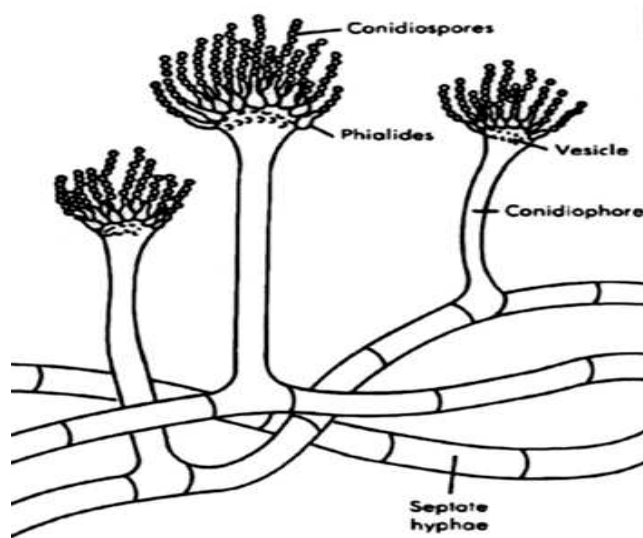
Genres	Espèces	Mycotoxines produites
<i>Aspergillus</i>	<i>A. candidus</i>	candiduline
	<i>A. clavatus</i>	acide kojique, patuline, xanthociline
	<i>A. flavus</i>	aflatoxines B1 et B2, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, acide kojique
	<i>A. fumigatus</i>	fumigaclavine, fumagiline, fumitoxine, fumitremorgine A et C, gliotoxine
	<i>A. niger</i>	malformine, naftoquinone
	<i>A. oryzae</i>	acide cyclopiazonique, acide kojique
	<i>A. terreus</i>	citréoviridine, citrinine, gliotoxine, patuline, terréine, acide terréique, terrétonine, territrem, terramide A
	<i>A. wentii</i>	acide kojique
	<i>Penicillium</i>	<i>P. chrysogenum</i>
<i>P. citreonigrum</i>		citréoviridine
<i>P. crustosum</i>		pénitrem A, roquefortine C
<i>P. roquefortii</i>		acide pénicillique, roquefortine C, PR toxine
<i>P. rubrum</i>		rubratoxine
<i>P. simplicissimum</i>		acide pénicillique, verrucologène
<i>P. variabile</i>		rugulosine
	<i>P. verrucosum</i>	citrinine, ochratoxine A

### 1.2.1. Le genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des *Ascomycètes*. Près de 150 espèces d'*Aspergillus* sont connues et réunies en 18 groupes par **Raper et Fennel (1965)**. Ces moisissures sont très répandues sur toute sorte de substrats, certaines (groupe *Glaucus*) acceptent de vivre dans des conditions de sécheresse particulièrement sévères. (**Moreau, 1978**).

La majorité des *Aspergillus* sont à croissance rapide sur milieux de culture classiques (Sabouraud, CEA, PDA, gélose au malt, ...) à 20-25°C, les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent à 37-40°C et parfois jusqu'à 57°C. (**Badillet et al., 1987**).

La représentation schématique du genre est sur le **Figure 2**.



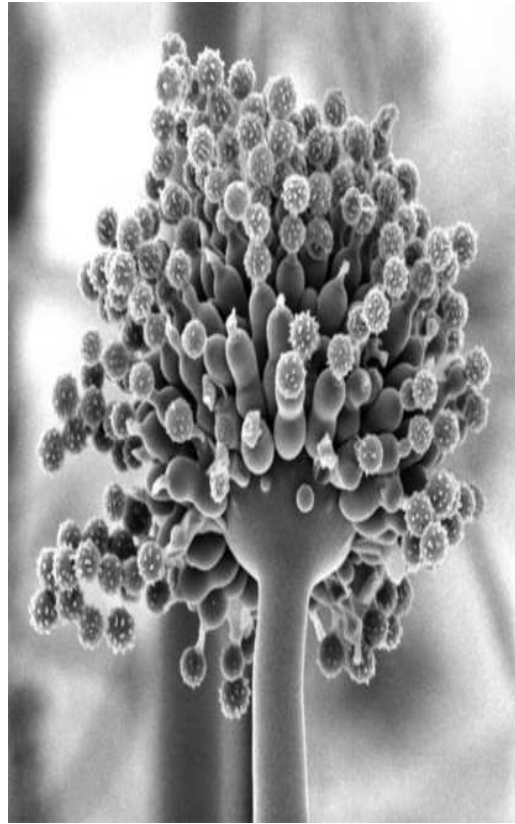
**Figure 2** : Fructification asexuée du genre *Aspergillus* (Tritz, 2000)

#### 1.2.1.1. *Aspergillus niger*

C'est une espèce cosmopolite parfois difficile à distinguer d'autres espèces telles que, *Aspergillus awamori* ou *Aspergillus phoenicis*. Bien que retrouvée dans le monde entier, elle est un peu plus fréquente dans les zones tièdes et les sites exposés au sud, mais peut se retrouver, aussi bien sur les sols glacés, que dans les environnements marins, les pâturages, les forêts et les dunes. Elle peut être isolée de substrats et habitats divers (sol, bois, cuir, caoutchouc, papier, métaux, textile,...). C'est un champignon à croissance rapide à des températures variant entre 20 et 30°C pouvant aller jusqu'à 42°C (Moreau, 1978).

### Description

- Tête aspergillaire
- Conidiophore long (de 1 à 3 mm), lisse
- Vésicules globuleuses (30) 45-75 (100)  $\mu\text{m}$
- Phialides 7-10 x 3-3,5  $\mu\text{m}$ .
- Sclérotes parfois différenciés, 0,8-1,2 mm
- Conidies globuleuses, parfois légèrement aplaties, 3,5-5  $\mu\text{m}$ , Sur milieu Sabouraud la tête est aspergillaire isolée c'est une colonie noire avec des zones de plémorphismes blanches (Gillaume, 2006)
- Toxicité: Production d'acide oxalique, de flavaspérone, de malformines, et d'aflatoxines par certaines souches, peut provoquer l'aspergillose du conduit auditif externe chez les sujets présentant des lésions préalables, mais elle possède des toxines à propriété insecticide, actives sur les moustiques responsables de la fièvre jaune.



**Figure 3:** Vue de l'appareil de reproduction asexuée d'*A. niger* (partiellement lyophilisé) sous microscope à balayage électronique (Anonyme 1, 2010)

#### 1.2.1.2. *Aspergillus flavus*

Difficile à distinguer d'*Aspergillus oryzae* et d'*Aspergillus parasiticus* en raison de l'existence de souches à caractères intermédiaires, cette moisissure colonise toutes sortes de matières organiques en décomposition et se développe sur les denrées alimentaires, en particulier sur les graines d'oléagineux et leurs dérivés.

Elle se développe rapidement sur tous les milieux de culture classiques entre 22 et 25°C, sa température optimale de croissance est de 37°C (Moreau, 1978).



### Description

- Thalle à revers incolore, rosâtre ou brun-rouge foncé pour les souches productrices de sclérotés,
- Têtes conidiennes unisériées, radiées se scindant en plusieurs colonnes sporales
- Conidiophores hyalins, verruqueux de 1mm à 2,5 mm de long,
- Vésicules sub-globuleuses, 25 (10-65) 45  $\mu\text{m}$ .
- Conidies globuleuses à sub-globuleuses, 3-6  $\mu\text{m}$ , vert-pâle, verruqueuses.
- Sclérotés fréquents dans les isolats récents, globuleux à sub-globuleux, blancs virant au brun rouge foncé et au noir, 400-700 (1000)  $\mu\text{m}$ .
- Toxicité: Elabore divers antibiotiques et des composés très toxiques et cancérogènes, les aflatoxines (Gillaume, 2006).



**Figure 4:** Vue de l'appareil de reproduction asexuée d'*A. flavus* sous microscope à balayage électronique (Williams Jr. et Birman, 2009)

### 1.2.1.3. *Aspergillus awamori*

Communément appelée *Aspergillus niger var awamori*, cette moisissure lipolytique des oléagineux est très utilisée au Japon pour la préparation du "Koji".

### Description

- Thalle à sporulation abondante, revers incolore ou brun-rouge.
- Têtes conidiennes bisériées, radiées ou divisées en plusieurs colonnes sporales mal définies, brun verdâtre foncé à brun-chocolat foncé.
- Conidiophores lisses, fragiles, 200 (1000-1500) 3000  $\mu\text{m}$ .
- Vésicules globuleuses, brun clair, 10 (25-50) 80  $\mu\text{m}$ , entièrement fertiles.
- Métules 5 (10-20) 40 x 3,5 (4,5-7) 10  $\mu\text{m}$ .
- Phialides 5,5-10 x 3-4  $\mu\text{m}$ .
- Conidies globuleuses à sub-globuleuses, 3,5-5 (6)  $\mu\text{m}$  échinulées ou garnies de crêtes.
- Toxicité: Production de "malformines", toxiques pour les animaux et à l'origine de malformations d'organes végétaux.



**Figure 5:** Vue de l'appareil de reproduction asexuée d'*A. awamori* (Anonyme 2, 2008).

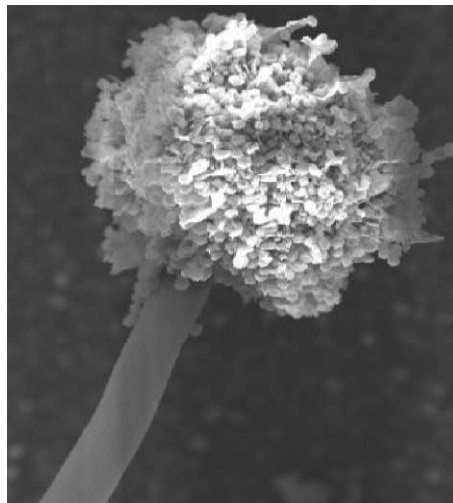


#### 1.2.1.4. *Aspergillus tubingensis*

Souche isolée en Thaïlande (Chiangmai) à partir de grain de café Arabica (Samson et al., 2007), a fait l'objet de plusieurs études.

##### Description

- Thalle à croissance modérée
- Colonies à villosités radiales
- Mycélium blanc en début de croissance.
- Vésicules rondes et radiales
- Métules 6  $\mu\text{m}$
- Conidies 2,5  $\mu\text{m}$ .
- Sporangies composées d'un grand nombre de spores
- Spores elliptiques
- Sclérotés fréquents chez certaines souches dans les isolats récents, blancs virant au rose 0,5-0,8 mm.



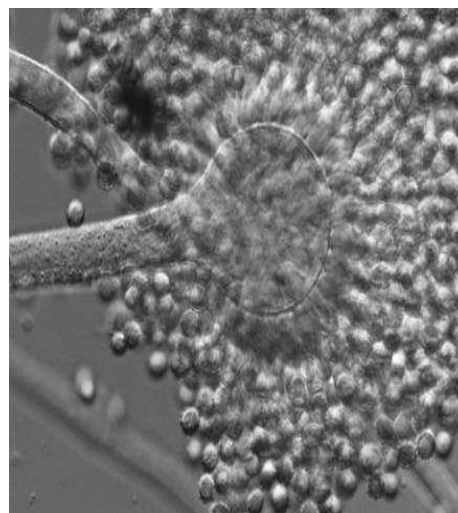
**Figure 6:** Vue de l'appareil de reproduction asexuée d'*A. tubingensis* (He et al., 2008)

#### 1.2.1.5. *Aspergillus tamaraii*

Cette espèce a été isolée la première fois d'une sauce de soja fermentée nommée "tamari", puis du sol, de matières végétales en décomposition et de denrées alimentaires: (grains de café, graines de cacaoyer, arachides, coprah).

##### Description

- Thalle à croissance rapide, à travers incolore ou rosâtre.
- Tête conidiennes uni-ou bisériées suivant les souches,
- Conidiophores hyalins, verruqueux, 1-2 mm.
- Vésicules globuleuses à sub-globuleuses, 25-30  $\mu\text{m}$ , fragiles, entièrement fertiles.
- Métules 10-15 x 4-8  $\mu\text{m}$ .
- Phialides 7-10 x 3-6  $\mu\text{m}$ .
- Conidies jaune-brun, cylindriques à piriformes puis globuleuses, 5-6,5 (8)  $\mu\text{m}$ ,
- Garnies de crêtes et de tubercules bruns situés entre la couche interne à la couche externe de la paroi sporale.
- Sclérotés parfois présents, bruns ou pourpre-rouge à noir, 1,5-2 mm.
- Toxicité: Produit de l'acide kojique

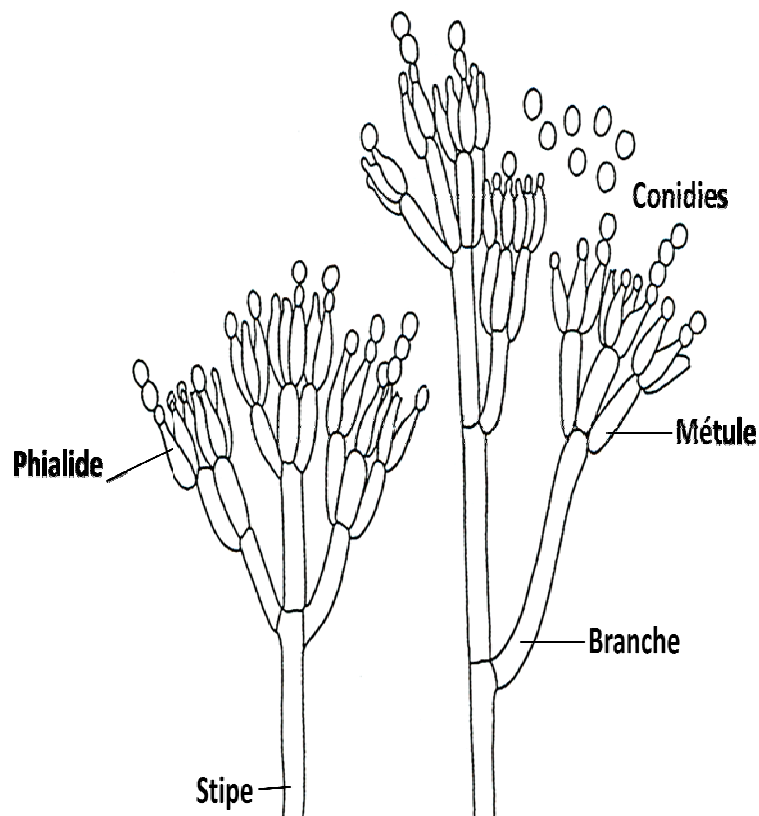


**Figure 7:** Vue microscopique de l'appareil de reproduction d'*A. tamaraii* (Kredics et al., 2007).

## 1.2.2. Le genre *Penicillium*

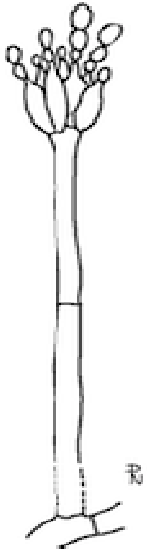
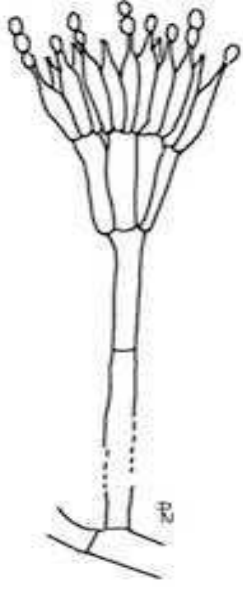
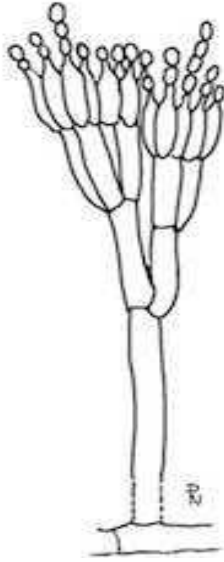
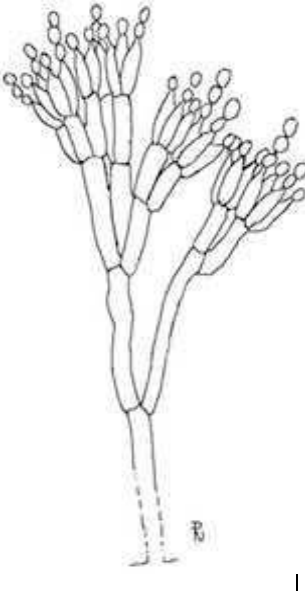
### 1.2.2.1. Généralités

Sous microscope, les *Penicillium* sont caractérisés par de longues chaînes de spores bourgeonnées par des organes en forme de bouteilles appelés "phialides", disposés à l'extrémité de ramifications des sporophores, l'ensemble a la forme d'un pinceau (en latin: penicillium) (**Figure 8**).



**Figure 8** : Fructification asexuée du genre *Penicillium* (Rakotonirainy, 2011)

D'après les caractères de ramifications des pinceaux (mono ou biverticillés, symétriques ou asymétriques) (Figure 9) et d'après l'aspect des thalles (veloutés, laineux, funiculeux, fasciculé, etc.), Raper et Thom ont classé plus de 250 espèces de *Penicillium* décrites (Moreau, 1978).

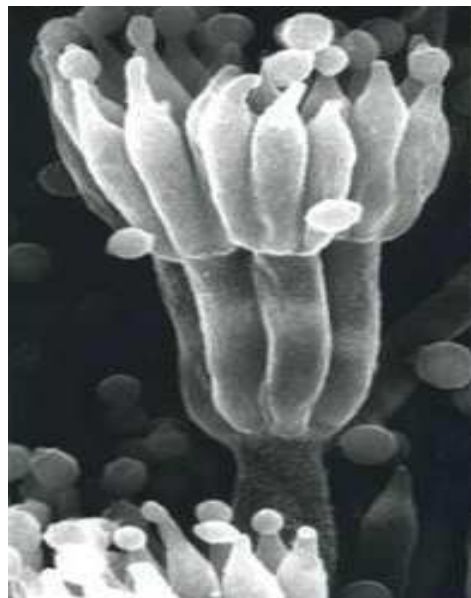
 <p>Pinceau monoverticillé : Phialide seule</p>	 <p>Pinceau biverticillé : Phialide + métule</p>	 <p>Pinceau terverticillé : Phialide + métule + rameau</p>	 <p>Pinceau tetraverticillé : Phialide + métule + rameau + branche</p>
<p><i>Sous genre Aspergilloides</i></p>	<p><i>Sous genre Furcatum</i> et <i>Sous genre Biverticillium</i></p>	<p><i>Sous genre Penicillium</i></p>	

**Figure 9** : Organisation des pinceaux de *Penicillium* et classement en sous-genres (Pitt, 1988)

### 1.2.2.2. L'espèce *Penicillium pinophilum*

#### Description

- Germination avec croissance limitée ou rapide.
- Mycélium, floconneux, vert grisâtre, grisâtre, jaune clair, blanc, orange blanc, blanc jaunâtre, jaune pastel ou jaune à revers blanc à blanc orange, orange brunâtre, blanc jaunâtre ou jaune clair.
- Colonies de 28-36 mm diamètres, plissée, soulevées et profondes.
- Phialides en verticilles de 5-7  $\mu\text{m}$ .
- Conidiogénèse modérée ou abondante,
- Conidies sphéroïdales à subsphéroïdales 2-2,4  $\mu\text{m}$ , lisses, à paroi épaisse.



**Figure 10**: Vue de l'appareil de reproduction de *P. pinophilum* (Anonyme 3, 2004).

### 1.3. Intérêt économique des moisissures

L'intérêt économique des moisissures repose sur leur capacité à produire de nombreux métabolites intéressants pour l'homme, (Scriban, 2009) mais jusqu'à ce jour le nombre de champignons exploités industriellement par rapport à celui des bactéries reste minime.

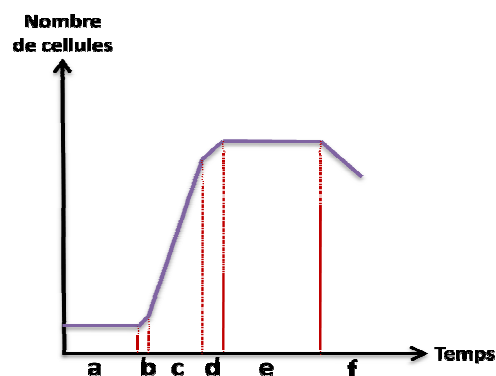
La plupart des moisissures utilisées en microbiologie alimentaire sont soit des Deutéromycètes (champignons imparfaits) soit de Mucorales (Leyral et Vierling, 2007), *Mucor*, *Actinomucor* et *Rhizopus* sont utilisés pour la fabrication de certains plats asiatiques, quant à *Penicillium*, *Geotrichum candidum* qui consomment l'acide lactique et possèdent des propriétés protéolytique et lipolytique jouent un rôle très important dans l'industrie fromagère. D'autres espèces de *Penicillium*, *Geotrichum* et *Candida* sont utilisées dans la fabrication de produits carnés. Par contre dans les fermentations alcooliques de certaines boissons c'est plutôt les levures qui sont le plus utilisés (Anonyme 4, 2011).

## 2. Cinétique de croissance des microorganismes et de production des enzymes

### 2.1. Phases de croissance

La croissance microbienne se traduit par une augmentation des constituants cellulaires aboutissant à l'augmentation du nombre de cellules dans le cas des bactéries ; ou de la taille dans le cas des moisissures. (Madigan et Martinko, 2007).

Comme les bactéries, la croissance des moisissures se caractérise par un ensemble de phases distinctes : latence, accélération, exponentielle, ralentissement, stationnaire et déclin (Marchandin, 2007), que nous pouvons représenter par la courbe en figure 11.



**Figure 11** : Courbe de croissance bactérienne.

a : phase de latence, b : phase d'accélération, c : phase exponentielle, d : phase de ralentissement, e : phase stationnaire et f : phase de déclin.

- **Phase de latence**

Phase dans laquelle aucune croissance n'est observée, elle permet au microorganisme de s'accoutumer à son environnement, elle est plus ou moins longue en fonction des constituants du milieu.

- **Phase d'accélération**

Caractérisée par une soudaine augmentation de vitesse indiquant le début de la croissance microbienne.

- **Phase de croissance exponentielle**

Également appelée phase de croissance équilibrée, elle est très favorable au développement de la population microbienne ce qui lui permet d'atteindre un taux de croissance maximal.

- **Phase de ralentissement**

Caractérisée par la diminution des nutriments et l'accumulation des déchets, ce qui diminue de façon considérable la vitesse de croissance.

- **Phase stationnaire**

À cette étape la croissance est nulle, le taux de division cellulaire égale le taux d'autolyse.

- **Phase de déclin**

Le taux de cellules lysées devient supérieur au taux de cellules vivantes, sa durée dépend des souches et de la composition du milieu.

## **2.2. Modes de biosynthèse des métabolites par rapport à la croissance du microorganisme**

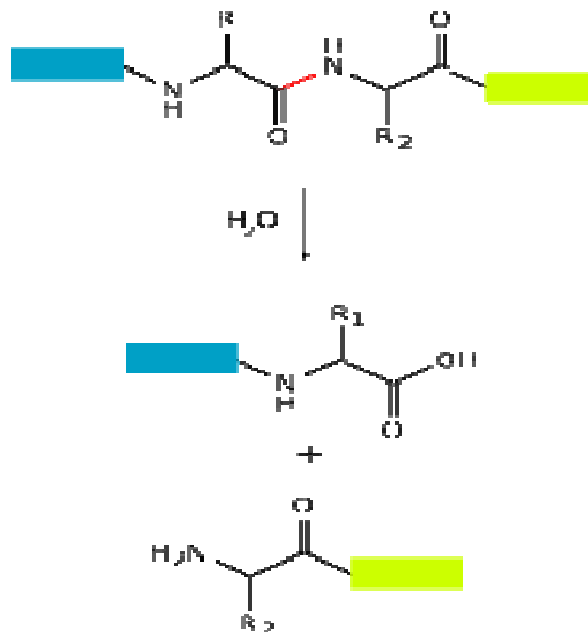
Durant le développement du microorganisme, la synthèse des métabolites peut être associée ou non à sa croissance, ce qui a permis de classer cette biosynthèse en trois groupes (**Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992**):

- Biosynthèse associée à la croissance : synthèse des métabolites primaires (indispensables) pendant la croissance cellulaire, exemple : acides aminés, vitamines, protéases.
- Biosynthèse partiellement associée à la croissance : c'est le cas des synthèses réalisées pendant la phase de croissance et la phase stationnaire, exemple : acide lactique, protéases dont la production est à son maximum.
- Biosynthèse non associée à la croissance : production de métabolites qui ne sont pas nécessaires lors de la croissance, appelés métabolites secondaires, exemple : antibiotiques et acide cyclopiazonique.

### 3. Enzymes protéolytiques

#### 3.1. Définition

Les protéases ou peptidases sont des enzymes qui coupent les liaisons peptidiques ( $AA_1-CO\sim NH-AA_2$ ) (**Figure 12**) des protéines (coupure protéolytique ou protéolyse) en impliquant l'utilisation d'une molécule d'eau ce qui les classe parmi les hydrolases.



**Figure 12:** Coupure protéolytique d'une chaîne peptidique (Dardel, 2007)

### 3.2. Les différentes classes de protéases

Il existe plusieurs classes de protéases suivant leur mode d'action, celui-ci dépend de la nature de l'acide aminé qui se trouve au niveau du site actif et donc, directement impliqué dans la catalyse, ce qui a permis de décrire plusieurs mécanismes d'action (**Tableau 3**).

**Tableau 3** : Classes des protéases et modes d'action (**Hartley, 1960**)

Classe de protéase	Mode d'action	Exemple
Protéases à sérine	utilisent une triade catalytique pour activer la chaîne latérale d'une sérine	- Trypsine - Chymotrypsine - Élastase - Thrombine - Plasmine - Subtiline
Protéases à thiol	utilisent une triade catalytique pour activer la chaîne latérale d'une cystéine	- Papaïne - Ficine - Broméline - Quelques cathepsines
Protéases acides	agissent à pH acide et possèdent un acide aspartique sur leur site actif	- Pepsine - Rennine (chymosine) - Protéase du VIH-1
Métalloprotéases	utilisent un ion métallique pour activer une molécule d'eau.	- Thermolysine - Protéases de la matrice extracellulaire.

### 3.3. Spécificité des protéases

Les protéases clivent spécifiquement les liaisons peptidiques associées à un acide aminé précis, par exemple la chymotrypsine qui possède une cavité profonde constituée essentiellement d'acides aminés hydrophobes, a une préférence pour les acides aminés à grandes chaînes latérales hydrophobes tels que la phénylalanine et le tryptophane (**Lodish et al., 2000**).



La trypsine quant à elle, possède au fond de sa cavité une chaîne latérale chargée négativement, cette caractéristique lui permet de couper préférentiellement les acides aminés à chaînes latérales chargées positivement (**Borel et al., 1997**).

L'élastase par contre a un résidu valine dans sa cavité d'où son attirance par les acides aminés à chaînes latérales de petites tailles (**Garrett et Grisham, 2000**).

### **3.4. Propriétés technologiques des protéases**

#### **3.4.1. Les différents rôles des protéases**

Qu'elles soient d'origine végétale, animale ou microbienne, les protéases jouent plusieurs rôles, particulièrement dans les productions agroalimentaires industrielles, elles permettent les réactions suivantes (**Madigan et Martinko, 2007**):

- Amélioration du procédé de fabrication de certains jus par hydrolyse des macromolécules en suspension, et de leur texture en hydrolysant par exemple la pectine naturelle.
- Insolubilisation de certaines molécules comme les caséines dans le cas de la coagulation du lait par la présure et amélioration de la texture et de la qualité organoleptique de certains fromages.
- Stabilisation et clarification de certains liquides comme les jus de fruits et le vin en vue de leur conservation.
- Augmentation du rendement et amélioration de la digestibilité.
- Mise au point de nouveaux procédés de fabrication afin d'élaborer de nouveaux produits.

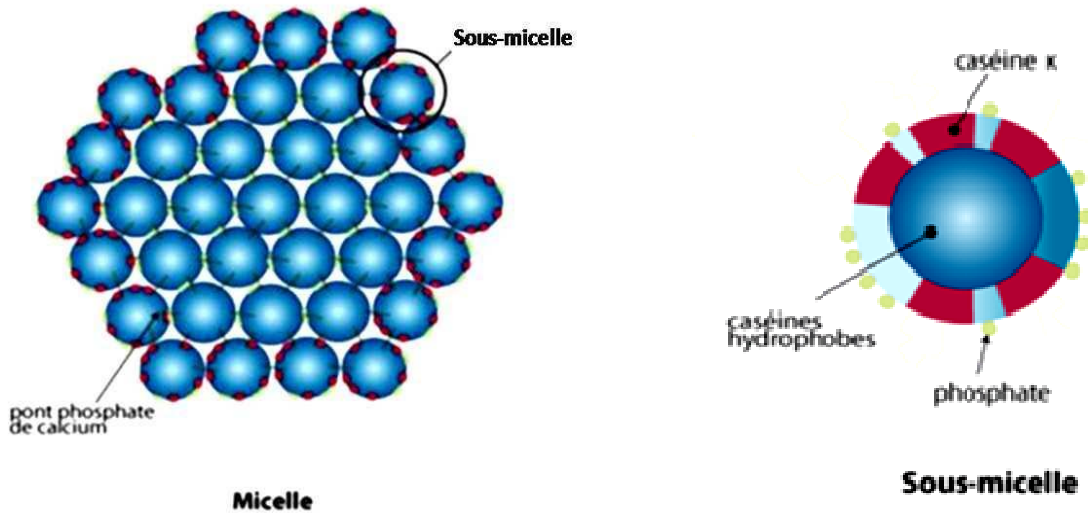
Traditionnellement, la coagulation enzymatique du lait se fait par action de la chymosine extraite des caillettes des veaux non sevrés, cette enzyme qui agit particulièrement sur la caséine  $\kappa$  en hydrolysant préférentiellement la liaison entre Phe105-Met106 (**Guerard, 1987**), assurait jusqu'en 1980 la coagulation d'environ 90% des fromages (**Desmazeaud, 1981**), depuis lors, un certain nombre d'enzymes d'origine microbienne est utilisé.

En plus de son action sur la caséine  $\kappa$ , la chymosine agit sur les autres caséines :

- Au niveau de la caséine  $\alpha_1$ , elle hydrolyse particulièrement la liaison entre Phe23 et Phe24, Phe 24 et Val25,







**Figure 14** : Représentation de la micelle de caséine (Bouquelet, 2008)

- Les différentes formes de caséine

Le fractionnement de la caséine a montré qu'elle était formée de trois ensembles de molécules:  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  dans l'ordre décroissant de leur mobilité électrophorétique. En 1956, Waugh démontre que la caséine  $\alpha$  est formée de deux types de protéines,  $\alpha_s^3$  et  $\kappa$ . Les améliorations des méthodes de séparation des protéines a permis de démontrer, que l'ensemble  $\alpha_s$  est constitué de plusieurs types de molécules réparties en deux groupes  $\alpha_{s1}$  et  $\alpha_{s2}$ , de même  $\kappa$  est apparue constituée d'un composant mineur et d'un autre majeur (Mathieu, 1998) (Tableau 4).

**Tableau 4**: Les différentes formes de caséines de lait de vache (Mathieu, 1998)

Caséines	Formes correspondantes						
$\alpha_{s1}$	$\alpha_{s0}$	$\alpha_{s1}$					
$\alpha_{s2}$	$\alpha_{s2}$	$\alpha_{s3}$	$\alpha_{s4}$	$\alpha_{s5}$	$\alpha_{s6}$		
$\beta$							
$\kappa$	$\kappa_0$	$\kappa_1$	$\kappa_2$	$\kappa_3$	$\kappa_4$	$\kappa_5$	$\kappa_6$
	$\kappa_1$	$\kappa_2$	$\kappa_3$	$\kappa_4$	$\kappa_5$	$\kappa_6$	$\kappa_7$
$\gamma$	$\gamma_1$	$\gamma_2$	$\gamma_3$				

<sup>3</sup>  $\alpha_s$ : caséine (s= sensible) qui précipite à toutes températures à pH=7 dans une solution aqueuse dont la concentration en ions  $Ca^{2+}$  est égale à celle du lait.

La distinction entre les différentes formes de caséines se fait par le nombre de groupement phosphate liés à certains de leurs acides aminés (Vidal et al., 1998)

- $\alpha_{s2}$  est identique à  $\alpha_{s1}$  possédant un composé phosphoséryle supplémentaire
- Les  $\alpha_{s2}$  se différencient entre elles par le nombre de groupements phosphate qui augmente de  $\alpha_{s2}$  (10) à  $\alpha_{s6}$  (13).
- La caséine  $\kappa$  existe sous sept formes qui se distinguent par leur richesse croissante en glucide, et selon l'ordre des résidus osidiques en nombre identique les fractions peuvent être classées différemment ce qui donne un nombre de fractions supérieur à sept.
- La caséine  $\gamma$  est un ensemble de trois peptides qui sont des fragments C-terminaux de la caséine  $\beta$ , le fragment  $\gamma_1$  est le seul à posséder un résidu de phosphosérine.

Si l'on prend en compte toutes les différences qui existent entre ces caséines c'est une bonne cinquantaine de molécules de caséines qui ont été mises en évidence mais au total, la caséine est composé de quatre constituants majeurs par leurs pourcentage et de plusieurs constituants mineurs (Tableau 5).

**Tableau 5:** Les constituants majeurs de la protéine de lait de vache (Mathieu, 1998)

Fraction	g/100 g de caséine totale
$\alpha_{s1}$	37
$\alpha_{s2}$	11
$\beta$	34
$\kappa$	12
$\gamma$	4
Constituants mineurs	2

### 3.4.2.2. Les protéines solubles

Nettement moins abondantes que les caséines, les protéines solubles ne représentent que 15 à 22 % des protéines du lait de vache et 17% de la matière azotée totale. Dans les mêmes conditions de précipitation des caséines, ces protéines restent en solution et en suspension dans le sérum du lait, elles se distinguent des caséines par leur composition, leur structure et diverses propriétés:

- Excellente valeur nutritionnelle due à leur teneur élevée en lysine, tryptophane et cystéine;
- Fixent peu d'ions et résistent à l'action des protéases lorsqu'elles ne sont pas dénaturées;
- Sont plus sensibles à la chaleur que les caséines ;
- Leur solubilité dépend de la teneur en sels de leur solution (**Mathieu, 1998**).

### 3.4.3. Le lactosérum

Le lactosérum ou petit lait est le liquide qui s'écoule de la masse protéique formée après coagulation du lait par acidification chimique, hydrolyse enzymatique ou acidification biologique (**Mahaut et al. 2000**).

Il contient les protéines solubles,  $\beta$ -lactoglobuline,  $\alpha$ -lactalbumine, sérumalbumine, immunoglobulines, protéoses-peptones.

#### 3.4.3.1. La composition chimique du lactosérum

La composition chimique du lactosérum varie selon le procédé de fabrication du fromage, donc des méthodes de coagulation. Celles-ci sont obtenues soit par acidification, soit par action d'une enzyme soit mixte. La composition chimique d'un litre de lactosérum est présentée dans le **tableau 6**.

**Tableau 6** : Composition chimique du lactosérum (**Scriban, 2009**)

Paramètre	
Lactose	38-57 g/l
Matière grasse	1,5- 2 g/l
Matière azotée totale (MAT)	4,8- 11 (g/l)
Matière sèche totale (MST)	5,5- 7,5 (%)
Calcium	0,3- 2,1 (g/l)
Phosphore	0,3- 1 (g/l)

### **3.4.3.2. Intérêt industriel du lactosérum**

Longtemps considéré comme déchet, le lactosérum était essentiellement utilisé pour l'alimentation du bétail, mais les problèmes des rejets devenant de plus en plus sévères, de nouveaux procédés de valorisation sont devenus indispensables. Le développement des techniques d'ultrafiltration a permis de répondre en partie à cette contrainte, même si la production mondiale du lactosérum et son élimination dans les cours d'eau est en augmentation constante (**Jacquet-Violleau, 1999**).

Le prétraitement, la concentration et la déminéralisation du lactosérum, ainsi que la séparation et le fractionnement, entre autres, de ses protéiques, ouvrent des perspectives dans la valorisation des constituants du lactosérum, notamment dans le domaine de l'alimentation humaine (**FAO, 1995**), médical (**Bounous, 2000**) et biotechnologique (**Scriban, 2009**).

## **3.5. Action des effecteurs sur les protéases**

### **3.5.1. Température**

L'agitation thermique facilite le franchissement de la barrière d'énergie d'activation, d'où, lorsque l'on augmente la température, la vitesse de réaction augmente mais lorsque la température est trop élevée l'enzyme se dénature.

Dans une zone de température de 0°C à 50°C, la vitesse initiale d'une réaction enzymatique augmente régulièrement d'un facteur constant de l'ordre de 2 à 3 par intervalle de 10°C (**Viratelle, 1993**), ce qui permet à la vitesse d'augmenter de façon linéaire en fonction des températures, mais ceci n'est pas toujours le cas, car certains changements de conformation et donc d'activité enzymatique donnent des courbes non linéaires.

Il est à noter qu'au cours d'un chauffage comme toutes les enzymes, les protéases peuvent subir une oxydation de thiols, hydrolyse de la chaîne polypeptidique après un groupe aspartique, formation de nouvelles liaisons...l'inactivation est alors irréversible (**Pelmont, 1993**).

### **3.5.2. pH**

Le pH du milieu dans lequel se trouve l'enzyme agit sur l'état d'ionisation de nombreux sites internes à la molécule, il peut agir à trois niveaux:

- Sur la structure de l'enzyme

- Sur l'association Enzyme-Substrat
- Sur le mécanisme réactionnel

Un pH trop acide ou trop basique dénature la protéine (**Viratelle, 1993**).

L'existence d'un pH optimum suggère qu'au moins deux groupes ionisables ayant deux pK différents sont impliqués. Dans un grand nombre de cas le  $K_m$  d'une réaction enzymatique n'est pas affecté par le pH contrairement à sa  $V_m$  qui atteint son maximum et laisse penser que les groupements ionisables participent à l'activation du complexe enzyme-substrat mais pas à sa formation (**Holm et Peck, 1998**).

### 3.5.3. Inhibiteurs

Les inhibiteurs enzymatiques sont des molécules qui en se liant aux enzymes diminuent l'activité de cette dernière. Ils peuvent empêcher la fixation du substrat sur le site actif en se fixant à sa place et forme alors avec l'enzyme un complexe binaire, ils peuvent également provoquer une déformation de l'enzyme en la rendant inactive (cas des inhibiteurs allostériques). Les inhibiteurs peuvent être ou non des analogues structuraux des substrats de l'enzyme. Selon le type de complexe enzyme-inhibiteur formés en présence de l'enzyme et/ou du substrat et la modification de la cinétique qu'ils entraînent, les inhibiteurs sont qualifiés de compétitifs, incompétitifs, non compétitifs ou mixtes (**Pelmont, 1993**).

Comme exemple d'inhibiteurs de certaines protéases de *Penicillium camemberti*, l'EPNP qui inhibe l'asparyl protéase et l'EDTA qui inhibe la métalloprotéase (**Mechakra, 2001**).

## 4. Techniques de purification des enzymes

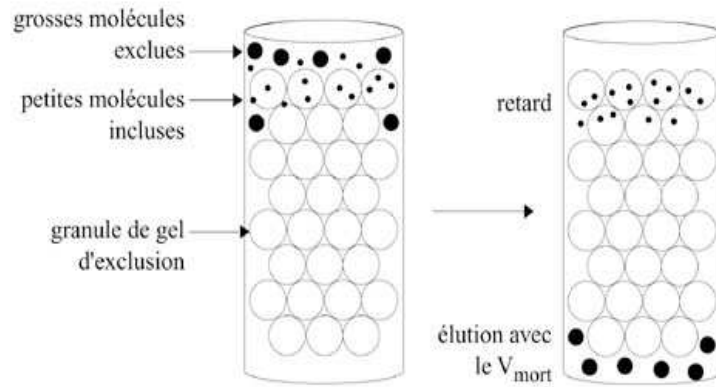
### 4.1. Chromatographie d'exclusion moléculaire

C'est une technique basée sur la séparation des molécules au travers de gel poreux en fonction de leurs tailles.

Les grosses molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues de la colonne les premières, donc éluées dans le volume mort  $V_0^4$ , les petites et moyennes sont éluées plus tardivement car leur migration est freinée par leur inclusion dans le gel (**Figure 15**).

---

<sup>4</sup>  $V_0$  = Volume d'eau (tampon) externe aux granules de gel.



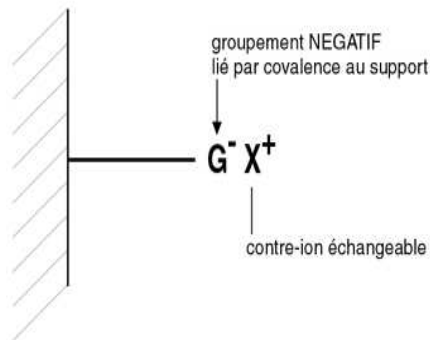
**Figure 15** : Tamisage moléculaire (Anonyme 5, 2010)

## 4.2. Chromatographie échangeuse d'ions

Cette chromatographie se fait avec des résines échangeuses d'ions, qui ont la capacité, grâce aux groupements ionisables qu'elles portent, d'échanger certains de leurs ions avec d'autres ions provenant d'une solution. Il existe deux types de résines : résines cationiques et résines anioniques (Figure 16 et 17).

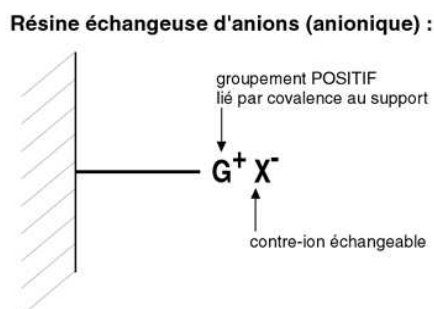
**4.2.1. Résine cationique** : chargée négativement, elle échange réversiblement des cations (exemple : DEAE-Cellulose).

### Résine échangeuse de cations (cationique) :



**Figure 16** : Résine échangeuse de cations (Anonyme 5, 2010)

**4.2.2. Résine anionique :** Chargée positivement, elle échange réversiblement des anions (exemple : CM-Cellulose).

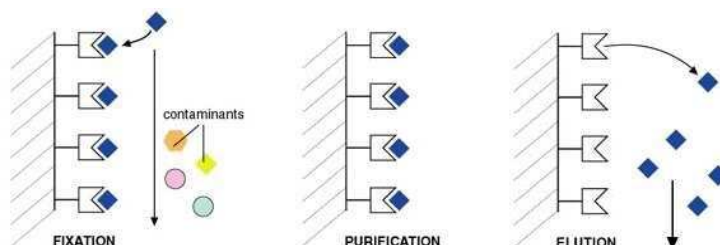


**Figure 17 :** Résine échangeuse d'anions (Anonyme 5, 2010)

Une fois les ions recherchés fixés sur la résine, il est possible de les décrocher par élution et ce en appliquant un gradient de pH ou de sel avec des ions de charge plus élevée :  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ , ...

### 4.3. Chromatographie d'affinité

Cette technique est basée sur l'affinité que possède la molécule à séparer vis-à-vis de l'effecteur greffé sur la phase stationnaire, ce qui permet à la molécule de se lier au support de façon stable. (Figure 18). Cette chromatographie peut utiliser d'affinités : enzyme-substrat, ligand-récepteur et antigène-anticorps.



**Figure 18:** Les étapes de la chromatographie d'affinité (Seve, 2010)

- **Étape de fixation:** Une fois le mélange contenant le composé à purifier est chargé sur la colonne, seule la molécule présentant une affinité pour l'effecteur greffé sur la phase stationnaire est retenue.
- **Étape de purification:** Le passage du tampon de façon continue dans la colonne permet d'éliminer et d'éluer toutes les molécules contaminantes.
- **Étape d'élution:** La molécule purifiée est décrochée de la colonne et est recueillie dans l'éluât.



#### **4.4. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)**

L'électrophorèse est une technique de séparation des constituants ionisés dans un champ électrique, également appelée gel électrophorèse en conditions dénaturantes (**Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis= SDS-PAGE**) (**Laemmli, 1970**), elle a pour but de séparer les molécules chargées au travers d'un gel sous l'effet d'un courant électrique. Les molécules se déplacent alors vers le pôle de charge opposée à leur charge nette à une vitesse proportionnelle à cette charge.

Cette technique permet entre autres de:

- Déterminer le nombre de sous unité d'une protéine et leur masse molaire respective
- Évaluer le degré de purification d'une protéine
- Séparer les protéines pour les révéler par la technique du Western blot

La SDS-PAGE est une technique qui permet la séparation des protéines dénaturées par un agent réducteur ( $\beta$ -mercaptoéthanol) qui réduit les ponts disulfures, et par un détergent anionique fort (le sodium dodécyl sulfate (SDS) qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives, ces dernières se repoussent entre elles et déplient alors les chaînes polypeptidiques. Une fois dénaturées les protéines sont séparées sur gel polyacrylamide en présence de SDS. La réaction de polymérisation est initiée par la formation de radicaux libres par le persulfate d'ammonium (APS) catalysée par le N,N,N',N'-tétraméthyl-1,2-diaminométhane (TEMED).

Remarque: Plus le pourcentage de bis-acrylamide est élevé plus les mailles des chaînes sont serrées et moins les molécules volumineuses peuvent migrer.

#### **5. Optimisation et modélisation de la production d'enzymes par les microorganismes**

Pour retrouver les conditions optimales de production d'un métabolite par les microorganismes, quelque soit le cadre dans lequel celui-ci sera utilisé, une bonne connaissance des différents paramètres maîtrisables et leur contrôle est nécessaire afin de pouvoir modéliser le système de production.

Ainsi la méthodologie de la recherche expérimentale impose dans un premier lieu le recensement des paramètres importants pour la production puis la détermination de leurs optima en fonction des réponses souhaitées (**Larpent et Sanglier, 1989**). Pour cela plusieurs

plans sont utilisés, parmi ceux-ci, les matrices d'expériences de Plackett et Burman (1946) dites matrices d'Hadamard, et le plan composite centré de Box et Wilson (1951) ; appliqués par de nombreux auteurs pour l'optimisation du milieu de production des enzymes comme la lipase (Venil et al., 2009) et l'alpha amylase (Dacheva et al., 2009).

**5.1. Matrices d'expériences de Plackett et Burman**

Ces matrices permettent d'évaluer l'influence de k facteurs à 2 niveaux sur la réponse étudiée avec un nombre d'expérience N tel que  $N = k+1$ , avec un minimum d'essai. Ce sont des matrices contenant des éléments égaux à +1 ou -1 et possédant toutes les propriétés d'optimalité: orthogonalité, isovariance par rotation, estimations de coefficients et des réponses calculées avec la meilleure précision. Les facteurs de la dernière expérience étant toujours pris à niveau -1 (Tableau 7).

**Tableau 7 :** Générateurs des matrices d'Hadamard pour N=8, 12, 16, 20 et 24 essais (Plackett et Burman, 1946)

Nombre d'essai	Niveaux
N= 8	+++--+--
N=12	++-+++----+-
N=16	+++++--+-----
N=20	++-+++++--+-----+-
N=24	+++++--+--+-----+-

*+1: Niveau supérieur, -1: niveau inférieur*

Les réponses Y sont représentées par une fonction de la forme:

$$Y = \text{Constante} + \sum \alpha_i X_i + \text{erreur}$$

Où:

$\alpha_i$  représente les coefficients de régression à déterminer, il varie de 1 à k et  $X_i$  représente les valeurs des variables explicatives.

L'effet de chaque facteur est déterminé par la différence entre la moyenne des réponses au niveau supérieur (+1) et la moyenne des réponses au niveau inférieur (-1).

$$E = \frac{\sum \text{réponse au niveau (+1)}}{6} - \frac{\sum \text{réponse au niveau (-1)}}{6}$$

La variance est déterminée par la moyenne des erreurs:  $V_i = \frac{\sum(\text{erreurs})^2}{n}$  où n est le nombre des erreurs.

L'erreur standard représente la racine carrée de la variance et est définie par l'équation suivante:  $ES = \sqrt{V_i}$

## 5.2. Plan composite centré

La recherche des valeurs optimales, si le modèle linéaire obtenu par le plan de Plackett et Burman est satisfaisant, peut s'effectuer selon des plans d'expériences qui permettent, tout en utilisant un grand nombre de facteurs, de minimiser le nombre d'expériences (**Box et Wilson (1951) ; Myers (1971) ; Pilat et al., (1976) et Box et Draper (1987).**

Le plan composite centré de Box et Wilson permet la détermination d'un polynôme quadratique, où chaque facteur est étudié au moins à trois niveaux, ce qui exige un nombre imposant de combinaison grâce à un plan  $3^k$ .

Un tel plan est composé de trois parties:

- Un plan factoriel à deux niveaux (-1, +1)
- $2^k$  points en étoile avec des niveaux  $-\alpha$  et  $+\alpha$
- n répétitions du point central (niveau 0) (généralement limité de 3 à 5)

La valeur de  $\alpha$  est fonction du nombre de facteurs, du fractionnement du plan, des critères d'orthogonalité et de l'isovariance par rotation.

Ce plan permet d'exprimer l'effet des facteurs sur la production du métabolite recherché sous forme d'équation du second degré du type:  $Y = b_0 + b_i X_i + b_{ij} X_{ij} + b_{ij} X_{ij}^2 + e$

Où:

Y: réponse expérimentale

$b_0$ : valeur moyenne des réponses

$b_i$ : effet principal du facteur  $X_i$

$b_{ij}$ : effet d'interaction des deux facteurs  $X_i$  et  $X_j$

e: erreur expérimentale

Les valeurs des coefficients sont déterminées par un programme de régression multilinéaire, les dérivés par rapport à 0 permettent de déterminer les extremums (**Larpent et Sanglier, 1989**).

## **Chapitre 2**

### ***Matériel et méthodes***

## **6. Matériel biologique**

Les souches de moisissures utilisées dans ce travail, sont isolées à partir du sol de la forêt de « Djebel El Ouahch », Constantine, Algérie et identifiées par CONIDIA, Lyon, France.

### **6.1. Méthode d'isolement des souches**

1 g de sol est introduit dans un tube en verre contenant 10 ml d'eau physiologique. Le mélange est homogénéisé grâce à un agitateur Vortex GENIE 2, (Scientific Industries), puis déposé quelques minutes dans un portoir pour décanter. Une goutte de la suspension est alors déposée sur une boîte contenant le milieu nutritif Sabouraud (Fluka), puis est étalée sur toute la surface à l'aide d'un étaloir.

Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C, pendant 2 à 3 jours. Dès qu'une souche pure apparaît, elle est repiquée sur le même milieu. L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à isolement de souches différentes sans contaminants.

### **6.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique des souches sur la caséine du lait**

La capacité des différentes souches isolées, 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 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, chaque souche est déposée à part, au milieu de la boîte, et incubée à 25°C pendant 72 heures.

Après incubation, l'hydrolyse de la caséine est représentée par un halo blanc autour de la culture, elle est significative si le diamètre du halo est supérieur ou égal à 3 mm.

### **6.3. Identification des souches**

Les souches ayant une activité protéolytique sur gélose au lait sont identifiées par le laboratoire CONIDIA, Lyon, France.

Les souches sont cultivées sur milieu MEA supplémenté en chloramphénicol, le milieu est incubé à 25°C. Après incubation les moisissures sont analysées suivant le mode opératoire MO-023 du laboratoire CONIDIA. Une identification par biologie moléculaire (travail sur séquence ITS) (**Annexe 1**) est réalisée suivant un protocole par comparaison des séquences obtenues avec les résultats des bases de données internationales.

D'autres renseignements sont obtenus en réalisant des repiquages de chaque souche sur milieu spécifique MEAc et après 7 jours d'incubation à 25°C, des observations macroscopiques et microscopiques sont réalisés afin d'affiner les résultats.

#### **6.4. Réactivation et sporulation des souches**

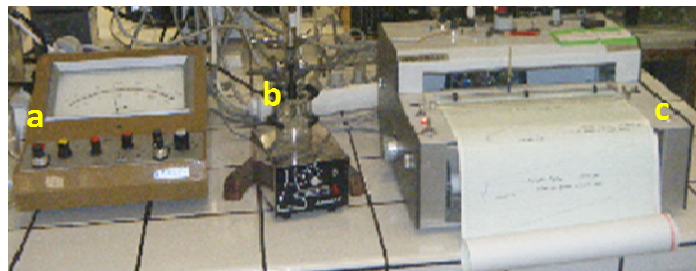
Les différentes souches sontensemencées sur PDA (Fluka) à 25 ° C et repiquées chaque mois afin de les réactiver ou les faire sporuler. Pour le stockage à court terme, elles sont maintenues sur gélose Sabouraud à température ambiante, pour un stockage à long terme, les cultures sous forme de spores sont lyophilisées.

Afin d'obtenir les spores (les inocula), chaque moisissure est repiquée sur 50 ml de PDA dans des flacons de 250 ml. Après 6 jours d'incubation à 25 ° C, 50 ml d'eau milliQ sont rajoutés. Les spores sont alors suspendues sous agitation, comptées dans une cellule de Malassez et conservées à +4 °C.

### **7. Méthodes de dosage**

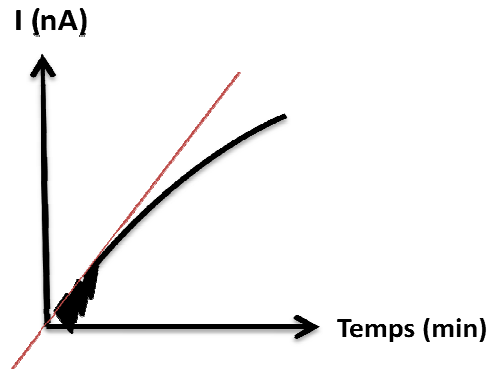
#### **7.1. Dosage du lactose**

La concentration de lactose dans le lactosérum et les différents filtrats après culture est mesurée électrochimiquement. La réaction entre les enzymes et le lactose libère une molécule de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui est alors dosée grâce à une électrode (**Figure 19**).



**Figure 19** : Voltmètre (a) avec électrode (b) (TACUSSEL électronique polarostate) Type PRGE couplé à un enregistreur (c) (SERVOTRACE SEFRAM type PE)

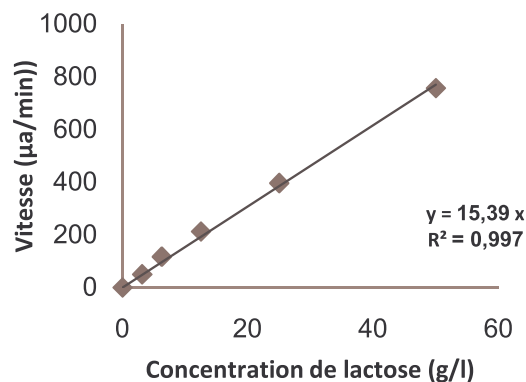
Le tracé (**Figure 20**) reporte la variation de courant dû à l'apparition des molécules de  $H_2O_2$  produites lors de la dégradation du lactose et la production de glucose en fonction du temps. La pente est exprimée en nA/min.



**Figure 20** : Tracé obtenu grâce à l'enregistreur

Les différentes mesures pour tracer la courbe d'étalonnage (**Figure 21**) sont réalisées comme suit: L'électrode est mise dans 10ml de tampon acétate 0,1 M KCl 0,1 M, pH 5,5, après stabilisation du potentiel, plusieurs injections des différentes dilutions de solution de lactose (50g/l) (Sigma-Aldrich) en présence de Glucose Oxydase (50 $\mu$ l) et  $\beta$ -galactosidase (500 $\mu$ l) sont réalisées et la sensibilité du système aux molécules de  $H_2O_2$  libérées est détectée.

Le lactose dans l'échantillon est dosé selon le même protocole, la valeur de la vitesse est reportée sur le graphe afin de déterminer la concentration de lactose correspondante.



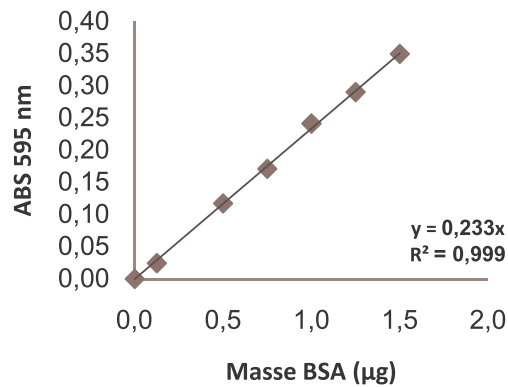
**Figure 21** : Courbe d'étalonnage du lactose



### 7.2. Dosage des protéines

Le taux de protéines est déterminé par la méthode de Bradford (1976) en utilisant la sérum albumine bovine (Sigma-Aldrich) comme standard.

Une gamme étalon est établie (Figure 22) à partir d'une solution de protéines à 25µg/ml, en présence de bleu de Coomassie R (Sigma-Aldrich). La lecture des absorbances se fait à 595 nm dans un lecteur de plaques (TECAN, Infinite M200).



**Figure 22** : Courbe d'étalonnage des protéines

Les protéines dans l'échantillon sont déterminées dans 5µl d'échantillon mélangé à 75 µl d'eau pure et 20µl de bleu de Coomassie.

### 7.3. Détermination de la matière grasse

Ce dosage est réalisé dans une ampoule à décanter en se servant d'un évaporateur rotatif (Rotavapor®) (Figure 23). Il est basé sur la méthode Röse-Gottlieb (1960) qui correspond à un dosage par pesée après extraction éthéro-ammoniacale.



**Figure 23** : L'évaporateur rotatif utilisé

L'association entre les lipides et les protéines dans l'échantillon est déstabilisée par de l'éthanol qui dénature les protéines, et de l'ammoniaque qui permet de les solubiliser

afin qu'elles ne gênent pas l'extraction des lipides par l'éther. Après l'extraction l'éther de pétrole est rajouté afin d'éliminer au maximum l'eau présente dans le milieu.

Dans une ampoule à décanter le mélange qui suit est introduit et mélangé par rotation :

- 10ml d'échantillon
- 1ml d'ammoniaque pure
- 1ml d'éthanol à 95%
- 25ml d'éther éthylique en agitant fortement par retournement
- 25ml d'éther de pétrole en agitant fortement par retournement

L'ampoule est laissée de côté jusqu'à séparation nette des deux phases, la phase supérieure doit être limpide. La phase inférieure est récupérée dans un bécher et la phase supérieure est filtrée sur 1g de sulfate d'ammonium et mise à évaporer sous la hotte.

Une deuxième extraction est nécessaire et est réalisée sur la phase aqueuse inférieure de la même façon en rajoutant successivement 15ml d'éther éthylique et 15ml d'éther de pétrole. Après évaporation, la capsule est déposée dans l'étuve à 100°C, puis pesée et la teneur en matière grasse est déduite en g pour 100ml de lactosérum.

#### **7.4. Détermination de la matière sèche**

La teneur en humidité est déterminée par la perte de poids après dessiccation par la chaleur (**Lecoq, 1965**).

L'échantillon est introduit dans une capsule séchée et préalablement tarée puis portée dans une étuve à 105°C pendant 20 heures. Elle est ensuite refroidie au dessiccateur puis pesée.

Les échantillons sont remis dans l'étuve pendant 1 heure et pesés de nouveau plusieurs fois jusqu'à stabilisation du poids.

#### **7.5. Détermination de la matière minérale**

La teneur en matière minérale est conventionnellement le résidu de la substance après incinération à une température de  $(500 \pm 5^\circ\text{C})$  (**Lecoq, 1965**).

Les capsules contenant la prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche sont portées au four à moufle, chauffées progressivement afin d'obtenir une carbonisation lente sans inflammation de la masse à  $(500 \pm 5^\circ\text{C})$  pendant 5 heures,

l'incinération est poursuivie jusqu'à l'obtention d'un résidu gris clair. Les capsules sont refroidies dans le dessiccateur puis pesées.

Les cendres exprimées en % de masse sont données par la formule :  $(E-m) \times 100/E$

Où:

- E est la masse initiale de la prise d'essai (g)
- m : masse en gramme du résidu après incinération

### **7.6. Détermination des chlorures**

10ml de lactosérum, 5ml d'azotate d'argent et 10ml de permanganates de potassium sont introduits dans un erlenmeyer. La solution obtenue est portée à ébullition jusqu'à décoloration. Après refroidissement, 50ml d'eau et 5ml d'une solution d'alun de fer ammoniacal sont ajoutés et le tout est titré par une solution de sulfocyanate de Potassium 0,1N jusqu'à coloration rose persistante. La teneur en chlorures est exprimée en g de NaCl par litre et calculée selon la formule suivante :  $(5-n) 0,585$ . (n : volume en litre du sulfocyanate de Potassium 0,1N) (**Lecoq, 1965**).

### **7.7. Détermination du phosphore**

Dans un premier temps, 100ml de lactosérum et une goutte de phénolphthaléine sont introduits dans un erlenmeyer, puis quelques gouttes d'acide sont rajoutées jusqu'à disparition de la couleur rose. Le mélange est autoclavé pendant 30 min à P 15-20 kg, refroidi et neutralisé par de la soude normale jauger à 100ml avec de l'eau. 4ml de réactif molybdinique et 0,5ml d'une solution de chlorures stanneux sont ensuite rajoutés. La lecture est faite après 10min d'incubation à 690m $\mu$ . La teneur en P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> est exprimée en mg/l (**Lecoq, 1965**).

### **7.8. Détermination du calcium et magnésium**

Pour le calcium, 50ml de lactosérum, 2,5ml de tampon ammoniacal, 1ml de complexonate de magnésium à 1% et quelques gouttes de noir euriochrome sont introduits dans un erlenmeyer, la solution est chauffée à 40°C puis titrer avec de l'EDTA 0,01M jusqu'à virage du rouge au bleu (1ml d'EDTA 0,01M correspond à 0,05mEq de Ca ou Mg).

Pour le magnésium, 100ml de lactosérum sont introduits dans une fiole puis complétés à 110ml avec une solution d'oxalates d'ammonium à 5%, après 30 min. de repos, le mélange est filtré.

50ml du filtrat sont alors titrés comme précédemment sans rajouter le complexonate de Mg (Lecoq, 1965).

## 8. Méthodes d'optimisation de la production des protéases

### 8.1. Plan d'expériences de Plackett et Burman

Le plan choisi est à 11 facteurs : 7 réels et 4 erreurs ; chaque facteur est à 2 niveaux différents (-1, +1). Il permet d'évaluer leur effet sur la réponse attendue, à savoir, la production de protéase coagulante (Tableau 8).

**Tableau 8** : Matrice d'expériences de Plackett et Burman à k=11 et N=12 (Plackett et Burman, 1946)

Facteurs Essais	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	(X <sub>3</sub> )	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	(X <sub>6</sub> )	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	(X <sub>9</sub> )	X <sub>10</sub>	(X <sub>11</sub> )
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*+1: Niveau supérieur, -1: niveau inférieur*

Tous les essais sont réalisés à deux niveaux -1 et +1, ce qui permet à chaque facteur d'avoir deux concentrations différentes (Tableau 9).

**Tableau 9** : Les facteurs et leurs niveaux

Facteurs	Niveau -1	Niveau +1
<b>Essais</b>		
X <sub>1</sub> : pH	4	5
X <sub>2</sub> : agitation	100 rpm	160 rpm
X <sub>3</sub> : Erreur	/	/
X <sub>4</sub> : Lactose	25 g/l	50 g/l
X <sub>5</sub> : Extrait de levure	5 g/l	10 g/l
X <sub>6</sub> : Erreur	/	/
X <sub>7</sub> : Ca Cl <sub>2</sub>	0 g/l	1 g/l
X <sub>8</sub> : Peptone de viande	5 g/l	10 g/l
X <sub>9</sub> : Erreur	/	/
X <sub>10</sub> : Sels: Mg SO <sub>4</sub>	0 g/l	0,2 g/l
FeSO <sub>4</sub>	0 g/l	0,1 g/l
X <sub>11</sub> : Erreur	/	/

Une fois les concentrations des facteurs de supplémentation du milieu établies, les fermentations sont lancées. Ces dernières sont réalisées en erlenmeyers de 250ml, à raison de 50 ml par erlen.

Après 4 jours d'incubation à 25°C, les filtrats sont récupérés et différents dosages sont réalisés, à savoir, volume du filtrat, pH, lactose, biomasse, protéines et activité enzymatique.

Tous les résultats sont alors traités par un logiciel statistique Minitab 3.2 afin de déterminer les facteurs ayant un effet positif sur la biomasse, la production protéique et enzymatique.

Une fois les facteurs obtenus un autre plan statistique est appliqué afin d'optimiser ces facteurs, c'est le plan composite centré de Box et Wilson.

### 8.2. Plan composite centré de Box et Wilson

Lorsque le modèle linéaire obtenu par le plan de Plackett et Burman est satisfaisant, la recherche des valeurs optimales est effectuée selon le plan composite centré de Box et Wilson (1951).

Ce plan permet la détermination d'un polynôme quadratique, où chaque facteur est étudié au moins à trois niveaux.

La valeur de  $\alpha$  qui dépend du nombre de facteur X est de 1.628 lorsque les facteurs sélectionnés par le plan de Plackett et Burman sont au nombre de trois et égale 1.414 lorsque les facteurs sont au nombre de deux (**Tableaux 10 et 11**).

**Tableau 10** : Matrice d'expérience de Box et Wilson (1951) pour X=3

Essai	Facteurs		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,682	0	0
10	+1,682	0	0
11	0	-1,682	0
12	0	+1,682	0
13	0	0	-1,682
14	0	0	+1,682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

**Tableau 11** : Matrice d'expérience de Box et Wilson (1951) pour X=2

Essai	Facteurs	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	+1,414	0
6	+1,414	0
7	0	-1,414
8	0	+1,414
9	0	0
10	0	0
11	0	0

En se basant sur les résultats de l'application du plan de Plackett et Burman, et sur les différents niveaux du plan de Box et Wilson :  $-\alpha$ ,  $+\alpha$ ,  $-1$ ,  $+1$  et  $0$ , il est possible de calculer les concentrations des différents facteurs à tous les niveaux précités. Sachant que :

$$X = \frac{\text{facteur ?} - \text{valeur au niveau } 0}{\text{Pas}}$$

Une fois les fermentations arrêtées, les valeurs des coefficients sont déterminées par un programme de régression multilinéaire, les dérivés par rapport à 0 permettent de déterminer les extremums (Box et Wilson, 1951).

## 9. Méthodes de culture

### 9.1. Préparation des milieux de culture

Le lactosérum utilisé dans cette étude est filtré sur papier Wathman et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Au moment des fermentations, le lactosérum est dilué à 1:1 avec 0,1 M de

tampon phosphate, pH 4,0 ou pH 5,0 pour constituer le milieu de culture de base. Ensuite, différents composés sont rajoutés au milieu suivant le plan expérimental,

## **9.2. Ensemencement et conditions de culture**

Toutes les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 250ml stérilisés (120 ° C pendant 20 minutes), contenant 50ml de milieu de culture dans lequel sont ajoutées  $10^6$  spores. Les fermentations sont conduites dans un bain marie-agitateur (BMAT 25-45, FIRLABO) suivant le plan d'expériences, à 25 ° C pendant 4 jours. À la fin de l'expérience, l'activité enzymatique, la biomasse et le taux des protéines sont mesurés.

## **10. Suivi de la cinétique de croissance des souches et fermentations**

La cinétique de croissance et de production des enzymes coagulantes par les différentes souches est suivie sur milieu optimisé dans des erlens de 250ml, à raison de 50ml par erlen, à pH 4.0, dans le bain marie-agitateur à 160 rpm, 25°C.

Deux prélèvements quotidiens sont réalisés sur une période de 7 jours permettant d'établir l'évolution de la croissance mycélienne, du lactose, des protéines et de l'activité enzymatique en fonction du temps.

Les fermentations permettant la production des protéases sont réalisées en erlenmeyers de 500ml, à raison de 100ml par erlen, à pH 4.0, dans le bain marie-agitateur à 160 rpm, 25°C. Au bout d'un certain nombre de jours dépendant des résultats de la cinétique, les fermentations sont arrêtées et les filtrats récupérés afin de réaliser les dosages qui suivent, à savoir l'extraction et la purification des enzymes.

## **11. Extraction des enzymes protéolytiques**

### **11.1. Préparation des extraits bruts**

L'extrait brut est récolté après fermentation, par filtration du milieu de culture sur papier Wathman n°1, le mycélium est récupéré, rincé puis pesé, et le volume du filtrat est mesuré, puis le liquide est utilisé pour les différents dosages.



### 11.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-25

La première étape de purification de l'enzyme est une chromatographie d'exclusion moléculaire. Le filtrat obtenu après fermentation est passé sur colonne (8 cm- 1,5 cm) contenant du Sephadex G-25 M (AMERSHAM Biosciences). La colonne est équilibrée et le mélange élué par du tampon acétate 50 mM, pH 3.8.

Les fractions de 2 ml sont récoltées au fur et à mesure que le pic d'exclusion moléculaire apparaît sur l'enregistreur couplé au détecteur UV relié à la pompe (Figure 24).



**Figure 24** : Le montage de la chromatographie d'exclusion moléculaire : La colonne est reliée à la pompe et à l'enregistreur couplé au détecteur UV.

### 11.3. Chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-Sepharose

Les fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire et qui présentaient une activité coagulante et une activité enzymatique ont été chargées sur colonne contenant du DEAE-Sepharose (8 cm- 1,5 cm) (PHARMACIA), qui a été préalablement équilibrée par du Bis-tris 20 mM, pH 8.35. L'éluion est réalisée par gradient de sel en utilisant le même tampon contenant du NaCl de 0-0.5 M. À chaque gradient des fractions sont récoltées, leurs activités coagulante et enzymatique sont déterminées.

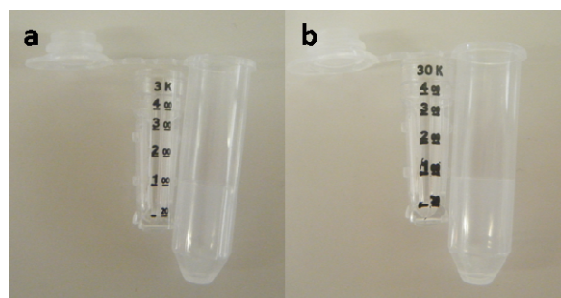
### 11.4. Chromatographie d'affinité sur pepstatine-A agarose

Dans le cas de notre enzyme, l'affinité est du type enzyme-ligand, qui suit les trois étapes de chromatographie d'affinité suivantes :

- Fixation : Les fractions issues de la chromatographie échangeuse d'ions et qui présentent une activité coagulante sont chargées sur la colonne (6.5 cm- 9 mm) contenant un gel sur lequel est greffée la pepstatine A (Pepstatine A-agarose) (Sigma-Aldrich) préalablement équilibrée par du tampon acétate 50 mM, pH 3.8.
- Purification : elle commence par le lavage de la colonne plusieurs fois par le même tampon pour éliminer toutes les molécules contaminantes avant de procéder à l'élution de l'enzyme fixée sur le gel.
- Éluion : elle est réalisée grâce au tampon Tris (MERCK)/Hcl 50 mM, NaCl 0.5 M pH 7.0, les fractions sont récoltées au fur et à mesure que le pic d'élution apparaît sur l'enregistreur couplé au détecteur UV relié à la pompe, leurs activités coagulante et enzymatique sont déterminées (Sarkkinen *et al.*, 1992 ; Geier *et al.*, 1999 ; Arnoštová *et al.*, 2001 ; Sabotič *et al.*, 2009).

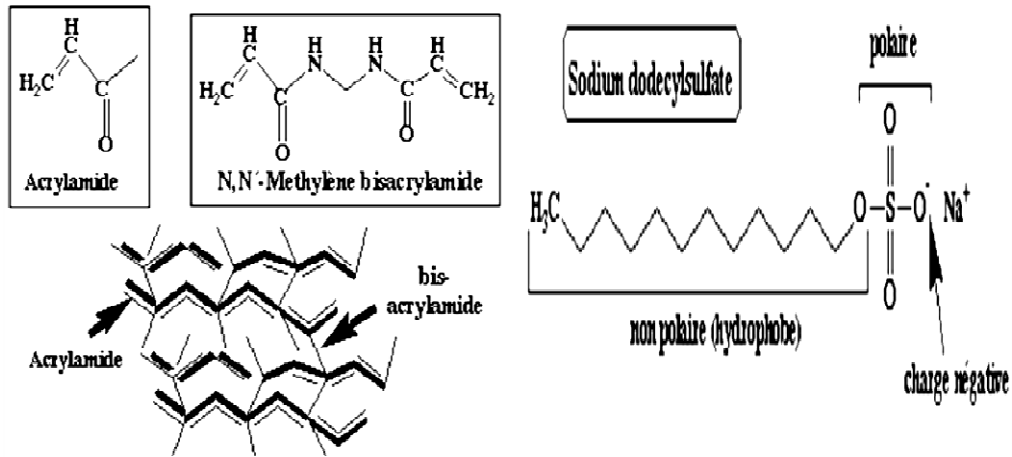
#### 11.5. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Après la chromatographie puis la détermination des activités enzymatiques et coagulantes des fractions, les protéines sont concentrées par filtration sur des tubes à membrane Eppendorf Amicon-Ultra 500 $\mu$ l, 3 KDa et 30KDa, (**Figure 25**) afin de les séparer par électrophorèse.



**Figure 25** : Tubes Eppendorf, 3KDa (a) et 30 KDa (b)

La séparation des protéines se fait en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide obtenu par polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide (**Figure 25**) en présence d'un détergent anionique fort le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (**Figure 26**).



**Figure 26** : Gels et détergent (Acrylamide et SDS) (Anonyme 6, 2010)

Le gel est coulé entre deux plaques de verre fixées sur un support ; un peigne est enchâssé entre ces plaques, après polymérisation du gel le peigne est retiré formant ainsi des puits. Le pourcentage d'acrylamide détermine la gamme de séparation (**Tableau 12**). Dans notre cas, nous avons utilisé un gel à 12%.

**Tableau 12** : Pourcentage d'acrylamide et gamme de séparation en KDa correspondante

Pourcentage d'acrylamide	Gamme de séparation en KDa
7,5	45-400
10	22-300
12	13-200
15	2,5-100

Les plaques de verre contenant le gel polymérisé sont placées dans la cuve d'électrophorèse (Bio-rad Laboratories GmbH) contenant le tampon conducteur (Tris 50mM-Glycine 0.2M-SDS 0.1%, pH8, 3-8,8) (**Figure 27**).



Figure 27 : Dispositif d'électrophorèse (Anonyme 6, 2010)

Le mélange de protéines est mis à bouillir en présence d'un agent réducteur le Dithiothreitol (DTT) et un tampon de charge (Bio-rad Laboratories GmbH). Puis chaque échantillon de protéines dénaturées est déposé à raison de 20 µl par puits. La migration se fait dans un champ électrique variant entre 80V et 120V.

Après migration, le gel est démoulé et les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie (Sigma-Aldrich).

La masse des protéines est déterminée à l'aide du marqueur (Euromedex) qui est un ensemble de protéines de masses molaires connues.

## 12. Propriétés technologiques des protéases

### 12.1. Tests de coagulations

Les tests de coagulation des différents laits (lait de vache UHT, lait de vache frais, et lait de chèvre UHT) ont été réalisés selon la méthode de **Berridge (1952)** ; et qui repose sur la mesure du temps d'apparition de petits flocons dans un mince film de lait s'écoulant sur la paroi d'un tube contenant le substrat à 35°C après addition de la solution coagulante.

L'unité d'activité coagulante (U.A.C) ou unité présure (UP) est définie comme étant la quantité d'enzyme par millilitre d'extrait enzymatique qui provoque la floculation de 10 ml de substrat et elle est calculée comme suit :  $UP = 10 \times V/T_c \times Q$

Où :

UP = Unité Présure

V = Volume de substrat utilisé (ml)

Tc = Temps de coagulation (secondes)

Q = Volume d'extrait coagulant (ml)

L'activité coagulante peut être également exprimée en « force coagulante de SOXHLET » (F), selon la relation suivante :  $F = UP/0,0045$  (**Bourdier et Luquet, 1981**).

### **12.2. Comparaison des résultats de la coagulation avec celle réalisée avec la présure**

Après coagulation des différents laits une comparaison avec la coagulation des laits avec la présure s'impose, et ce pour déterminer les différences entre les temps de coagulation, l'aspect des caillés et leurs couleurs.

### **12.3. Effet des enzymes produites sur les caséines de lait**

L'effet des enzymes produites par fermentations à partir des six souches, est visualisé sur gel de polyacrylamide par électrophorèse SDS-PAGE, après incubation des différentes enzymes en présence de caséine totale,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  (Sigma-Aldrich).

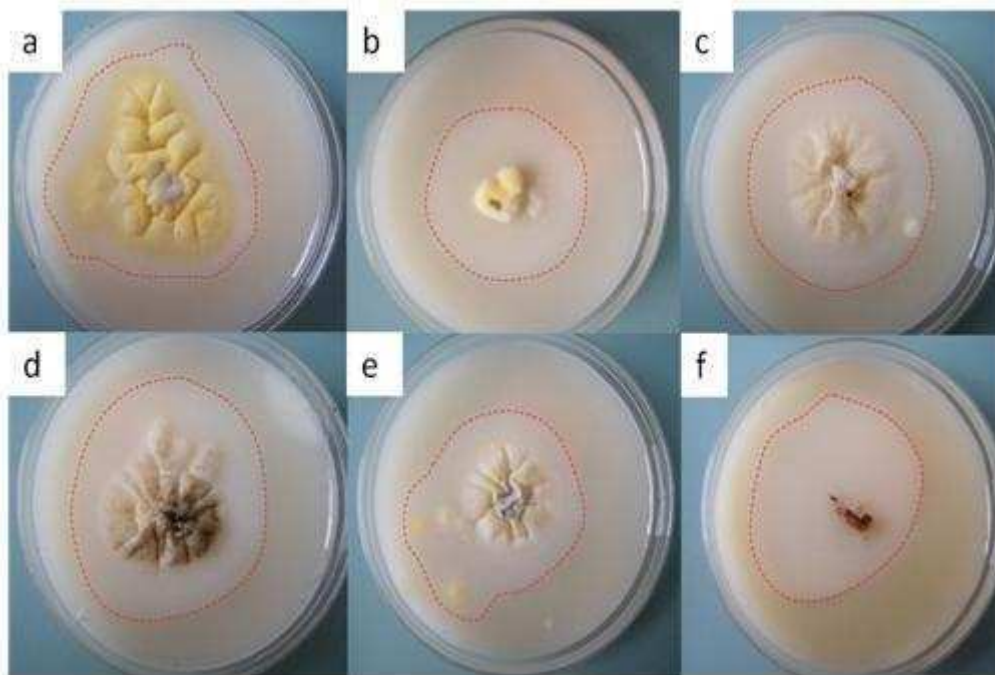
## **Chapitre 3**

***Résultats de l'isolement,  
de l'identification des moisissures  
et de l'optimisation de la production***

### 13. Résultats de la détermination de l'activité protéolytique des souches sur la caséine du lait

Parmi les 35 souches isolées, 29 d'entre elles avaient un pouvoir protéolytique sur caséine, confirmé sur gélose au lait par formation de halos blanchâtres au tour des colonies (**Figure 28**).

Chaque souche est capable de générer une zone de protéolyse de taille supérieure à 3 mm. Cette observation démontre clairement que, d'une part, les champignons isolés sont capables 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.



**Figure 28:** Activité protéolytique des souches isolées sur la caséine du lait.

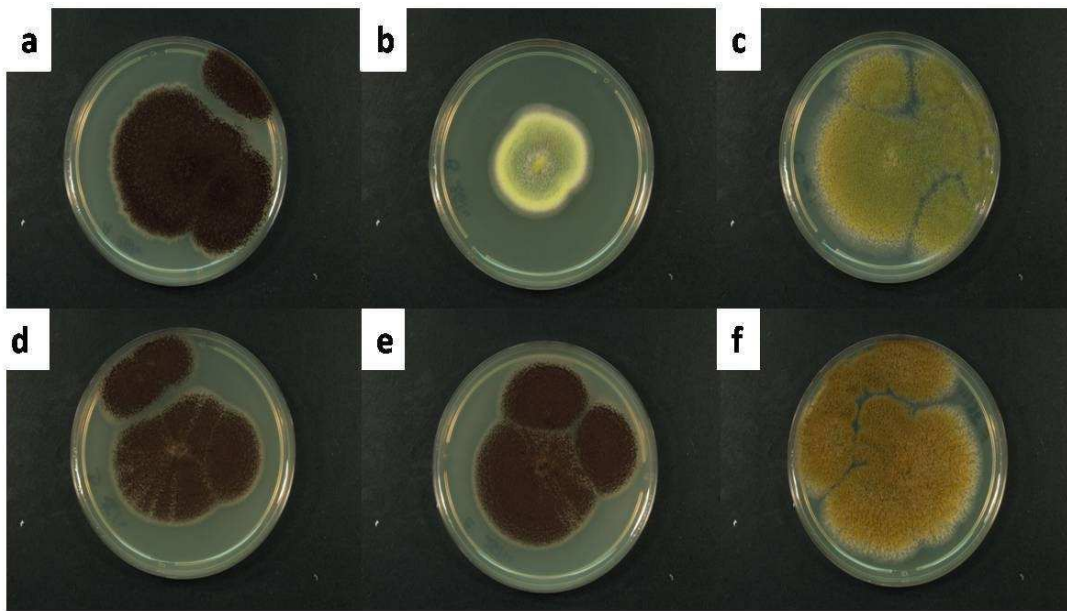


## 14. Identification des souches isolées

L'identification des six souches isolées a été réalisée au niveau du laboratoire CONIDIA (Lyon, France) par macroscopie, microscopie et biologie moléculaire.

### 14.1. Observation macroscopique des souches

L'observation macroscopique des souches isolées sur le milieu de culture MEAc permet d'observer l'aspect des colonies.



**Figure 29:** Vue macroscopique des souches isolées

D'après la **figure 29**, les souches en **a**, **d** et **e** présentent à peu près la même taille des cultures, avec des mycéliums de couleur nègre allant jusqu'au noir, d'après **Mosseray (1934)**, ces espèces peuvent appartenir au groupe des black aspergilli.

La souche en **c**, montre un thalle vert olive au centre à vert jaune en périphérie comme cela a été observé par **Pitt et Hocking (1997)**, celle en **f**, présente un thalle de couleur brun-jaunâtre comme il a été rapporté par **Ito et al., (1999)**. Il est à noter que les deux souches **c** et **f** ont des tailles de mycélium similaires.

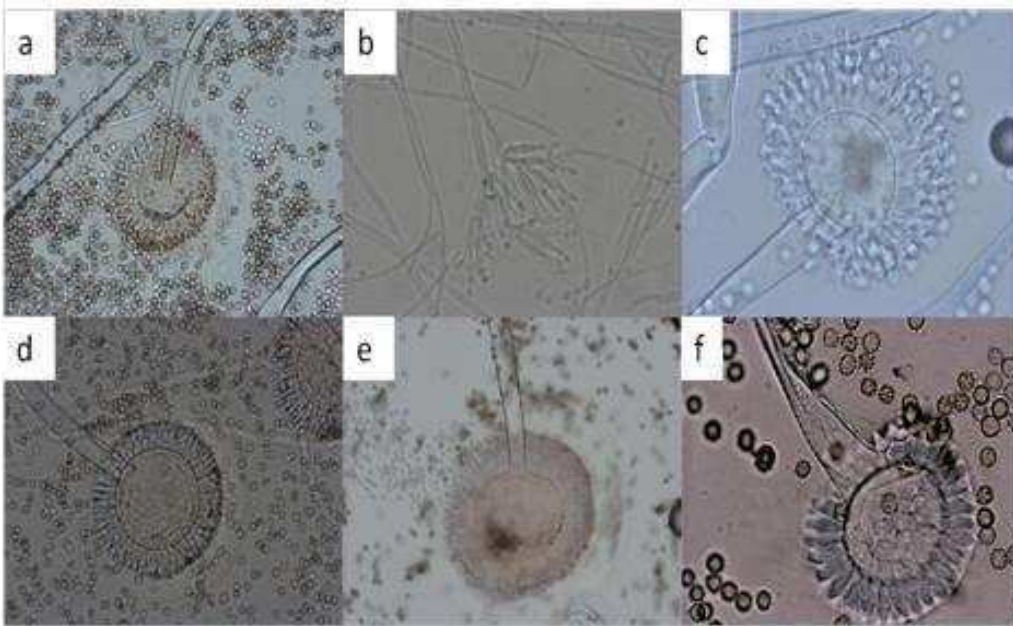
Contrairement à toutes les autres souches, l'isolat en **b** montre une croissance beaucoup plus lente avec un mycélium vert-jaune. Les travaux de **Tzean et al., (1994)**, parlent de thalle à croissance limitée de couleur gris-jaunâtre à gris-terne sur G25N à 25°C, 7 jours.



#### 14.2. Observation microscopique des souches

L'observation au microscope optique (grossissement X630) (**Figure 30**), permet de visualiser les conidies des espèces isolées. Les souches en **a**, **c**, **d**, **e** et **f** sont caractérisées par des filaments septés portant des têtes aspergillaires qui sont spécifiques au genre *Aspergillus*, ces têtes sont formées de vésicules, de filaires et de conidies, qui changent d'une espèce à l'autre. Les différents sporanges observés dans ce cas sont typiques des *Aspergillus sp.*

La souche en **b** est caractérisée par un conidiophore en forme de pinceau dont les ramifications portent des phialides ayant des conidies rondes à leurs extrémités. Les pénicilles sont typiques des *Penicillium sp.* **Tzean et al., (1994)**.



**Figure 30:** Vue microscopique des souches isolées (grossissement X630)

#### 14.3. Identification des souches par biologie moléculaire

Le travail sur séquence ITS permet l'identification des souches. La comparaison des résultats obtenus pour chaque souche avec les résultats des bases de données internationales fournies des pistes pour l'identification.

La **figure 31** montre la séquence ITS d'*A. niger*, les autres séquences sont en **Annexe 1**.

```
CACCTGGAAGAATGGTTGAAAACGTCGGCAGGCGCCGCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGG
ATCGGACGCGGTGCCCGCGTGCCTTTCGGGCCCCGTCCTCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGA
GGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCCTG
AATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTA
ACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGG
CAGAGGGCCCCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGGGGCCCCGCCAAGCAACAGGGTACAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGC
CCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAAGTCATTACCGAGTGCGGGTCTTTGGGCCCAAC
CTCCCATCCGTGTCTATTGTACCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCTTGTGCGCCGCCGGGGGGCGCCTCTGCCCCGGGC
CGTGCCCCG
```

**Figure 31** : Séquence ITS d'*Aspergillus niger*

Cette étude a permis d'identifier les six souches, il s'agit de : *Aspergillus niger* (a) ; *Penicillium pinophilum* (b), *Aspergillus flavus* (c), *Aspergillus awamori* (d) ; *Aspergillus tubingensis* (e) et *Aspergillus tamarisii* (f).

Les moisissures des espèces *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* et *Aspergillus tubingensis* sont très proches phylogénétiquement. Certains auteurs considèrent même que *Aspergillus awamori* est une variété d'*Aspergillus niger* (= *Aspergillus niger* var *awamori*). les travaux de **Kuster van Someren et al., (1991)**, ont montré qu'*Aspergillus niger* et *Aspergillus tubingensis* font toutes deux partie des *A. niger* aggregate, la première appartenant au groupe I et la deuxième au groupe II, **Pařenicová et al., (2001)** de leur côté confirment ceci en signalant que ces deux différentes espèces sont morphologiquement identiques, par contre **Pařenicová et al., (1997)** ont montré que l'espèce *Aspergillus awamori* pouvait appartenir soit à l'espèce *A. niger* soit à l'espèce *A. tubingensis*.

## 15. Optimisation du milieu de culture

### 15.1. Détermination de la composition du lactosérum

La détermination de la composition chimique du lactosérum dont le pH était de 5,0 a données différentes valeurs en g/l selon le paramètre dosé (**Tableau 13**).

**Tableau 13:** Composition chimique du lactosérum utilisé pour la réalisation de toutes les fermentations (valeurs en g/l)

Paramètres	Valeurs obtenues	De Wit (2001)	Assenat (1985)
Lactose	50,21	47	50
Protéines totales	2,80	6	8,5
Matière grasse	2	0,3	0,5
Matière sèche	58,27	65	65
Cendres	3,60	7,9	/
Azote total	1,40	2	5
Chlorures	2,70	/	2,20
Phosphore	0,250	1	/
Calcium	0,118	1,6	/
Magnésium	0,025	/	/

Les taux des différents paramètres observés pour le lactosérum utilisé sont assez proches de ceux de la littérature (De Wit, 2001 ; Assenat, 1985).

### 15.2. Résultats de l'optimisation du milieu de culture par la méthode de Plackett et Burman

Les différentes concentrations choisies pour l'application de la matrice du plan mentionné dans le **tableau 8** ont permis l'obtention de résultats variant d'une souche à l'autre (**Tableaux 14, 15, 16, 17, 18 et 19**).

**Tableau 14:** Résultats du plan d'expérience de Plackett et Burman pour la souche *Aspergillus niger*.

Facteurs Essais	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	(X <sub>3</sub> )	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	(X <sub>6</sub> )	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	(X <sub>9</sub> )	X <sub>10</sub>	(X <sub>11</sub> )	Prot. (µg/ml)	Biom. (g/l)	Act.Enz. (U.)
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	91.70	14.2	800
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	<b>148.20</b>	22.4	733.33
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	61.18	21.20	1545
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	151.80	17.4	933.33
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	63.33	19.60	1245
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	60.00	23.00	1145
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	78.22	21.60	1145
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	70.04	14.00	1000
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	26.36	17.40	733.33
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	34.64	<b>24.00</b>	1000
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	45.18	18.80	<b>1695</b>
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	59.85	15.80	1195

**Tableau 15:** Résultats du plan d'expérience de Plackett et Burman pour la souche *Penicillium pinophilum*

Facteurs	Prot. (µg/ml)	Biom. (g/l)	Act. Enz. (U.)
N° d'essai			
<b>1</b>	<b>359.48</b>	6.40	866.66
<b>2</b>	551.20	8.00	866.66
<b>3</b>	62.59	14.60	1245
<b>4</b>	288.28	4.40	1060
<b>5</b>	66.81	12.80	1145
<b>6</b>	58.96	8.00	1295
<b>7</b>	54.74	<b>14.80</b>	1095
<b>8</b>	284.50	6.80	560
<b>9</b>	132.8	7.20	910
<b>10</b>	101.98	4.60	710
<b>11</b>	103.18	8.40	<b>1345</b>
<b>12</b>	115.34	9.80	1090.90

**Tableau 16:** Résultats du plan d'expérience de Plackett et Burman pour la souche *Aspergillus flavus*

Facteurs	Prot. (µg/ml)	Biom. (g/l)	Act. Enz. (U.)
N° d'essai			
<b>1</b>	178.40	9.80	404.35
<b>2</b>	<b>296.10</b>	4.60	926.09
<b>3</b>	145.26	35.60	1272.72
<b>4</b>	247.40	14.20	621.74
<b>5</b>	227.06	16.40	<b>1272.72</b>
<b>6</b>	59.37	<b>28.40</b>	1227.27
<b>7</b>	191.42	15.20	1090.90
<b>8</b>	223.60	10.40	839.13
<b>9</b>	79.50	5.60	665.22
<b>10</b>	131.50	16.80	752.17
<b>11</b>	206.41	12.60	1181.81
<b>12</b>	160.80	12.40	1090.90

**Tableau 17:** Résultats du plan d'expérience de Plackett et Burman pour la souche *Aspergillus awamori*

Facteurs	Prot. (µg/ml)	Biom. (g/l)	Act. Enz. (U.)
<b>N° d'essai</b>			
1	76.18	19.00	860.00
2	68.51	20.00	660.00
3	41.24	22.60	300.00
4	56.71	20.60	810.00
5	75.76	23.80	<b>1909.09</b>
6	24.97	22.20	1045.45
7	54.66	24.20	1863.63
8	56.43	18.00	960.00
9	46.05	14.40	910.00
10	<b>107.20</b>	15.40	710.00
11	50.83	<b>25.20</b>	258.33
12	55.95	23.40	425.00

**Tableau 18:** Résultats du plan d'expérience de Plackett et Burman pour la souche *Aspergillus tubingensis*

Facteurs	Prot. (µg/ml)	Biom. (g/l)	Act. Enz. (U.)
<b>N° d'essai</b>			
1	284	3.60	882.61
2	103.50	1.60	795.65
3	59.70	22.60	341.66
4	127.70	1.60	752.17
5	52.54	25.40	341.66
6	46.07	<b>26.40</b>	216.66
7	50.55	23.80	425.00
8	111.90	15.80	839.13
9	61.10	17.00	665.22
10	<b>179.90</b>	2.40	<b>969.56</b>
11	45.40	22.40	175.00
12	69.47	21.80	425.00

**Tableau 19:** Résultats du plan d'expérience de Plackett et Burman pour la souche *Aspergillus tamaritii*

Facteurs	Prot. (µg/ml)	Biom. (g/l)	Act. Enz. U.)
<b>N° d'essai</b>			
<b>1</b>	114.50	14.40	491.30
<b>2</b>	138.80	16.60	752.17
<b>3</b>	100.25	39.40	383.33
<b>4</b>	130.80	16.20	665.22
<b>5</b>	184.11	<b>21.60</b>	258.33
<b>6</b>	66.72	16.60	303.03
<b>7</b>	126.34	14.60	333.33
<b>8</b>	186.20	13.20	<b>882.61</b>
<b>9</b>	108.70	13.60	708.69
<b>10</b>	121.00	14.60	866.66
<b>11</b>	119.50	13.00	272.72
<b>12</b>	<b>211.20</b>	16.60	454.54

Le traitement des résultats précédents a permis de sélectionner les composés ayant un effet positif et significatif sur la production de la biomasse, des protéines et de l'activité enzymatique.

### 15.3. Effets des différents composés sur la biomasse, le taux des protéines et l'activité enzymatique

#### 15.3.1. *Aspergillus niger*

Le traitement des résultats obtenus pour la souche *A. niger*, montre que les paramètres lactose, CaCl<sub>2</sub>, peptone et sels ont un effet positif et significatif sur la croissance mycélienne (**Annexe 2**), les coefficients estimés pour chaque paramètre, ainsi que la moyenne observée pour la biomasse a permis l'élaboration d'une équation de la forme :

$$Y = 19.117 + 0.650 X_4 + 1.383 X_7 + 0.517 X_8 + 0.850 X_{10}$$

Malgré la richesse de la peptone en acide aminés et en peptides, ce qui fait de cet additif une source principale d'énergie, d'azote et de carbone (**Scriban, 1993**), le rajout de lactose comme source supplémentaire de carbone, de CaCl<sub>2</sub> ( $p=72\%$ ) et des sels dans le milieu de culture est bénéfique pour la croissance de la moisissure.

D'après (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985), l'extrait de levure dans le milieu de culture du microorganisme représente un bon stimulant pour la synthèse des protéines, ceci est confirmé par l'analyse des résultats et l'équation de réponse :

$Y = 74.21 + 12.92 X_2 + 22.20 X_5 + 13.42 X_7$ , qui démontre que l'extrait de levure, a un effet positif et très significatif sur la production des protéines d'*A. niger* avec une valeur de  $p$  de 96%. L'agitation et le  $\text{CaCl}_2$  ont également un effet significatif sur le taux de protéines avec des valeurs de  $p$  de l'ordre de 85% et 86% respectivement.

L'activité protéasique quant à elle, est influencé positivement par trois facteurs telle que le montre l'équation de réponse :  $Y = 670.17 + 196.49 X_2 + 108.19 X_8 + 32.75 X_{10}$ , où l'agitation, la peptone et les sels ont des effets positifs très significatifs avec des valeurs de  $p$  de l'ordre de 100%, 99% et 84% respectivement.

### **15.3.2. *Penicillium pinophilum***

Dans le cas de *Penicillium pinophilum*, l'analyse statistique des résultats a permis de constater que quatre facteurs : l'extrait de levure, le  $\text{CaCl}_2$ , la peptone ( $p=76\%$ ) et les sels ont un effet positif sur la production de la biomasse (Annexe 2), avec une équation de réponse de la forme :  $Y = 8.817 + 0.317 X_5 + 0.683 X_7 + 0.850 X_8 + 0.150 X_{10}$ .

La production des protéines est stimulée positivement et de façon très significative par l'agitation et l'extrait de levure avec des valeurs de  $p$  de l'ordre de 98% et 87% respectivement et une équation de réponse de la forme :  $Y = 181.66 + 104.73 X_2 + 55.62 X_5$

Par contre la moyenne observée pour l'activité enzymatique et les coefficients estimés pour chaque paramètre ont permis d'élaborer cette équation de réponse :

$Y = 668.83 + 160.06 X_2 + 68.86 X_4 + 59.88 X_5 + 32.02 X_7$ , qui nous informe sur l'effet positif de l'agitation, du lactose, de l'extrait de levure et du  $\text{CaCl}_2$  sur l'activité enzymatique avec des  $p$  de l'ordre de 97%, 76% et 70% pour les trois premiers respectivement.

### **15.3.3. *Aspergillus flavus***

Pour *A. flavus*, l'équation de réponse élaborée après traitement des résultats de la biomasse, s'écrit comme suit :  $Y = 15.167 + 4.400 X_4 + 2.933 X_8$ . Le lactose et la peptone ont des effets positifs et très significatifs sur la croissance mycélienne avec des  $p$  égales à 97% et 92% respectivement (Annexe 2).



La production des protéines et l'activité enzymatique sont également stimulées par l'agitation et la présence dans le milieu de culture de l'extrait de levure et de la peptone qui représentent des sources majeures d'énergie, d'azote et de carbone. Dans le cas des protéines l'équation de réponse est :  $Y = 178.90 + 13.85 X_2 + 45.56 X_5 + 15.47 X_8$  avec des  $p$  de l'ordre de 91%, 100% et 93% pour  $X_2$ ,  $X_5$  et  $X_8$  respectivement, dans celui de l'activité enzymatique l'équation est de la forme :  $Y = 573.84 + 127.61 X_2 + 14.30 X_8$  avec  $p=89%$  pour  $X_2$ .

#### **15.3.4. *Aspergillus awamori***

L'équation de réponse après analyse des résultats de la biomasse de la souche *A. awamori* est de la forme:  $Y = 20.733 + 0.100 X_4 + 1.400 X_5 + 0.033 X_8$ , où l'extrait de levure ( $X_5$ ) a l'effet positif le plus significatif avec une  $p=99%$  (**Annexe 2**). Son effet, aux côtés de la peptone et de l'agitation est également très net sur la production des protéines avec une équation de la forme :  $Y = 59.54 + 8.97 X_2 + 4.23 X_5 + 5.79 X_8$ , où l'agitation a un effet très significatif avec  $p=86%$ , mais cette dernière est plus importante (95%) sur l'activité enzymatique avec une équation du type :  $Y = 681.10 + 137.24 X_2$ .

#### **15.3.5. *Aspergillus tubingensis***

Dans le cas d'*A. tubingensis*, le traitement des résultats permet de constater que, seulement deux facteurs : le  $\text{CaCl}_2$  et les sels ont un effet positif sur la production de la biomasse, avec une équation de réponse de la forme :  $Y = 15.367 + 0.133 X_7 + 1.067 X_{10}$ .

La production des protéines est stimulée positivement et de façon significative par l'agitation, le lactose, l'extrait de levure et les sels comme le montre l'équation de réponse :

$Y = 99.32 + 45.36 X_2 + 24.48 X_4 + 11.30 X_5 + 13.04 X_{10}$ , avec des  $p$  égales à 95% 79% (**Annexe 2**) pour l'agitation et le lactose respectivement. Pour l'activité enzymatique, la moyenne de la réponse et les coefficients estimés pour chaque paramètre ont permis d'élaborer une équation de la forme :  $Y = 627.99 + 189.40 X_2 + 0.57 X_8 + 2.10 X_{10}$  qui nous informe sur les effets positifs qu'exercent l'agitation (100%), la peptone et les sels sur la production d'enzymes.

#### **15.3.6. *Aspergillus tamaritii***

Pour la souche *A. tamaritii*, l'équation de réponse après analyse des résultats de la biomasse est de la forme:  $Y = 17.533 + 1.500 X_4 + 1.967 X_7 + 2.400 X_8$ . Cette équation montre les effets positifs qu'exercent le lactose, le  $\text{CaCl}_2$  et la peptone sur la croissance mycélienne, qui



représentent des sources de calcium, carbones et d'acide-aminés nécessaires à la vie cellulaire. Pour la production des protéines l'équation s'écrit comme suit :

$Y = 133.93 + 1.74 X_5 + 7.36 X_8$ , dans ce cas aussi la peptone avec l'extrait de levure ont chacun un effet positif sur le taux des protéines avec une  $p=80\%$  pour la peptone.

La production enzymatique quant à elle, est stimulée positivement par l'agitation, le  $\text{CaCl}_2$  et la peptone dont les valeurs de  $p$  sont de 89% pour  $X_2$  et 87% pour  $X_8$ , avec des coefficients particuliers comme le montre l'équation :  $Y = 609.10 + 118.67 X_2 + 9.20 X_7 + 112.03 X_8$ .

Il est à noter que le pH 5 a un effet négatif sur les différentes productions de toutes les souches, par contre l'agitation de 160 rpm a un effet positif très significatif, pour cette raison la recherche des optima par le deuxième plan d'expérience (Box et Wilson) est réalisée sur un milieu de culture supplémenté par différents composés (**Tableau 20**) en fonction de la souche et des résultats obtenus par le plan de Plackett et Burman.

**Tableau 20** : Paramètres de supplémentation du milieu de culture de base des différentes souches sélectionnés par le plan statistique de Plackett et Burman.

Souches	Paramètres sélectionnés par le plan statistique Plackett et Burman
<i>A. niger</i>	Extrait de levure + peptone + sels
<i>P. pinophilum</i>	Extrait de levure + lactose + $\text{CaCl}_2$
<i>A. flavus</i>	Extrait de levure + peptone
<i>A. awamori</i>	Extrait de levure + peptone
<i>A. tubingensis</i>	Extrait de levure + lactose + sels
<i>A. tamaritii</i>	Peptone + $\text{CaCl}_2$

#### 15.4. Résultats de la détermination des optima par la méthode de Box et Wilson

Le modèle linéaire obtenu par le plan précédent a permis de retenir les paramètres à utiliser dans le plan de Box et Wilson. Dans ce cas, chaque paramètre est étudié à cinq niveaux  $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$ ,  $+\alpha$ , ce qui permet de calculer les concentrations nécessaires pour lancer les fermentations des différentes souches et de retrouver les optima des différents paramètres selon la méthode des plans composites centrés (**Box et Wilson, 1951**).

Les fermentations sont réalisées sur milieu supplémenté par différents paramètres à 25°C, pH 4,0 et 160rpm suivant le plan de Box et Wilson.

##### 15.4.1. *Aspergillus niger*

Les concentrations des paramètres sélectionnés pour la souche *A. niger* sont reportées sur le **tableau 21** ;

**Tableau 21:** Les facteurs sélectionnés par le Plan de Plackett et Burman et leurs niveaux respectifs (concentrations exprimées en g/l)

Facteurs	Niveaux				
	$-\alpha$ (-1,682)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,682)
X <sub>1</sub> : Ext. Lev.	5.27	8	12	16	18.73
X <sub>2</sub> : Peptone	5.27	8	12	16	18.73
X <sub>3</sub> : Sels:					
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.13	0.3	0.55	0.8	0.97
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.034	0.05	0.075	0.1	0.12

L'application de la matrice d'expérience pour 3 facteurs permet l'obtention des résultats synthétisés dans le **tableau 22**.

**Tableau 22:** Résultats des fermentations selon le plan composite centré de Box et Wilson

Facteurs	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Prot. (µg/ml)	Biom. (g/l)	Act. enz. (U.)
N° essais						
1	-1	-1	-1	66.01	20.80	857.14
2	+1	-1	-1	116.95	21.80	928.57
3	-1	+1	-1	184.15	19	714.28
4	+1	+1	-1	81.70	18.60	1142.85
5	-1	-1	+1	79.70	21.60	714.28
6	+1	-1	+1	72.46	<b>24.80</b>	857.14
7	-1	+1	+1	97.46	22.80	857.14
8	+1	+1	+1	101.94	21.40	1285.71
9	-1.682	0	0	67.54	18	571.42
10	+1.682	0	0	143.22	23.40	857.14
11	0	-1.682	0	86.57	21.20	928.57
12	0	+1.682	0	<b>217.55</b>	16	1000
13	0	0	-1.682	88.52	20.80	<b>1428.57</b>
14	0	0	+1.682	94.85	19.80	1142.86
15	0	0	0	72.40	21	928.57
16	0	0	0	92.15	19.40	642.86
17	0	0	0	80.00	21.20	1214.28

Les résultats du tableau sont utilisés pour déterminer les optima en utilisant le programme statistique MINITAB, par réalisation d'un modèle quadratique pour chaque paramètre (**Annexe 3**) ; et son expression par une équation polynomiale du second degré qui représente les réponses mesurées pour chaque paramètre.

Par rapport aux combinaisons 15 à 17 (**Tableau 22**), de grandes variations de résultats sont observées pour l'activité enzymatique, lorsque  $X_1$  et  $X_3$  sont à leur niveau +1 et  $X_2$  à son niveau -1 la biomasse est à son maximum, lorsque  $X_1$  et  $X_3$  sont à leur niveau 0 et  $X_2$  à son niveau + $\alpha$  le taux de protéines est à son maximum, par contre lorsque  $X_1$  et  $X_2$  sont à leur niveau 0 et  $X_3$  à son niveau - $\alpha$  c'est l'activité enzymatique qui est à son maximum. Ce qui peut s'expliquer par l'influence marquée des facteurs  $X_1$  et  $X_3$ .

Ceci permet de représenter les modèles observés par des équations de la forme :

- $Y = 20,43 + 0,84 X_1 - 1,16 X_2 + 0,63 X_3 + 0,39 X_1^2 - 0,34 X_2^2 + 0,25 X_3^2 - 0,75 X_1 X_2 + 0,15 X_1 X_3 + 0,35 X_2 X_3$  pour la biomasse ;
- $Y = 82,70 + 5,34 X_1 + 25,65 X_2 - 6,34 X_3 + 4,34 X_1^2 + 20,84 X_2^2 - 0,49 X_3^2 - 17,70 X_1 X_2 + 6,09 X_1 X_3 - 4,45 X_2 X_3$  pour le taux des protéines ;
- $Y = 933,19 + 113,63 X_1 + 55,86 X_2 - 29,95 X_3 - 91,73 X_1^2 - 3,36 X_2^2 + 110,25 X_3^2 + 80,35 X_1 X_2 + 8,92 X_1 X_3 + 62,50 X_2 X_3$  pour l'activité enzymatique ;

Le modèle linéaire peut être considéré comme satisfaisant puisque l'écart entre la moyenne générale pour la biomasse 20,43, le taux des protéines 82,70 et l'activité enzymatique 933,19 et les valeurs observées au point central pour chaque paramètre 20,53; 81,51 et 928,57 respectivement est acceptable. Aussi, il est à noter que l'interaction des différents paramètres en particulier  $X_1$  et  $X_3$  a un effet positif sur la production des protéines, des enzymes et sur la croissance mycélienne.

#### **15.4.2. *Penicillium pinophilum***

Les concentrations calculées des paramètres sélectionnés pour la souche *P. pinophilum* sont reportées sur le **tableau 23**;

**Tableau 23:** Les facteurs sélectionnés par le Plan de Plackett et Burman et leurs niveaux respectifs (concentrations exprimées en g/l)

Facteurs	Niveaux				
	$-\alpha$ (-1,682)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,682)
$X_1$ : Lactose	33.18	40	50	60	66.82
$X_2$ : Ext.Lev.	5.27	8	12	16	18.73
$X_3$ :CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.53	0.8	1.2	1.6	1.87

L'application de la matrice d'expérience pour 3 facteurs permet l'obtention des résultats synthétisés dans le **tableau 24**.

**Tableau 24:** Résultats des fermentations selon le plan composite centré de Box et Wilson

F acteurs	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Prot. (µg/ml)	Biom.(g/l)	Act. enz. (U.)
N° essais						
1	-1	-1	-1	121.54	9.8	583.33
2	+1	-1	-1	116.91	9.6	750
3	-1	+1	-1	280.73	4.6	750
4	+1	+1	-1	659.34	5.4	833.33
5	-1	-1	+1	139.43	11	416.66
6	+1	-1	+1	187.48	10.20	250
7	-1	+1	+1	846.34	5.6	750
8	+1	+1	+1	<b>929.27</b>	7.2	750
9	-1.682	0	0	177.96	10.4	666.66
10	+1.682	0	0	276.66	8.4	<b>916.66</b>
11	0	-1.682	0	109.84	10.40	833.33
12	0	+1.682	0	191.50	11.20	444.44
13	0	0	-1.682	184.15	14.40	500
14	0	0	+1.682	219.19	14.80	638.88
15	0	0	0	176.50	14.40	694.44
16	0	0	0	195.16	11.20	333.33
17	0	0	0	227.78	<b>15.20</b>	305.55

Les combinaisons 15 à 17 (**Tableau 24**), montrent de faibles variations des résultats, lorsque les trois paramètres sont à leur niveau +1 le taux de protéines est à son maximum, lorsqu'ils sont à leur niveau 0 la biomasse est à son maximum, par contre lorsque  $X_1$  est au niveau  $+\alpha$  et  $X_2$  et  $X_3$  sont à leur niveau 0 c'est l'activité enzymatique qui est à son maximum. Ce qui peut s'expliquer par l'influence marquée des trois facteurs. Ceci permet de représenter les trois paramètres par des équations de la forme qui suit :

- $Y = 13,83 - 0,14 X_1 - 1,20 X_2 + 0,38 X_3 - 2,27 X_1^2 - 1,78 X_2^2 - 0,43 X_3^2 + 0,42 X_1X_2 + 0,025 X_1X_3 + 0,12 X_2X_3$  pour la biomasse;
- $Y = 185,86 + 49,12 X_1 + 167,49 X_2 + 71,96 X_3 + 57,93 X_1^2 + 30,84 X_2^2 + 48,87 X_3^2 + 52,26 X_1X_2 - 30,37 X_1X_3 + 93,38 X_2X_3$  pour le taux des protéines;
- $Y = 447,30 + 36,89 X_1 + 31,42 X_2 - 37,81 X_3 + 112,82 X_1^2 + 58,82 X_2^2 + 34,27 X_3^2 + 10,41 X_1X_2 - 52,08 X_1X_3 + 72,92 X_2X_3$  pour l'activité enzymatique;

Ce modèle linéaire est satisfaisant puisque l'écart entre la moyenne générale de la biomasse 13,83, du taux protéique 185,86, et de l'activité enzymatique 447,30 et les valeurs observées au point central pour chaque paramètre 13,60; 199,78 et 444,44 respectivement est acceptable. L'interaction des différents facteurs en particulier  $X_1X_2$  et  $X_2X_3$  a un effet positif sur toutes les productions.

### 15.4.3. *Aspergillus flavus*

Dans le cas d'*A. flavus*, les concentrations calculées des deux paramètres sélectionnés sont reportées sur le **tableau 25**;

**Tableau 25:** Les facteurs sélectionnés par le Plan de Plackett et Burman et leurs niveaux respectifs (concentrations exprimées en g/l)

Facteurs	Niveaux				
	$-\alpha$ (-1,414)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,414)
$X_1$ : Ext.Lev.	6.34	8	12	16	17.65
$X_2$ : Peptone	6.34	8	12	16	17.65

L'application de la matrice d'expérience pour 2 facteurs permet l'obtention des résultats du **tableau 26**.

**Tableau 26:** Résultats des fermentations selon le plan composite centré de Box et Wilson

Facteurs	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Prot. (µg/ml)	Biom. (g/l)	Act. enz. (U.)
N° essais					
1	-1	-1	133.62	5.2	500
2	+1	-1	114.64	<b>10.20</b>	571.43
3	-1	+1	<b>175.48</b>	<b>10.20</b>	428.57
4	+1	+1	139.20	7.60	<b>1214.28</b>
5	-1.414	0	174.50	5.60	500
6	+1.414	0	98.60	3.60	357.14
7	0	-1.414	124.30	6.60	857.14
8	0	+1.414	142.90	7	1000
9	0	0	170.40	<b>10.20</b>	428.57
10	0	0	166.70	9.20	1071.43
11	0	0	120.10	8.80	428.57

Malgré le faible coefficient de variation non contrôlée des résultats (combinaison 9 à 11) (**Tableau 26**), une influence marquée de certains facteurs est observée. Lorsque les deux facteurs X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub> sont à leurs niveaux respectifs +1 et -1 ; -1 et +1 ou 0 la biomasse est à son maximum, lorsqu'ils sont à leurs niveaux respectifs +1 et -1 le taux de protéines est à son maximum, par contre l'activité enzymatique est maximale au niveau +1 pour les deux facteurs. Ceci confirme que la présence de la peptone en particulier et l'extrait de levure dans le milieu de culture de cette souche l'enrichie en azote, carbone, peptides et sels (**Scriban, 1993**) ce qui permet à la croissance d'être maximale malgré la variation des concentrations.

Les modèles quadratiques élaborés sont de la forme:

- $Y = 9,40 - 0,053 X_1 + 0,37 X_2 - 1,75 X_1^2 - 0,65 X_2^2 - 1,90 X_1 X_2$  pour la biomasse
- $Y = 152,40 - 20,32 X_1 + 11,48 X_2 - 6,47 X_1^2 - 8,10 X_2^2 - 4,32 X_1 X_2$  pour le taux des protéines
- $Y = 642,85 + 81,88 X_1 + 96,68 X_2 - 107,143 X_1^2 + 142,86 X_2^2 + 178,57 X_1 X_2$  pour l'activité enzymatique

Le facteur  $X_2$  (Peptone) présente un effet positif plus marqué que celui du facteur  $X_1$  et le modèle linéaire est considéré comme très satisfaisant car l'écart entre la moyenne générale de la biomasse 9.40, du taux de protéines 152.40 et de l'activité enzymatique 642.85 et les valeurs observées au point central de chaque paramètre 152.4 ; 9.40 et 642.85 respectivement est nul.

#### 15.4.4. *Aspergillus awamori*

Pour la souche *A. awamori* les concentrations des différents niveaux des facteurs sélectionnés sont reportées sur le **tableau 27** ;

**Tableau 27:** Les facteurs sélectionnés par le Plan de Plackett et Burman et leurs niveaux respectifs (concentrations exprimées en g/l)

Facteurs	Niveaux				
	$-\alpha$ (-1,414)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,414)
$X_1$ : Ext.Lev.	6.34	8	12	16	17.65
$X_2$ : Peptone	6.34	8	12	16	17.65

L'application de la matrice d'expérience du plan pour 2 facteurs permet l'obtention des résultats du **tableau 28**.

**Tableau 28:** Résultats des fermentations selon le plan composite centré de Box et Wilson

N° essais	Facteurs $X_1$	$X_2$	Prot . ( $\mu\text{g/ml}$ )	Biom. (g/l)	Act. enz. (U.)
1	-1	-1	84	16.20	421.05
2	+1	-1	128.83	16.60	789.47
3	-1	+1	99.64	17	526.31
4	+1	+1	91.41	21.80	789.47
5	-1.414	0	54.86	17.60	631.58
6	+1.414	0	<b>134.88</b>	19	<b>842.10</b>
7	0	-1.414	68.54	17.40	526.31
8	0	+1.414	57.70	<b>23.20</b>	<b>842.10</b>
9	0	0	11.48	20	526.31
10	0	0	115.86	19.40	789.47
11	0	0	47.72	17.60	368.42

Le **tableau 28** montre de très grandes variations des résultats. Lorsque le facteur  $X_1$  est à son niveau  $+\alpha$  et  $X_2$  au niveau 0 le taux de protéines et l'activité enzymatique sont à leur maximum, quand c'est  $X_2$  qui est au niveau  $+\alpha$  et  $X_1$  au niveau 0 c'est la biomasse et l'activité enzymatique qui sont à leur maximum, ce qui confirme que la souche *A. awamori* exige dans son milieu de culture des taux élevés de peptone et d'extrait de levure pour un maximum de production enzymatique. Cette influence des deux facteurs se fait suivant les modèles qui suivent :

- $Y = 19,00 + 0,89 X_1 + 1,77 X_2 - 0,70 X_1^2 + 0,30 X_2^2 + 1,10 X_1 X_2$  pour la biomasse
- $Y = 58,34 + 18,72 X_1 - 4,63 X_2 + 23,76 X_1^2 + 7,88 X_2^2 - 13,26 X_1 X_2$  pour le taux des protéines
- $Y = 561,41 + 116,17 X_1 + 68,98 X_2 + 67,98 X_1^2 + 41,66 X_2^2 - 26,31 X_1 X_2$  pour l'activité enzymatique

$X_1$  et  $X_2$  ont chacun des effets positifs sur la croissance mycélienne et la production enzymatique, leur interaction est significative mais le facteur  $X_1$  a un effet plus marqué sur la production des protéines et des enzymes. Ces observations rendent le modèle très satisfaisant sachant que l'écart entre la moyenne générale de la biomasse 19 ; du taux de protéines 58,34 et de l'activité enzymatique 561,41 et les valeurs observées au point central pour chaque paramètre 19 ; 58,35 et 561,5 est nul.

#### 15.4.5. *Aspergillus tubingensis*

Les concentrations des paramètres sélectionnés pour la souche *A. tubingensis* sont reportées sur le **tableau 29**;

**Tableau 29:** Les facteurs sélectionnés par le Plan de Plackett et Burman et leurs niveaux respectifs (concentrations exprimées en g/l)

Facteurs	Niveaux				
	$-\alpha$ (-1,682)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,682)
$X_1$ : Lactose	33.18	40	50	60	66.82
$X_2$ : Ext.Lev.	5.27	8	12	16	18.73
$X_3$ : Sels :					
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.13	0.3	0.55	0.8	0.97
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.034	0.05	0.075	0.1	0.12



La réalisation des fermentations en appliquant la matrice d'expérience du plan à 3 facteurs permet l'obtention des résultats du **tableau 30**.

**Tableau 30:** Résultats des fermentations selon le plan composite centré de Box et Wilson

Faceurs	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Prot. (µg/ml)	Biom. (g/l)	Act. enz. (U.)
<b>N° essais</b>						
1	-1	-1	-1	26.90	21.80	714.28
2	+1	-1	-1	91.19	19.20	642.86
3	-1	+1	-1	45.22	21.80	714.28
4	+1	+1	-1	<b>183.40</b>	22.60	500
5	-1	-1	+1	20.61	18.80	642.86
6	+1	-1	+1	27.74	19.60	785.71
7	-1	+1	+1	82.98	16.00	<b>1071.42</b>
8	+1	+1	+1	167.01	21.20	1000
9	-1.682	0	0	68.60	17.40	928.57
10	+1.682	0	0	34.73	21.20	857.14
11	0	-1.682	0	67.62	17.80	785.71
12	0	+1.682	0	86.04	22.60	928.57
13	0	0	-1.682	141.53	19.40	<b>1071.42</b>
14	0	0	+1.682	26.61	20.60	500
15	0	0	0	133.33	<b>25.60</b>	785.71
16	0	0	0	70.85	23.00	785.71
17	0	0	0	21.18	20.2	785.71

Les résultats montrent de grandes variations. Les combinaisons de 15 à 17 révèlent l'influence non contrôlée des paramètres sur le taux des protéines et la biomasse.

Les modèles élaborés par mesure de la moyenne et des coefficients de chaque paramètre sont de la forme :

- $Y = 22,90 + 0,77 X_1 + 0,75 X_2 - 0,57 X_3 - 1,18 X_1^2 - 0,86 X_2^2 - 0,93 X_3^2 + 0,97 X_1X_2 + 0,97 X_1X_3 - 0,57 X_2X_3$  pour la biomasse
- $Y = 74,47 + 17,32 X_1 + 25,12 X_2 - 17,69 X_3 - 6,06 X_1^2 + 2,83 X_2^2 + 5,39 X_3^2 + 18,84 X_1X_2 - 13,91 X_1X_3 + 11,39 X_2X_3$  pour le taux des protéines
- $Y = 791,48 - 24,48 X_1 + 54,20 X_2 - 2,38 X_3 + 17,92 X_1^2 + 5,30 X_2^2 - 19,94 X_3^2 - 44,64 X_1X_2 + 44,64 X_1X_3 + 98,21 X_2X_3$  pour l'activité enzymatique

Le facteur  $X_2$  présente un effet positif sur les trois paramètres, celui-ci est très marqué sur la production protéique et enzymatique. L'interaction entre les facteurs est significative sur chaque paramètre, aussi, l'écart entre la moyenne générale dans le cas de la biomasse 22,90 ; des protéines 74,47 et de l'activité enzymatique 791,48 et les valeurs observées au point central de chaque paramètre 75.12 ; 22,93 et 785,71 est acceptable, ce qui rend le modèle linéaire satisfaisant.

#### 15.4.6. *Aspergillus tamarii*

Dans le cas d'*A. tamarii*, les concentrations calculées des deux paramètres sélectionnés sont reportées sur le **tableau 31**;

**Tableau 31:** Les facteurs sélectionnés par le Plan de Plackett et Burman et leurs niveaux respectifs (concentrations exprimées en g/l)

Facteurs	Niveaux				
	$-\alpha$ (-1,414)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,414)
$X_1$ : CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.63	0.8	1.2	1.6	1.76
$X_2$ : Peptone	6.34	8	12	16	17.65

L'application de la matrice d'expérience du plan pour 2 facteurs permet l'obtention des résultats reportés sur le **tableau 32**.

**Tableau 32:** Résultats des fermentations selon le plan composite centré de Box et Wilson

N° essais	Facteurs X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Prot. (µg/ml)	Biom. (g/l)	Act. enz. (U.)
1	-1	-1	221.60	11.6	681.81
2	+1	-1	169.77	11.8	<b>863.63</b>
3	-1	+1	139.72	14.6	727.27
4	+1	+1	181.63	15.6	727.27
5	-1.414	0	<b>422.91</b>	<b>12.8</b>	772.72
6	+1.414	0	90.32	12.2	772.72
7	0	-1.414	129.02	13	681.81
8	0	+1.414	187.16	11.8	818.18
9	0	0	193.13	12.6	772.72
10	0	0	158.09	12	<b>863.63</b>
11	0	0	166.11	12.6	<b>863.63</b>

L'interprétation des résultats obtenus après fermentation, permet de représenter les modèles linéaires par des équations du second degré de la forme qui suit :

- $Y = 12,40 + 1,81 X_1 + 0,64 X_2 - 1,58 X_1^2 + 0,86 X_2^2 + 0,20 X_1 X_2$  pour la biomasse
- $Y = 172,44 - 60,03 X_1 + 1,52 X_2 + 34,79 X_1^2 - 14,48 X_2^2 + 23,43 X_1 X_2$  Pour le taux des protéines
- $Y = 833,32 + 22,73 X_1 + 12,74 X_2 - 33,15 X_1^2 - 44,51 X_2^2 - 45,45 X_1 X_2$  pour l'activité enzymatique

Il y a influence des deux facteurs X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub>, lorsque X<sub>1</sub> est à son niveau -α et X<sub>2</sub> à son niveau 0 le taux de protéines et la biomasse sont à leur maximum, par contre lorsque ces deux paramètres sont à leurs niveaux 0 ou X<sub>1</sub> est à son niveau +1 et X<sub>2</sub> à son niveau -1 l'activité enzymatique est maximale. Ceci prouve que cette souche n'exige pas de grande quantité de peptone pour sa croissance puisque le niveau 0 suffit pour que tous les paramètres soient à leur maximum.

Le calcul de l'écart entre la moyenne générale dans le cas des protéines 172.44, de la biomasse 12,40 et de l'activité enzymatique 833,32 et les valeurs observées au point central pour chaque paramètre 172.44, 12,40 et 833,32 est nul ce qui rend le modèle linéaire très satisfaisant.

- **Résultats des optima**

Les résultats et les interactions des différents paramètres obtenus pour chaque souche sont représentés en graphiques de deux et trois dimensions. L'**Annexe 3** représente les différentes tables d'ANOVA, les surfaces de réponses et les maximums locaux obtenus.

À partir de tous les résultats graphiques, les positions des extremums sont déterminées et les points fixes de toutes les souches calculés, ce qui permet de retrouver les concentrations optimisées des différents facteurs (**Tableau 33**)

**Tableau 33** : Les positions des extremums pour chaque souche

Paramètres	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
<b>Souches</b>			
<i>A. niger</i>	1.1788	1.6820	1.524
<i>P. pinophilum</i>	0.2209	1.2063	1.682
<i>A. flavus</i>	0.5801	1.414	/
<i>A. awamori</i>	1.414	1.414	/
<i>A. tubingensis</i>	1.5121	1.682	1.0671
<i>A. tamarii</i>	0.3142	0.0242	/

Ces résultats codés ont permis le calcul des différentes concentrations en g/l et ce en utilisant les équations suivantes :  $U_i = 4 * X_i + 12$ .

Où :  $X_i$  = valeurs codées et  $U_i$  = Différentes valeurs de X en g/l (Tableau 34).

**Tableau 34** : Concentrations des différents paramètres pour chaque souche

Souche	Paramètre	Valeur (g/l)
<i>A. niger</i>	Ext. Lev.	16,71
	Peptone	18,73
	MgSO <sub>4</sub>	16,28
	FeSO <sub>4</sub>	1,81
<i>P. pinophilum</i>	Lactose	12,88
	Ext. Lev.	16,82
	CaCl <sub>2</sub>	18,72
<i>A. flavus</i>	Ext. Lev.	17,95
	Peptone	14,32
<i>A. awamori</i>	Ext. Lev.	17,65
	Peptone	17,65
<i>A. tubingensis</i>	Lactose	18,05
	Ext. Lev	18,72
	MgSO <sub>4</sub>	16,26
	FeSO <sub>4</sub>	1,79
<i>A. tamarü</i>	CaCl <sub>2</sub>	13,25
	Peptone	12,09

Les différentes concentrations obtenues après optimisation sont utilisées pour lancer les fermentations qui permettent de suivre les cinétiques de croissance des six souches afin de produire les enzymes recherchées.

## **Chapitre 4**

# ***Résultats de la production des enzymes***

Ce chapitre présente les résultats de la production de la protéase acide par fermentation du milieu optimisé spécifique à chaque souche puis de la purification de chacune des enzymes.

## 16. Résultats des cinétiques

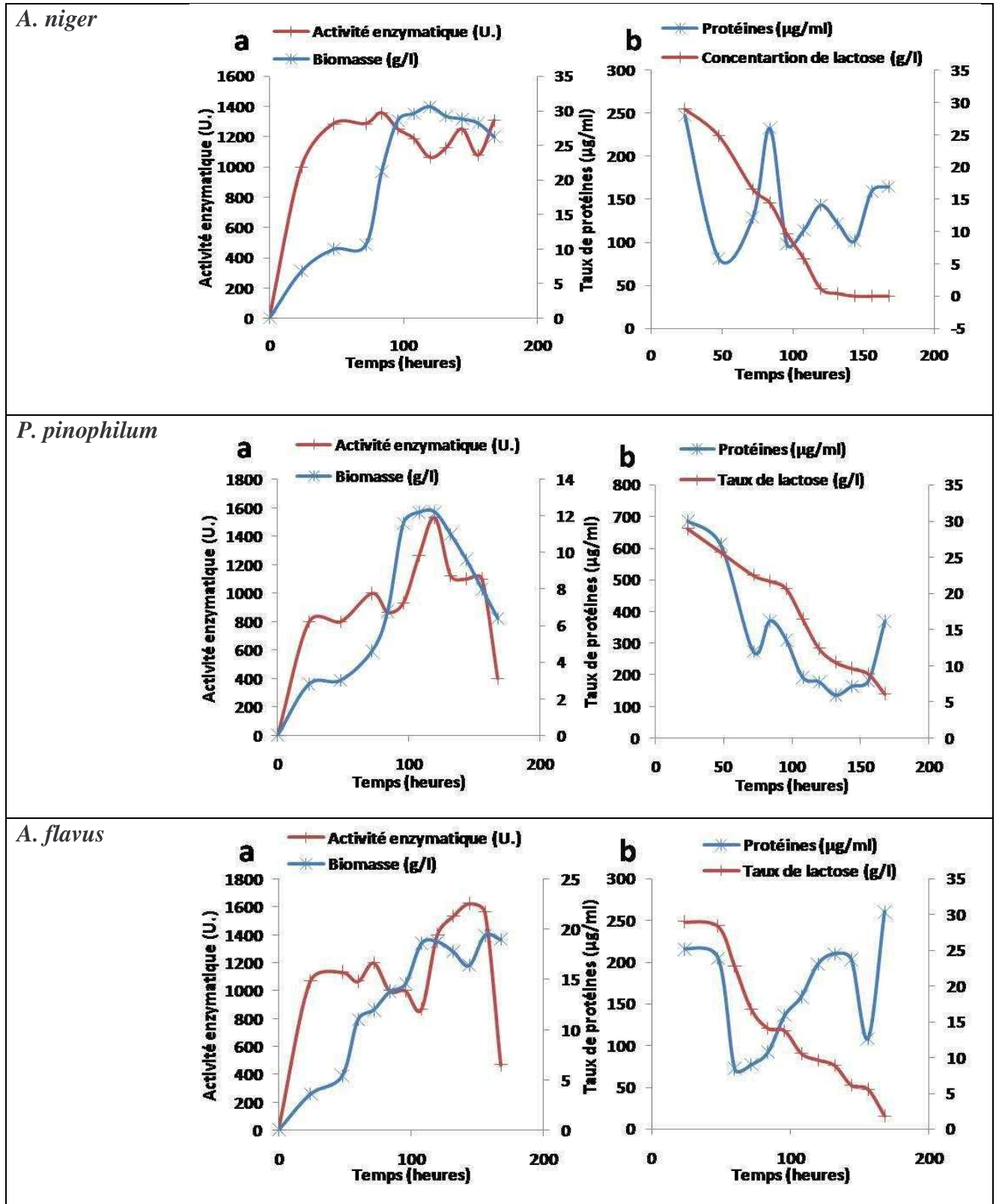
Les cinétiques de croissance et de production des enzymes sont suivies sur une période de 7 jours afin de déterminer le mécanisme de production de la protéase par rapport à la croissance de la moisissure.

### 16.1. *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum* et *Aspergillus flavus*

Dans le cas des souches *A. niger*, *P. pinophilum* et *A. flavus*, la période de près-germination dure environ 24 heures (**Figure 32, a**), ce qui permet aux microorganismes de s'adapter aux milieux de culture dans lesquels ils se trouvent, en mettant en place tous les systèmes enzymatiques dont ils ont besoin pour leur croissance. Ceci est exprimé dans un premier temps par la diminution de la concentration des protéines d'environ 67%, 74% et 66% pour *A. niger*, *P. pinophilum*, *A. flavus* respectivement, puis, la croissance devient rapide c'est la phase exponentielle où les biomasses atteignent leur maximum après, en moyenne 5 jours soit, 30,6g/l ; 12,2g/l et 17,8g/l pour chaque souche respectivement.

**Molimard et al., (1995)** démontrent qu'en milieu liquide la teneur en matière sèche des cultures de *Penicillium camemberti* atteint un maximum de  $4,57 \pm 0,34$  après 28 jours de croissance.

L'augmentation du taux de protéines lors la phase exponentielle des souches *A. niger* et *A. flavus* peut se traduire par la quantité importante d'enzymes libérées dans le milieu extérieur, car, comme *A. niger* (**Bosmann, 1973**), *A. flavus* est connue comme souche productrice de protéases extracellulaires (**Towhid Hossain et al., 2006 ; Oyeleke et al., 2010 ; Muthulakshmi et al., 2011**).



**Figure 32** : Évolution de la biomasse et de l'activité enzymatique (a), des protéines et des taux de lactose (b) d'*A. niger*, de *P. pinophilum* et d'*A. flavus*.



Comme le montre la **figure 32, a** ; la souche *A.niger*, a une activité protéasique qui suit la croissance mycélienne de près, avec des variations allant de 50 U. à 400 U., elle atteint son maximum 1357,14 U. après 84 heures à pH 4,29, ce qui signifie que la biosynthèse des protéases est associée à la croissance du microorganisme. Il est à noter, que pendant la croissance de cette souche il y a utilisation successive des deux sources de carbone à savoir l'extrait de levure et la peptone représentée par une légère diauxie (**A. niger : Figure 32, a**).

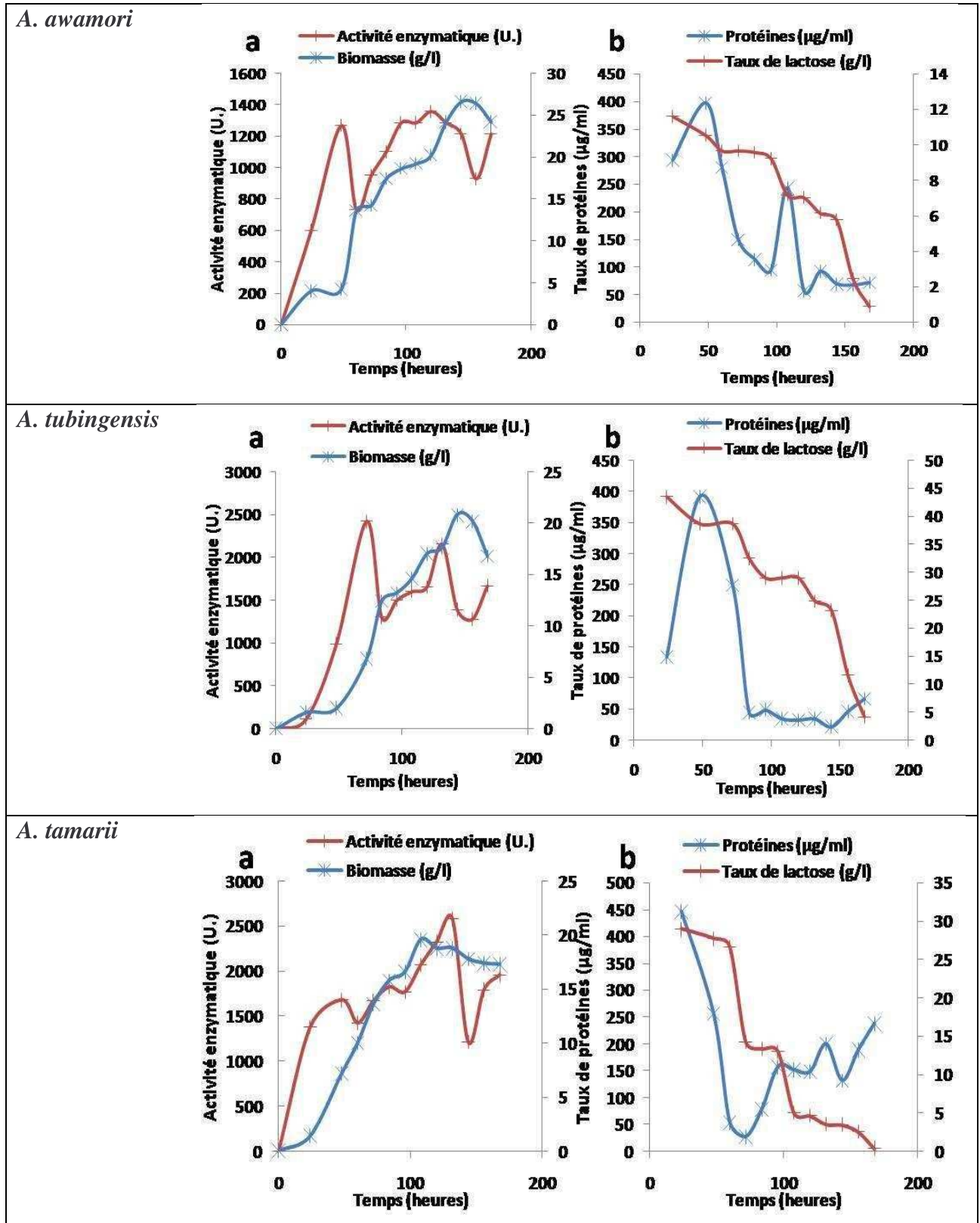
**Maldonado et Callieri (1989)** avaient également observé une diauxie lors de la production de la pectinestérase et la polygalacturonase sur milieu de culture contenant la pectine comme source de carbone.

Pour *P.pinophilum* et *A. flavus* l'activité enzymatique suit également la croissance mycélienne de près, et atteint son maximum en phase stationnaire avec 1533,33 U. à pH 4,79, pour *P. pinophilum*, et 1562,5 U. à pH 4,62 pour *A. flavus*, ce qui, dans les deux cas, l'associe partiellement à la croissance du microorganisme. Cette dernière, pour *A. flavus*, présente aussi, une diauxie très nette due à l'utilisation successive des deux substrats : extrait de levure et peptone.

Pendant la croissance mycélienne, la phase stationnaire diffère d'une souche à l'autre, dure environ 10 heures pour *A. niger* et *A. flavus* et 24 heures pour *P. pinophilum*, cette phase est caractérisée par la stabilité de la biomasse due, aux concentrations limitées des substrats et à l'accumulation des déchets. La phase de déclin quant à elle, pour les trois souches, se caractérise par une baisse du nombre de cellules viables et l'augmentation du nombre de cellules mortes à cause de l'épuisement total des nutriments, l'accumulation des déchets. La libération des protéines et des enzymes endocellulaires après lyse cellulaire, explique les augmentations des taux de protéines et de l'activité enzymatique.

D'un autre côté, dans le cas de *P. pinophilum* et *A. flavus*, le taux de lactose (**Figure 32, b**) en fin de croissance, a été transformé à 80%, 93% en biomasse pour chaque souche respectivement contrairement à *A. niger* qui a transformé la totalité du lactose en biomasse après 144 heures de croissance.

Il est à noter que, les variations de l'activité enzymatique caractérisées par des pics (**Figure 32, a**) sont dues aux variations de pH pendant la croissance, aussi pour *A. flavus* après le déclin il y a eu une augmentation de la biomasse et du taux de protéines, due à la croissance de certaines cellules revivifiables après lyse des cellules mortes.



**Figure 33:** Évolution de la biomasse et de l'activité enzymatique (a), des protéines et des taux de lactose (b) d'*A. awamori*, *A. tubingensis* et *A. tamaraii*

### 16.2. *Aspergillus awamori*, *Aspergillus tubingensis* et *A. tamaraii*

La croissance d'*A. awamori* présente trois paliers exprimant clairement une croissance triaxique due à l'utilisation successive des trois sources de carbone qui sont l'extrait de levure, la peptone et le lactose présent dans le milieu de base. Celle d'*A. tubingensis* est diauxique à cause de l'utilisation de l'extrait de levure et du lactose. La première phase de latence dans le cas de ces deux souches dure 48 heures environ (**Figure 33, a**), pour *A. tamaraii* elle dure seulement 24 heures.

Après la latence vient la phase de croissance qui se caractérise pour *A. awamori* par l'augmentation rapide de la biomasse qui passe de 4g/l à 13,6 g/l en seulement 12 heures. Pour *A. awamori*, *A. tubingensis* et *A. tamaraii* l'activité enzymatique suit la croissance mycélienne de près, avec des variations de 300 U. en moyenne ce qui signifie que la biosynthèse des protéases est associée à la croissance des microorganismes (**Figure 33, a**). L'activité enzymatique d'*A. awamori* atteint son maximum 1357,14 U. après 120 heures à pH 3,75, celles d'*A. tubingensis* et d'*A. tamaraii* sont de 2155,55 U. à pH 3,29 et 2577,77 U. à pH 4,99 après 132 heures de croissance respectivement.

Tout au long de la croissance, il y a diminution des concentrations de lactose dans le milieu, ce qui confirme sa transformation en biomasse à 92%, 89% et 99% par *A. awamori*, *A. tubingensis* et *A. tamaraii* respectivement. Les concentrations des protéines du milieu varient également en fonction des besoins cellulaires (**Figure 33, b**).

### 16.3. Résultats des fermentations

Les fermentations réalisées en erlenmeyers de 500 ml permettent après un certains nombre de jours de récupérer les filtrats pour réaliser les différents dosages afin d'extraire et de purifier les protéases (**Tableau 35**).

Le nombre de jours nécessaire pour arrêter les fermentations, est retrouvé à partir des courbes de croissance.

**Tableau 35** : Résultats des fermentations

Souches	Nombre de jours	pH	Biom. (g/l)	Taux prot. (µg/ml)	de Act. Enz. (U.)
<i>A. niger</i>	4	4,45	41,80	201,03	2583,33
<i>P. pinophilum</i>	5	5,25	25,80	138,21	1822,21
<i>A. flavus</i>	6	4,95	26,20	112,59	2428,57
<i>A. awamori</i>	5	4,10	26,80	117,45	2142,85
<i>A. tubingensis</i>	6	3,60	34,80	86,96	2350
<i>A. tamaritii</i>	6	5,09	35,20	141,23	1933,33

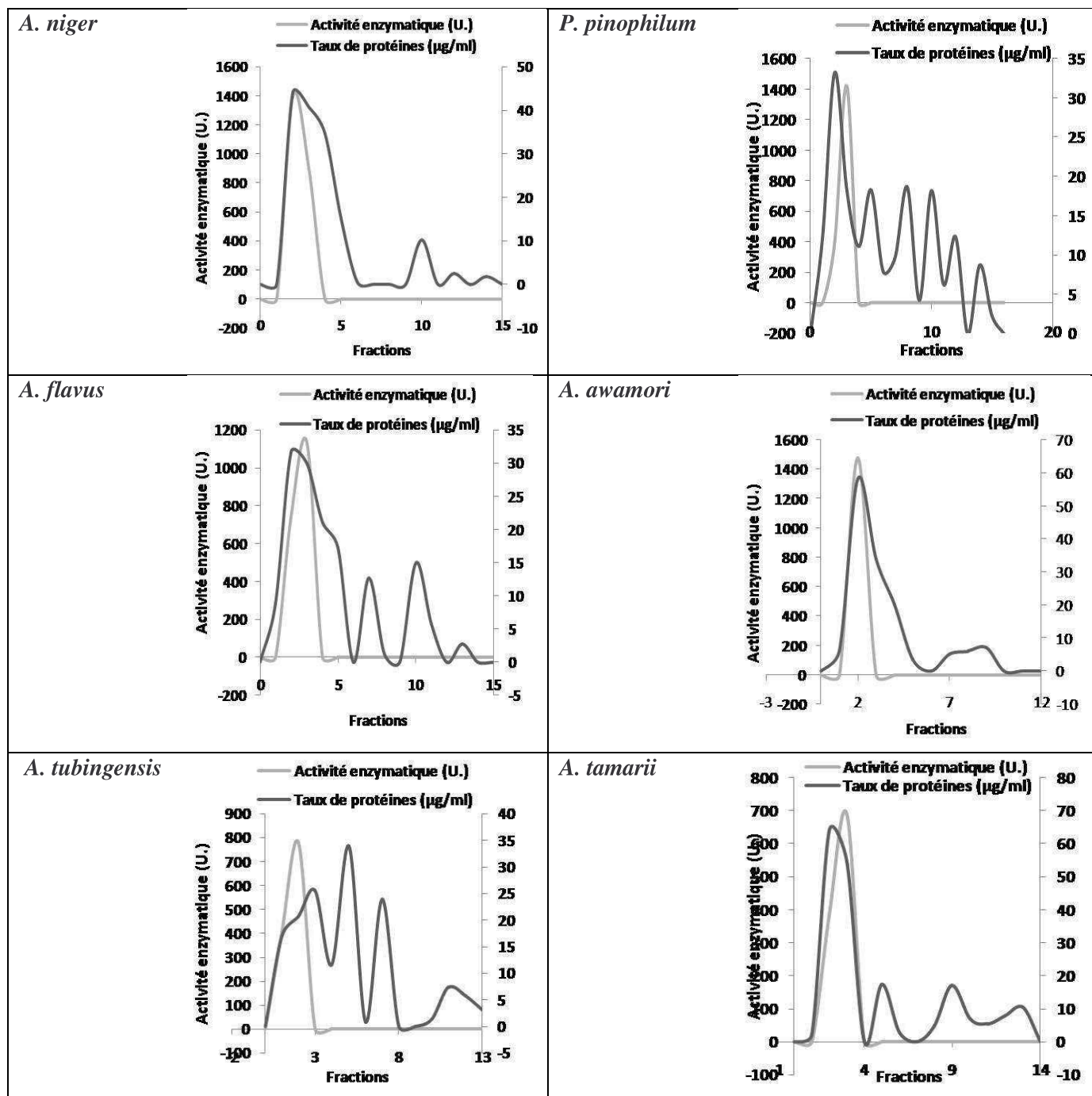
## 17. Extraction et purification des protéases

Les différents filtrats obtenus après fermentation constituent les extraits bruts. Ils sont utilisés pour la purification.

### 17.1. Chromatographie d'exclusion moléculaire

Sur Sephadex G25 M le filtrat dessalé révèle deux pics d'élution pour *A. awamori*, quatre pics d'élution pour les souches *A. niger*, *A. flavus*, *A. tubingensis* et *A. tamaritii* et six pics pour *P. pinophilum*, (**Figure 34**), dont seul les premiers sont doués d'une activité coagulante et protéolytique sur caséine.

Dans le cas de *Mucor pusillus*, **Nouani et al., (2009)** indiquent 2 pics d'élution dont seul le premier est actif, et **Somkuti et Babel (1968)**, quatre pics d'élution dont seul le deuxième est actif.



**Figure 34** : Profils d'élution sur colonne d'exclusion Sephadex G-25 M des filtrats issus des cultures de : *Aspergillus niger*, *P. pinophilum*, *A. flavus*, *A. awamori*, *A. tubingensis* et *A. tamaritii*.

Les résultats de purification par chromatographie d'exclusion moléculaire (**Tableaux 36 et 37**), montrent que cette étape a permis de purifier l'extrait brut d'*A. niger* plus de deux fois avec un rendement de 88,60%, et une activité spécifique de 18,54 U/µg. Les résultats obtenus par **Siala et al., 2009**, pour *A. niger* II, indiquent 3 pics d'élutions dont seul le deuxième

possède une activité protéasique, un facteur de purification de 1,96 et un rendement égal à 65,45% , ceux obtenus par **Fazouane-Naimi et al., (2010)**, indiquent un facteur de purification de 9,14, 20,4% de rendement et une activité spécifique de 1858 U/mg de protéines.

Pour *P. pinophilum* une légère augmentation de l'activité spécifique 13,97 U/ $\mu$ g et du facteur de purification 1,06 avec un rendement de 99,87 % est observée. **Hachimoto et al., (1973)**, ont montré que dans le cas de *Penicillium duponti* K1014, sur Sephadex G200 et après 4 différentes étapes de purification, l'activité spécifique était de 1450,2 U/mg de protéines avec un rendement de 25,5%. **Pol et al., (2012)** de leur côté ont pu purifier l'endoglucanase de *Penicillium pinophilum* MS20 avec un facteur de 5,8 ; 3,6 % de rendement et une activité spécifique de 69 U/mg de protéines.

Dans le cas d'*A. flavus* les résultats indiquent une activité spécifique de 28,60 U/ $\mu$ g, un facteur de purification de 1,32 avec un rendement de 76,86 %. **Muthulakshmi et al., (2011)** démontrent qu'à pH 7, *A. flavus* sécrète également une protéase avec un facteur de purification de 5,2, mais seulement 3,2% de rendement.

**Impoolsup et al., (1981)** reportent pour deux différentes protéases produites à partir d'*A. flavus* var. *columnaris*, une activité spécifique de 708 U/mg, un facteur de purification de 79 et 67% de rendement pour la première (PI) et une activité spécifique de 84 U/mg, un facteur de purification de 53 et 11% de rendement pour la deuxième (PII).

Pour *A. awamori* le facteur de purification après chromatographie d'exclusion moléculaire est de 1,98 avec un rendement de 68,96%. **Do et al., (2012)**, ont montré que dans le cas de la xylanase d'*Aspergillus awamori* VTCC-F312 et sur Sephadex G100, l'activité enzymatique était de 40,6 U/mg de protéines avec un facteur de purification de 3,9 et un rendement de 67%.

Dans le cas d'*A. tubingensis*, une légère augmentation de l'activité spécifique 33,31 U/ $\mu$ g et du facteur de purification 1,23 a été observée avec un rendement de 42,91 % qui exprime une perte d'une quantité importante de protéines pendant cette étape de purification. Une activité spécifique de 19,82 U/ $\mu$ g, un facteur de purification de 17,8 et un rendement de 20% ont été reportés par **Al-Najada et al., (2012)** dans le cas de la polygalactoronase d'*A. tubingensis*.

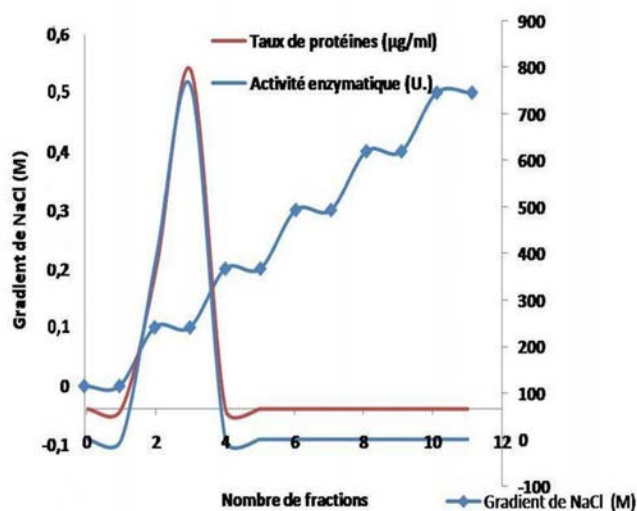


Pour *A. tamarii* l'exclusion moléculaire a permis d'avoir une activité spécifique de 15,27 U/μg ; un facteur de purification de 1,11 et un rendement égal à 55,60%

Dans le cas de la purification de la bêta-N-acétylhexosaminidase d'*A. tamarii* sur Sephadex G250, **Tao et al.**, (1990) ; rapportent que l'enzyme a été purifiée 170 fois avec un rendement de 24,7%. La purification de la protéase alcaline d'*A. tamarii* par chromatographie d'exclusion moléculaire réalisée par **Anandan et al.**, (2007) a permis de purifier 21 fois l'extrait brut avec un rendement de 8%.

## 17.2. Chromatographie échangeuse d'ions

Le profil chromatographique d'échange d'ions sur DEAE-Sepharose des fractions actives des six souches, issues de l'exclusion moléculaire est identique à celui d'*A. niger* reporté sur la **Figure 35** avec des variations de taux de protéines et d'activité enzymatique (**Tableaux 36 et 37**). Toutes les fractions actives montrent un seul pic ayant une activité protéasique coagulante. Ce pic est obtenu au gradient 0,1 M de NaCl.



**Figure 35:** Profil d'élution sur colonne échangeuse d'ions DEAE-Sepharose de la fraction active d'*Aspergillus niger*.

Au cours de cette étape, nous avons observé une augmentation, par rapport à l'étape précédente, du facteur de purification 2,62 et de l'activité spécifique 33,70 U/μg malgré la perte de protéines enregistrée durant la purification (**Tableau 36**).

Les résultats obtenus par **Siala et al., 2009**, pour *A. niger* I1, indiquent 2 pics d'élutions dont seul le deuxième possède une activité protéasique, un facteur de purification de 3,55 et un rendement égal à 56,29%, ceux obtenus par **Kalpana Devi et al., (2008)** dans le cas de la protéase alcaline d'*A. niger* indiquent une activité spécifique de 165,92 U/mg de protéines, un facteur de purification de 34,42 et un rendement de 32%.

Au cours de cette étape, les enzymes produites par *P. pinophilum* et *A. flavus* ont été purifiées deux fois et demie environ, avec un rendement de 99,39% et 47,35% respectivement (**Tableaux 36 et 37**).

Dans une étude réalisée par **Lenoir et al. (1979)**, la purification de la protéase de *Penicillium caseicolum*, a donné un rendement supérieur à 40 %, celle réalisée par **Pol et al., (2012)** dans le cas de l'endoglucanase de *Penicillium pinophilum* MS20, s'est faite avec un facteur de 3,82, une activité spécifique de 45,7 U/mg et un rendement égal à 10,5.

**Impoolsup et al., (1981)**, dans le cas de deux protéases différentes produites par *A. flavus* et purifiées sur carboxyméthyl cellulose une activité spécifique de 3230 U/mg, un facteur de purification de 359 et 8% de rendement pour la première (PI) et une activité spécifique de 143 U/mg, un facteur de purification de 89 et 5% de rendement pour la deuxième (PII).

Dans le cas des souches *A. awamori*, *A. tubingensis* et *A. tamarii* la chromatographie échangeuse d'ions permet de purifier en moyenne trois fois les enzymes avec des rendements entre 39 et 64% (**Tableau 36 et 37**).

**Sundberg et al., (1990)** ont montré que la purification de l'estérase extracellulaire de *Aspergillus awamori* VTT-D-75028 par chromatographie échangeuse d'ions a donné un rendement de 51%.

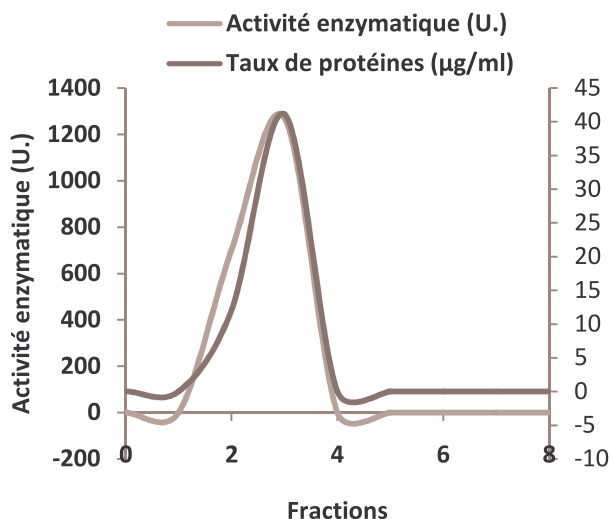
La purification de la protéase produite par *Aspergillus tubingensis* et citée par **Chung et al., (1982)** a donné un rendement de 39% avec un facteur de purification de 5,4.

Dans le cas de la protéase alcaline d'*A. tamarii* de **Sharma et De (2011)**, l'enzyme a été purifiée 26 fois avec une activité spécifique de 11078 U/mg et un rendement de 50%, celle rapportée par **Anandan et al., (2007)** a été purifiée avec un rendement de 31,9% et une activité spécifique égale à 536,1 U/mg.



### 17.3. Chromatographie d'affinité

Le profil chromatographique d'affinité sur Pepstatine A agarose des fractions ayant une activité coagulante, obtenues par chromatographie échangeuse d'ions et concentrées révèle un seul pic d'élution doué d'une activité coagulante pour toutes les souches ressemblant de très près au profil d'élution obtenu avec la fraction d'*A. niger* (**Figure 36**), avec des variations d'activité enzymatique et de taux de protéines (**Tableau 36 et 37**).



**Figure 36** : L'allure de la courbe d'élution des protéines par chromatographie d'affinité pour *Aspergillus niger*

Pour *A. niger*, *P. pinophilum* et *A. tubingensis* l'enzyme a été purifiée trois fois environ, avec des rendements de 76,28% ; 98,90% et 32,98% pour chaque souche respectivement, cette étape a permis d'éliminer 73,57%, 68% et 88,41% des protéines non actives pour *A. niger*, *P. pinophilum* et *A. tubingensis* respectivement.

Les résultats de **Krishnan et Vijayalakshmi (1985)** pour *A. niger*, après chromatographie d'affinité sur Cu<sup>+</sup>-tyrosine-Sepharose 6B, indiquent que l'enzyme a été purifiée 14 fois avec un rendement de 5% et une activité spécifique de 1641U/mg de protéines.

Les fractions actives d'*Aspergillus flavus* après chromatographie d'affinité ont été purifiées cinq fois avec un rendement de 45,50%. La même technique a permis à **Reichard et al., (1994)** de purifier l'aspartyl protéase d'*Aspergillus fumigatus* avec un rendement de 24%.

**Tableau 36** : Résultats des différentes étapes de purifications de : *A. niger*, *P. pinophilum* et *A. tubingensis*

Souches	Étapes de purification	Protéines totales (µg)	Activité totale (U.)	Activité spécifique (U/µg)	Facteur de purification	Rendement
<i>A. niger</i>	Extrait brut	14675,19	188583,09	12,85	1	100
	Exclusion moléculaire	5661,15	167088,24	29,51	2,29	88,60
	Échangeuse d'ions	4500,45	151677,21	33,70	2,62	80,43
	Pepstatine-A agarose	3879,22	143846,5	37,08	2,88	76,28
<i>P. pinophilum</i>	Extrait Brut	10089,33	133021,33	13,18	1	100
	Exclusion moléculaire	9507,52	132860	13,97	1,06	99,87
	Échangeuse d'ions	4080,7	132211,03	32,40	2,46	99,39
	Pepstatine-A agarose	3244,12	131562,06	40,55	3,08	98,90
<i>A. tubingensis</i>	Brut	6522	176250	27,02	1	100
	Exclusion moléculaire	2270,25	75624,75	33,31	1,23	42,91
	Échangeuse d'ions	996	69999,75	70,28	2,60	39,72
	Pepstatine-A agarose	756	58125	76,88	2,84	32,98

Par ailleurs, cette étape a permis de purifier les enzymes d'*A. awamori* et d'*A. tamaritii* avec des facteurs de purification de l'ordre de 3,50 et 6,19 et des rendements de 34,22% et 46,01% pour chaque souche respectivement. (Tableau 37), ceci a permis d'éliminer 90,23% et 92,57% de protéines non actives pour *A. awamori* et *A. tamaritii* respectivement.

Les résultats de la chromatographie d'affinité sur pepstatine agarose obtenus par **Llorente et al., (2004)**, dans le cas d'une protéase acide purifiée à partir de fleurs d'artichaut, indiquent un pic d'élution avec une grande activité coagulante, l'enzyme a été purifiée 30 fois avec un

rendement de 85%. **Amourache (1986)** indique que la purification de la chymosine sur le même gel s'est faite avec un facteur de purification de 6 et un rendement de 60%.

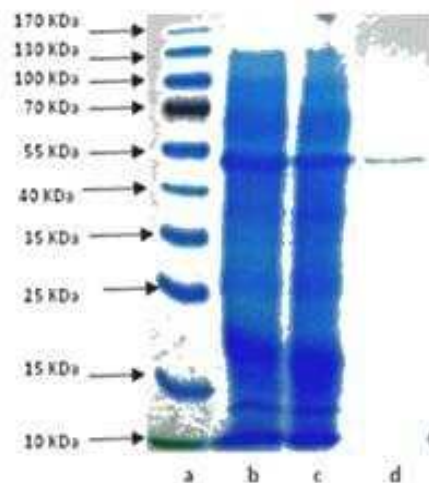
**Tableau 37** : Résultats des différentes étapes de purifications de : *A. flavus*, *A. awamori* et *A. tamaritii*.

Souche	Étapes de purification	Protéines totales (µg)	Activité totale (U.)	Activité spécifique (U/µg)	Facteur de purification	Rendement
<i>A. flavus</i>	Brut	8444,25	182142,75	21,57	1	100
	Exclusion moléculaire	4894,5	139999,5	28,60	1,32	76,86
	Échangeuse d'ions	1621,5	86250	53,19	2,46	47,35
	Pepstatine-A agarose	770,25	82875	107,59	4,99	45,50
<i>A. awamori</i>	Brut	9748,35	177856,55	18,24	1	100
	Exclusion moléculaire	3390,55	122654,91	36,17	1,98	68,96
	Échangeuse d'ions	1850,9	114125	61,66	3,38	64,17
	Pepstatine-A agarose	952,01	60855,6	63,92	3,50	34,22
<i>A. tamaritii</i>	Brut	10309,79	141133,09	13,69	1	100
	Exclusion moléculaire	5138,47	78475	15,27	1,11	55,60
	Échangeuse d'ions	1770,98	76650	43,28	3,16	54,31
	Pepstatine-A agarose	765,77	64931,31	84,79	6,19	46,01

## 17.4. Électrophorèse SDS-PAGE

### 17.4.1. *Aspergillus niger*

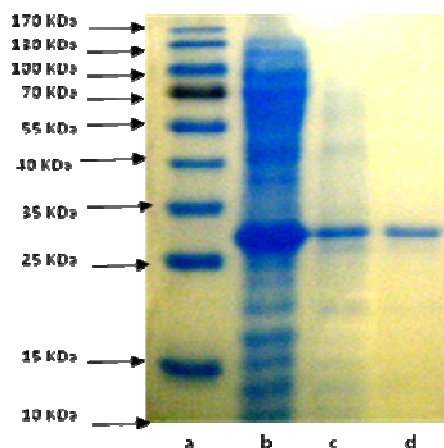
L'enzyme purifiée est visualisée sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), leurs sous-unités ont un poids moléculaire d'environ 55 kDa. Les résultats de filtration sur gel de l'enzyme sont donnés dans la **Figure 37**. Dans le cas de la protéase isolé par **Fazouane et al., (2010)**, la masse moléculaire apparente de l'enzyme purifiée était également de 55 KDa, dans le cas de **Siala et al., (2009)** sa masse est de 50KDa.



**Figure 37** : SDS-PAGE d'*Aspergillus niger*: a- marqueur de PM, b- Extrait Brut, c- fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire, d- Fractions issues de Pepstatin A-agarose

#### 17.4.2. *Penicillium pinophilum*

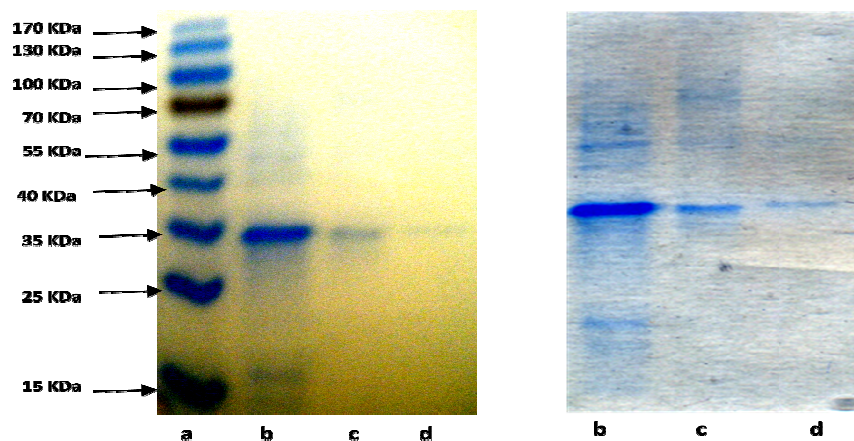
La visualisation de l'enzyme produite par *P. pinophilum* sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), leurs sous-unités ont un poids moléculaire d'environ 30 kDa (**Figure 38**). Dans le cas de la protéase isolé **Vamsi et al., (2009)** la masse moléculaire apparente de l'enzyme purifiée était de 33 KDa. celle de *Penicillium camemberti* isolée par **Chrzanowska et al., (1995)**, était de 33,5 KDa et de *Penicillium roqueforti* isolée par **Durand-Poussereau et Fevre (1996)** était de 43 KDa.



**Figure 38** : SDS-PAGE de *Penicillium pinophilum*: a- marqueur de PM, b- Extrait Brut, c- fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire, d- Fractions issues de Pepstatin A-agarose

### 17.4.3. *Aspergillus flavus*

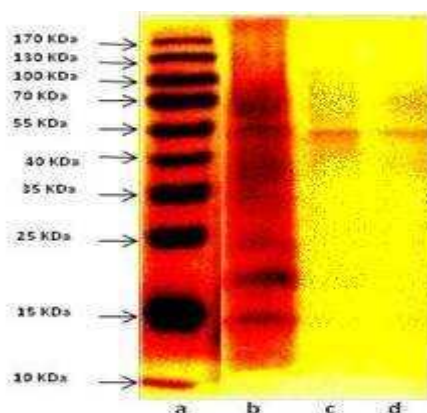
L'enzyme purifiée est visualisée sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), leurs sous-unités ont un poids moléculaire d'environ 35 kDa. Les résultats de filtration sur gel de l'enzyme sont donnés dans la **Figure 39**. Dans le cas de la protéase isolé par **Towhid Hussein et al., (2006)**, et **Muthulakshmi et al., (2011)** la masse moléculaire apparente de l'enzyme purifiée était de 46 kDa.



**Figure 39** : SDS-PAGE d'*Aspergillus flavus*: a- marqueur de PM, b- Extrait Brut, c- fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire, d- Fractions issues de Pepstatin A-agarose

### 17.4.4. *Aspergillus awamori*

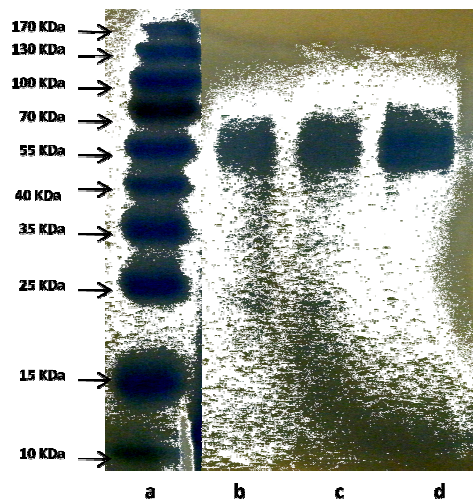
L'enzyme purifiée est visualisée sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), leurs sous-unités ont un poids moléculaire d'environ 55 kDa. Les résultats de filtration sur gel de l'enzyme sont donnés dans la **Figure 40**.



**Figure 40** : SDS-PAGE d'*Aspergillus awamori*: a- marqueur de PM, b- Extrait Brut, c- fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire, d- Fractions issues de Pepstatin A-agarose

#### 17.4.5. *Aspergillus tubingensis*

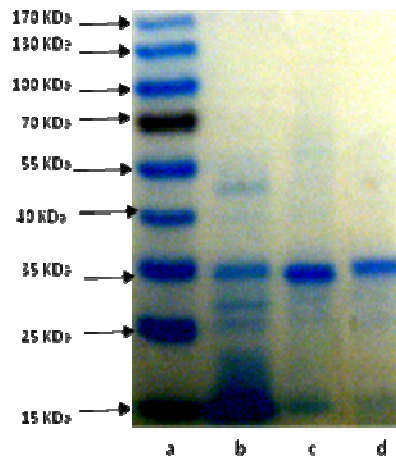
L'enzyme purifiée est visualisée sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), leurs sous-unités ont un poids moléculaire d'environ 55 kDa Les résultats de filtration sur gel de l'enzyme sont donnés dans la **Figure 41**.



**Figure 41** : SDS-PAGE d'*Aspergillus tubingensis*: a- marqueur de PM, b- Extrait Brut, c- fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire, d- Fractions issues de Pepstatin A-agarose

#### 17.4.6. *Aspergillus tamarii*

L'enzyme purifiée est visualisée sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), leurs sous-unités ont un poids moléculaire d'environ 35 kDa Les résultats de filtration sur gel de l'enzyme sont donnés dans la **Figure 42**. Dans le cas de la protéase alcaline produite par Namrata et Kantichri (2011), la masse moléculaire apparente de l'enzyme purifiée était de 63 kDa.



**Figure 42** : SDS-PAGE d'*Aspergillus tamaris* : a- marqueur de PM, b- Extrait Brut, c- fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire, d- Fractions issues de Pepstatin A-agarose

## **Chapitre 5**

### ***Résultats des propriétés physicochimiques et technologiques des enzymes produites***



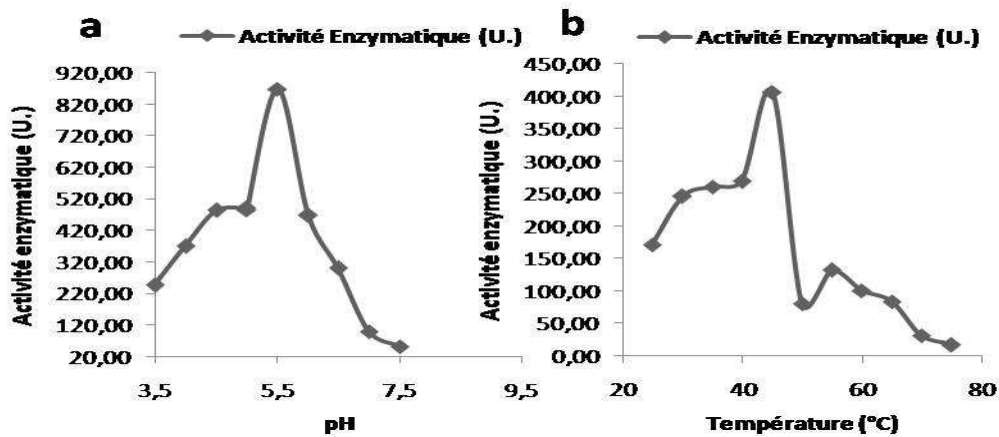
## 18. Propriétés physicochimiques

### 18.1. Effet du pH et de la température

#### 18.1.1. *Aspergillus niger*

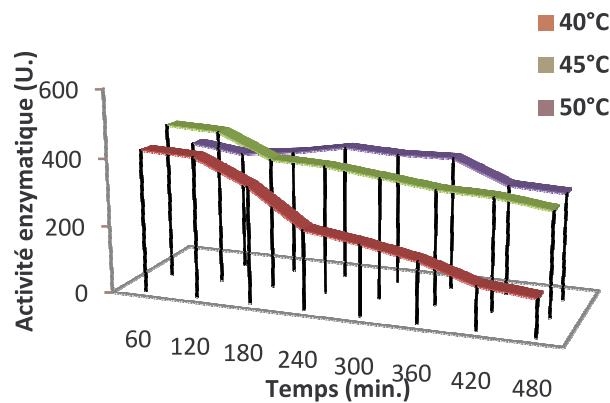
L'effet du pH sur l'activité protéasique de l'enzyme purifiée d'*Aspergillus niger* est illustré sur la **figure 43**, l'enzyme est active à différents pH 3.5- 5.0 dans du tampon Tris / HCl mais son maximum d'activité a été observé à pH 5.5 et à 45 ° C, au-delà de ce pH l'activité de l'enzyme diminue de façon considérable. Ces optima sont comparables à ceux observés précédemment par **Fazouane et al., (2010)**.

**Siala et al., 2009** de leur côté, ont observé une activité optimale à 60°C et à pH 3. La protéase produite par **Paranthaman et al., (2009)** donne un maximum d'activité à 35°C à pH 7.



**Figure 43:** Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité d'*Aspergillus niger*.

La stabilité de l'enzyme purifiée a été étudiée à pH 5,5 à différentes températures, de 40 à 50 ° C (Figure 44).

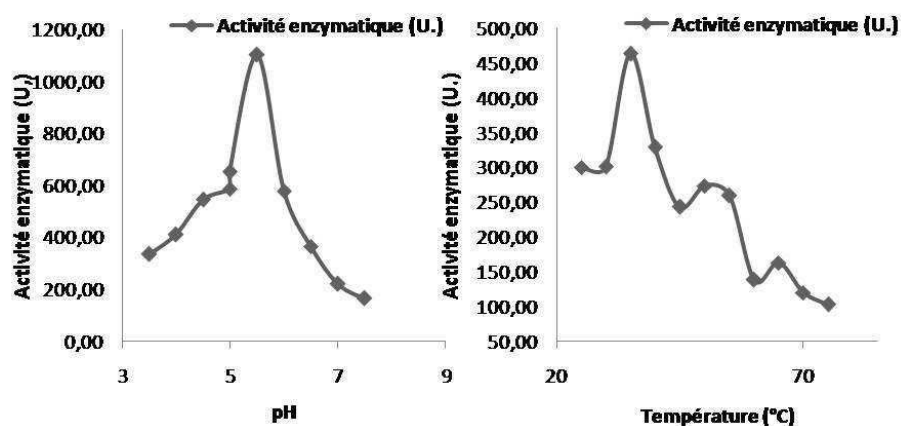


**Figure 44 :** Stabilité de l'activité enzymatique d'*A. niger* à différentes températures

L'enzyme a montré un  $t_{1/2}$  d'environ 3h à 40 ° C, au bout de 8h d'incubation elle a perdu plus de 74% de son activité (**Figure 44**), à 45°C l'activité reste stable environ 120 min puis diminue en moyenne de 5,5 % toute les 60 min. jusqu'à la fin de l'incubation. À 50°C et après 3h d'incubation l'activité enzymatique a augmenté de 9,5%, est restée stable environ 120 min puis a diminué d'environ 6% toutes les 60 min jusqu'à la fin de l'incubation. **Siala et al. (2009)** ont remarqué que l'enzyme était très stable à des températures inférieures à 40°C à pH 3, et reste entièrement active après 1h d'incubation à 30°C, mais perd jusqu'à 73 et 91% de son activité après 15 min d'incubation à 50 et 60°C respectivement.

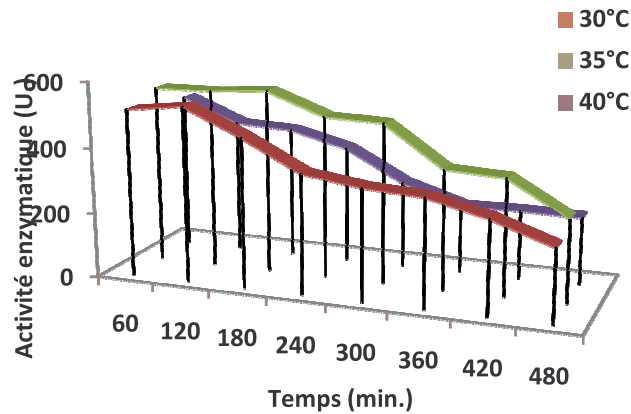
### 18.1.2. *Penicillium pinophilum*

Dans ce cas, l'enzyme purifiée a également présenté un maximum d'activité à pH 5,5 dans du tampon Tris / HCl mais à 35°C (**Figure 45**). Au delà de ce pH l'activité a baissé de façon considérable.



**Figure 45:** Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité de *Penicillium pinophilum*.

**Zevaco et al., (1974)** lors de l'étude de la protéase acide de *Penicillium roqueforti* ont observé une très grande activité de l'enzyme à pH 3,5 sur caséine à 40°C avec un optimum à 50°C et une stabilité à pH 3,5 -5,5. **Hashem (2000)** indique que l'enzyme de coagulation produite par *Penicillium oxalicum* avait une activité maximale à 65°C et à pH 4,0.



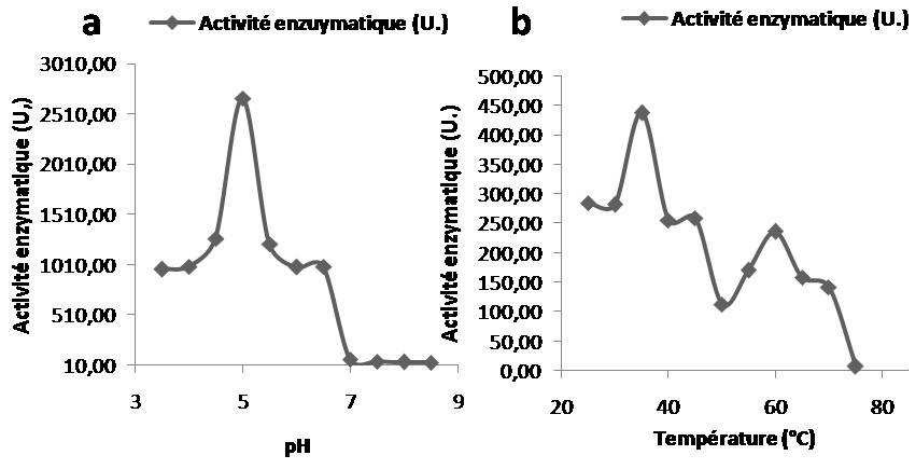
**Figure 46:** Stabilité de l'activité enzymatique de *P. pinophilum* à différentes températures

Dans le cas de *P. pinophilum* l'activité de l'enzyme à 30 ° C a augmenté de 1% durant la deuxième heure d'incubation puis a perdu environ 13 % de son activité toutes les heures jusqu'à la fin de l'incubation où l'enzyme perd plus de 57% de son activité, (**Figure 46**), à 35°C l'enzyme est restée stable environ 2h, puis a commencé à perdre son activité jusqu'à atteindre 45% de perte en fin d'incubation, à 40°C par contre, l'enzyme a commencer à perdre son activité dès la première heure d'incubation et a montré un  $t_{1/2}$  de 4 heures.

Dans le cas de la protéase acide de *Penicillium duponti*, **Shigenori et al., (1976)** ont montré que l'enzyme était stable à pH 3,5 et 6,5 pendant 24 heures d'incubation à 30°C, 1 heure à 60°C et 1 heure à 75°C à pH 3,7.

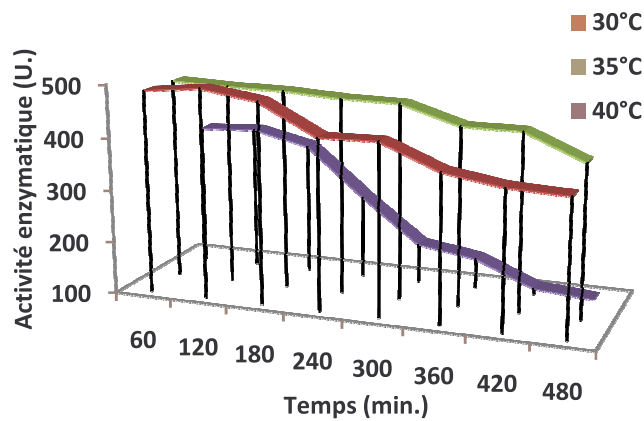
### **18.1.3. *Aspergillus flavus***

L'enzyme purifiée d'*Aspergillus flavus*, a montré une activité maximale à 35 ° C à pH 5 dans du tampon citrate (**Figure 47**), dans le même contexte, **Towhid Hossain et al. (2006)**; **Shumi et al., (2003)** ont rapporté que l'activité maximale d'une protéase de l'extrait enzymatique brut de *A. flavus* a été retrouvée à 45°C ± 1, pH 8,0, et à 45°C respectivement.



**Figure 47:** Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité d'*Aspergillus flavus*

La stabilité de l'enzyme purifiée a été étudiée dans un intervalle de 30 à 40 ° C, la variation dans le temps des températures a montré que l'activité de l'enzyme à 35 ° C augmente d'environ 11U. après 2 heures d'incubation, puis diminue de 5% toute les heures pour atteindre 356 U. en fin d'incubation. (Figure 48), à 40°C on enregistre un  $t_{1/2}$  d'environ 4 heures.

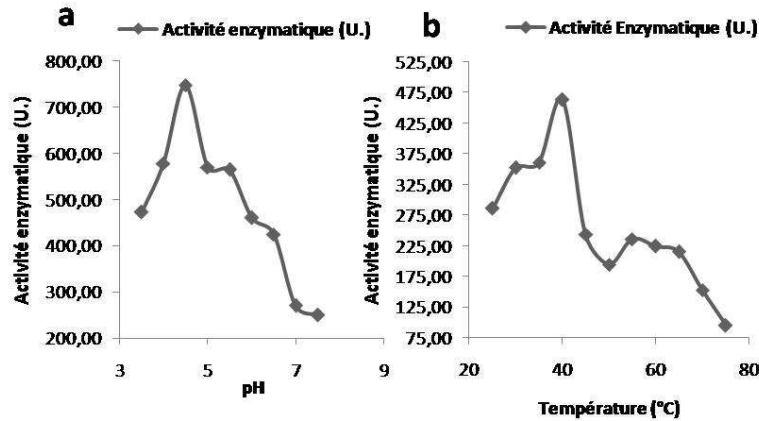


**Figure 48:** Stabilité de l'activité enzymatique d'*Aspergillus flavus* à différentes températures

Dans le cas de la protéase alcaline d'*Aspergillus flavus*, **Yadav et al., (2011)** indiquent une stabilité de 96% de l'activité enzymatique pendant la première heure d'incubation à 40°C, de 84 et 53% à 45 et 55°C respectivement.

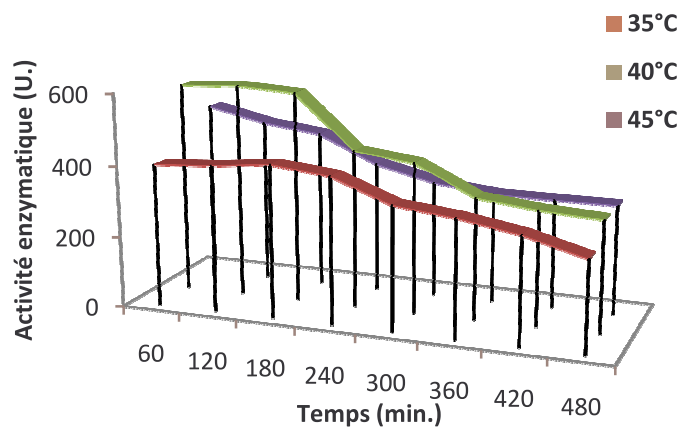
**18.1.4. *Aspergillus awamori***

Dans ce cas, le maximum d'activité de l'enzyme purifiée a été observé à 40° C à pH 4,5 dans du tampon citrate (**Figure 49**), au-delà de 5,5 l'activité de l'enzyme diminue de façon très visible.



**Figure 49:** Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité d'*Aspergillus awamori*

À 35°C et après plus de 60 min d'incubation (**Figure 50**) l'activité enzymatique a augmenté d'environ 27 U. et s'est stabilisée pendant 30min, puis a commencer à perdre 5% de son activité toute les heures jusqu'à la fin de l'incubation. Cette même enzyme présente une certaine stabilité à 40°C pendant plus de 240 minutes, puis perd environ 12% de son activité chaque heure jusqu'à la fin de l'incubation.

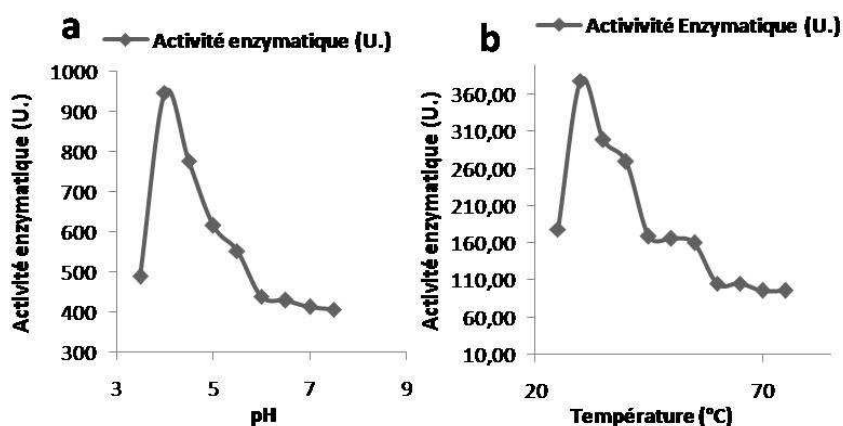


**Figure 50:** Stabilité de l'activité enzymatique d'*Aspergillus awamori* à différentes températures

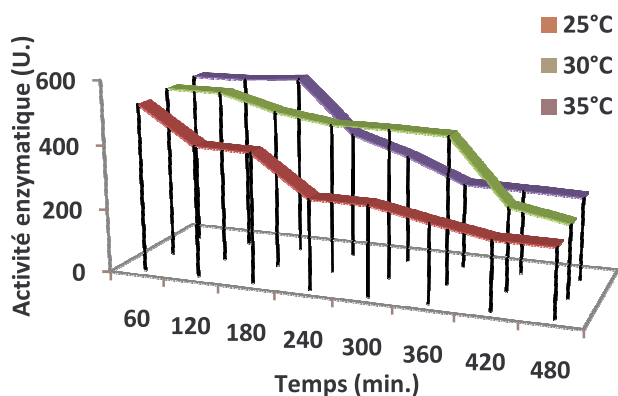
Par ailleurs et dès la première heure d'incubation, l'enzyme perd de l'activité jusqu'à la fin puisqu'elle atteint à peine 306 U. après 8 heures à 45°C. l'acétylestérase d'*Aspergillus awamori* reportée par **Koseki et al., (1997)** était à son maximum à pH 7,0 et avait une grande stabilité a des température inférieures à 40°C.

### 18.1.5. *Aspergillus tubingensis*

Dans ce cas, l'enzyme purifiée a une activité maximale à pH 4, 30° C dans du tampon citrate (**Figure 51**).



**Figure 51:** Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité d'*Aspergillus tubingensis*



**Figure 52:** Stabilité de l'activité enzymatique d'*Aspergillus tubingensis* à différentes températures

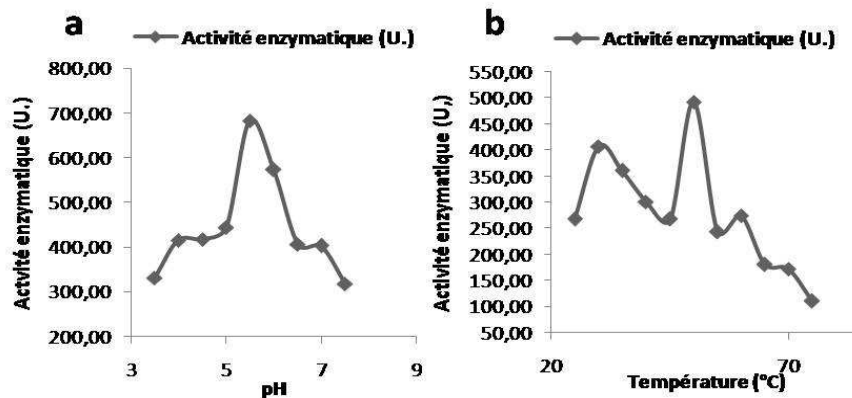
À 25°C (**Figure 52**), dès la première heure d'incubation l'enzyme a perdu 23% de son activité, on a enregistré à cette température un  $t_{1/2}$  de 4 heure 50 min. À 30 et 35°C l'enzyme

était plus stable durant les deux premières heures d'incubation, ensuite il y a eu perte d'activité à raison de 12% et 13% toutes les 60 min. aux deux températures respectivement.

Morya et Yadav (2010) indiquent que la protéase neutre d'*Aspergillus tubingensis* a une activité maximale à 40°C à pH 6,4 et est stable au-delà de 60°C pendant 30 min.

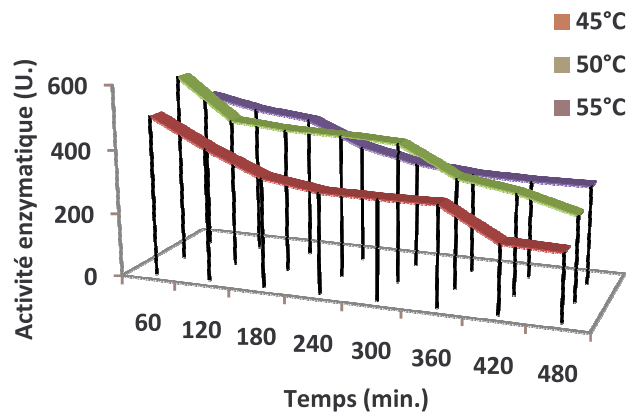
### 18.1.6. *Aspergillus tamarii*

L'enzyme purifiée à partir d'*Aspergillus tamarii* présente une activité optimale à pH 5,5 dans du tampon Tris / HCl et à 50° C, (Figure 53). Namrata et Kantishree (2011), ont démontré que la protéase alcaline produite à partir d'*A. tamarii* avait un pH optimum d'activité entre 8 et 9 et un optimum d'activité à 60°C mais était inactive à 80°C.



**Figure 53:** Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité d'*Aspergillus tamarii*

La stabilité de l'enzyme purifiée a été étudiée à différentes températures de 45 à 55 ° C (Figure 54),



**Figure 54:** Stabilité de l'activité enzymatique d'*Aspergillus tamarii* à différentes températures



## **Chapitre 5 : Résultats des propriétés physicochimiques et technologiques des enzymes produites**

Comme le montre la figure, aux trois températures l'enzyme est instable, et son activité diminue dès la première heure d'incubation, il y a perte de 60%, 56% et 40% de l'activité en fin d'incubation à 45, 50 et 55°C respectivement.

**Sharma et De (2011)** indiquent que la protéase alcaline d'*Aspergillus tamaraii* a une activité maximale à 60°C, pH 8-9, et est inactive au-delà de 80°C.

Les différents pH et températures sont résumés dans le **tableau 38**.

**Tableau 38:** pH optimums et températures optimales d'activité des différentes souches

<b>Souche</b>	<b>pH optimal</b>	<b>Température optimale (°C)</b>
<i>Aspergillus niger</i>	5,5	45
<i>Penicillium pinophilum</i>	5,5	35
<i>Aspergillus flavus</i>	5	35
<i>Aspergillus awamori</i>	4,5	40
<i>Aspergillus tubingensis</i>	4	30
<i>Aspergillus tamaraii</i>	5,5	50

### **18.2. Activité coagulante sur différents laits**

#### **18.2.1. Action sur le lait de chèvre UHT**

La coagulation du lait de chèvre UHT par les enzymes produites se fait par dégradation des caséines du lait et leur agrégation par formation d'un caillé. Les temps de coagulation du lait, les activités coagulantes et les forces coagulantes sont reportés sur le **tableau 39**.

La présure liquide (Cooper) contient 520 mg/l de protéines, 10µl sont utilisés pour coaguler 10ml de lait dans les mêmes conditions.

D'après les résultats du tableau 38 et par comparaison avec la présure les temps de coagulation du lait de chèvre avec l'enzyme après chromatographie d'affinité semble intéressant pour les souches *A. flavus* et *A. tamaraii* qui est de 12 min. mais les forces coagulantes des enzymes sont très faibles par rapport à la force de la présure, ce qui est dû d'une part à la différence des volumes utilisés pour la coagulation du lait et ce à cause de la concentration en protéines de chaque volume, et d'autre part à la spécificité de la présure.



**Tableau 39** : Temps de coagulation du lait de chèvre UHT, activités coagulantes et Forces coagulantes des différentes souches

Souches	Étape de purification	T. C. L.C (min.)	Act. Coag. (UP/ml)	F. Coag.
<i>A. niger</i>	Extrait brut	45	0,037	8,23
	Après chromato. d'excl. mol.	40	0,042	9,26
	Après chromato. d'affinité	35	0,07	15,55
<i>P. pinophilum</i>	Extrait brut	38	0,044	9,78
	Après chromato. d'excl. mol.	35	0,048	10,67
	Après chromato. d'affinité	20	0,17	37,03
<i>A. flavus</i>	Extrait brut	20	0,083	18,44
	Après chromato. d'excl. mol.	15	0,11	24,44
	Après chromato. d'affinité	12	0,35	<b>77,16</b>
<i>A. awamori</i>	Extrait brut	65	0,026	5,78
	Après chromato. d'excl. mol.	48	0,035	7,78
	Après chromato. d'affinité	35	0,07	15,55
<i>A. tubindensis</i>	Extrait brut	55	0,030	6,66
	Après chromato. d'excl. mol.	25	0,067	14,89
	Après chromato. d'affinité	25	0,16	35,55
<i>A. tamaritii</i>	Extrait brut	25	0,067	14,89
	Après chromato. d'excl. mol.	25	0,067	14,89
	Après chromato. d'affinité	15	0,28	<b>62,22</b>
<b>Présure</b>	Directement	<b>12</b>	<b>13,89</b>	<b>3086,67</b>

Il est à noter que, la stérilisation à haute température du lait de chèvre peut être la cause des temps de coagulations élevés, observés dans le cas des coagulations réalisées grâce aux extraits bruts riches en protéases coagulantes (activités protéolytiques variant de 1822,21 à 2583,33U.).

**18.2.2. Action sur le lait de vache UHT**

Les temps de coagulation du lait de vache UHT par les différentes enzymes, les activités coagulantes et les forces coagulantes sont reportés sur le **tableau 40**. La coagulation du lait de vache UHT permet la formation de caillés.

**Tableau 40** : Temps de coagulation du lait de Vache UHT, activités coagulantes et Forces coagulantes des différentes souches

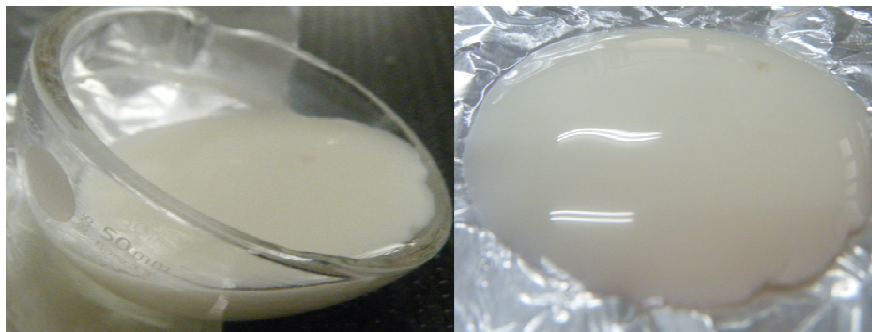
Souches	Étape de purification	T C. L. V UHT (min.)	Act. Coag. (UP/ml)	F. Coag.
<i>A. niger</i>	Extrait brut	30	0,055	12,22
	Après chromato. d'excl. mol.	30	0,055	12,22
	Après chromato. d'affinité	9	0,20	44,44
<i>P. pinophilum</i>	Extrait brut	45	0,037	8,22
	Après chromato. d'excl. mol.	25	0,067	14,89
	Après chromato. d'affinité	12	0,14	31,11
<i>A. flavus</i>	Extrait brut	20	0,083	18,44
	Après chromato. d'excl. mol.	10	0,17	37,78
	Après chromato. d'affinité	8	0,21	46,67
<i>A. awamori</i>	Extrait brut	65	0,026	5,78
	Après chromato. d'excl. mol.	60	0,028	6,22
	Après chromato. d'affinité	9	0,20	44,44
<i>A. tubindensis</i>	Extrait brut	35	0,048	10,67
	Après chromato. d'excl. mol.	15	0,11	24,44
	Après chromato. d'affinité	8	0,21	46,67
<i>A. tamaritii</i>	Extrait brut	7	0,24	53,33
	Après chromato. d'excl. mol.	5	0,33	73,33
	Après chromato. d'affinité	5	0,33	<b>73,33</b>
Présure	Directement	<b>15</b>	<b>11,11</b>	<b>2468,89</b>

Les temps de coagulation du lait avec les enzymes après chromatographie d'affinité sont très satisfaisants pour toutes les souches, sont inférieurs à celui obtenu après coagulation du lait avec la présure car le volume utilisé dans le cas des enzymes est élevé par rapport à celui de la présure (10µl).

### **18.2.3. Action sur le lait de vache frais**

#### **18.2.3.1. *Aspergillus niger***

La coagulation du lait de vache frais par l'extrait brut d'*Aspergillus niger* se fait en 25 min. à 35°C (**Figure 55**). Le lait caille de façon globale, laisse apparaître un sérum clair jaunâtre et un caillé brillant, ferme de couleur blanche.



**Figure 55**: *A. niger*: Aspect du caillé après coagulation

#### **18.2.3.2. *Penicillium pinophilum***

L'extrait brut de *P. pinophilum* coagule le lait de vache frais en 35 min. à 35°C (**Figure 56**). Les protéines du lait agrègent et forment un caillé moins ferme que celui d'*Aspergillus niger* laisse apparaître un sérum clair jaunâtre et un caillé brillant de couleur blanche à jaunâtre.



**Figure 56**: *P. pinophilum* : Aspect du caillé après coagulation

**18.2.3.3. *Aspergillus flavus***

L'extrait brut d'*A. flavus* coagule le lait de vache frais en 8 min. à 35°C (**Figure 57**) Le lait caille de façon homogène laissant apparaître un sérum clair blanchâtre et un caillé ferme brillant de couleur blanche.



**Figure 57**: *A. flavus*: Aspect du caillé après coagulation

**18.2.3.4. *Aspergillus awamori***

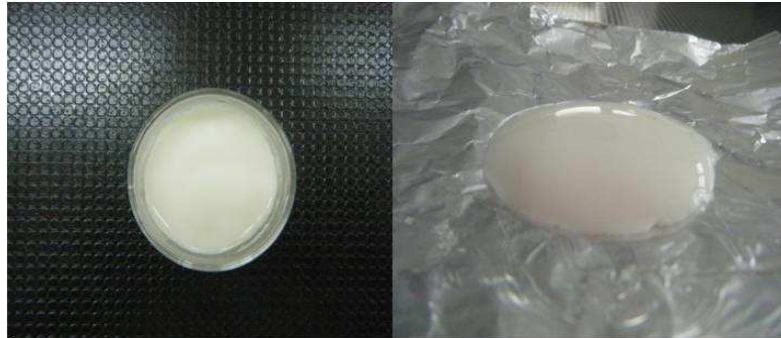
Contrairement à toutes les autres *A. awamori* est la seule souche dont seule la concentration des protéines des différentes fractions après chaque étape de purification permet l'obtention d'une coagulation (**Figure 58**) avec une différence de temps de coagulation. L'extrait brut de cette souche coagule le lait en 55 min.



**Figure 58**: *A. awamori*: Aspect du caillé après coagulation

**18.2.3.5. *Aspergillus tubingensis***

La coagulation du lait de vache frais par l'extrait brut d'*Aspergillus tubingensis* permet d'avoir une coagulation à 35°C en 25 min. (**Figure 59**). Le lait caille de façon homogène laissant apparaître un sérum clair blanchâtre et un caillé ferme brillant de couleur blanche.



**Figure 59**: *A. tubingensis*: Aspect du caillé après coagulation

**18.2.3.6. *Aspergillus tamaris***

Contrairement à toutes les autres souches, *Aspergillus tamaris* est la seule souche dont l'extrait brut coagule le lait de vache frais à 35°C en 5 min. L'enzyme produite coagule le lait en 2 min à 35°C avec une force coagulante de 184,44. Le caillé formé laisse apparaître un sérum clair jaunâtre. (**Figure 60**).



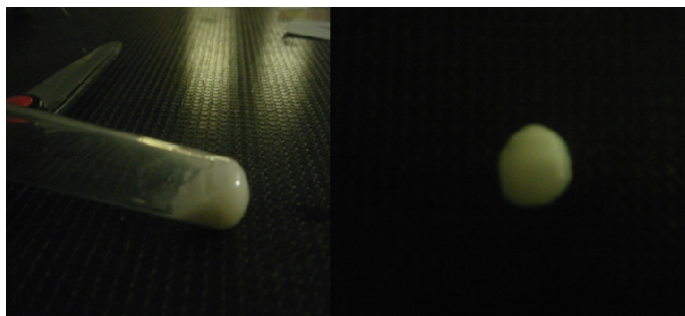
**Figure 60**: *A. tamaris*: Aspect du caillé après coagulation

Il est à noter que, toutes les coagulations sont réalisées avec 1 ml d'extrait enzymatique et 10 ml de lait, à l'exception de certains cas, où l'enzyme étant en quantité minimale impose la réduction du volume de lait de façon à garder le rapport 1/10.



## Chapitre 5 : Résultats des propriétés physicochimiques et technologiques des enzymes produites

Les coagulations réalisées avec l'enzyme directement après chromatographie d'affinité permettent d'avoir un caillé ferme comme le montre la **figure 61** pour toutes les souches avec une différence de temps de coagulation.



**Figure 61:** Aspect du caillé après coagulation avec l'enzyme des six souches

Les temps de coagulations du lait de vache frais par les différentes fractions des six souches, les activités coagulantes et les forces coagulantes sont reportés sur le **tableau 41**.

**Tableau 41 :** Temps de coagulation du lait de Vache frais, activités coagulantes et Forces coagulantes des différentes souches

Souches	Étape de purification	T. C. L.V frais (min.)	Act. Coag. (UP/ml)	F. Coag.
<i>A. niger</i>	Extrait Brut	25	0,067	14,89
	Après chromato. d'excl. mol.	12	0,14	31,11
	Après chromato. d'affinité	5	0,33	73,33
<i>P. pinophilum</i>	Extrait Brut	35	0,048	10,67
	Après chromato. d'excl. mol.	10	0,17	37,78
	Après chromato. d'affinité	5	0,33	73,33
<i>A. flavus</i>	Extrait Brut	8	0,21	46,67
	Après chromato. d'excl. mol.	8	0,21	46,67
	Après affinité	5	0,33	73,33
<i>A. awamori</i>	Extrait Brut	55	0,030	6,67
	Après chromato. d'excl. mol.	15	0,11	24,44
	Après chromato. d'affinité	5	0,33	73,33
<i>A. tubindensis</i>	Extrait Brut	25	0,067	14,89
	Après chromato. d'excl. mol.	8	0,21	46,67
	Après chromato. d'affinité	5	0,33	73,33
<i>A. tamarii</i>	Extrait Brut	5	0,33	73,33
	Après chromato. d'excl. mol.	5	0,33	73,33
	Après chromato. d'affinité	2	0,83	<b>184,44</b>
Présure	Directement	<b>15</b>	<b>11,11</b>	<b>2468,89</b>

### **19. Comparaison des résultats de coagulation avec ceux obtenus avec la présure**

Les coagulations réalisées avec les enzymes produites et par comparaison avec celles réalisées avec la présure montrent certaines différences :

- Le temps de coagulation du lait de chèvre par la présure par rapport aux temps de coagulation du lait de chèvre par les enzymes des souches *A. niger*, *P. pinophilum*, *A. awamori*, et *A. tubingensis* est plus court.
- Les caillés obtenus après coagulation avec la présure sont plus légers que ceux obtenus après coagulation avec les extraits enzymatiques des six souches.
- Les caillés obtenus par coagulation à la présure (**Figure 62**), ont des aspects différents, en (a) donne un caillé blanc très brillant et ferme qui dégage un sérum clair, en (b) le caillé est blanchâtre moins ferme que le premier avec un sérum jaunâtre. Enfin, en c la coagulation donne un caillé moins ferme blanchâtre et un sérum pleins de résidus protéiques.



**Figure 62:** Aspect des caillés coagulés à la présure, a : Lait de vache frais, b : lait de chèvre UHT et c : lait de vache UHT

Les résultats montrent que les différentes étapes de purification permettent d'avoir des extraits enzymatiques ayant des activités coagulantes jugées acceptables, mais par comparaison aux résultats obtenus avec la présure, les enzymes ont des forces coagulantes trop faibles. Les résultats obtenus par **Nouani et al., (2009)** montrent que l'extrait enzymatique brut, obtenu à partir de la culture en surface de *Mucor pusillus*, est caractérisé par une force coagulante brute de 1/1200. La présure commercialisée a une force de 1/10000.

Cette grande différence des résultats peut s'expliquer par le fait que la présure soit composée de deux hydrolases spécifiques, en particulier la chymosine qui brise la liaison peptidique Phe<sub>105</sub>- Met<sub>106</sub> de la caséine kappa responsable de la coagulation du lait. De ce fait, il serait

très intéressant de réaliser des coagulations avec des enzymes de références d'origines microbiennes dans des conditions opératoires normalisées afin de comparer et déterminer les activités de coagulation du lait des six enzymes purifiées et leurs forces coagulantes.

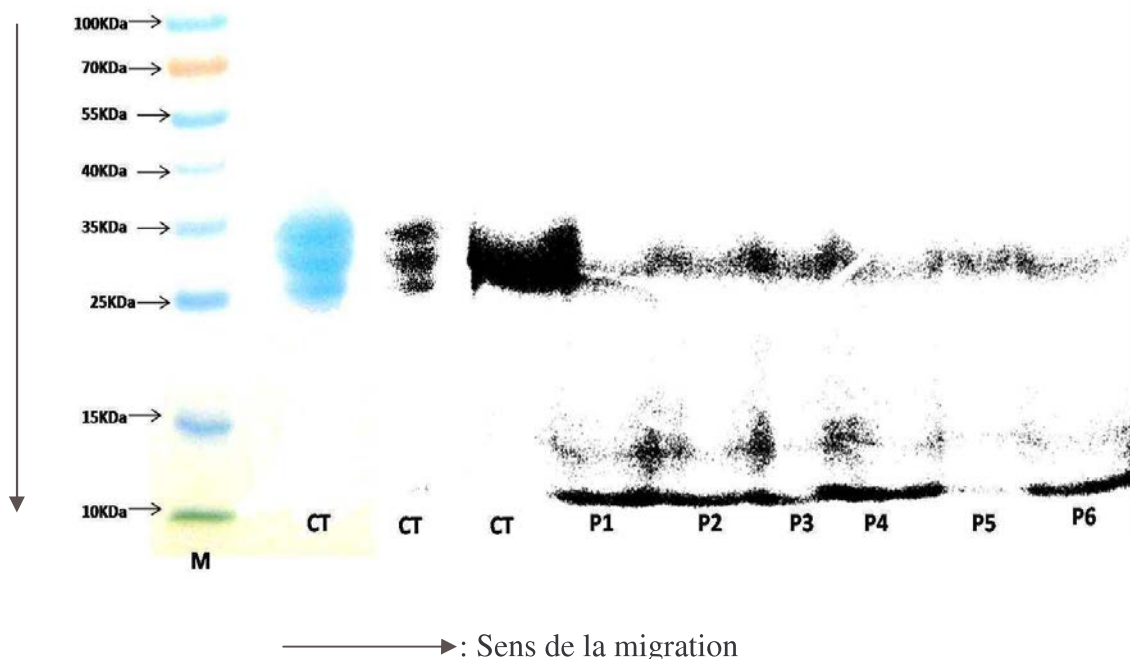
Aussi, afin que la coagulation du lait par les enzymes produites soit efficace il est nécessaire de considérer simultanément la teneur en  $Ca^{++}$ , la température, le pH, la force de l'enzyme

## 20. Effet des enzymes sur les caséines de lait

Dans cette dernière partie nous nous sommes intéressés à l'effet exercé par les enzymes produites sur la caséine totale et les différentes caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  en comparaisons avec la caséine commerciale et les travaux réalisés antérieurement.

### 20.1. Effet sur la caséine totale

L'effet des enzymes produites sur la caséine totale est représenté sur la **figure 63**. La caséine totale après migration laisse apparaitre trois bandes nettes, qui correspondent aux trois caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ , de poids moléculaires voisin de 35KDa pour  $\alpha$ , 30KDa pour  $\beta$  et 25KDa pour  $\kappa$ .



**Figure 63** : Hydrolyse de la caséine totale par les différentes enzymes ; M- marqueur de PM ; CT-caséine totale P1-protéase d'*A. niger* ; P2-protéase de *P. pinophilum* ; P3- protéase d'*A. flavus* ; P4-protéase d'*A. awamori* ; P5-protéase d'*A. tubingensis* ; P6-protéase d'*A. tamaritii*.

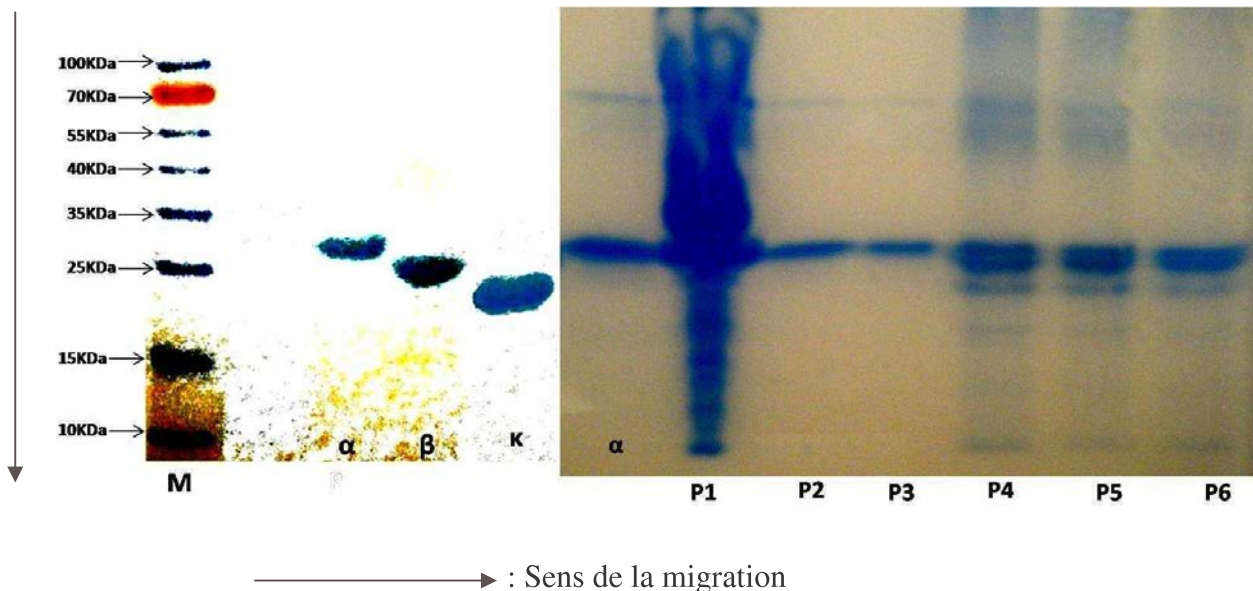


Sur la **figure 63**, les protéases de P1 à P6 laissent apparaître trois bandes : une qui correspond à la caséine totale partiellement hydrolysée, et les deux autres à des fragments libérés après hydrolyse. La première bande a un PM d'environ 35KDa, la deuxième un PM d'environ 13KDa et la troisième un PM d'environ 10KDa, ce qui laisse penser et vu la taille réduite de la caséine totale observée sur le gel, que, les enzymes ont partiellement hydrolysé la caséine totale de lait.

Le profil chromatographique HPLC de l'hydrolyse de la caséine totale par la protéase de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Merheb-Dini et al., 2010) indique deux bandes correspondant aux caséines  $\alpha$  et  $\beta$ .

### 20.2. Effet sur la caséine $\alpha$

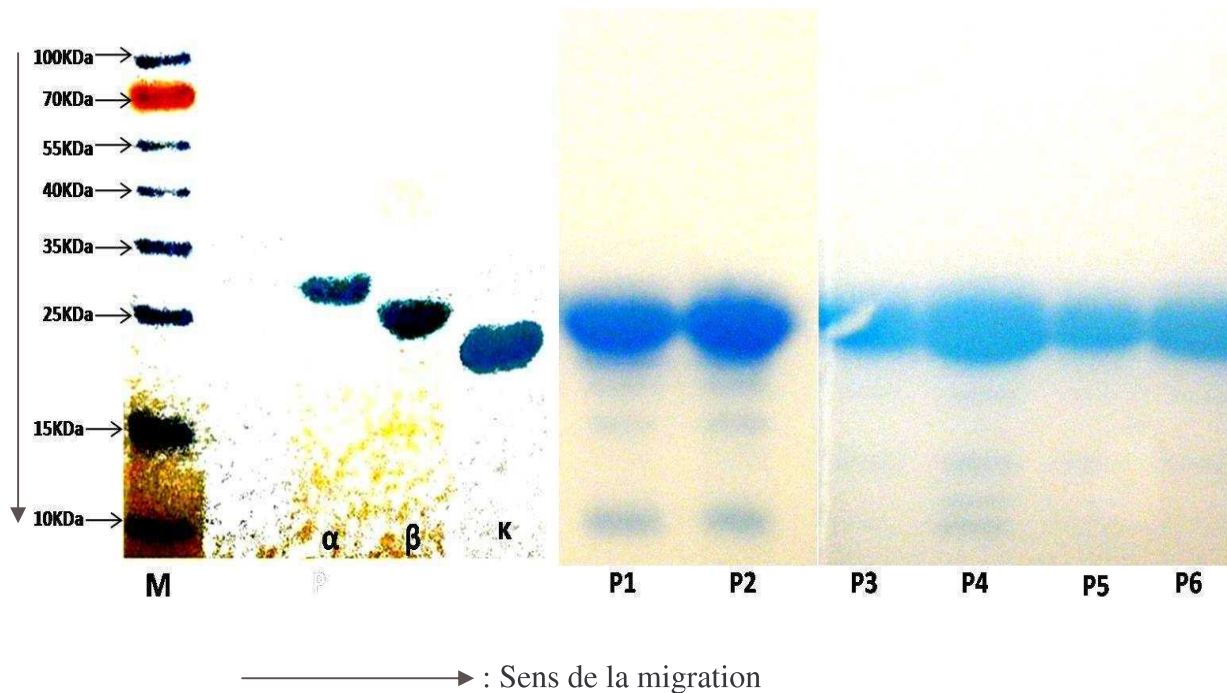
Le profil électrophorétique représenté sur la **figure 64**, et en comparaison avec la caséine alpha sans enzyme ( $\alpha$ ), montre une lyse partielle de la protéine du lait par la P1, P4, P5 et P6. Au départ la caséine alpha laisse apparaître une seule bande plus ou moins épaisse, mais après action des enzymes il y a apparition de deux bandes à peu près au même niveau laissant penser à une coupure en deux de la protéine  $\alpha$ . D'autres bandes moins épaisses se dirigent vers le bas du gel. D'après cette observation les enzymes P1, P4, P5 et P6 hydrolysent la caséine alpha, par contre P2 et P3 ne montrent aucune action sur cette même caséine.



**Figure 64 :** Hydrolyse de la caséine alpha par les différentes enzymes ; M- marqueur de PM ; P1-protéase d'*A. niger* ; P2-protéase de *P. pinophilum* ; P3- protéase d'*A. flavus* ; P4-protéase d'*A. awamori* ; P5-protéase d'*A. tubingensis* ; P6-protéase d'*A. tamarii*.

### 20.3. Effet sur la caséine $\beta$

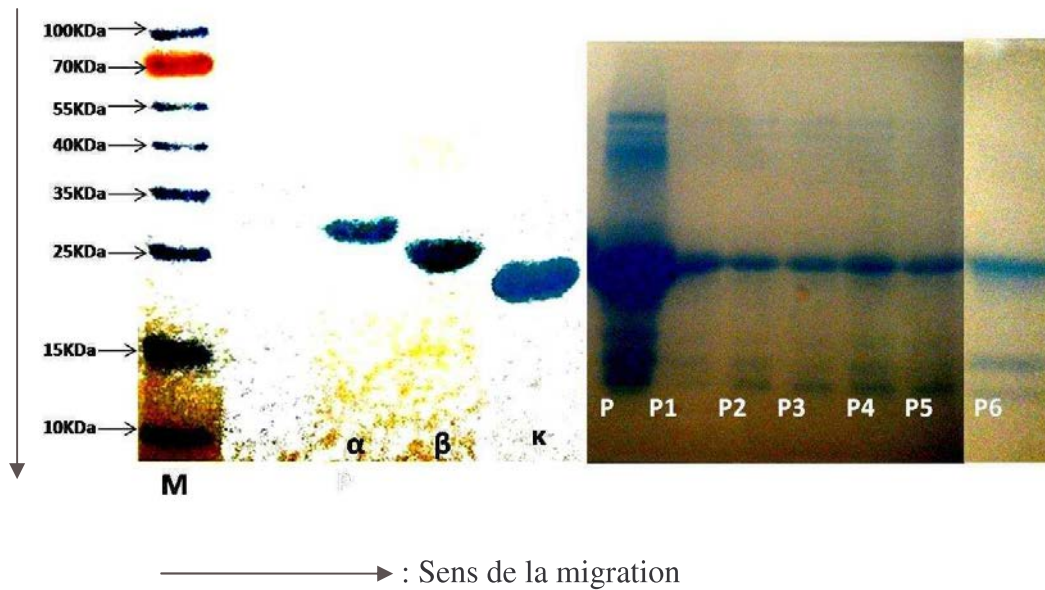
La **figure 65** montre le poids moléculaire approximatif de la caséine bêta ( $\beta$ ) qui est de 25KDa, l'effet des différentes enzymes sur cette caséine de P1 à P6 laisse apparaître sur le gel des bandes plus ou moins épaisses malgré la grosseur de la bande correspondant à la caséine bêta, ce qui peut s'expliquer par des hydrolyses partielles libérant de petits fragments protéiques ce qui n'affecte pas de façon visible le PM de la caséine bêta.



**Figure 65 :** Hydrolyse de la caséine bêta par les différentes enzymes ; M- marqueur de PM ; P1-protéase d'*A. niger* ; P2-protéase de *P. pinophilum* ; P3- protéase d'*A. flavus* ; P4-protéase d'*A. awamori* ; P5-protéase d'*A. tubingensis* ; P6-protéase d'*A. tamaraii*.

### 20.4. Effet sur la caséine $\kappa$

Sur la caséine kappa aussi, les six protéases de P1 à P6 à figure 65 ont une action positive car elles lysent partiellement cette caséine laissant apparaître sur le gel représenté sur la **figure 66** des bandes correspondant à des fragments protéiques libérés après lyse enzymatique ce qui rend la bande qui représente la caséine  $\kappa$  moins dense.



**Figure 66** : Hydrolyse de la caséine kappa par les différentes enzymes ; M- marqueur de PM ; P-présure ; P1- protéase d'*A. niger* ; P2-protéase de *P. pinophilum* ; P3- protéase d'*A. flavus* ; P4-protéase d'*A. awamori* ; P5-protéase d'*A. tubingensis* ; P6-protéase d'*A. tamarii*.

Les résultats de l'hydrolyse des caséines par les protéases produites ont permis d'estimer l'effet de ces coagulases sur les caséines de lait. On constate que l'ensemble des enzymes produites provoquent une hydrolyse importante de la caséine totale et la caséine  $\kappa$  responsable de la gélification du lait au cours de la coagulation (Mathieu, 1998).

**Tableaux 42:** Effet des protéases P1, P2, P3, P4, P5 et P6 sur les caséines de lait

Caséine	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Caséine $\alpha$	+	-	-	+	+	+
Caséine $\beta$	+	+	±	+	±	±
Caséine $\kappa$	+	+	+	+	+	+
Caséine totale	+	+	+	+	+	+

+ Hydrolyse très nette

- Pas d'hydrolyse

± Hydrolyse pas très nette

## **Chapitre 5 : Résultats des propriétés physicochimiques et technologiques des enzymes produites**

Les caséines  $\alpha$  et  $\beta$  sont plus ou moins hydrolysées selon la souche. P1 et P4 produites par *A. niger* et *A. awamori* respectivement, sont capables d'hydrolyser les trois types de caséines.

La visualisation de la caséine totale et des caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE a permis d'évaluer (**Tableau 43**) les poids moléculaires approximatifs de toutes les caséines. On observe des poids moléculaires différents par rapport aux poids moléculaires théoriques, cela peut s'expliquer par la formation d'agrégats protéiques ce qui retarde la migration. Ce phénomène a été également observé par **Nitsche (2011)**.

**Tableaux 43** : Poids moléculaires des différentes caséines de lait

Caséine	PM (KDa) caséine totale	PM (KDa)	PM (KDa) Sigma-Aldrich	PM (Kda) (Nische, 2011) (2100 Bioanalyzer)	PM (Kda) (Nische, 2011)
Caséine $\alpha$ 1	35	30	22-23,7	37	23
Caséine $\alpha$ 2			25	37	25
Caséine $\beta$	30	25	24	33	24
Caséine $\kappa$	25	22	19	46	19

Toutes ces coagulases sont d'un grand intérêt ; elles ont toutes pu entraîner une très bonne coagulation du lait, particulièrement de vache. Cependant on observe une différence selon la souche productrice de l'enzyme.

# *Conclusion*

## Conclusion

L'isolement des moisissures productrices de protéases coagulantes est important, non seulement en raison de l'intérêt économique que représentent ces molécules mais aussi du milieu sur lequel sont cultivées ces souches.

Les six souches à activité caséolytique isolées au cours de cette étude appartiennent aux genres : *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. awamori*, *A. tubingensis*, *A. tamaritii*) et *Penicillium* (*P. pinophilum*). Ces souches ont permis de synthétiser des quantités importantes de protéases acides dans les milieux de culture utilisés. Les milieux de production de ces protéases acides ont été optimisés grâce à deux plans statistiques, le premier, de Plackett et Burman (1946), a permis de sélectionner les constituants du milieu de culture ayant un effet positif sur la croissance des microorganismes et la production des enzymes, et le deuxième celui de Box et Wilson (1951) a permis de maximiser les valeurs retrouvées pour chaque paramètre et ce, en optimisant au maximum la production.

Les fermentations réalisées sur les milieux de culture, à base de lactosérum, optimisés indiquent que toutes les souches croissent selon des cinétiques normales. Elles ont pu produire des quantités importantes aussi bien de biomasses (entre 25,80 et 41,80g/l) que de protéases (entre 1822,21 et 2583,33U.).

Les protéases produites ont été purifiées par des techniques chromatographiques (Chromatographie d'exclusion moléculaire, Chromatographie échangeuse d'ions et chromatographie d'affinité), ce qui a permis d'éliminer entre 68 à 92% des protéines non actives.

La visualisation des enzymes purifiées sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes a indiqué que les différentes protéases avaient des poids moléculaires compris entre 30KDa pour *P. pinophilum*, 35KDa pour *A. flavus* et *A. tamaritii* et 55KDa pour les trois souches *A. niger*, *A. awamori* et *A. tubingensis* qui sont phylogénétiquement très proches.

L'étude des effets du pH et de la température sur l'activité des enzymes a permis de déterminer les valeurs optimales de ces deux paramètres pour les six souches. Ces enzymes présentent des pH acides compris entre 4 et 5,5 avec des températures optimales comprises entre 30 et 50°C. Toutes les enzymes sont stables environ 1 heure à leur température optimale d'activité.

L'aptitude technologique des protéases produites a révélé une très bonne capacité à coaguler les laits de vache et de chèvre, particulièrement la protéase d'*A. tamaris* qui coagule le lait de vache en 2 min. Tous les laits ont donné des caillés fermes et un lactosérum limpide.

Ainsi les enzymes montrent une apparente force coagulante très faible, malgré des temps de coagulation du lait bien inférieurs à ceux de la présure, ce qui s'explique par les dilutions des solutions enzymatiques obtenues après purification.

Afin que la coagulation du lait par les coagulases produites soit assimilable à celle de la présure, il est nécessaire de connaître les liaisons hydrolysées par ces protéases et de considérer l'évolution de la protéolyse.

Pour une meilleure application de ce travail, des comparaisons avec d'autres laits et des tests à l'échelle industrielle sont nécessaires.



# *Références bibliographiques*



1. Agboola, S. **2002**. Cheesemaking from ultrafiltered milk using plant rennet. *The Aust. J. Dairy Tech.* **57** : 143.
2. Aïssaoui, S. **2009**. La filière agroalimentaire en Algérie. Fiche de Synthèse. UBIFRANCE et Les Missions économiques.
3. Alais, C. **1984**. Science du Lait- Principes des techniques laitières. 4<sup>ème</sup> éd, SEPAIC, Paris.
4. Alais, C. et Novak, G. **1968**. Étude d'un enzyme coagulant microbien dérivé de *Endothia parasitica*. I. - Propriétés biochimiques de l'enzyme coagulant Pfizer et propriétés rhéologiques des caillés formés dans le lait. *Lait*. **48** (477): 393-418.
5. Alam, S.I., Dube, S., Reddy, G.S.N., Bhattacharya, B.K., Shivaji, S., and Singh L. **2005**. Purification and characterization of extracellular protease produced by *Clostridium* sp. from Schirmacher oasis, Antarctica. *Enzyme Microb. Technol.* **36**:824–831
6. Al-Najada, A.R., Al-Hindi, R.R. and Mohamed, S.A. **2012**. Characterization of polygalacturonases from fruit spoilage *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus tubingensis*. *Afr. J. Biotechnol.* **11** (34): 8527-8536.
7. Amourache, L. **1986**. Purification et immobilisation de la chymosine. Thèse de Doctorat. Compiègne.
8. Anandan, D., Marmer, W.N. and Dudley, R.L. **2007**. Characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamarii*. *USDA. National Agricultural Library*.
9. Anonyme 1, **2010**.  
<http://www.fungalcell.org/sites/sbsweb2.bio.ed.ac.uk.fungalcell/files/images/IMC9%20Image%203.jpg> « Consulté le 21 janvier 2010 ».
10. Anonyme 2. Center on Environmental Biotechnology. **2008**. Fungi. *Aspergillus awamori*. <http://www.deskuervis.nic.in/fungi.htm> « Consulté le 21 janvier 2010 ».
11. Anonyme 3. **2004**. *Penicillium pinophilum* Hedgcock, Bull. bur. Anim. Ind. Us Dep. Agric. 118:37.  
[http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal\\_detail.jsp?id=FU200802270008](http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802270008) « Consulté le 03 Février 2010 ».
12. Anonyme 4. **2011**. Biotechnologies,  
[http://ispb.univ-lyon1.fr/mycologie/Site\\_labomyco/Enseignement/3/Biotechnologie01.htm](http://ispb.univ-lyon1.fr/mycologie/Site_labomyco/Enseignement/3/Biotechnologie01.htm)  
« Consulté le 20 décembre 2010 ».

13. Anonyme 5. **2010**. Les différentes techniques de chromatographie. <http://www.123bio.net/cours/chromato/exclusion.html> « Consulté le 14 Septembre 2010 »
14. Anonyme 6. **2010**. L'électrophorèse des protéines et des acides nucléiques. <http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/TexteTD/8TPmethodologie/5Electrophorese/1Electrophorese.htm> « Consulté le 11 Septembre 2010 ».
15. Anstrup, K. **1980**. Proteinases. In: microbial enzymes and bioconversions. éd. Rose A.H. Academic Press, 93-108.
16. Arima, K., Yu, J., Iwasaki, S. and Tamura, G. **1968**. Milk-clotting enzyme from microorganisms, V. Purification and crystallization of *Mucor* rennin from *Mucor pusillus* var. *Lindt*. *Appl. Microbiol.*, **16**: 1727-1733.
17. Areces, L.B., Biscoglio de Jimenez, Bonino, M.J., Parry, M.A.A., Fraile, E.R., Fernandez, H.M., and Cascone, O. **1992**. Purification and characterization of milk-clotting protease from *Mucor bacilliformis*. *Appl. biochem. Biotechnol.* **37**: 283-294.
18. Arnoštová, H., Kučerová, Z., Tišlerová, I., Trnka, T. and Ticha, M. **2001**. Affinity chromatography of porcine pepsin on different types of immobilized 3,5-diiodo-L-tyrosine. *J. Chromatogr. A.* **911**: 211–216.
19. Assenat, L. **1985**. Laits et Produits Laitiers: Vache, Brebis, Chèvre. éd. F.M. Luquet. *Tec & Doc*. Lavoisier, Paris, France.
20. Badillet, G., De Briève, C. et Guého, E. **1987**. Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique, vol II, éd. VARIA, Paris.
21. Belyauskaite, I.P., Palubinskas, V.J., Ancheuko, O.E., Vesa, V.S., and Glemzha, A.A., **1980**. Purification and some properties of the extracellular acid proteases from *Mucor renninus*. *Enzyme Microb. Technol.*, **2**: 37- 44.
22. Berridge, N.J. **1952**. An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *J. Dairy Res.* **19** (3): 328-329.
23. Borel, J.P., Maquart, F.X., Le Peuch, C., Randoux, A., Gillery, P., Bellon, G. et Monboisse, J.C. **1997**. Nomenclature des enzymes et types de réactions enzymatiques *In* : Biochimie Dynamique. De Boeck & Larcier s.a. Bruxelles.
24. Bosmann, H.B., **1973**. Protein catabolism. Identification of natural and acidic proteolytic enzymes in *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Acta*, **293**: 476–89
25. Botton, B. et Breton, A. **1990**. Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Masson, Paris, France.

26. Bouille, E., Dubois, V., Egal, M., Herpin, P., Porterie, P., Senesse, O., Vales, R. **2004**. Traitement, épuration et valorisation des effluents d'une fromagerie. <http://hmf.enseeiht.fr/travaux/CD0405/beiere/4/html/index.htm>. « Consulté le 14 Septembre 2010 »
27. Bounous, G. **2000**. Le concentré protéique de lactosérum (CPL) et la modulation du glutathion dans le traitement du cancer. <http://www.glutathion.com/public/doc/WPC%28fr%29.pdf> « consulté le 14 Novembre 2011 ».
28. Bouquelet, S. **2008**. Protéines alimentaires. <http://biochim-agro.univ-lille1.fr/proteines/co/revisions.html> « Consulté le 22 Décembre 2011 »
29. Bourdier, J.F., et Luquet, F.M. **1981**. Dictionnaire laitier. *Tec & Doc*. Lavoisier. Paris.
30. Box, G.E.P., and Draper, N.R. **1987**. Empirical model-building and response surfaces. *J. Wiley & Sons*. New-York.
31. Box G.E.P. and Wilson K.B. **1951**. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Statistical Methodology. J. Roy. Statist. Soc. Ser. B.* **13** (1): 1-45.
32. Bradford, M.A. **1976**. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analyt. Biochem.* **72**: 248-254.
33. Cahagnier, B. et Richard-Molard, D. **1998**. Analyse mycologique des Moisissures des aliments peu hydratés, *éd. Tec & Doc*. 140-158.
34. Chekireb, D., Tahar A. and Cochet N. **2009**. Acid protease production by isolated species of penicillium. *Eur. J. Sci. Res.* **25**: 469-477.
35. Chrzanowska, J., Kolaczowska, M. and Palonowski, A. **1993**. Production of exocellular proteolytic enzymes by various species of *Penicillium*. *Enzyme. Microb. Technol.* **15**: 140-143.
36. Chrzanowska, J., Kolaczowska, M., Dryjański, M., Stachowiak, D. and Palonowski, A. **1995**. Aspartic proteinase from *Penicillium camemberti*: purification, properties, and substrate specificity. *Enzyme. Microb. Technol.* **17** (8): 719-724.
37. Chun-Chang, C., Yen-Ching, C., Chien-Chen, L. and Wen-Hwei H. **2009**. Purification and characterization of new Rhizopuspepsin from *Rhizopus oryzae* NBRC 4749. *J. Agric. Food. Chem.* **57**: 6742-6747.
38. Chung, Y.S., KO, D.S., Cho, Y. and Lee, K.S. **1982**. Studies on acid protease produced from *Aspergillus tubingensis*. Enzyme purification, Kinetic study and reaction

- mechanism. *Kor. Jour. Microbiol.* **20** (4). 189-194.
39. Chutmanop, J., Chuichulcherm, S. Chisti, Y. and Srinophakun, P. **2008**. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83**:1012 –1018
  40. Cuvellier G.F., **1999**. Production des enzymes. *In: Biotechnologie.* . Scriban R., 5<sup>ème</sup> éd., 345 – 363.
  41. Dacheva, V., Galabova, G. and Atev, A. **2009**. Optimization of nutrient medium composition for alpha-amylase biosynthesis by *Aspergillus oryzae* PP. *Biotechnol. & Biotechnol.* **23**: 771-774.
  42. Desmazeaud, J.M. **1981**. Principales Utilisations des Enzymes en Industrie laitière, Aspects Scientifiques. *Industr. Aliment. Agric.* **98** : 195-204.
  43. De Wit, J.N. **2001**. Lecturer's Handbook on hey and whey products. 1<sup>st</sup> Ed. European Whey Products Association: 1-91.
  44. Dial, S.M. **2007**. Fungal diagnostics: current techniques and future trends, *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **37** (2): 373-392.
  45. Durand-Poussereau, N. and Fevre, M. **1996**. Characterization of a protease deficient strain of *Penicillium roqueforti* generated by heterologous plasmid integration: potential use for protein production. *J. Biotechnol.* **51** (1): 97-105.
  46. Do, T.T., Quyen, D.T. and Dam, T.H. **2012**. Purification and characterization of an acid-stable and organic solvent-tolerant xylanase from *Aspergillus awamori* VTCC-F312. *ScienceAsia*, **38**: 157-165.
  47. El Atyqy, M. **2010**. Microorganismes d'importance alimentaire. Sciences et techniques des aliments. <http://www.azaquar.com/doc/microorganismes-importance-alimentaire>  
« Consulté le 08 Janvier 2011 »
  48. Ernstrom, C.A. and Wong, N.P. **1983**. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. *In: Webb, B.H., Johnson, A.H., Alford, J.A. (Ed). Fundamentals of dairy chemistry, The Avi publishing Company Inc, Westport Connecticut.*
  49. FAO, **1995**. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome. Italie.
  50. Farley, P.C. and Ikasari, L. **1992**. Regulation of secretion of *Rhizopus oligosporus* extracellular carboxyl proteinases. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2539-2544.
  51. Fazouane-Naimi, F., Mechakra, A., Abdellaoui, R., Nouani, A., Magagi Daga, S., Marou Alzouma, A., Gais, S. and Pennincks M.J. **2010**. Characterization and cheese-making properties of Rennet-Like enzyme produced by a local Algerian isolate of

- Aspergillus niger*. *Food Biotechnol.* **24**:1-12
52. Dardel, F. **2007**. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Proteolysis.svg> « Consulté le 03 mai 2010 ».
53. Figarella J., Leyral, G. et Terret, M. **2004**. Microbiologie générale et appliquée, Ed. Delagrave, n° 3328, Paris, 14-15.
54. Fox, P.F. **1982**. Proteolysis in milk and dairy products. *Biochem. Soc. Trans.*, **10**: 285.
55. Garrett, R.H and Grisham C.M. **2000**. Mécanismes d'action des enzymes, *In* : Biochimie. De Boeck Université s.a. Bruxelles.
56. Geier, G., Banaj, H.J., Heid, H., Bini, L., Pallini, V. and Zwilling, R. **1999**. Aspartyl proteases in *Caenorhabditis elegans*. Isolation, identification and characterization by a combined use of affinity chromatography, two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and databank analysis. *Eur. J. Biochem.* **264** : 872–879.
57. Gnanadoss, J.J., Robert, R. and Jebapriya, R. **2011**. Production of protease from *Aspergillus niger* and *Mucor mucedo* under submerged and solid state fermentation. *Int. J. Cur. Res.* **3** (10): .075-078.
58. Green, G. and Llewellyn J.M. **1973**. The Purification and Properties of a Single Chicken Pepsinogen Fraction. *Biochem. J.* **133**:105-115
59. Guerard, F. **1987**. Une Utilisation des Enzymes Protéolytiques Extraites des Viscères de Poissons : La Coagulation du Lait. *Reo. Trou. Inst. Pêches mariL*, **49** (3 et 4) : 199-203.
60. Guillaume, V. **2006**. Mycologie : Les champignons filamenteux, éd De Boeck, Bruxelles.
61. Haard, N.F., Shamsuzzaman, K., Brewer, P., and Arunchalam, K. **1982**. Enzymes from marine organisms as rennet substitutes. *In*: Utilisation des enzymes en technologie alimentaire. éd. P.Dupuy. Tec & Doc. Lavoisier. Paris
62. Haggag, W.M., Kansoh, A.L. and Aly, A.M. **2006**. Proteases From *Talaromyces flavus* and *Trichoderma harzianum*: Purification, Characterization and Antifungal Activity Against Brown Spot Disease and Faba Bean. *Plant Pathology Bulletin* **15**: 231-239.
63. Hartley, B.S. 1960. Proteolytic Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **29**: 45-72.
64. Hashem, A.M. **2000**. Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Penicillium oxalicum*. *J. Bioessour. Technol.* **75**: 219-222.
65. Hashimoto, H., Kaneko, Y., Iwaasa, T. and Yokotsuka, T. **1973**. Production and Purification of Acid Protease from the Thermophilic Fungus, *Penicillium duponti* K1014. *J. Appl. Microbiol.* **25** (4) : 584-588.

66. He, C., Fan, Y., Liu, G. and Zhang, H. **2008**. Isolation and Identification of a Strain of *Aspergillus Tubingensis* with Deoxynivalenol Biotransformation Capability. *Int. J. Mol. Sci.*, **9**: 2366-2375.
67. Hinrikson, H.P., Hurst, S.F., De Aguirre, L. and Morrison, C.J. **2005**. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species, **43** (1), 129-137.
68. Holme D.J., Peck H. **1998**. "Analytical Biochemistry", Longman, New York, ISBN 185996074X.
69. Impoolsup, A., Bhumiratana, A. and Flegel, T.W. **1981**. Isolation of Alkaline and Neutral Proteases from *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, a Soy Sauce Koji Mold. *Appl. Environ. Microbiol.* **42** (4): 619-628.
70. Ito, Y., Peterson, S.W. and Goto, T. **1999**. Properties of *Aspergillus tamarii*, *A. caelatus* and related species from acidic tea field soils in Japan. *Mycopathologia.* **144** (3):169-75.
71. Jacquet-Violleau, V. **1999**. Déminéralisation par électrodialyse en présence d'un complexant. Application au lactosérum. Thèse de doctorat, UMR INRA INP, Toulouse, France.
72. Kalpana Devi, M., Rasheedha Banu, A., Gnanaprabhal, G.R., Pradeep, B.V. and Palaniswamy, M. **2008**. Purification, Characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.* **1** (7). 1-6.
73. Kim, J.D. **2003**. Preliminary Characterization of keratinolytic Enzyme of *Aspergillus flavus* K-03 and its Potentiel in Biodegradation of Keratin Wastes. *Microbiology.* **31** (4): 209-213.
74. Koseki, T., Furuse, S., Iwano, K., Sakai, H., and Matsuzawa, H. **1997**. An *Aspergillus awamori* acetylcysteine: purification of the enzyme, and cloning and sequencing of the gene. *Biochem. J.* **326**: 485–490
75. Kranthi, V.S., Muralidhar Rao, D. and Jaganmohan, P. **2012**. Production of protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. *Int. J. Microbiol. Res.* **3** (1): 12-15.
76. Kredics, L., Vargal, J., Koscubé, S., Dóczy, I., Samson, R.A., Rajaraman, R., Narendran, V., Bhaskar, M., Vágvölgyi, C. and Manikandan, P. **2007**. Case of Keratitis Caused by *Aspergillus tamarii*. *J. Clin. Microbiol.* **45** (10): 3464.



77. Krishnan, S. and Vijayalkshmi, M.A. **1985**. Purification of an acid protease and a serine carboxypeptidase from *Aspergillus niger* using metal-chelate affinity chromatography. *J. chromatogr.* **329**: 165-170.
78. Kusters-van Someren, M. A., Samson, R. A. and Visser, J. **1991**. The use of RFLP analysis in classification of the black Aspergilli: reinterpretation of *Aspergillus niger* aggregate. *Current Genetics*, **19**: 21-26.
79. Laemmli, U.K. **1970**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227**, 680-685.
80. Lalitha Kumari, B., Vijetha, P. and Sudhakar, P. **2010**. Optimization of physico-chemical properties for production of alkaline protease from *Fusarium graminearum*. *Recent res. Sci. technol.* **2**: 24-28.
81. Larpent, J.P. et Larpent-Gourgaud, M. **1985**. *Eléments de Microbiologie*. Hermann, Paris, France.
82. Larpent, J.P. et Sanglier, J.J. **1989**. *Biotechnologies des antibiotiques*. Masson, Paris.
83. Larpent-Gourgaud, M. et Sanglier, J.J. **1992**. *Biotechnologies, principes et méthodes*. Doin. Paris.
84. Larson, M.K. and Whitaker, J.R. **1970**. *Endothia parasitica* Protease. Parameters Affecting Activity of the Rennin-like Enzyme. *Journal of dairy Science*. **53**(3): 253-261.
85. Lecomte, M. **2009**. Classification des champignons.  
<http://www.champignons-passion.be/ClassificationGen.pdf> « Consulté le 11 janvier 2010 ».
86. Lecoq R. **1965**. *Manuel d'analyse alimentaire et d'Expertises Usuelles*. Lavoisier, Paris, France
87. Lenoir, J., Auberger, B. and Gripon, J. C. **1979**. "Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. III. Caractérisation d'une protéase acide. Le lait. **59**: 244-268.
88. Leyral, G. and Vierling, E. **2007**. *Microbiologie et toxicologie des aliments Hygiène et sécurité alimentaires*. Sciences des aliments. *4<sup>ème</sup> Ed. Biosciences et Techniques*. Bordeaux.
89. Llorente, B. E., Brutti, C. B. and Caffini, N. O. **2004**. Purification and characterization of milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cyanara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52** : 8182-8189.
90. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. and Darnell, J. **1995**. Structure and fonction of proteins *In: Molecular Cell Biology*. *3<sup>rd</sup> Ed.* W.H.



- Freeman and Company. New York.
91. Madigan, M.T. et Martinko, J.M. **2007**. Brock/ Biologie des micro-organismes, 11<sup>ème</sup> éd, 2007, Person éducation, Paris.
  92. Mahaut, M., Romain J., Brulé G., et Schuck, P. **2000**. Les produits industriels laitiers, *Tec & Doc*. Lavoisier, Paris, 116-117.
  93. Maldonado, M.C. and Callieri, D.A.S. **1989**. Influence of environmental conditions on the production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **5** (3): 327-333.
  94. Marchandin, H. 2007. Bactériologie, Physiologie Bactérienne.  
[http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle\\_1/PCEM2/mod-base/MB7\\_Bio\\_Med/Ressources\\_locales/BACTERIO/B2-Physiologie\\_bacterienne.pdf](http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_1/PCEM2/mod-base/MB7_Bio_Med/Ressources_locales/BACTERIO/B2-Physiologie_bacterienne.pdf)  
« Consulté le 10 Octobre 2011 ».
  95. Martinelli, S.D. and Kinghorn, J.R. **1997**. *Aspergillus* 50 Years on Progress in Industrial Microbiology. Elsevier, London, UK.
  96. Mathieu, J. **1998**. Initiation à la physicochimie du lait, *Tec & Doc*. Lavoisier, Paris.
  97. Mechakra, A. **2001**. Optimisation et Modélisation de la production d'enzymes protéolytiques par *Penicillium camemberti*. Thèse de Doctorat d'État Es-Sciences. Université Mentouri Constantine.
  98. Mechakra, A., Auberger, B., Remeuf, F. and Lenoir, J. **1999**. Optimization of a culture medium for acid proteolytic enzyme production by *Penicillium camemberti*. *Sci. al.* **19** (6): 663-675.
  99. Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscole, M. and Da Silva, R. **2010**. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Food Chem.* **120**: 87-93.
  100. Molimard, P., Vassal, L., Bouvier, I. and Spinnler, H.E. **1995**. Suivi de croissance de *Penicillium camemberti* et *Geotrichum candidum* en culture pure et en association au cours de l'affinage de fromages expérimentaux à pâte molle de type Camembert. *Lait. Elsevier/INRA.* **75** : 3-16.
  101. Moreau, C. **1978**. Larousse des champignons, librairie Larousse, Paris, 93-237.
  102. Morya, V.K. and Yadav, D. **2010**. Production and partial characterization of neutral protease by an indigenously isolated strain of *Aspergillus tubingensis* NIICC-08155. *The Internet Journal of Microbiology.* **8** (1).
  103. Mosseray, R. **1934**. Les *Aspergillus* de la section Nigri Thom and Church. *La cellule,* **43** : 203-285.

104. Mulimani, V.H. and Patil, G.N. **1999**. Production of proteases by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. *Ind. J Experiment. Biol.* **37**:1248–1250.
105. Muthulakshmi, C., Gomathi, D., Guru Kumar, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M. and Uma, C. **2011**. Production, Purification and Characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. *Jordan J. Biol. Sci.* **4**: 137-148.
106. Myers, R.H. **1971**. Response surface methodology. *Allyn and Bacon Inc.*, Boston.
107. Namrata, S. and Kantishree, D. **2011**. Production, purification and crystallization of an alkaline protease from *Aspergillus tamari* [EF661565.1]. *Agr. Biol. J. N. Am.* **2** (7): 2151-7517.
108. Nitsche, R. **2011**. Milk protein analysis with the Agilent 2100 bioanalyzer and the Agilent protein 80 kit. Application note. Food analysis. Agilent Technologies Inc. Waldbronn, Germany.
109. Nouani, A., Belhamiche, N., Slamani, R., Fazouane, F., Belbraouet, S. et Bellal, M.M. **2009**. Purification et Caractérisation Électrophorétique D'une Protéase Coagulant le Lait de *Mucor Pusillus*: Comparaison de Méthodes. *Eur. J. Sci. Res.* **35** (4): 512-521.
110. Ottesen, M. and Rickert, W. **1970**. The acid protease of *Mucor miehei*. *Methods Enzymol.* **19**: 459-460
111. Oyeleke, S.B., Egwin, E.C. and Auta, S.H. **2010**. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *J. Microbiol. Antimicro.* **7**: 83-87.
112. Paranecova, L., Benen, J. A. E., Samson, R. A. and Visser, J. **1997**. Evaluation of RFLP analysis of the classification of selected black aspergilli. *Myc. Res.* **101** (7): 810-814.
113. Paranecova, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R. A., Rossen, L., Ten Hoor-Suykerbuyk, M. and Visser, J. **2001**. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *App. Environmental Microbiology.* **67** : 521-527.
114. Paranthaman, R., Alagusundaram, K. and Indhumathi, J. **2009**. Production of Protease From Rice Mill Wastes By *Aspergillus niger* In Solid State Fermentation. *W. J. Agr. Sci.* **5** (3): 308-312.
115. Pelmont, J. **1993**. Enzymes. Office des Publications Universitaires. Alger.
116. Perry, J.J., Staley, J.T. et Lory S. **2004**. Microbiologie, Cours et questions de révision. Dunod, Paris.

117. Pfohl-Leskowicz, A. **1999**. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. *Tech. & Doc.* Lavoisier. Paris.
118. Pilat, P., Votruba, J., Dobersky, P. and Prokop, A. **1976**. Application of mathematical optimization methods in microbiology. *Folia Microbiol.* **21**: 391-405.
119. Pitt, J.I. **1988**. A laboratory guide to common *Penicillium* species (2nd Ed.). Commonwealth Scientific And Industrial Research Organization, Division of Food Research. North Ryde Australia.
120. Pitt, J.I. and Hocking, A.D. **1997**. Fungi and Food spoilage, 2nd éd. Blackie Academic and Professional, London.
121. Plackett, K.L. and Burman, J.P. **1946**. The design of optimum multifactoriel experiments. *Biometrika.* **33**: 305-325.
122. Pol, D., Seeta Laxman, R. and Rao, M. **2012**. Purification and biochemical characterization of endoglucanase from *Penicillium pinophilum* MS20. *Indian J. Biochem. Biophys.* **49**: 189-194.
123. Potumarthi, R., Subhakar, C.H. and Jetty, A. **2006**. Alkaline protease produced by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. *Biochem. Eng. J.* **34**: 185-192.
124. Rakotonirainy, M. S. **2011**. MYCOTA, les contaminants fongiques du patrimoine culturel. CRCC, <http://mycota-crcc.mnhn.fr/> « Consulté le 11 Janvier 2011 ».
125. Rama Devi, P., Vijaya Raghavan, P., Vasudheven, I., Joshua, L. and M. VijayaKumar, **2011**. Purification and Characterization of Protease from *Rhizopus oligosporus*. *Inter. J. Biol. Technol.* **2**:46-49.
126. Ramet, J.P., **1997**. Les agents de transformation du lait. *In: Le fromage. éd. Tec & Doc.* Lavoisier 3è éd., Paris.
127. Raper, k.B. and Fennell, D.I. **1965**. The Genus *Aspergillus*. *Science.* **150** (3697): 736-737.
128. Reetz, M.T. **2004**. Methods in enzymology. Elsevier, Academic press, San Diego, California. USA.
129. Regnault, J.P. **1990**. Microbiologie générale, *Ed. Vigot*, Paris, 143-164.
130. Reichard, U., Eiffert, H. and Rùchel, R. **1994**. Purification and characterization of an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigates*. *J. Med. Vet. Mycol.* **32** (6): 427-436.
131. Röse-Gottlieb. **1960**. "Official methods of analysis". 9ème Ed. A.O.A.C. Washington,
132. Ross, R. **2010**. How does Ganoderma applanata reproduce?

[http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2010/ross\\_rach/life\\_history.htm](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2010/ross_rach/life_history.htm) « consulté le 20 mai 2010 ».

- 133.Sabotič, J., Avanzo, P., Anžlovar, S., Popovic, T., Leonardi, A., Pain, R.H., Kos, J. and Brzin, J. **2009**. Trypsin-specific inhibitors from the basidiomycete *Clitocybe nebularis* with regulatory and defensive functions. *Microbiology*. **155** : 3971–3981
- 134.Sandhya, C., Sumantha, A., Szacaks, G. et Pandey, A. **2005**. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. *Process. Biochem.* **40**: 2689-2694
- 135.Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraeken, J., Frisvad, J.V. and Varga, J. **2007**. Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Studies in Mycology*. 59: 129-146.
- 136.Sarkkinen, P., Kalkkinen, N., Tilgmann, C., Siuro, J., Kervinen, J., and Mikola, L. **1992**. Aspartic proteinase from barley grains is related to mammalian lysosomal cathepsin D. *Planta*. **186**: 317-323.
- 137.Schaechter, M., Ingraham, J.L and Neidhardt, F.C. **2005**. *Microbe*, ASM Press, Washington.
- 138.Scriban, R. **1993**. *Biotechnologie*, 4è Ed, Tec & Doc. Lavoisier, Paris.
- 139.Scriban, R. **2009**. *Biotechnologie*, 5è Ed, Tec & Doc. Lavoisier, Paris.
- 140.Seve, M. **2010**. Méthodes d'analyse et de séparation des peptides et protéines. [http://www.uvp5.univ-paris5.fr/wikinu/docvideos/Grenoble\\_1011/seve\\_michel/seve\\_michel\\_P17/seve\\_michel\\_P17.pdf](http://www.uvp5.univ-paris5.fr/wikinu/docvideos/Grenoble_1011/seve_michel/seve_michel_P17/seve_michel_P17.pdf) « Consulté le 21 février 2011 ».
- 141.Sengupta, S. and Dasgupta, M. **2006**. Industrial and clinical applications including diagnostic clinical enzymology. *Enzymology*. 1-25.
- 142.Sharma, N. and De, K. **2011**. Production, purification and crystallization of an alkaline protease from *Aspergillus tamarii* [EF661565.1]. *Agric. Biol. J. N. Am.* 2 (7). 1135-1142.
- 143.Shigenori, E., Myers, D.S.Y. and Lacobucci, G.A. **1976**. Purification and properties of the Thermostable Acid Protease of *Penicillium duponti*. *Biochemistry*. **15** (4): 842-848.
- 144.Shumi, W., Towhid Hossain, M.D. and Anwar, M.N. **2003**. Protease from *Fusarium tumitum* Sherbak off. *The chittagong Univ J Sci.* **27**: 79-84.
- 145.Siala, R., Sellami-Kamoun, A., Hajji, M., Abid, I., Gharssallah, N. and Nasri, M. **2009**. Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* II: purification and characterization. *Afr. J. Biotechnol.* **8** (18): 4582-4589.

- 146.Sidrach L., Garcia-Canovas F., Tudela J., and Neptuno Rodriguez-Lopez J. **2005**. Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus*): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, **66**: 41-49.
- 147.Somkuti G.A. and Babel F.J. **1968**. Purification and properties of *Mucor pusillus* acid protease. *J. Bact.* **95** (4): 1407-1414.
- 148.Sundberg, M., Poutanen, K., Markkanen, P. and Linko, M. **1990**. An extracellular esterase of *Aspergillus awamori*. *Biotechnol. appl. biochem.* **12** (6): 670-680.
- 149.Tao, Y., Yan, Z., Sun, J., Cheng, X. and Zhang, S. **1990**. Purification and characterization of beta-N-acetyl hexosaminidase from *Aspergillus tamaris*. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* **30** (4): 258-266.
- 150.Thakur, M.S., Kranth, N.G. and Krishna, N. **1990**. Production of fungul rennet by *Mucor miehei* using solid stat fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 409-413.
- 151.Timotijević, G.S., Milisavljević, M.D., Radović, S. R. and Maksimović, V. R. **2004**. Various forms of aspartic proteinases in Buckwheat seeds. Proceedings of the 9<sup>th</sup> symposium on Buckwheat, Prague. 158-166.
- 152.Towhid Hossain, M.D., Das, F., Marzan, L.W., Shafiqur Rahman, M.D. and Anwar, M.N. **2006**. Some Properties of Protease of the Fungal Strain *Aspergillus flavus*. *Int J Agri Biol.* **8**: 162-164.
- 153.Tripathi, V.R., Kumar, S. and Garg, S.K. **2011**. A study on trypsin, *Aspergillus flavus* and *Bacillus sp.* protease inhibitor activity in Cassia tora (L.) Syn Senna tora (L.) Roxb. seed extract. 2011. *BMC Complementary & Alternative Medicine.* 1472-6282.
- 154.Tritz, G. **2000**. Medical Microbiology Fall. The Fungi, General properties. <http://www.atsu.edu/faculty/chamberlain/Website/Lects/Fungi.htm#top> « Consulté le 11 Juin 2010 ».
- 155.Tzean, S. S., Chiu, S. C., Chen, J. L., Hseu, S. H., Lin, G. H., Liou, G. Y., Chen, C. C. and Hsu, W. H. **1994**. *Penicillium* and related teleomorphs from Taiwan. Mycological Monograph of the Food Industry Research & Development Institute. **9**: 159.
- 156.Upgade, A., Nandeshwar, A. and Samant, L. **2011**. Assessment of fungal protease enzyme from French bean using *A. niger* by Solid State Fermentation. *J. Microbiol. Biotech. Res.* **1** (4):45- 51.
- 157.Vamsi Krishna, K., Mayank, G., Nikhil, G., Hipal, G., Soham, T., Prasad, P., Girish, G., Yogesh, K., Amol, B. and Dharmendra, M. **2009**. Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation *Int. J. Microbiol. Res.* **1** (1): 14-18.

158. Venil, C.K., Sangeetha Kamatshi, N. and Lakshmanaperumalsamy, P. **2009**. Statistical optimization of medium components for the production of lipase by *Serratia marcescens* SB08. *The Internet Journal of Microbiology*. 7 (1).
159. Vidal, V., Marchesseau S., Lagaude A. and Cuq J.L. **1998**. Influence of chemical agents on casein interactions in dairy products: chemical modification of milk proteins. *Colloids and surfaces B. Biointerfaces*. **12**: 7-14
160. Viratelle, O. **1993**. *Enzymologie*, Hermann. Collection Méthodes. Paris.
161. Virto M., Chavarria F., Bustamantea M.A., Barronb L.J.R., Aramburuc Vicented M.S., Perez-Elortondoc F.J., Albusuc M., and De Renobalesa, M. **2003**. Lamb rennet paste in ovine cheesemanufacture. Lipolysis and favour. *Int. Dairy J.* **13**: 391–399.
162. Williams Jr, K. and Birman, A. **2009**. Kingdoms of Life Theme Park! <http://www.schoolproject2.ewebsite.com/photos/> « Consulté le 11 novembre 2010 ».
163. Wong, Y., Xue, W., Sims, A.H., Zhao, C., Wang, A., Tang, G., Qin, J. and Wang, H. **2008**. Isolation of four pepsin-like protease genes from *Aspergillus niger* and analysis of the effect of disruptions on heterologous laccase expression. *Fungal. Genet. Biol.* **45**: 17-27.
164. Yadav, S.K., Bisht, D., Darmwal, S. and Darmwal, N.S. **2011** Oxidant and solvent stable alkaline protease from *Aspergillus flavus* and its characterization. *Afr. J. Biotechnol.* **10** (43): 8630-8640.
165. Zevaco, C., Hermier, J. et Gripon J.C. **1974**. Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. II- Purification et propriétés de la protéase acide. *Biochimie*. **55** (11-12) : 1353-1360.

# *Annexes*



## Annexe 1

### Séquence ITS des souches identifiées

- *Penicillium pinophilum*

AAAACATGGTGGTGACCAACCCCGCAGGTCTTCCCGAGCGAGTGACAGAGCCCCATACGCTCGAGG  
ACCAGACGGACGTCGCCGCTGCCTTTTCGGGCAGGTCCCCGGGGGGACCACACCAACACACAAGCCGT  
GCTTGAGGGCAGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTC  
AAAGATTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCATCG  
ATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGACAATTTTCACAGTACTCAGACAGCCCATCTT  
CATCAGGGTTCACAGAGCGCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGAGACGTGCGTCCCCGGCGACCAGGTGG  
CCCCGTGGGCCCGCAAAGCAACAGGTGTATAGAGACAAGGGTGGGAGGTTGGGCCGCGAGGGCCCC  
CACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

- *Aspergillus flavus*

CATCCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACG  
CTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGACCAACACA  
CAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGT  
TCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCATCGATGCC  
GGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAG  
AGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCTGAGAGCCCCGGCGGCCAGGAATGGCGGGCCCCGCCAA  
GCAACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTCGGTAATGATCCTTCCGC  
AGGTTACCTACGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTA  
CCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCGCCATTATGGCCGCCGGGGGCTCTCACCCCGGG

- *Aspergillus awamori*

ACCTGATCCGAGGTACCTGGAAAAATGGTTGGAAAACGTCCGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGAC  
AAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACG  
GCGACCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGG  
CGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTC  
TTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAACTCAGACTGCACG  
CTTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGGCGGCCGA  
CAAGCGGCGGGCCCCGCGAAGCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGCACTCG  
GTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCCCTACGGAAGTCATTACCGAGTGCGGGTCCATTGGGCCCAACCTCCCATCC  
GTGTCTATAATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCCGCTTGTTCGGCCCGGGGGGGCGCCTTTGCCCGGGGCC  
CGTGCCCGCGGAGACCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCT

- *Aspergillus tubingensis*

AATCGGTTGGAAAACGTTCGGCAGGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAAGCCCCATACGCTCGAGGATC  
GGACGCGGTGCCGCGCTGCCTTTTCGGGCCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGC  
TTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCG  
ATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAG  
ATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGG  
GGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGGCGGCGACAAGCGGGCGGGCCCGCAAGCA  
ACAGGGTACAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCA  
CCTACGGAAGCATTACGA

- *Aspergillus tamarii*

TCCGAGGCACCTGGAAGAATGGTTGTTTTGCGTTTCGGCAAGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCC  
CCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCGCTGCCTTTGGGGCCCCGTCCCCCGAAGAGGGGACGACGACC  
CAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAA  
TGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCAT  
CGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAATCAACTCAGACTTCACTAGAT  
CAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGGGCCCCGGGGCTGATGCCCCCGGGCGCCTTAAAGGCGGGCC  
CGCCGAAGCAACTAAGTTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTTAACTCGGTAATGAT  
CCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAGGACATTACC

## Annexe 2

### ❖ Souche *Aspergillus niger*

#### Protéines

Ajustement factoriel fractionnaire : Taux de protéines en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; ...

##### Effets et coefficients estimés pour la production des protéines

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		74.21	7.322	10.14	0.001
X1	-24.19	-12.10	7.322	-1.65	0.174
X2	25.83	12.92	7.322	1.76	0.153
X4	-0.25	-0.12	7.322	-0.02	0.987
X5	44.39	22.20	7.322	3.03	0.039
X7	26.84	13.42	7.322	1.83	0.141
X8	4.65	2.33	7.322	0.32	0.767
X10	-30.33	-15.17	7.322	-2.07	0.107

##### Analyse de la variance la production des protéines

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	14655	14655	2093.6	3.25	0.136
Erreur résid	4	2573	2573	643.3		
Total	11	17229				

#### Biomasse

Ajustement factoriel fractionnaire : Biomasse en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; ...

##### Effets et coefficients estimés pour la biomasse

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		19.117	1.114	17.15	0.000
X1	-2.500	-1.250	1.114	-1.12	0.325
X2	-1.767	-0.883	1.114	-0.79	0.472
X4	1.300	0.650	1.114	0.58	0.591
X5	-0.233	-0.117	1.114	-0.10	0.922
X7	2.767	1.383	1.114	1.24	0.282
X8	1.033	0.517	1.114	0.46	0.667
X10	1.700	0.850	1.114	0.76	0.488

##### Analyse de la variance pour la biomasse

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	68.18	68.18	9.740	0.65	0.708
Erreur résid	4	59.61	59.61	14.903		
Total	11	127.80				

#### Activité enzymatique

Ajustement factoriel fractionnaire : Activité enzymatique en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>..

##### Effets et coefficients estimés pour l'activité enzymatique

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		670.17	18.94	35.39	0.000
X1	-39.77	-19.88	18.94	-1.05	0.353
X2	392.98	196.49	18.94	10.38	0.000
X4	-8.19	-4.09	18.94	-0.22	0.839
X5	25.73	12.86	18.94	0.68	0.534
X7	-66.67	-33.34	18.94	-1.76	0.153
X8	216.37	108.19	18.94	5.71	0.005
X10	65.50	32.75	18.94	1.73	0.159

### Analyse de la variance pour l'activité enzymatique

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	636895	636895	90985	21.14	0.005
Erreur résid	4	17216	17216	4304		
Total	11	654111				

#### ❖ Souche *Penicillium pinophilum*

### Protéines

#### Ajustement factoriel fractionnaire : Taux de protéines en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; ...

##### Effets et coefficients estimés pour la production des protéines

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		181.66	28.82	6.30	0.003
X1	-30.86	-15.43	28.82	-0.54	0.621
X2	209.45	104.73	28.82	3.63	0.022
X4	-38.50	-19.25	28.82	-0.67	0.541
X5	111.24	55.62	28.82	1.93	0.126
X7	-19.56	-9.78	28.82	-0.34	0.751
X8	-77.03	-38.51	28.82	-1.34	0.252
X10	-105.04	-52.52	28.82	-1.82	0.142

##### Analyse de la variance pour la production des protéines

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	228083	228083	32583	3.27	0.135
Erreur résid	4	39858	39858	9965		
Total	11	267941				

### Biomasse

#### Ajustement factoriel fractionnaire : Biomasse en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; ...

##### Effets et coefficients estimés pour la biomasse

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		8.817	0.6144	14.35	0.000
X1	-1.767	-0.883	0.6144	-1.44	0.224
X2	-5.167	-2.583	0.6144	-4.20	0.014
X4	-2.167	-1.083	0.6144	-1.76	0.153
X5	0.633	0.317	0.6144	0.52	0.633
X7	1.367	0.683	0.6144	1.11	0.328
X8	1.700	0.850	0.6144	1.38	0.239
X10	0.300	0.150	0.6144	0.24	0.819

##### Analyse de la variance pour la biomasse

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	119.28	119.28	17.040	3.76	0.109
Erreur résid	4	18.12	18.12	4.530		
Total	11	137.40				

## Activité enzymatique

### Ajustement factoriel fractionnaire : Activité enzymatique en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>;

#### Effets et coefficients estimés pour l'activité enzymatique

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		668.83	49.87	13.41	0.000
X1	-2.63	-1.32	49.87	-0.03	0.980
X2	320.12	160.06	49.87	3.21	0.033
X4	137.72	68.86	49.87	1.38	0.239
X5	119.76	59.88	49.87	1.20	0.296
X7	64.04	32.02	49.87	0.64	0.556
X8	-69.76	-34.88	49.87	-0.70	0.523
X10	-87.72	-43.86	49.87	-0.88	0.429

#### Analyse de la variance pour l'activité enzymatique

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	457362	457362	65337	2.19	0.234
Erreur résid	4	119379	119379	29845		
Total	11	576741				

### ❖ Souche *Aspergillus flavus*

## Protéines

### Ajustement factoriel fractionnaire : Taux de protéines en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; ...

#### Effets et coefficients estimés pour la production des protéines

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		178.90	6.158	29.05	0.000
X1	-16.27	-8.14	6.158	-1.32	0.257
X2	27.70	13.85	6.158	2.25	0.088
X4	-35.02	-17.51	6.158	-2.84	0.047
X5	91.13	45.56	6.158	7.40	0.002
X7	-18.12	-9.06	6.158	-1.47	0.215
X8	30.94	15.47	6.158	2.51	0.066
X10	-68.72	-34.36	6.158	-5.58	0.005

#### Analyse de la variance pour la production des protéines

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	49713	49713	7101.8	15.60	0.009
Erreur résid	4	1820	1820	455.1		
Total	11	51533				

## Biomasse

### Ajustement factoriel fractionnaire : Biomasse en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; ...

#### Effets et coefficients estimés pour la biomasse

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		15.167	1.243	12.20	0.000
X1	-0.600	-0.300	1.243	-0.24	0.821
X2	-9.867	-4.933	1.243	-3.97	0.017
X4	8.800	4.400	1.243	3.54	0.024
X5	-6.067	-3.033	1.243	-2.44	0.071
X7	-4.200	-2.100	1.243	-1.69	0.166
X8	5.867	2.933	1.243	2.36	0.078
X10	-0.400	-0.200	1.243	-0.16	0.880

### Analyse de la variance pour la biomasse

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	792.52	792.52	113.22	6.10	0.050
Erreur résid	4	74.19	74.19	18.55		
Total	11	866.71				

### Activité enzymatique

#### Ajustement factoriel fractionnaire : Activité enzymatique en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>..

##### Effets et coefficients estimés pour l'activité enzymatique

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		573.84	61.01	9.40	0.001
X1	-55.31	-27.65	61.01	-0.45	0.674
X2	255.22	127.61	61.01	2.09	0.105
X4	-65.98	-32.99	61.01	-0.54	0.617
X5	-5.72	-2.86	61.01	-0.05	0.965
X7	-43.85	-21.93	61.01	-0.36	0.737
X8	28.60	14.30	61.01	0.23	0.826
X10	-139.20	-69.60	61.01	-1.14	0.318

##### Analyse de la variance pour l'activité enzymatique

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	284103	284103	40586	0.91	0.574
Erreur résid	4	178695	178695	44674		
Total	11	462798				

#### ❖ Souche *Aspergillus awamori*

### Protéines

#### Ajustement factoriel fractionnaire : Taux de protéines en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; ...

##### Effets et coefficients estimés pour la production des protéines

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		59.54	4.886	12.19	0.000
X1	-10.62	-5.31	4.886	-1.09	0.338
X2	17.95	8.97	4.886	1.84	0.140
X4	-0.04	-0.02	4.886	-0.00	0.997
X5	8.47	4.23	4.886	0.87	0.435
X7	-21.70	-10.85	4.886	-2.22	0.091
X8	11.59	5.79	4.886	1.19	0.301
X10	9.19	4.60	4.886	0.94	0.400

##### Analyse de la variance pour la production des protéines

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	3588	3588	512.6	1.79	0.300
Erreur résid	4	1146	1146	286.4		
Total	11	4734				

## **Biomasse**

### **Ajustement factoriel fractionnaire : Biomasse en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; ...**

#### Effets et coefficients estimés pour la biomasse

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		20.733	0.2744	75.57	0.000
X1	-0.333	-0.167	0.2744	-0.61	0.576
X2	-5.667	-2.833	0.2744	-10.33	0.000
X4	0.200	0.100	0.2744	0.36	0.734
X5	2.800	1.400	0.2744	5.10	0.007
X7	-0.133	-0.067	0.2744	-0.24	0.820
X8	0.067	0.033	0.2744	0.12	0.909
X10	-1.800	-0.900	0.2744	-3.28	0.030

#### Analyse de la variance pour la biomasse

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	130.093	130.093	18.5848	20.57	0.005
Erreur résid	4	3.613	3.613	0.9033		
Total	11	133.707				

## **Activité enzymatique**

### **Ajustement factoriel fractionnaire : Activité enzymatique en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>;..**

#### Effets et coefficients estimés pour l'activité enzymatique

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		681.10	48.70	13.99	0.000
X1	-13.60	-6.80	48.70	-0.14	0.896
X2	274.47	137.24	48.70	2.82	0.048
X4	-25.00	-12.50	48.70	-0.26	0.810
X5	-146.93	-73.47	48.70	-1.51	0.206
X7	-95.18	-47.59	48.70	-0.98	0.384
X8	-167.11	-83.55	48.70	-1.72	0.161
X10	-61.84	-30.92	48.70	-0.63	0.560

#### Analyse de la variance pour l'activité enzymatique

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	415625	415625	59375	2.09	0.249
Erreur résid	4	113849	113849	28462		
Total	11	529474				

### **❖ Souche *Aspergillus tubingensis***

## **Protéines**

### **Ajustement factoriel fractionnaire : Taux de protéines en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; ...**

#### Effets et coefficients estimés pour la production des protéines

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		99.32	16.44	6.04	0.004
X1	-5.58	-2.79	16.44	-0.17	0.873
X2	90.73	45.36	16.44	2.76	0.051
X4	48.95	24.48	16.44	1.49	0.211
X5	22.59	11.30	16.44	0.69	0.530
X7	-49.10	-24.55	16.44	-1.49	0.210
X8	-4.54	-2.27	16.44	-0.14	0.897
X10	26.08	13.04	16.44	0.79	0.472



### Analyse de la variance pour la production des protéines

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	42843	42843	6120	1.89	0.281
Erreur résid	4	12970	12970	3242		
Total	11	55812				

## **Biomasse**

### **Ajustement factoriel fractionnaire : Biomasse en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; ...**

#### Effets et coefficients estimés pour la biomasse

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		15.367	1.394	11.02	0.000
X1	-4.333	-2.167	1.394	-1.55	0.195
X2	-16.733	-8.367	1.394	-6.00	0.004
X4	-4.400	-2.200	1.394	-1.58	0.190
X5	-4.600	-2.300	1.394	-1.65	0.174
X7	0.267	0.133	1.394	0.10	0.928
X8	-0.200	-0.100	1.394	-0.07	0.946
X10	2.133	1.067	1.394	0.77	0.487

#### Analyse de la variance pour la biomasse

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	1031.89	1031.89	147.41	6.32	0.047
Erreur résid	4	93.29	93.29	23.32		
Total	11	1125.19				

## **Activité enzymatique**

### **Ajustement factoriel fractionnaire : Activité enzymatique en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>..**

#### Effets et coefficients estimés pour l'activité enzymatique

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		627.99	29.65	21.18	0.000
X1	-74.37	-37.18	29.65	-1.25	0.278
X2	378.80	189.40	29.65	6.39	0.003
X4	-1.91	-0.95	29.65	-0.03	0.976
X5	-42.33	-21.17	29.65	-0.71	0.515
X7	-114.80	-57.40	29.65	-1.94	0.125
X8	1.14	0.57	29.65	0.02	0.986
X10	4.19	2.10	29.65	0.07	0.947

#### Analyse de la variance pour l'activité enzymatique

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	492029	492029	70290	6.66	0.043
Erreur résid	4	42207	42207	10552		
Total	11	534237				

## ❖ Souche *Aspergillus tamarii*

### Protéines

#### **Ajustement factoriel fractionnaire : Taux de protéines en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; ...**

Effets et coefficients estimés pour la production des protéines

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		133.93	4.798	27.92	0.000
X1	-16.35	-8.17	4.798	-1.70	0.164
X2	-1.20	-0.60	4.798	-0.12	0.907
X4	-50.58	-25.29	4.798	-5.27	0.006
X5	3.49	1.74	4.798	0.36	0.735
X7	-44.30	-22.15	4.798	-4.62	0.010
X8	14.73	7.36	4.798	1.53	0.200
X10	-27.41	-13.70	4.798	-2.86	0.046

Analyse de la variance pour la production des protéines

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	17312	17312	2473.1	8.95	0.026
Erreur résid	4	1105	1105	276.2		
Total	11	18416				

### Biomasse

#### **Ajustement factoriel fractionnaire : Biomasse en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; ...**

Effets et coefficients estimés pour la biomasse

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		17.533	2.440	7.19	0.002
X1	-1.000	-0.500	2.440	-0.20	0.848
X2	-5.533	-2.767	2.440	-1.13	0.320
X4	3.000	1.500	2.440	0.61	0.572
X5	-2.933	-1.467	2.440	-0.60	0.580
X7	3.933	1.967	2.440	0.81	0.465
X8	4.800	2.400	2.440	0.98	0.381
X10	-3.267	-1.633	2.440	-0.67	0.540

Analyse de la variance pour la biomasse

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	295.2	295.2	42.17	0.59	0.745
Erreur résid	4	285.7	285.7	71.42		
Total	11	580.9				

### Activité enzymatique

#### **Ajustement factoriel fractionnaire : Activité enzymatique en fonction de X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>;**

Effets et coefficients estimés pour l'activité enzymatique

Terme	Effet	Coef	Er-T coef	T	P
Constante		609.10	58.69	10.38	0.000
X1	-6.20	-3.10	58.69	-0.05	0.960
X2	237.35	118.67	58.69	2.02	0.113
X4	-36.10	-18.05	58.69	-0.31	0.774
X5	-169.43	-84.71	58.69	-1.44	0.222
X7	18.40	9.20	58.69	0.16	0.883
X8	224.05	112.03	58.69	1.91	0.129
X10	-106.67	-53.34	58.69	-0.91	0.415

Analyse de la variance pour l'activité enzymatique

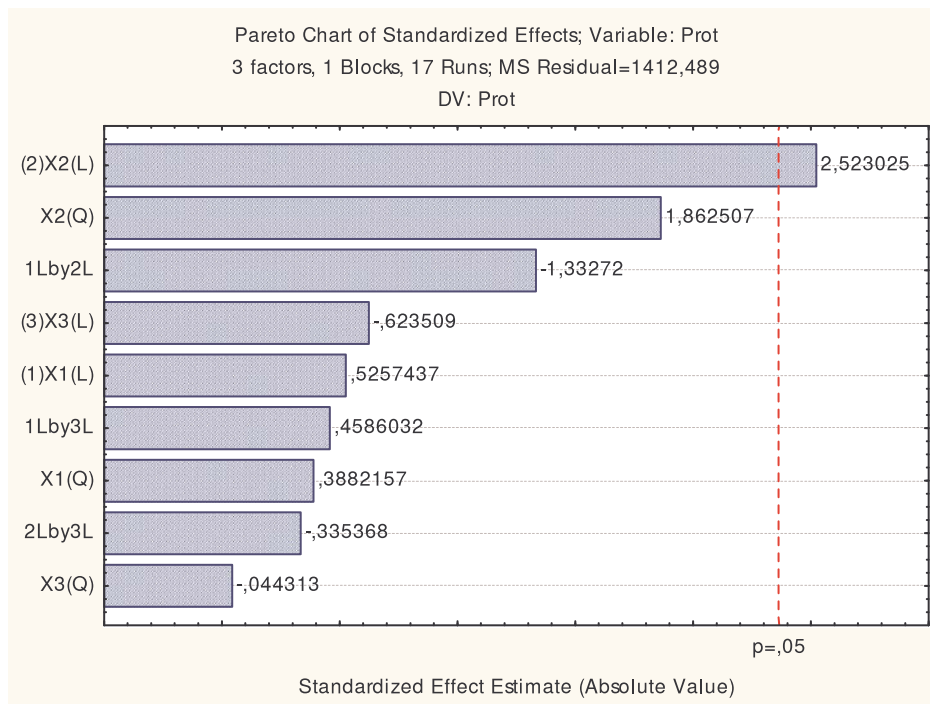
Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
Effets principaux	7	444898	444898	63557	1.54	0.355
Erreur résid	4	165360	165360	41340		
Total	11	610259				

## Annexe 3

### ❖ Aspergillus niger

Effect Estimates; Var.:Prot; R-sqr=,64977; Adj:,19948 (SoucheA_Benlounissi.sta) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=1412,489 DV: Prot										
Factor	Effect	Std.Err.	t(7)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	82,7000	21,65651	3,81872	0,006553	31,4905	133,9095	82,7000	21,65651	31,4905	133,9095
(1)X1 (L)	10,6930	20,33879	0,52574	0,615304	-37,4006	58,7866	5,3465	10,16939	-18,7003	29,3933
X1 (Q)	8,6896	22,38338	0,38822	0,709393	-44,2387	61,6179	4,3448	11,19169	-22,1193	30,8089
(2)X2 (L)	51,3153	20,33879	2,52303	0,039635	3,2217	99,4089	25,6576	10,16939	1,6108	49,7044
X2 (Q)	41,6892	22,38338	1,86251	0,104825	-11,2391	94,6175	20,8446	11,19169	-5,6195	47,3087
(3)X3 (L)	-12,6814	20,33879	-0,62351	0,552717	-60,7750	35,4122	-6,3407	10,16939	-30,3875	17,7061
X3 (Q)	-0,9919	22,38338	-0,04431	0,965893	-53,9201	51,9364	-0,4959	11,19169	-26,9601	25,9682
1L by 2L	-35,4175	26,57526	-1,33272	0,224365	-98,2580	27,4230	-17,7087	13,28763	-49,1290	13,7115
1L by 3L	12,1875	26,57526	0,45860	0,660418	-50,6530	75,0280	6,0938	13,28763	-25,3265	37,5140
2L by 3L	-8,9125	26,57526	-0,33537	0,747174	-71,7530	53,9280	-4,4563	13,28763	-35,8765	26,9640

ANOVA; Var.:Prot; R-sqr=,64977; Adj:,19948 (SoucheA_Benlounissi.sta) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=1412,489 DV: Prot					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	390,42	1	390,421	0,276406	0,615304
X1 (Q)	212,88	1	212,878	0,150711	0,709393
(2)X2 (L)	8991,42	1	8991,420	6,365655	0,039635
X2 (Q)	4899,83	1	4899,828	3,468931	0,104825
(3)X3 (L)	549,12	1	549,124	0,388763	0,552717
X3 (Q)	2,77	1	2,774	0,001964	0,965893
1L by 2L	2508,80	1	2508,799	1,776154	0,224365
1L by 3L	297,07	1	297,070	0,210317	0,660418
2L by 3L	158,87	1	158,865	0,112472	0,747174
Error	9887,42	7	1412,489		
Total SS	28231,55	16			

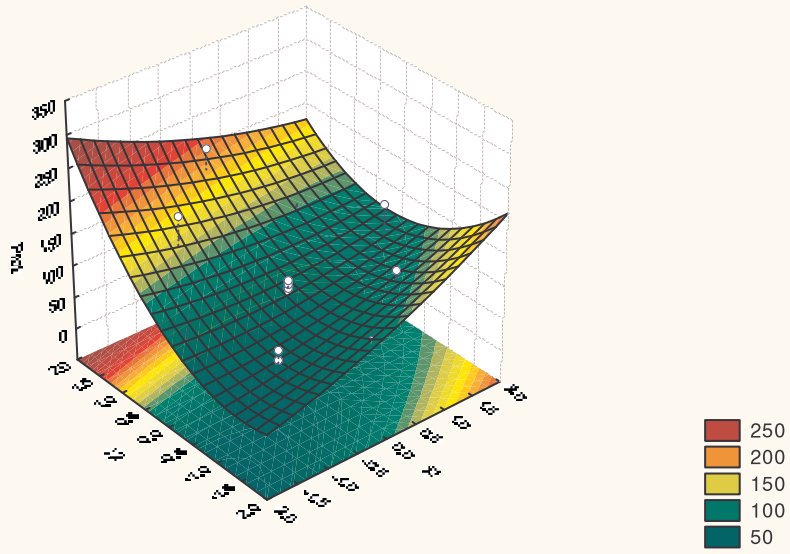


Response surface; Variable: Prot (SoucheA_Benlounissi.sta)				
Surface coefficients				
Factor	X1	X2	X3	Prot
X1	4,3448	-17,7087	6,09375	5,34650
X2	-17,7087	20,8446	-4,45625	25,65764
X3	6,0938	-4,4563	-0,49593	-6,34071

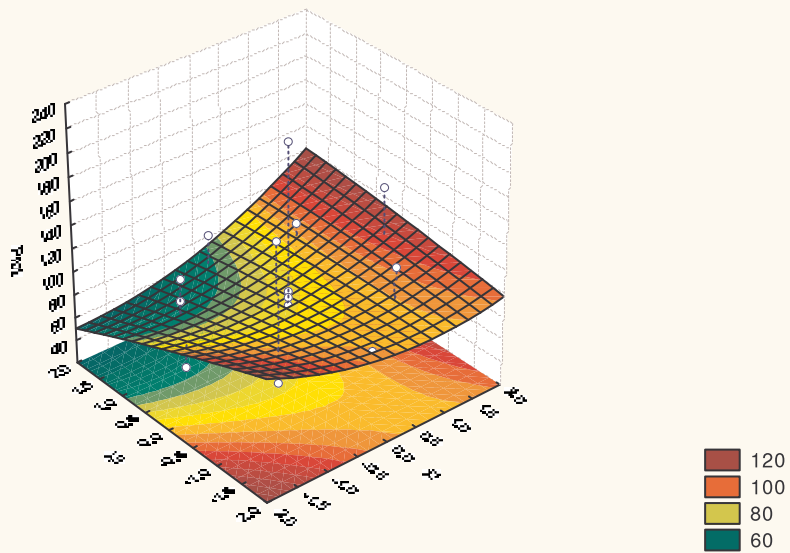
Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Prot (SoucheA_Benlounissi.sta)			
Determinant: -100,891319845			
Factor	1	2	3
	25,11384	1,805135	-2,22552
X1	0,40470	0,720534	0,56307
X2	-0,90560	0,401268	0,13740
X3	0,12694	0,565521	-0,81491

Critical values; Variable: Prot (SoucheA_Benlounissi.sta)			
Solution: saddlepoint			
Predicted value at solution: 77,87088			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,68200	-0,45125	1,682000
X2	-1,68200	-1,20710	1,682000
X3	-1,68200	<b>-3,74180</b>	1,682000

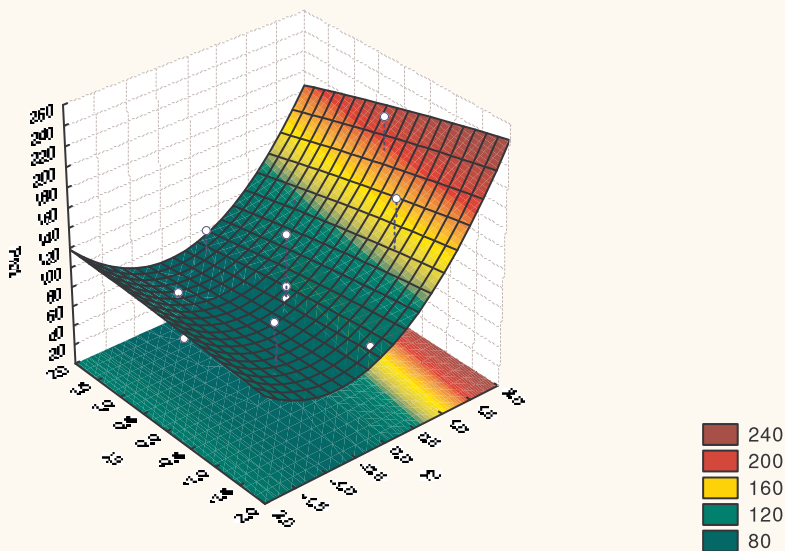
Fitted Surface; Variable: Prot  
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=1412,489  
DV: Prot



Fitted Surface; Variable: Prot  
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=1412,489  
DV: Prot



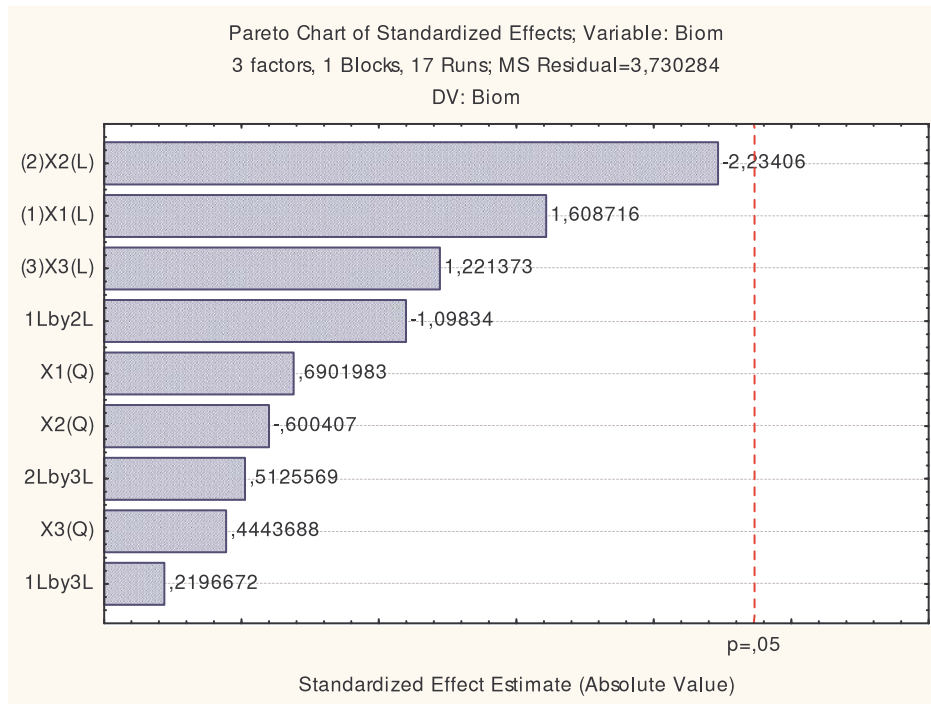
Fitted Surface; Variable: Prot  
 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=1412,489  
 DV: Prot



Effect Estimates; Var.:Biom; R-sqr=,63121; Adj:.,15705 (SoucheA_Benlounissi.sta)										
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=3,730284										
DV: Biom										
Factor	Effect	Std.Err.	t(7)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	20,43553	1,112927	18,36196	0,000000	17,80387	23,06718	20,43553	1,112927	17,80387	23,06718
(1)X1 (L)	1,68145	1,045210	1,60872	0,151714	-0,79008	4,15297	0,84072	0,522605	-0,39504	2,07649
X1 (Q)	0,79392	1,150281	0,69020	0,512296	-1,92606	3,51390	0,39696	0,575141	-0,96303	1,75695
(2)X2 (L)	-2,33506	1,045210	-2,23406	0,060607	-4,80659	0,13647	-1,16753	0,522605	-2,40329	0,06824
X2 (Q)	-0,69064	1,150281	-0,60041	0,567157	-3,41062	2,02935	-0,34532	0,575141	-1,70531	1,01467
(3)X3 (L)	1,27659	1,045210	1,22137	0,261479	-1,19494	3,74812	0,63830	0,522605	-0,59747	1,87406
X3 (Q)	0,51115	1,150281	0,44437	0,670189	-2,20883	3,23113	0,25557	0,575141	-1,10442	1,61557
1L by 2L	-1,50000	1,365702	-1,09834	0,308394	-4,72937	1,72937	-0,75000	0,682851	-2,36469	0,86469
1L by 3L	0,30000	1,365702	0,21967	0,832399	-2,92937	3,52937	0,15000	0,682851	-1,46469	1,76469
2L by 3L	0,70000	1,365702	0,51256	0,624034	-2,52937	3,92937	0,35000	0,682851	-1,26469	1,96469

ANOVA; Var.:Biom; R-sqr=,63121; Adj:.,15705 (SoucheA_Benlounissi.sta)					
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=3,730284					
DV: Biom					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	9,65385	1	9,65385	2,587967	0,151714
X1 (Q)	1,77701	1	1,77701	0,476374	0,512296
(2)X2 (L)	18,61788	1	18,61788	4,991009	0,060607
X2 (Q)	1,34472	1	1,34472	0,360488	0,567157
(3)X3 (L)	5,56466	1	5,56466	1,491753	0,261479
X3 (Q)	0,73660	1	0,73660	0,197464	0,670189
1L by 2L	4,50000	1	4,50000	1,206342	0,308394
1L by 3L	0,18000	1	0,18000	0,048254	0,832399
2L by 3L	0,98000	1	0,98000	0,262715	0,624034
Error	26,11199	7	3,73028		
Total SS	70,80471	16			



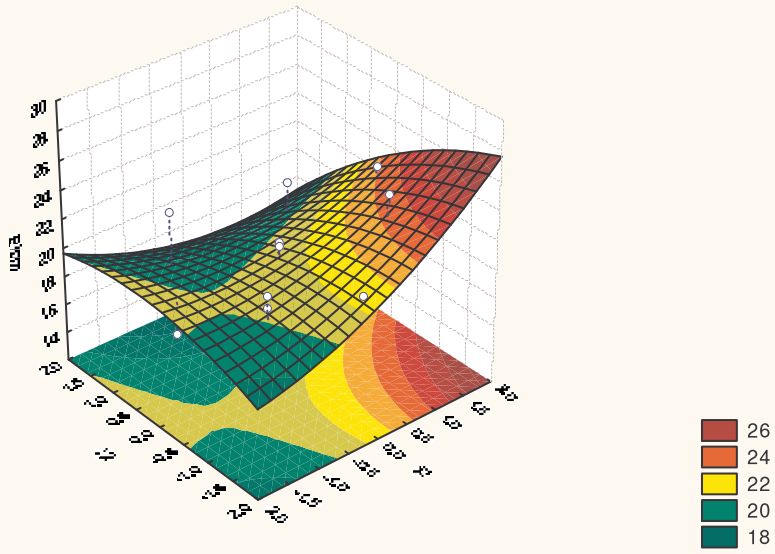


Response surface; Variable: Biom (SoucheA_Benlounissi.sta Surface coefficients				
Factor	X1	X2	X3	Biom
X1	0,396961	-0,750000	0,150000	0,84072
X2	-0,750000	-0,345318	0,350000	-1,16753
X3	0,150000	0,350000	0,255575	0,63830

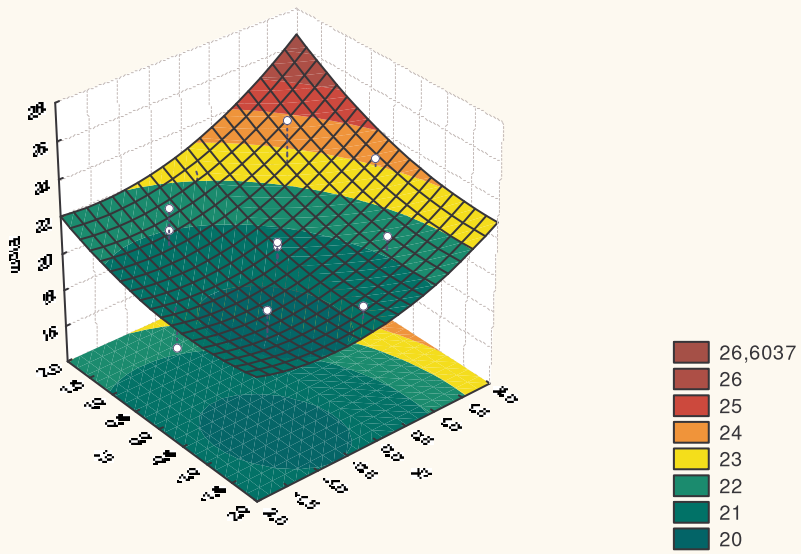
Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Biom (SoucheA_Benlounissi.sta Determinant: -,091032050294			
Factor	1	2	3
	0,553442	0,300728	-0,546952
X1	0,923346	-0,082385	-0,375027
X2	-0,383907	-0,215736	-0,897816
X3	0,006940	-0,972970	0,230827

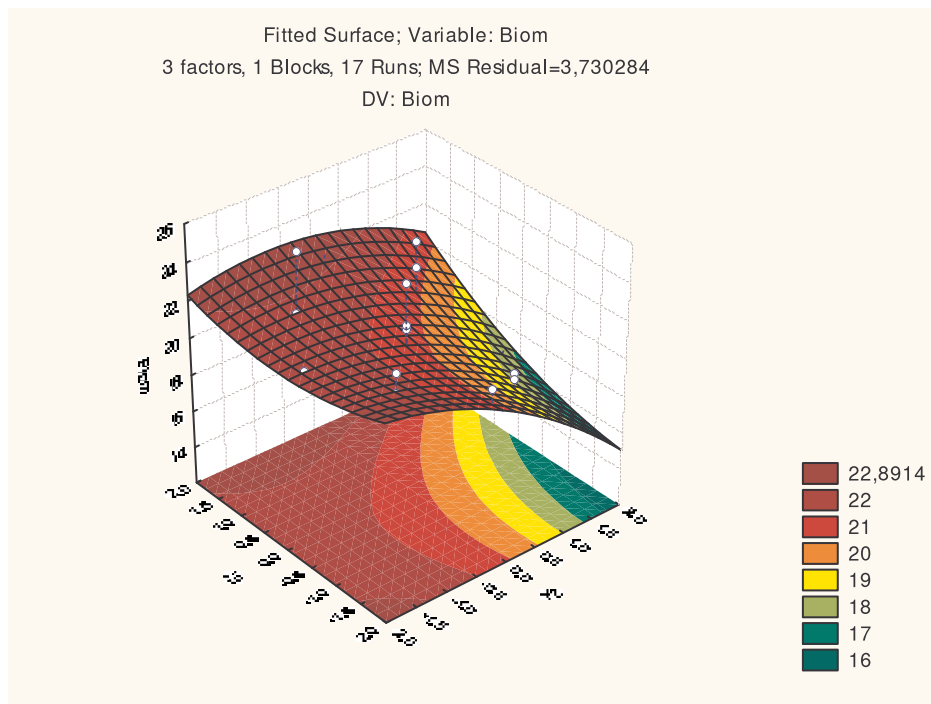
Critical values; Variable: Biom (SoucheA_Benlounissi.sta Solution: saddlepoint Predicted value at solution: 19,94769			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,68200	-1,38700	1,682000
X2	-1,68200	-0,45350	1,682000
X3	-1,68200	-0,53120	1,682000

Fitted Surface; Variable: Biom  
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=3,730284  
DV: Biom



Fitted Surface; Variable: Biom  
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=3,730284  
DV: Biom



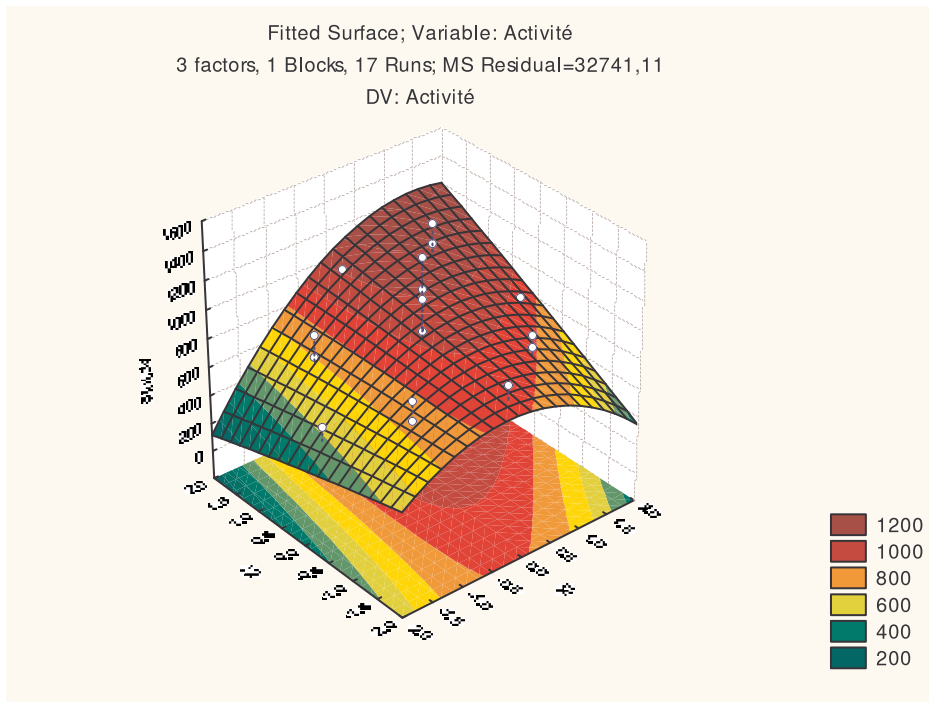


Effect Estimates; Var.:Activité; R-sqr=,7374; Adj:.,39976 (SoucheA_Benlounissi.sta) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=32741,11 DV: Activité										
Factor	Effect	Std.Err.	t(7)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	933,195	104,2659	8,95014	0,000044	686,645	1179,745	933,1952	104,2659	686,645	1179,745
(1)X1 (L)	227,264	97,9218	2,32087	0,053326	-4,285	458,812	113,6318	48,9609	-2,142	229,406
X1 (Q)	-183,461	107,7655	-1,70241	0,132464	-438,286	71,364	-91,7304	53,8827	-219,143	35,682
(2)X2 (L)	111,727	97,9218	1,14098	0,291405	-119,821	343,275	55,8633	48,9609	-59,911	171,637
X2 (Q)	-6,724	107,7655	-0,06240	0,951992	-261,549	248,101	-3,3621	53,8827	-130,775	124,050
(3)X3 (L)	-59,910	97,9218	-0,61182	0,559997	-291,458	171,638	-29,9551	48,9609	-145,729	85,819
X3 (Q)	220,505	107,7655	2,04616	0,079983	-34,320	475,330	110,2526	53,8827	-17,160	237,665
1L by 2L	160,712	127,9475	1,25608	0,249384	-141,835	463,260	80,3562	63,9737	-70,918	231,630
1L by 3L	17,858	127,9475	0,13957	0,892931	-284,690	320,405	8,9288	63,9737	-142,345	160,203
2L by 3L	125,003	127,9475	0,97698	0,361125	-177,545	427,550	62,5013	63,9737	-88,773	213,775

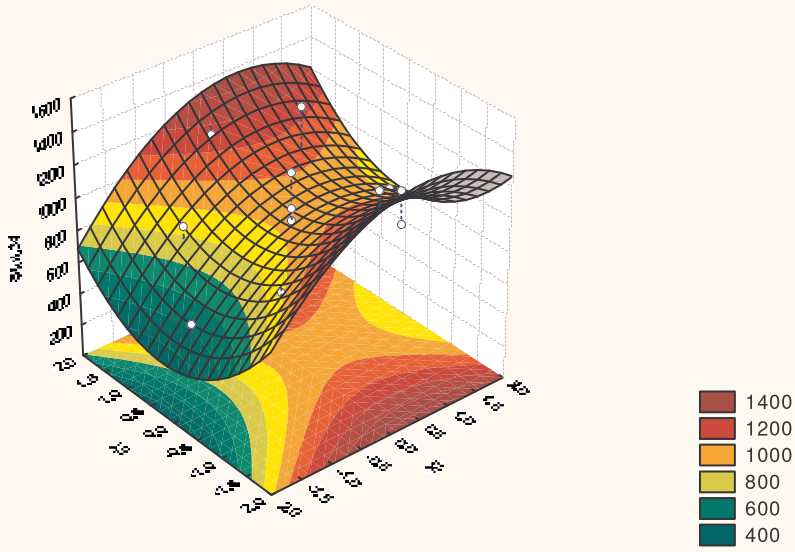
ANOVA; Var.:Activité; R-sqr=,7374; Adj:.,39976 (SoucheA_Benlounissi.sta) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=32741,11 DV: Activité					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	176357,8	1	176357,8	5,386433	0,053326
X1 (Q)	94890,0	1	94890,0	2,898191	0,132464
(2)X2 (L)	42623,5	1	42623,5	1,301833	0,291405
X2 (Q)	127,5	1	127,5	0,003893	0,951992
(3)X3 (L)	12255,7	1	12255,7	0,374320	0,559997
X3 (Q)	137079,3	1	137079,3	4,186763	0,079983
1L by 2L	51657,0	1	51657,0	1,577742	0,249384
1L by 3L	637,8	1	637,8	0,019480	0,892931
2L by 3L	31251,3	1	31251,3	0,954496	0,361125
Error	229187,8	7	32741,1		
Total SS	872752,2	16			

Critical values; Variable: Activité (SoucheA_Benlounissi.sta)			
Solution: saddlepoint			
Predicted value at solution: 217,0634			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,68200	-4,9962	1,682000
X2	-1,68200	-13,2766	1,682000
X3	-1,68200	4,1014	1,682000

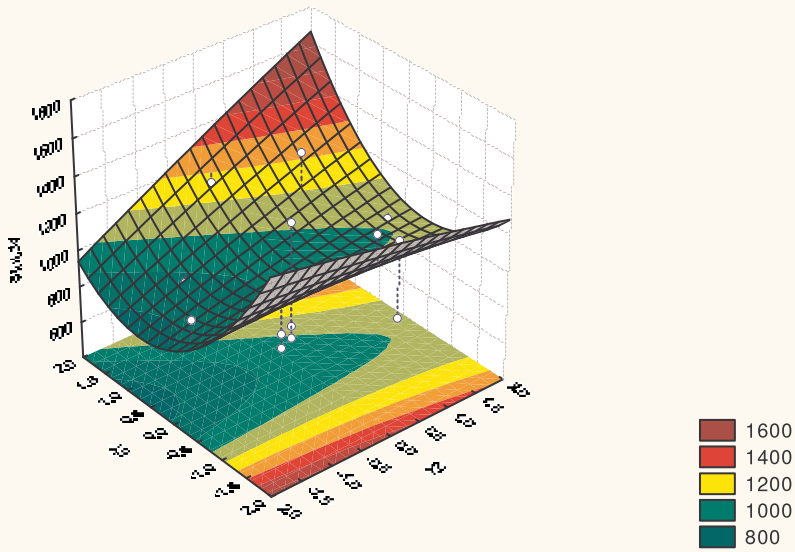
Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Activité (SoucheA_Benlounissi.sta)			
Determinant: -43114,7127438			
Factor	1	2	3
	119,3060	3,361440	-107,507
X1	0,0714	-0,363155	0,929
X2	0,2681	-0,890099	-0,369
X3	0,9607	0,275396	0,034



Fitted Surface; Variable: Activité  
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=32741,11  
DV: Activité



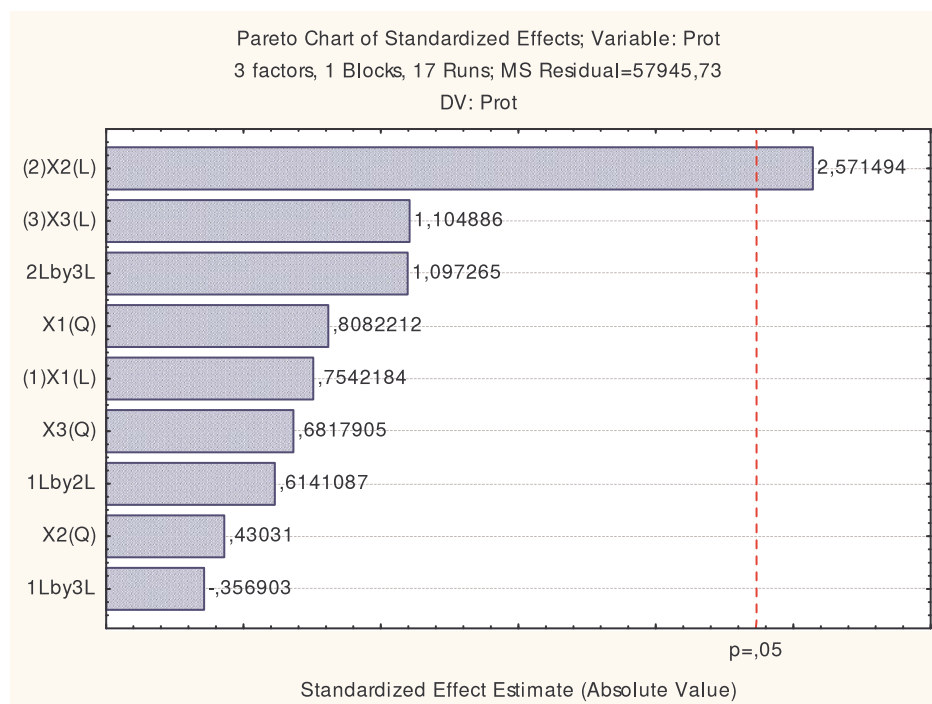
Fitted Surface; Variable: Activité  
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=32741,11  
DV: Activité



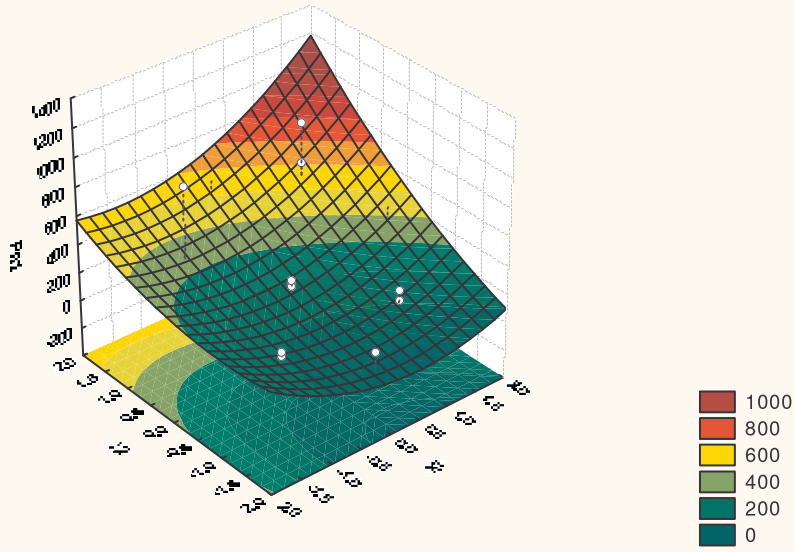
❖ Penicillium camemberti

Effect Estimates; Var.:Prot; R-sqr=,61086; Adj:,11053 (Souche_B.sta) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=57945,73 DV: Prot										
Factor	Effect	Std.Err.	t(7)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	185,8631	138,7096	1,339944	0,222125	-142,133	513,8591	185,8631	138,7096	-142,133	513,8591
(1)X1 (L)	98,2518	130,2696	0,754218	0,475320	-209,787	406,2905	49,1259	65,1348	-104,893	203,1452
X1 (Q)	115,8708	143,3652	0,808221	0,445557	-223,134	454,8756	57,9354	71,6826	-111,567	227,4378
(2)X2 (L)	334,9876	130,2696	2,571494	0,036927	26,949	643,0264	167,4938	65,1348	13,474	321,5132
X2 (Q)	61,6915	143,3652	0,430310	0,679908	-277,313	400,6963	30,8457	71,6826	-138,657	200,3482
(3)X3 (L)	143,9331	130,2696	1,104886	0,305733	-164,106	451,9719	71,9666	65,1348	-82,053	225,9859
X3 (Q)	97,7450	143,3652	0,681791	0,517287	-241,260	436,7499	48,8725	71,6826	-120,630	218,3749
1L by 2L	104,5300	170,2142	0,614109	0,558566	-297,963	507,0226	52,2650	85,1071	-148,981	253,5113
1L by 3L	-60,7500	170,2142	-0,356903	0,731681	-463,243	341,7426	-30,3750	85,1071	-231,621	170,8713
2L by 3L	186,7700	170,2142	1,097265	0,308831	-215,723	589,2626	93,3850	85,1071	-107,861	294,6313

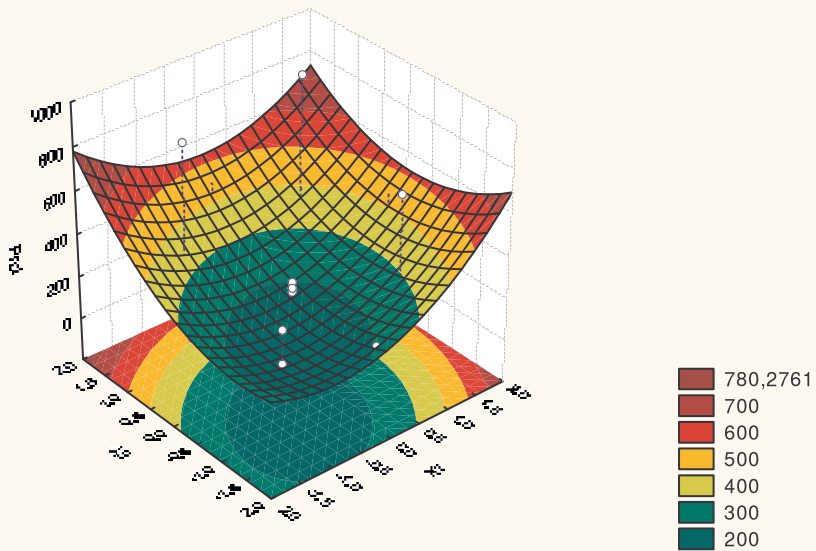
ANOVA; Var.:Prot; R-sqr=,61086; Adj:,11053 (Souche_B.sta) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=57945,73 DV: Prot					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	32962	1	32962,2	0,568845	0,475320
X1 (Q)	37851	1	37851,4	0,653221	0,445557
(2)X2 (L)	383171	1	383170,9	6,612583	0,036927
X2 (Q)	10730	1	10729,6	0,185167	0,679908
(3)X3 (L)	70739	1	70738,6	1,220774	0,305733
X3 (Q)	26935	1	26935,4	0,464838	0,517287
1L by 2L	21853	1	21853,0	0,377129	0,558566
1L by 3L	7381	1	7381,1	0,127380	0,731681
2L by 3L	69766	1	69766,1	1,203990	0,308831
Error	405620	7	57945,7		
Total SS	1042347	16			



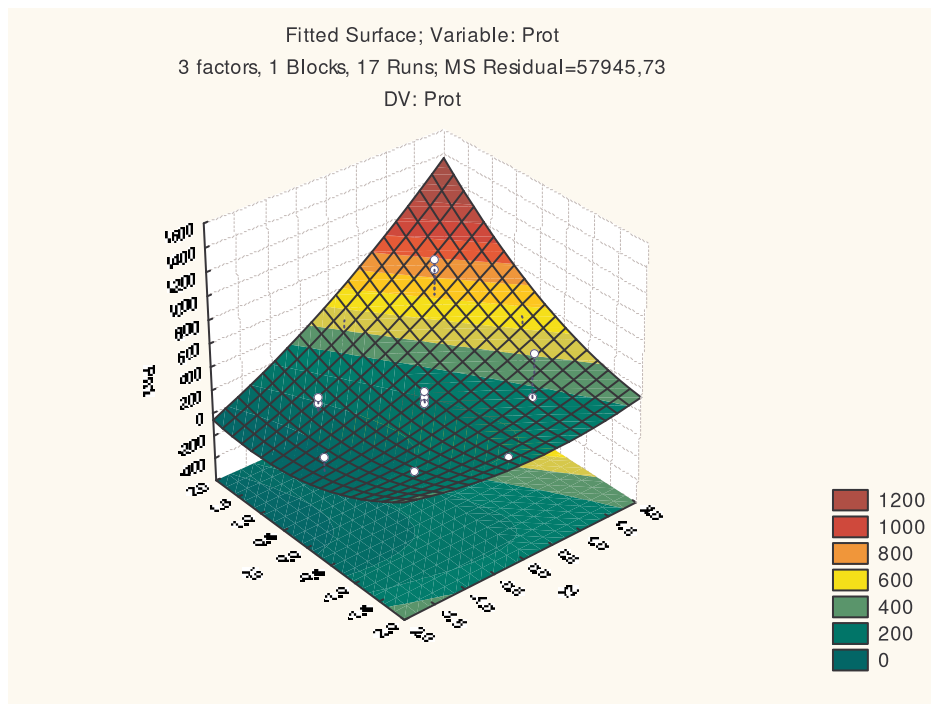
Fitted Surface; Variable: Prot  
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=57945,73  
DV: Prot



Fitted Surface; Variable: Prot  
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=57945,73  
DV: Prot







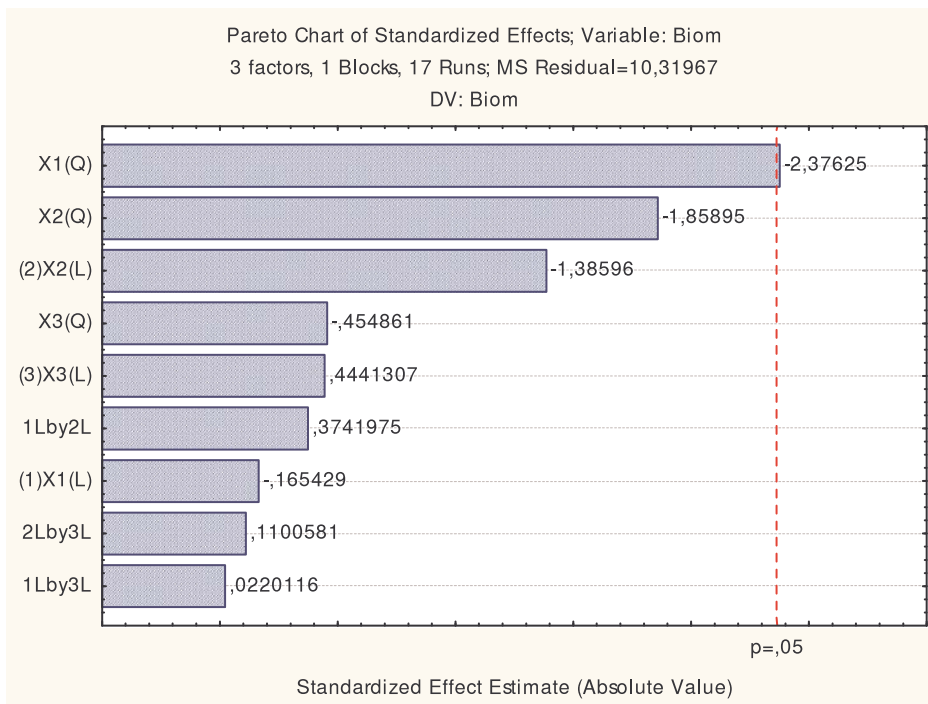
Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Prot (Souche_B.sta)			
Determinant: -116525,637925			
Factor	1	2	3
	88,54746	68,35746	-19,2513
X1	-0,22392	0,90518	0,3613
X2	-0,67235	0,12488	-0,7296
X3	-0,70556	-0,40627	0,5806

Critical values; Variable: Prot (Souche_B.sta)			
Solution: saddlepoint			
Predicted value at solution: 146,2304			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,68200	-1,04789	1,682000
X2	-1,68200	0,49257	1,682000
X3	-1,68200	-1,53251	1,682000

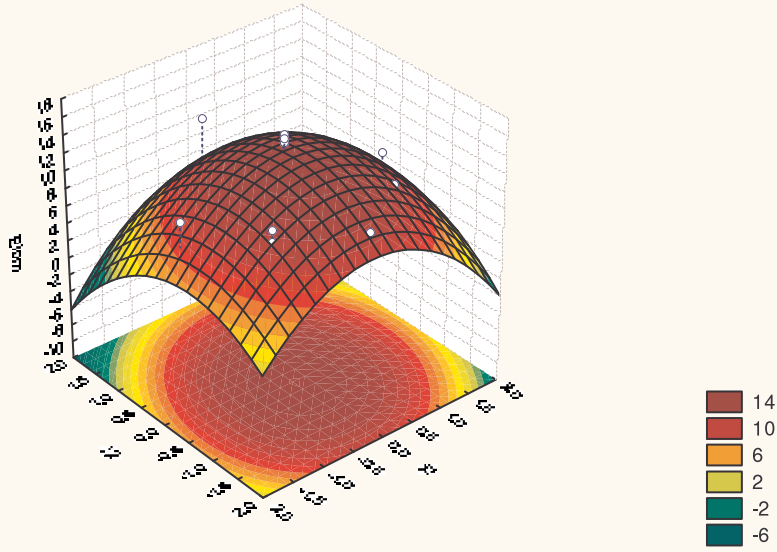
Effect Estimates; Var.:Biom; R-sqr=,58116; Adj:,.04265 (Souche_B.sta)										
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=10,31967										
DV: Biom										
Factor	Effect	Std.Err.	t(7)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	13,82816	1,851095	7,47026	0,000141	9,45102	18,20531	13,82816	1,851095	9,45102	18,20531
(1)X1 (L)	-0,28759	1,738463	-0,16543	0,873283	-4,39840	3,82322	-0,14380	0,869232	-2,19920	1,91161
X1 (Q)	-4,54630	1,913225	-2,37625	0,049152	-9,07036	-0,02224	-2,27315	0,956612	-4,53518	-0,01112
(2)X2 (L)	-2,40945	1,738463	-1,38596	0,208303	-6,52026	1,70137	-1,20472	0,869232	-3,26013	0,85068
X2 (Q)	-3,55660	1,913225	-1,85895	0,105373	-8,08065	0,96746	-1,77830	0,956612	-4,04033	0,48373
(3)X3 (L)	0,77210	1,738463	0,44413	0,670353	-3,33871	4,88292	0,38605	0,869232	-1,66935	2,44146
X3 (Q)	-0,87025	1,913225	-0,45486	0,662980	-5,39431	3,65381	-0,43513	0,956612	-2,69715	1,82690
1L by 2L	0,85000	2,271528	0,37420	0,719335	-4,52131	6,22131	0,42500	1,135764	-2,26065	3,11065
1L by 3L	0,05000	2,271528	0,02201	0,983053	-5,32131	5,42131	0,02500	1,135764	-2,66065	2,71065
2L by 3L	0,25000	2,271528	0,11006	0,915452	-5,12131	5,62131	0,12500	1,135764	-2,56065	2,81065



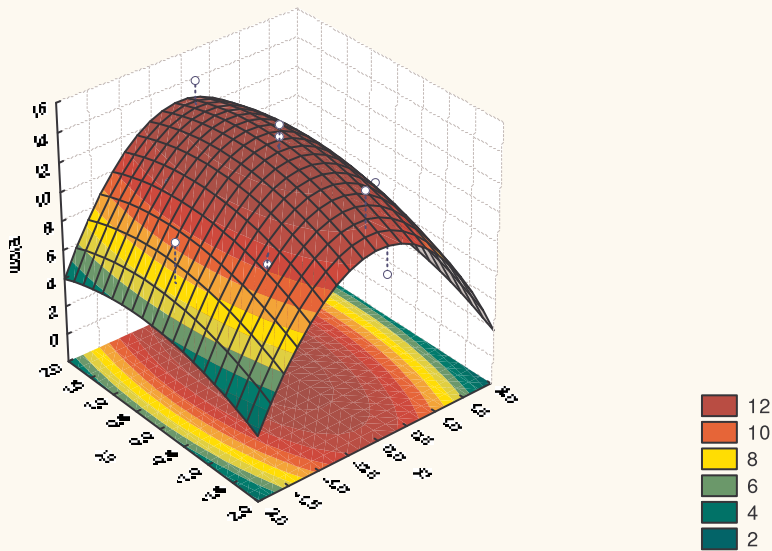
ANOVA; Var.:Biom; R-sqr=,58116; Adj:,04265 (Souche_B.sta 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=10,31967 DV: Biom					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	0,2824	1	0,28242	0,027367	0,873283
X1 (Q)	58,2707	1	58,27070	5,646564	0,049152
(2)X2 (L)	19,8230	1	19,82299	1,920893	0,208303
X2 (Q)	35,6618	1	35,66176	3,455706	0,105373
(3)X3 (L)	2,0356	1	2,03558	0,197252	0,670353
X3 (Q)	2,1351	1	2,13512	0,206898	0,662980
1L by 2L	1,4450	1	1,44500	0,140024	0,719335
1L by 3L	0,0050	1	0,00500	0,000485	0,983053
2L by 3L	0,1250	1	0,12500	0,012113	0,915452
Error	72,2377	7	10,31967		
Total SS	172,4706	16			



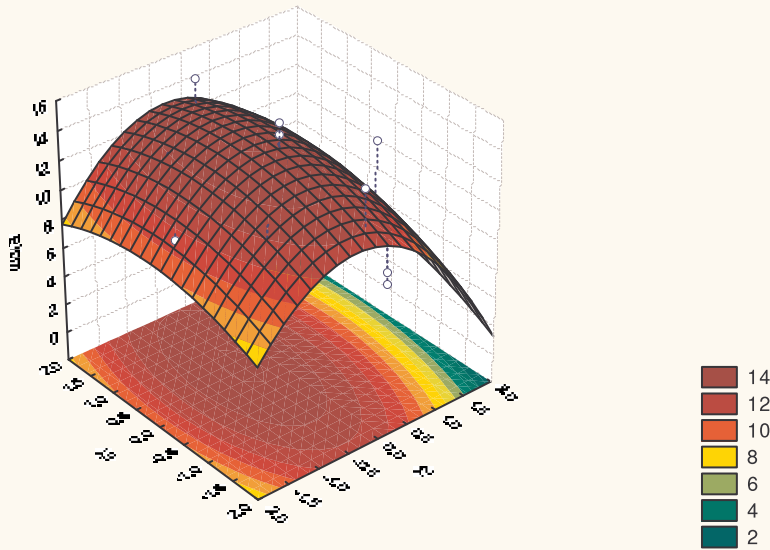
Fitted Surface; Variable: Biom  
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=10,31967  
DV: Biom



Fitted Surface; Variable: Biom  
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=10,31967  
DV: Biom



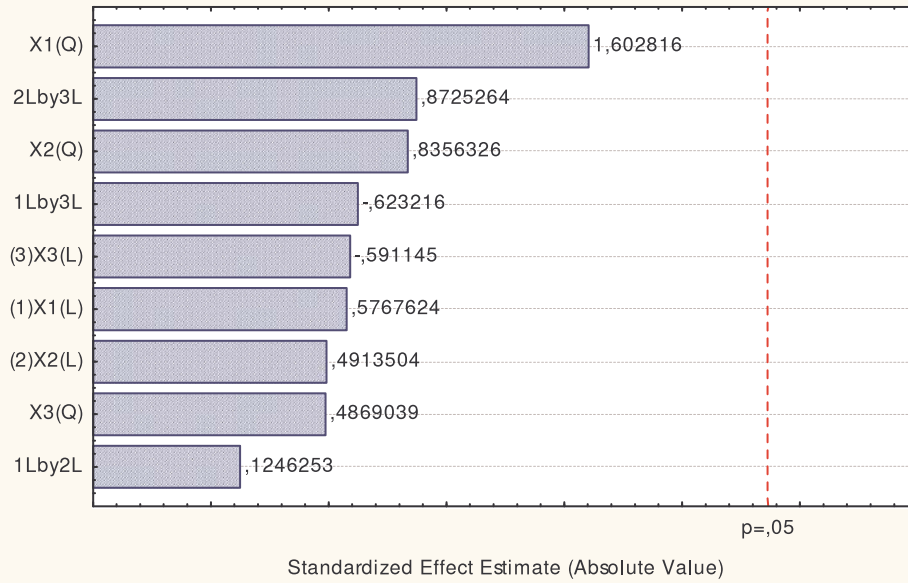
Fitted Surface; Variable: Biom  
 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=10,31967  
 DV: Biom



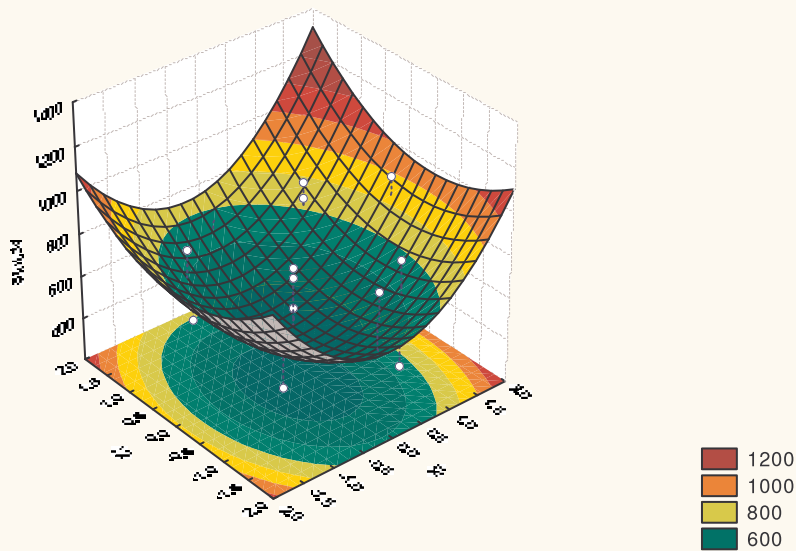
Effect Estimates; Var.:Activité; R-sqr=,40713; Adj:0, (Souche_B.sta) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=55872,28 DV: Activité										
Factor	Effect	Std.Err.	t(7)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	447,307	136,2053	3,284068	0,013412	125,233	769,3818	447,3075	136,2053	125,233	769,3818
(1)X1 (L)	73,778	127,9177	0,576762	0,582164	-228,699	376,2555	36,8891	63,9589	-114,350	188,1277
X1 (Q)	225,639	140,7769	1,602816	0,153010	-107,245	558,5237	112,8197	70,3884	-53,623	279,2619
(2)X2 (L)	62,852	127,9177	0,491350	0,638209	-239,625	365,3298	31,4262	63,9589	-119,812	182,6649
X2 (Q)	117,638	140,7769	0,835633	0,430957	-215,247	450,5221	58,8189	70,3884	-107,623	225,2610
(3)X3 (L)	-75,618	127,9177	-0,591145	0,573009	-378,095	226,8595	-37,8089	63,9589	-189,048	113,4297
X3 (Q)	68,545	140,7769	0,486904	0,641202	-264,340	401,4292	34,2724	70,3884	-132,170	200,7146
1L by 2L	20,830	167,1411	0,124625	0,904324	-374,396	416,0559	10,4150	83,5705	-187,198	208,0279
1L by 3L	-104,165	167,1411	-0,623216	0,552898	-499,391	291,0609	-52,0825	83,5705	-249,695	145,5304
2L by 3L	145,835	167,1411	0,872526	0,411848	-249,391	541,0609	72,9175	83,5705	-124,695	270,5304

ANOVA; Var.:Activité; R-sqr=,40713; Adj:0, (Souche_B.sta) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=55872,28 DV: Activité					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	18586,2	1	18586,2	0,332655	0,582164
X1 (Q)	143536,9	1	143536,9	2,569018	0,153010
(2)X2 (L)	13489,0	1	13489,0	0,241425	0,638209
X2 (Q)	39014,6	1	39014,6	0,698282	0,430957
(3)X3 (L)	19524,7	1	19524,7	0,349452	0,573009
X3 (Q)	13245,9	1	13245,9	0,237075	0,641202
1L by 2L	867,8	1	867,8	0,015531	0,904324
1L by 3L	21700,7	1	21700,7	0,388398	0,552898
2L by 3L	42535,7	1	42535,7	0,761302	0,411848
Error	391106,0	7	55872,3		
Total SS	659677,5	16			

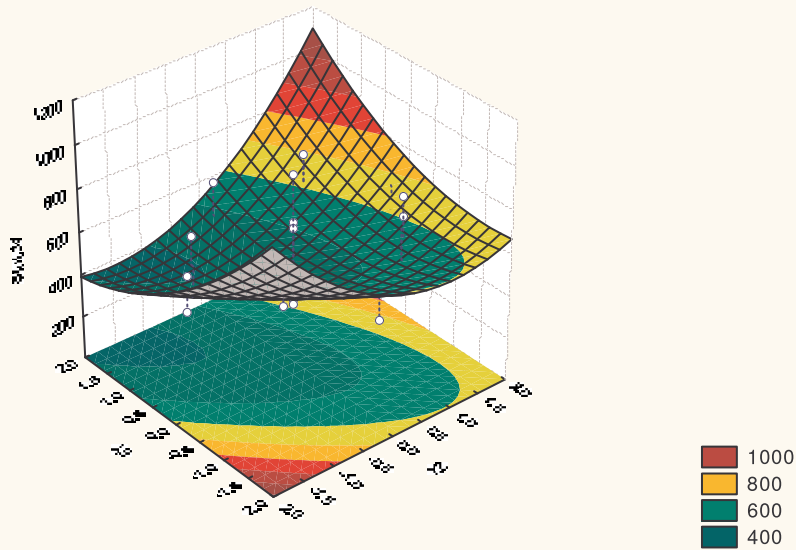
Pareto Chart of Standardized Effects; Variable: Activité  
 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=55872,28  
 DV: Activité



Fitted Surface; Variable: Activité  
 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=55872,28  
 DV: Activité



Fitted Surface; Variable: Activité  
 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=55872,28  
 DV: Activité



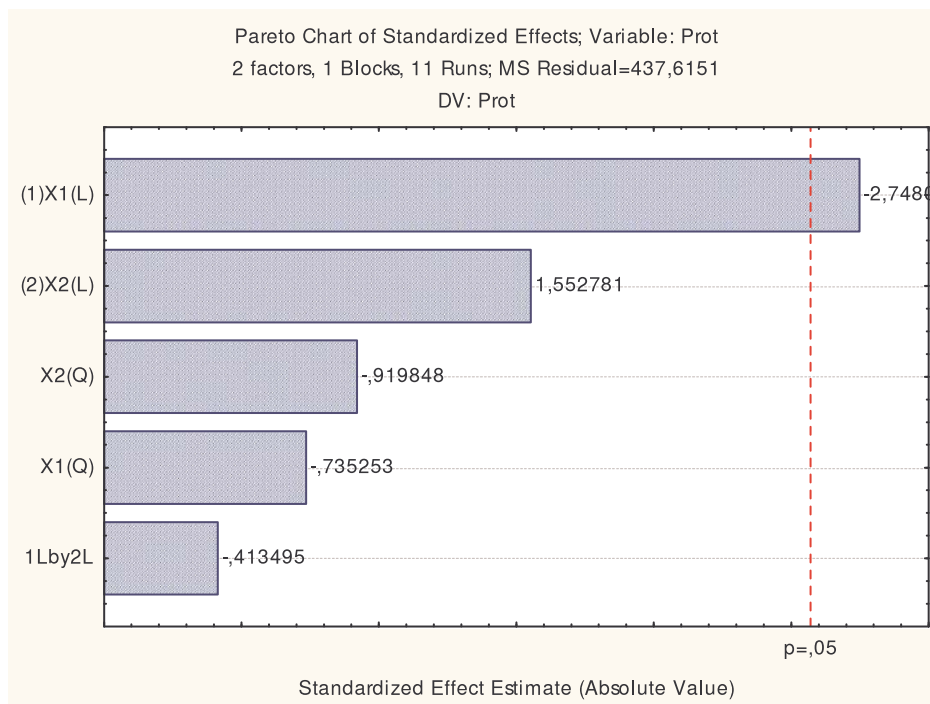
Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Activité (Souche_B.sta)			
Determinant: 26759,04844126			
Factor	1	2	3
	121,3006	81,91733	2,692972
X1	-0,9378	0,27075	0,217173
X2	0,1133	0,83020	-0,545835
X3	0,3281	0,48730	0,809259

Critical values; Variable: Activité (Souche_B.sta)			
Solution: minimum			
Predicted value at solution: 295,8612			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,68200	1,40528	1,682000
X2	-1,68200	-4,09654	1,682000
X3	-1,68200	5,97724	1,682000

❖ Aspergillus flavus

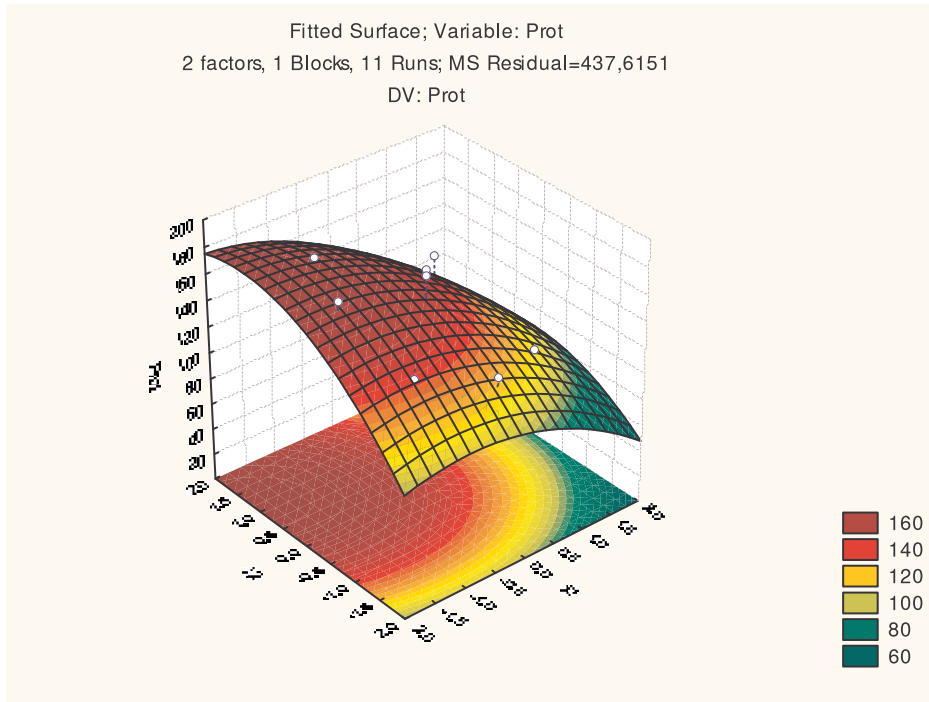
Effect Estimates; Var.:Prot; R-sqr=,69167; Adj:,38334 (Souche_C.sta) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=437,6151 DV: Prot										
Factor	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	152,4000	12,07774	12,61826	0,000056	121,3532	183,4468	152,4000	12,07774	121,3532	183,446
(1)X1 (L)	-40,6497	14,79214	-2,74806	0,040403	-78,6741	-2,6253	-20,3249	7,39607	-39,3371	-1,312
X1 (Q)	-12,9450	17,60617	-0,73525	0,495204	-58,2031	32,3131	-6,4725	8,80309	-29,1016	16,156
(2)X2 (L)	22,9690	14,79214	1,55278	0,181183	-15,0555	60,9934	11,4845	7,39607	-7,5277	30,496
X2 (Q)	-16,1950	17,60617	-0,91985	0,399856	-61,4531	29,0631	-8,0975	8,80309	-30,7266	14,531
1L by 2L	-8,6500	20,91925	-0,41349	0,696381	-62,4246	45,1246	-4,3250	10,45963	-31,2123	22,562

ANOVA; Var.:Prot; R-sqr=,69167; Adj:,38334 (Souche_C.sta) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=437,6151 DV: Prot					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	3304,797	1	3304,797	7,551835	0,040403
X1 (Q)	236,574	1	236,574	0,540598	0,495204
(2)X2 (L)	1055,146	1	1055,146	2,411129	0,181183
X2 (Q)	370,275	1	370,275	0,846120	0,399856
1L by 2L	74,823	1	74,823	0,170978	0,696381
Error	2188,075	5	437,615		
Total SS	7096,570	10			



Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Prot (Souche_C.sta) Determinant: 47,7346625		
Factor	1	2
	-4,97490	-9,59510
X1	0,82211	0,56933
X2	-0,56933	0,82211

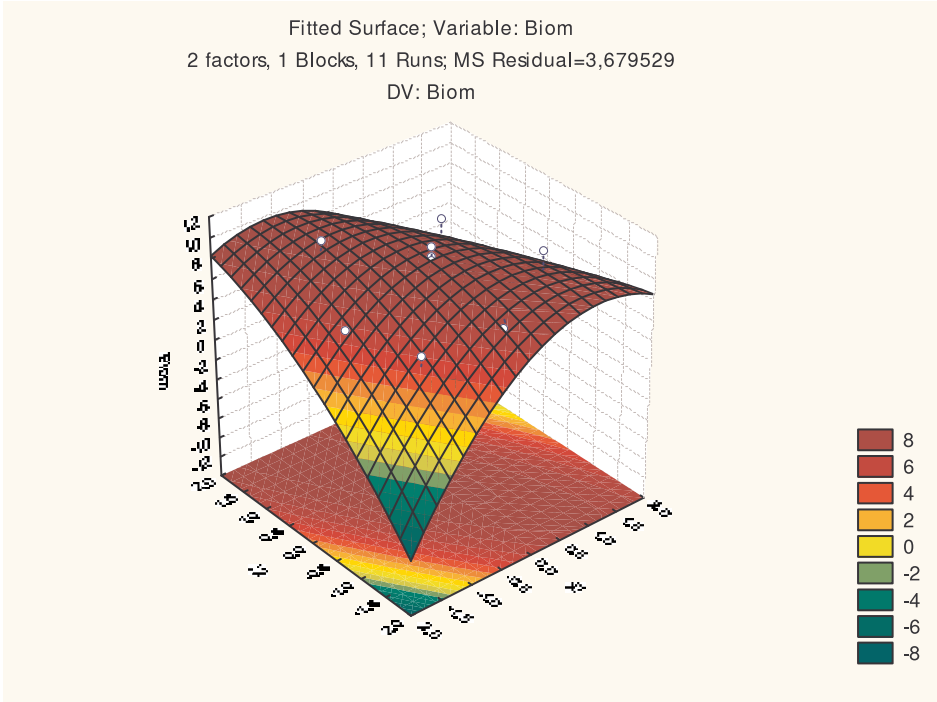
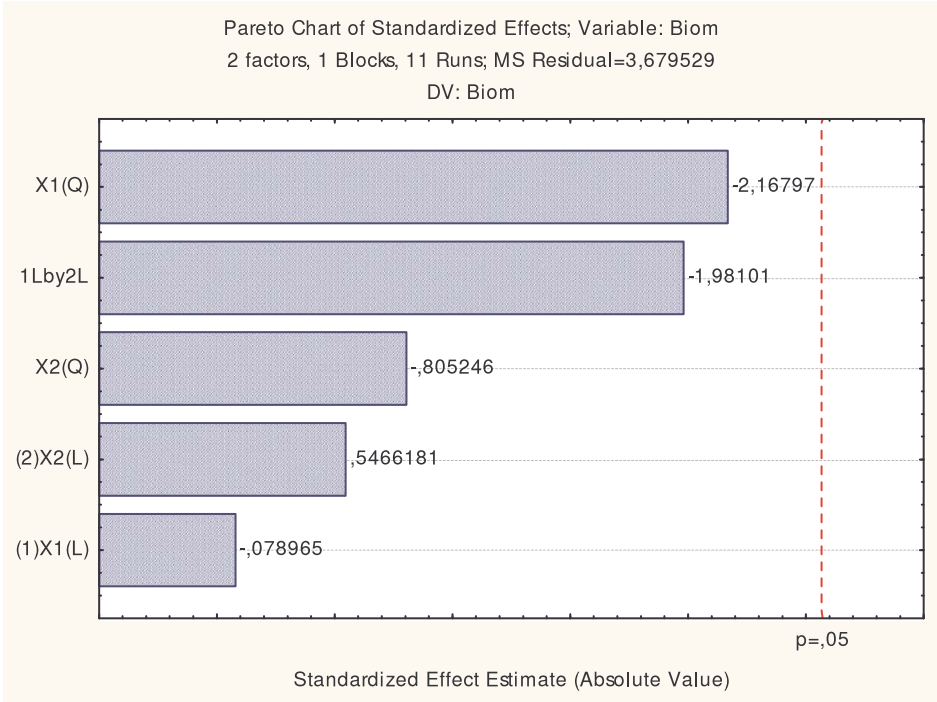
Critical values; Variable: Prot (Souche_C.sta)			
Solution: maximum			
Predicted value at solution: 179,6773			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,41421	-1,98405	1,414214
X2	-1,41421	1,23899	1,414214



Effect Estimates; Var.:Biom; R-sqr=,64184; Adj:,.28368 (Souche_C.sta)										
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=3,679529										
DV: Biom										
Factor	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	9,40000	1,107479	8,48775	0,000373	6,55313	12,24687	9,40000	1,107479	6,55313	12,24687
(1)X1 (L)	-0,10711	1,356379	-0,07897	0,940123	-3,59379	3,37958	-0,05355	0,678190	-1,79690	1,68979
X1 (Q)	-3,50000	1,614414	-2,16797	0,082354	-7,64998	0,64998	-1,75000	0,807207	-3,82499	0,32499
(2)X2 (L)	0,74142	1,356379	0,54662	0,608140	-2,74526	4,22811	0,37071	0,678190	-1,37263	2,11405
X2 (Q)	-1,30000	1,614414	-0,80525	0,457245	-5,44998	2,84998	-0,65000	0,807207	-2,72499	1,42499
1L by 2L	-3,80000	1,918210	-1,98101	0,104443	-8,73092	1,13092	-1,90000	0,959105	-4,36546	0,56546

ANOVA; Var.:Biom; R-sqr=,64184; Adj:,.28368 (Souche_C.sta)					
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=3,679529					
DV: Biom					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	0,02294	1	0,02294	0,006236	0,940123
X1 (Q)	17,29412	1	17,29412	4,700090	0,082354
(2)X2 (L)	1,09941	1	1,09941	0,298791	0,608140
X2 (Q)	2,38588	1	2,38588	0,648421	0,457245
1L by 2L	14,44000	1	14,44000	3,924415	0,104443
Error	18,39765	5	3,67953		
Total SS	51,36727	10			



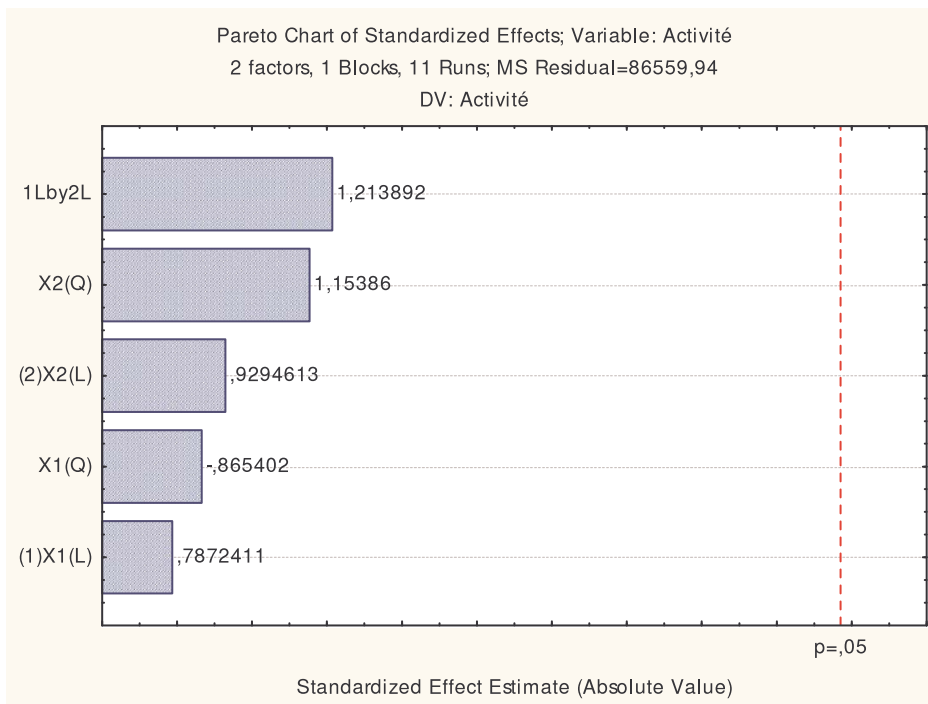


Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Biom (Souche_C.sta)		
Determinant: ,235		
Factor	1	2
	-0,102275	-2,29772
X1	-0,499482	0,86632
X2	0,866324	0,49948

Critical values; Variable: Biom (Souche_C.sta) Solution: maximum Predicted value at solution: 9,697958			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,41421	-0,823372	1,414214
X2	-1,41421	1,488552	1,414214

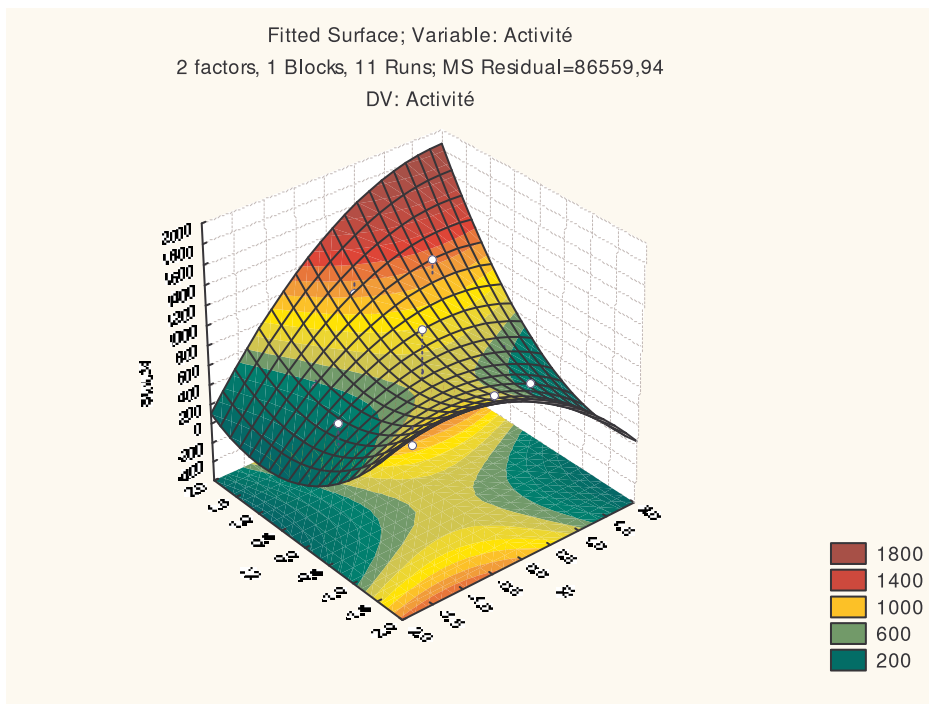
Effect Estimates; Var.:Activité; R-sqr=,54034; Adj:,.08067 (Souche_C.sta) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=86559,94 DV: Activité										
Factor	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	642,857	169,8626	3,784568	0,012830	206,211	1079,502	642,857	169,8626	206,211	1079,502
(1)X1 (L)	163,776	208,0384	0,787241	0,466800	-371,003	698,556	81,888	104,0192	-185,502	349,278
X1 (Q)	-214,287	247,6152	-0,865402	0,426382	-850,802	422,228	-107,143	123,8076	-425,401	211,114
(2)X2 (L)	193,364	208,0384	0,929461	0,395310	-341,416	728,143	96,682	104,0192	-170,708	364,072
X2 (Q)	285,713	247,6152	1,153860	0,300712	-350,802	922,228	142,857	123,8076	-175,401	461,114
1L by 2L	357,140	294,2107	1,213892	0,278993	-399,153	1113,433	178,570	147,1054	-199,576	556,716

ANOVA; Var.:Activité; R-sqr=,54034; Adj:,.08067 (Souche_C.sta) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=86559,94 DV: Activité						
Factor		SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)		53645,4	1	53645,4	0,619749	0,466800
X1 (Q)		64826,5	1	64826,5	0,748920	0,426382
(2)X2 (L)		74779,0	1	74779,0	0,863898	0,395310
X2 (Q)		115245,3	1	115245,3	1,331393	0,300712
1L by 2L		127549,0	1	127549,0	1,473534	0,278993
Error		432799,7	5	86559,9		
Total SS		941555,8	10			



Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Activité (Souche_C.sta)		
Determinant: -23277,9506806		
Factor	1	2
	171,4692	-135,756
X1	0,3052	0,952
X2	0,9523	-0,305

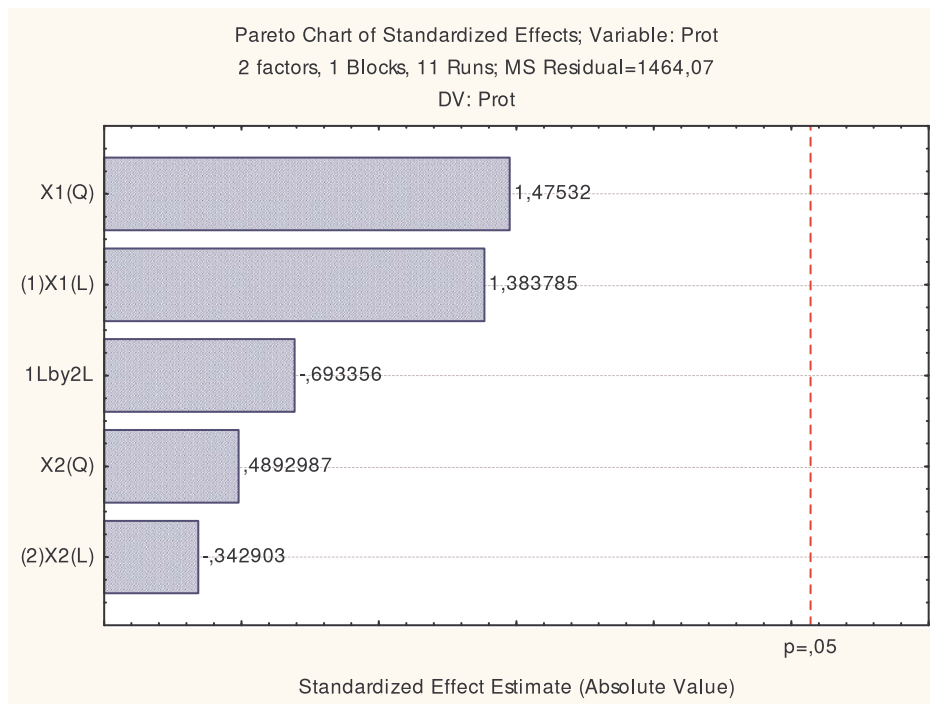
Critical values; Variable: Activité (Souche_C.sta)			
Solution: saddlepoint			
Predicted value at solution: 627,2054			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,41421	0,065857	1,414214
X2	-1,41421	-0,379548	1,414214

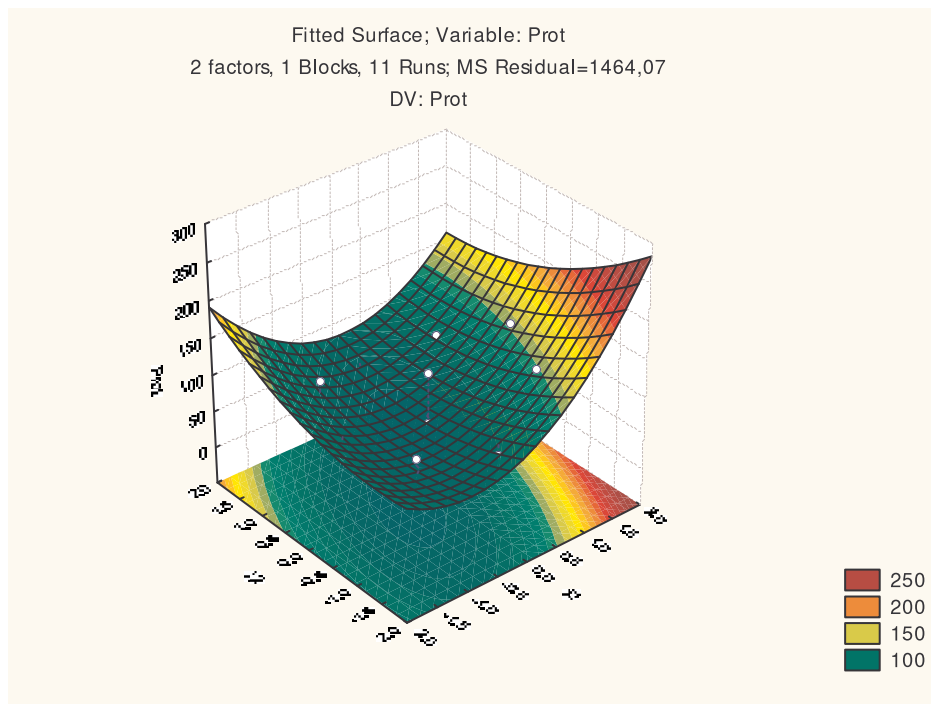


❖ Aspergillus awamori

Effect Estimates; Var.:Prot; R-sqr=,48417; Adj:0, (Souche_D.sta) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=1464,07 DV: Prot										
Factor	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	58,3489	22,09125	2,641268	0,045906	1,562	115,1363	58,3489	22,09125	1,5615	115,1363
(1)X1 (L)	37,4427	27,05819	1,383785	0,225013	-32,113	106,9980	18,7214	13,52909	-16,0563	53,4990
X1 (Q)	47,5198	32,20983	1,475320	0,200145	-35,278	130,3178	23,7599	16,10492	-17,6391	65,1589
(2)X2 (L)	-9,2783	27,05819	-0,342903	0,745617	-78,834	60,2769	-4,6392	13,52909	-39,4168	30,1385
X2 (Q)	15,7602	32,20983	0,489299	0,645339	-67,038	98,5582	7,8801	16,10492	-33,5189	49,2791
1L by 2L	-26,5300	38,26317	-0,693356	0,518969	-124,889	71,8286	-13,2650	19,13158	-62,4443	35,9143

ANOVA; Var.:Prot; R-sqr=,48417; Adj:0, (Souche_D.sta) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=1464,07 DV: Prot					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	2803,49	1	2803,492	1,914862	0,225013
X1 (Q)	3186,65	1	3186,651	2,176570	0,200145
(2)X2 (L)	172,15	1	172,149	0,117583	0,745617
X2 (Q)	350,52	1	350,518	0,239413	0,645339
1L by 2L	703,84	1	703,841	0,480743	0,518969
Error	7320,35	5	1464,070		
Total SS	14191,43	10			

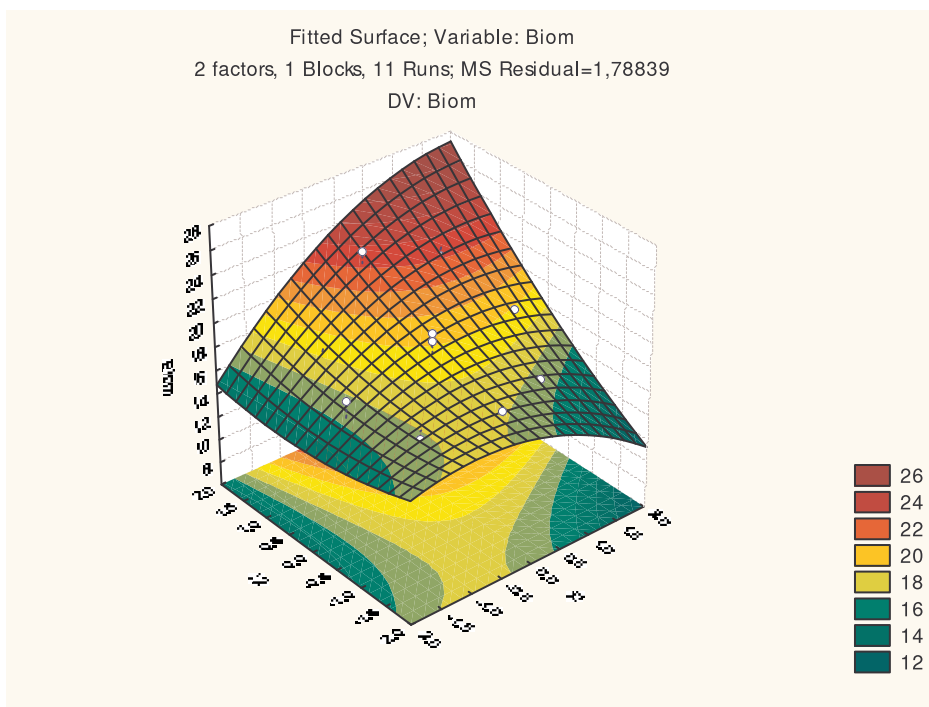
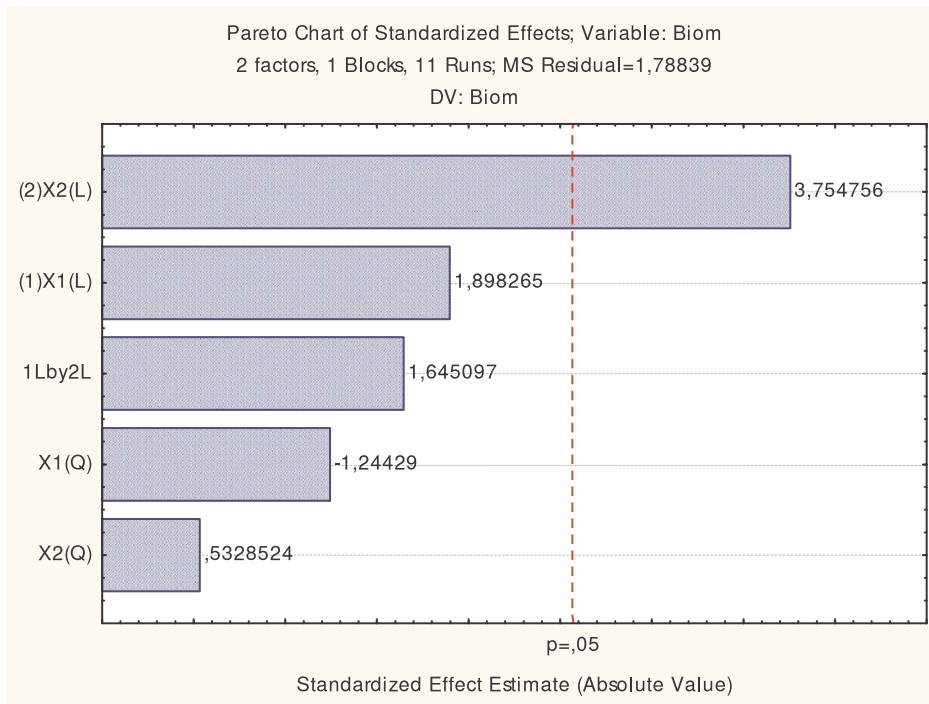




Critical values; Variable: Prot (Souche_D.sta)			
Solution: minimum			
Predicted value at solution: 54,64681			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,41400	-0,407556	1,414000
X2	-1,41400	-0,048670	1,414000

Effect Estimates; Var.:Biom; R-sqr=,8204; Adj:,64081 (Souche_D.sta)										
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=1,78839										
DV: Biom										
Factor	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	19,00028	0,772095	24,60875	0,000002	17,01555	20,98501	19,00028	0,772095	17,01555	20,98501
(1)X1 (L)	1,79517	0,945690	1,89827	0,116122	-0,63580	4,22615	0,89759	0,472845	-0,31790	2,11307
X1 (Q)	-1,40075	1,125742	-1,24429	0,268539	-4,29456	1,49306	-0,70038	0,562871	-2,14728	0,74653
(2)X2 (L)	3,55084	0,945690	3,75476	0,013229	1,11986	5,98181	1,77542	0,472845	0,55993	2,99091
X2 (Q)	0,59985	1,125742	0,53285	0,616958	-2,29396	3,49366	0,29993	0,562871	-1,14698	1,74683
1L by 2L	2,20000	1,337307	1,64510	0,160869	-1,23766	5,63766	1,10000	0,668654	-0,61883	2,81883

ANOVA; Var.:Biom; R-sqr=,8204; Adj:,64081 (Souche_D.sta)					
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=1,78839					
DV: Biom					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	6,44431	1	6,44431	3,60341	0,116122
X1 (Q)	2,76889	1	2,76889	1,54826	0,268539
(2)X2 (L)	25,21307	1	25,21307	14,09819	0,013229
X2 (Q)	0,50778	1	0,50778	0,28393	0,616958
1L by 2L	4,84000	1	4,84000	2,70634	0,160869
Error	8,94195	5	1,78839		
Total SS	49,78909	10			

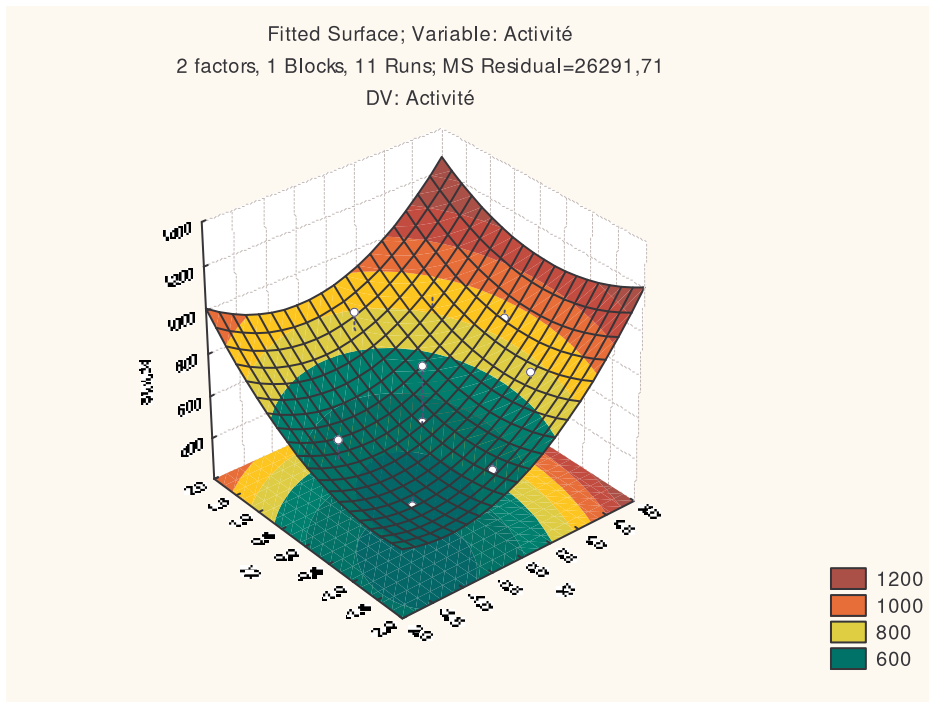


Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Biom (Souche_D.sta)		
Determinant: -,512561406367		
Factor	1	2
	0,543181	-0,943629
X1	0,404485	0,914545
X2	0,914545	-0,404485

Critical values; Variable: Biom (Souche_D.sta) Solution: saddlepoint Predicted value at solution: 17,18637			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,41400	-0,68994	1,414000
X2	-1,41400	-1,69456	1,414000

Effect Estimates; Var.:Activité; R-sqr=,5749; Adj:,1498 (Souche_D.sta) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=26291,71 DV: Activité										
Factor	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	561,4159	93,6157	5,997026	0,001850	320,769	802,0628	561,4159	93,61571	320,769	802,0628
(1)X1 (L)	232,3489	114,6640	2,026345	0,098569	-62,404	527,1022	116,1745	57,33201	-31,202	263,5511
X1 (Q)	135,9689	136,4951	0,996145	0,364914	-214,903	486,8406	67,9844	68,24753	-107,451	243,4203
(2)X2 (L)	137,9676	114,6640	1,203234	0,282744	-156,786	432,7209	68,9838	57,33201	-78,393	216,3604
X2 (Q)	83,3180	136,4951	0,610410	0,568267	-267,554	434,1897	41,6590	68,24753	-133,777	217,0949
1L by 2L	-52,6300	162,1472	-0,324582	0,758638	-469,443	364,1826	-26,3150	81,07359	-234,721	182,0913

ANOVA; Var.:Activité; R-sqr=,5749; Adj:,1498 (Souche_D.sta) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=26291,71 DV: Activité						
Factor		SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)		107955,7	1	107955,7	4,106075	0,098569
X1 (Q)		26089,4	1	26089,4	0,992305	0,364914
(2)X2 (L)		38064,4	1	38064,4	1,447771	0,282744
X2 (Q)		9796,3	1	9796,3	0,372601	0,568267
1L by 2L		2769,9	1	2769,9	0,105353	0,758638
Error		131458,5	5	26291,7		
Total SS		309240,2	10			





Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Activité (Souche_D.sta)		
Determinant: 2659,04375611		
Factor	1	2
	73,43293	36,21051
X1	0,92392	0,38259
X2	-0,38259	0,92392

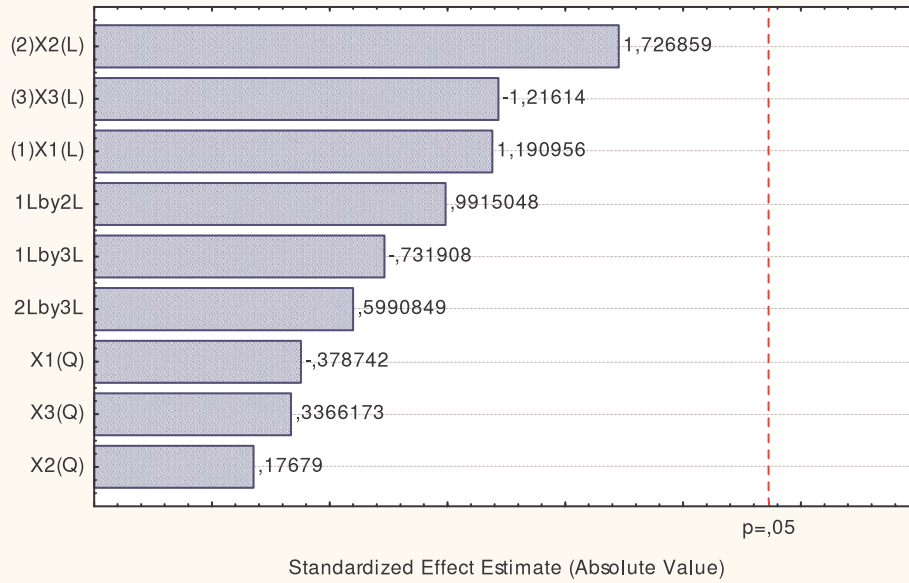
Critical values; Variable: Activité (Souche_D.sta)			
Solution: minimum			
Predicted value at solution: 458,3088			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,41400	-1,08072	1,414000
X2	-1,41400	-1,16929	1,414000

❖ Aspergillus tubingensis

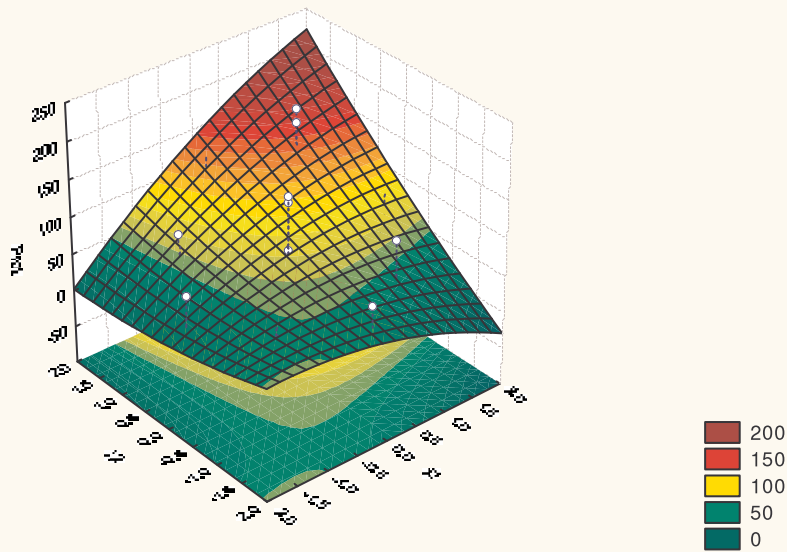
Effect Estimates; Var.:Prot; R-sqr=,53829; Adj:0, (Souche_E.sta)										
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=2891,115										
DV: Prot										
Factor	Effect	Std.Err.	t(7)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	74,4759	30,98336	2,40374	0,047206	1,212	147,7399	74,4759	30,98336	1,2119	147,7399
(1)X1 (L)	34,6546	29,09814	1,19096	0,272484	-34,152	103,4608	17,3273	14,54907	-17,0758	51,7304
X1 (Q)	-12,1286	32,02328	-0,37874	0,716105	-87,852	63,5944	-6,0643	16,01164	-43,9258	31,7972
(2)X2 (L)	50,2484	29,09814	1,72686	0,127834	-18,558	119,0545	25,1242	14,54907	-9,2789	59,5273
X2 (Q)	5,6614	32,02328	0,17679	0,864680	-70,062	81,3844	2,8307	16,01164	-35,0308	40,6922
(3)X3 (L)	-35,3875	29,09814	-1,21614	0,263345	-104,194	33,4187	-17,6937	14,54907	-52,0968	16,7093
X3 (Q)	10,7796	32,02328	0,33662	0,746272	-64,943	86,5026	5,3898	16,01164	-32,4717	43,2513
1L by 2L	37,6975	38,02049	0,99150	0,354467	-52,207	127,6017	18,8487	19,01025	-26,1033	63,8008
1L by 3L	-27,8275	38,02049	-0,73191	0,487999	-117,732	62,0767	-13,9138	19,01025	-58,8658	31,0383
2L by 3L	22,7775	38,02049	0,59908	0,567990	-67,127	112,6817	11,3887	19,01025	-33,5633	56,3408

ANOVA; Var.:Prot; R-sqr=,53829; Adj:0, (Souche_E.sta)					
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=2891,115					
DV: Prot					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	4100,69	1	4100,692	1,418377	0,272484
X1 (Q)	414,72	1	414,718	0,143446	0,716105
(2)X2 (L)	8621,43	1	8621,428	2,982042	0,127834
X2 (Q)	90,36	1	90,361	0,031255	0,864680
(3)X3 (L)	4275,96	1	4275,965	1,479002	0,263345
X3 (Q)	327,60	1	327,596	0,113311	0,746272
1L by 2L	2842,20	1	2842,203	0,983082	0,354467
1L by 3L	1548,74	1	1548,740	0,535689	0,487999
2L by 3L	1037,63	1	1037,629	0,358903	0,567990
Error	20237,81	7	2891,115		
Total SS	43832,63	16			

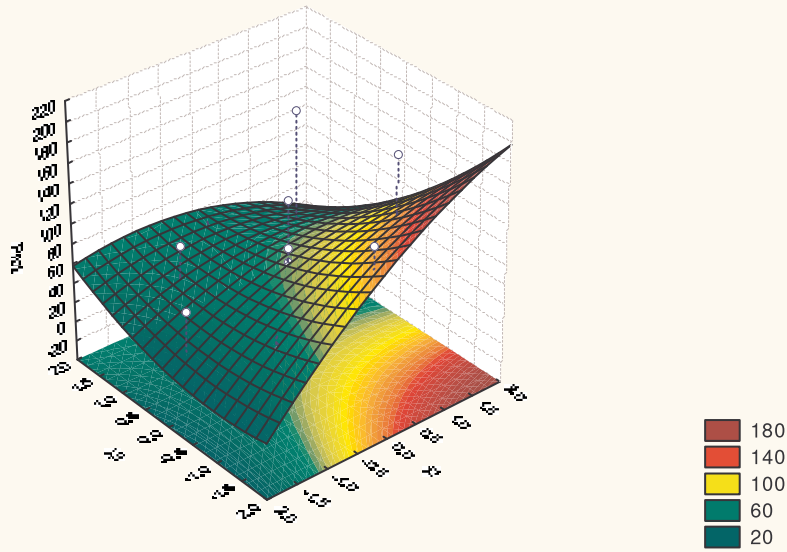
Pareto Chart of Standardized Effects; Variable: Prot  
 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=2891,115  
 DV: Prot



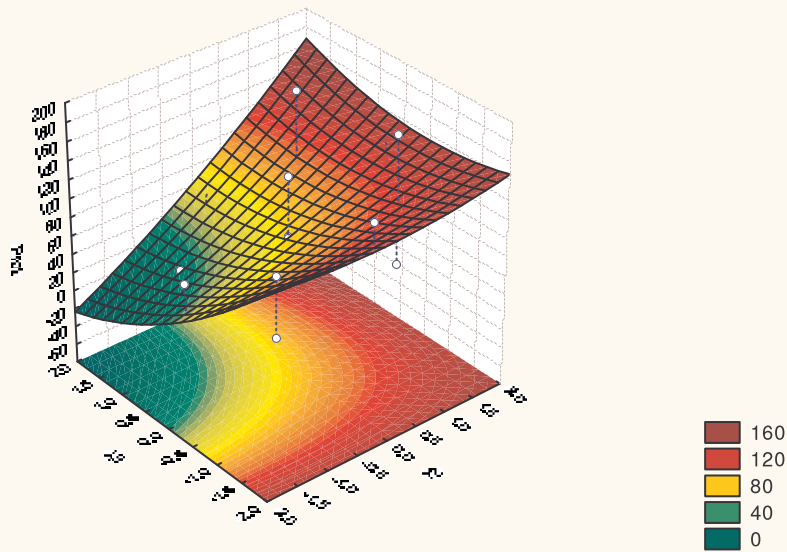
Fitted Surface; Variable: Prot  
 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=2891,115  
 DV: Prot



Fitted Surface; Variable: Prot  
 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=2891,115  
 DV: Prot



Fitted Surface; Variable: Prot  
 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=2891,115  
 DV: Prot



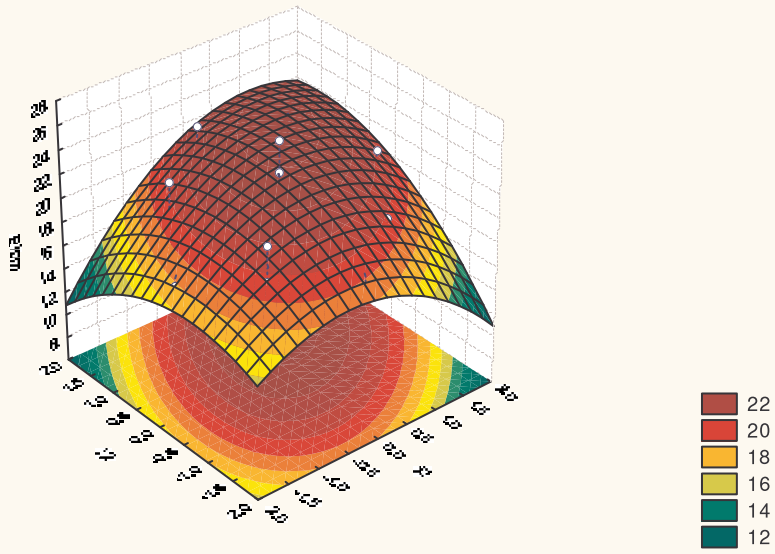
Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Prot (Souche_E.sta)			
Determinant: -1258,29206009			
Factor	1	2	3
	9,994330	7,966208	-15,8043
X1	0,103390	-0,630992	0,7689
X2	0,698718	-0,504077	-0,5076
X3	0,707887	0,589707	0,3888

Critical values; Variable: Prot (Souche_E.sta) Solution: saddlepoint Predicted value at solution: 37,59529			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,68200	-1,53660	1,682000
X2	-1,68200	-1,21381	1,682000
X3	-1,68200	0,94045	1,682000

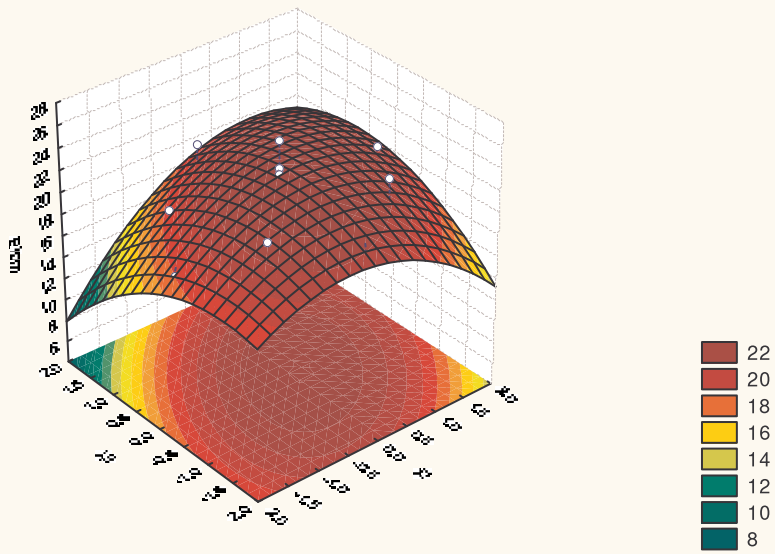
Effect Estimates; Var.:Biom; R-sqr=,67135; Adj:.,2488 (Souche_E.sta) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=4,191899 DV: Biom										
Factor	Effect	Std.Err.	t(7)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	22,90259	1,179780	19,41259	0,000000	20,11285	25,69233	22,90259	1,179780	20,11285	25,69233
(1)X1 (L)	1,55095	1,107995	1,39978	0,204305	-1,06905	4,17094	0,77547	0,553998	-0,53452	2,08547
X1 (Q)	-2,35601	1,219378	-1,93214	0,094624	-5,23938	0,52736	-1,17800	0,609689	-2,61969	0,26368
(2)X2 (L)	1,50438	1,107995	1,35775	0,216684	-1,11561	4,12437	0,75219	0,553998	-0,55781	2,06219
X2 (Q)	-1,71977	1,219378	-1,41036	0,201287	-4,60314	1,16360	-0,85988	0,609689	-2,30157	0,58180
(3)X3 (L)	-1,13947	1,107995	-1,02841	0,337976	-3,75947	1,48052	-0,56974	0,553998	-1,87973	0,74026
X3 (Q)	-1,86115	1,219378	-1,52631	0,170766	-4,74453	1,02222	-0,93058	0,609689	-2,37226	0,51111
1L by 2L	1,95000	1,447739	1,34693	0,219977	-1,47336	5,37336	0,97500	0,723870	-0,73668	2,68668
1L by 3L	1,95000	1,447739	1,34693	0,219977	-1,47336	5,37336	0,97500	0,723870	-0,73668	2,68668
2L by 3L	-1,15000	1,447739	-0,79434	0,453080	-4,57336	2,27336	-0,57500	0,723870	-2,28668	1,13668

ANOVA; Var.:Biom; R-sqr=,67135; Adj:.,2488 (Souche_E.sta) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=4,191899 DV: Biom					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	8,21350	1	8,21350	1,959374	0,204305
X1 (Q)	15,64902	1	15,64902	3,733159	0,094624
(2)X2 (L)	7,72770	1	7,72770	1,843485	0,216684
X2 (Q)	8,33823	1	8,33823	1,989129	0,201287
(3)X3 (L)	4,43346	1	4,43346	1,057626	0,337976
X3 (Q)	9,76560	1	9,76560	2,329636	0,170766
1L by 2L	7,60500	1	7,60500	1,814214	0,219977
1L by 3L	7,60500	1	7,60500	1,814214	0,219977
2L by 3L	2,64500	1	2,64500	0,630979	0,453080
Error	29,34329	7	4,19190		
Total SS	89,28471	16			

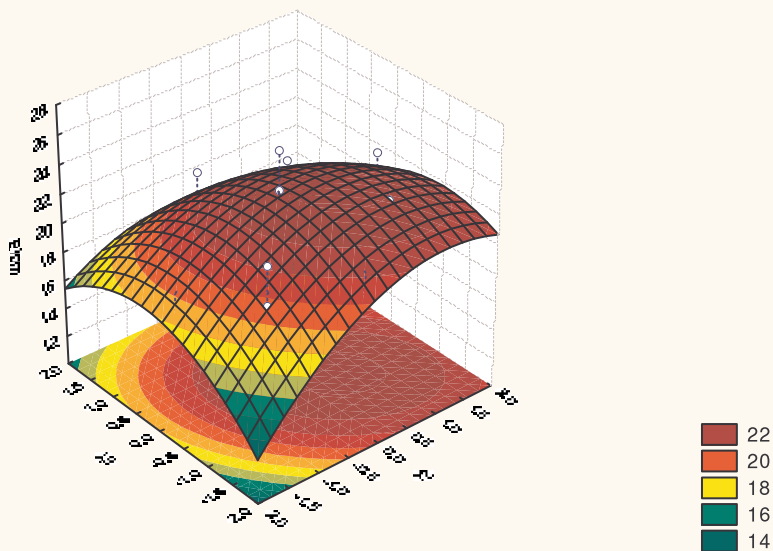
Fitted Surface; Variable: Biom  
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=4,191899  
DV: Biom



Fitted Surface; Variable: Biom  
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=4,191899  
DV: Biom



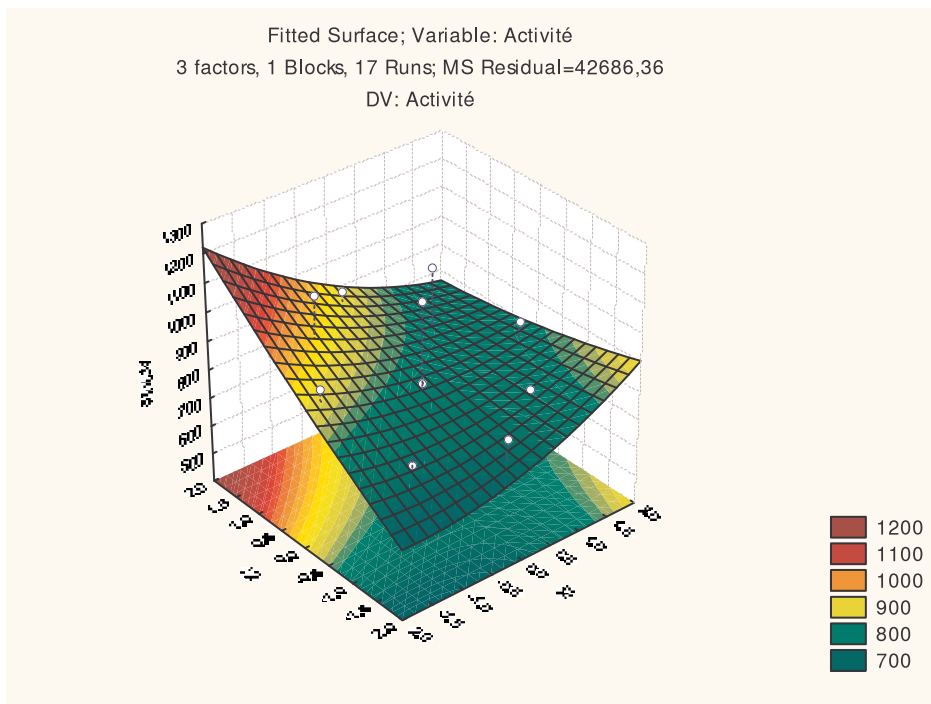
Fitted Surface; Variable: Biom  
 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=4,191899  
 DV: Biom



Critical values; Variable: Biom (Souche_E.sta)			
Solution: maximum			
Predicted value at solution: 23,52026			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,68200	0,569076	1,682000
X2	-1,68200	0,850541	1,682000
X3	-1,68200	-0,270772	1,682000

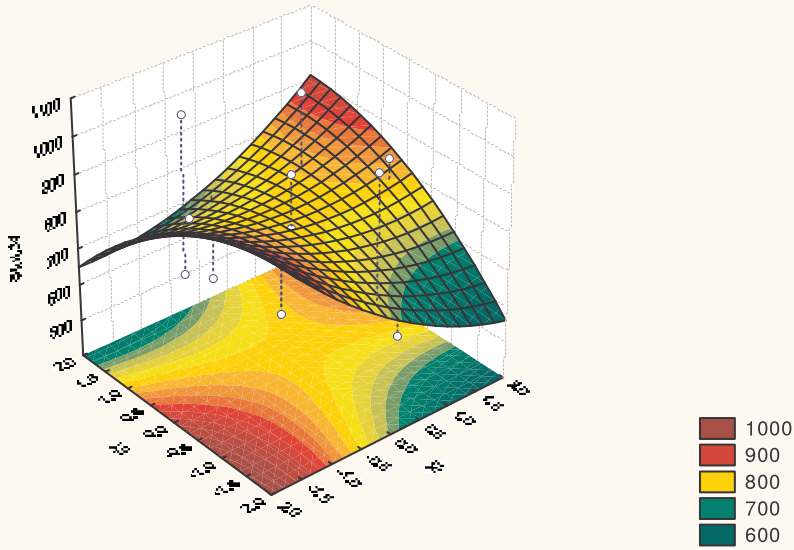
Effect Estimates; Var.:Activité; R-sqr=,36177; Adj:0, (Souche_E.sta)										
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=42686,36										
DV: Activité										
Factor	Effect	Std.Err.	t(7)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
Mean/Interc.	791,4814	119,0530	6,648143	0,000291	509,966	1072,997	791,4814	119,0530	509,966	1072,997
(1)X1 (L)	-48,9690	111,8091	-0,437970	0,674605	-313,355	215,417	-24,4845	55,9045	-156,678	107,709
X1 (Q)	35,8492	123,0489	0,291341	0,779234	-255,115	326,814	17,9246	61,5244	-127,558	163,407
(2)X2 (L)	108,4005	111,8091	0,969514	0,364587	-155,986	372,787	54,2003	55,9045	-77,993	186,393
X2 (Q)	10,6011	123,0489	0,086154	0,933757	-280,363	301,565	5,3006	61,5244	-140,182	150,783
(3)X3 (L)	-4,7676	111,8091	-0,042640	0,967179	-269,154	259,619	-2,3838	55,9045	-134,577	129,809
X3 (Q)	-39,8951	123,0489	-0,324221	0,755243	-330,859	251,069	-19,9475	61,5244	-165,430	125,535
1L by 2L	-89,2825	146,0930	-0,611134	0,560424	-434,738	256,173	-44,6413	73,0465	-217,369	128,086
1L by 3L	89,2825	146,0930	0,611134	0,560424	-256,173	434,738	44,6412	73,0465	-128,086	217,369
2L by 3L	196,4275	146,0930	1,344537	0,220710	-149,028	541,883	98,2137	73,0465	-74,514	270,941

ANOVA; Var.:Activité; R-sqr=,36177; Adj:0, (Souche_E.sta, 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=42686,36 DV: Activité					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	8188,0	1	8187,99	0,191817	0,674605
X1 (Q)	3623,2	1	3623,21	0,084880	0,779234
(2)X2 (L)	40123,4	1	40123,39	0,939958	0,364587
X2 (Q)	316,8	1	316,84	0,007422	0,933757
(3)X3 (L)	77,6	1	77,61	0,001818	0,967179
X3 (Q)	4487,2	1	4487,17	0,105119	0,755243
1L by 2L	15942,7	1	15942,73	0,373485	0,560424
1L by 3L	15942,7	1	15942,73	0,373485	0,560424
2L by 3L	77167,5	1	77167,53	1,807780	0,220710
Error	298804,5	7	42686,36		
Total SS	468177,1	16			

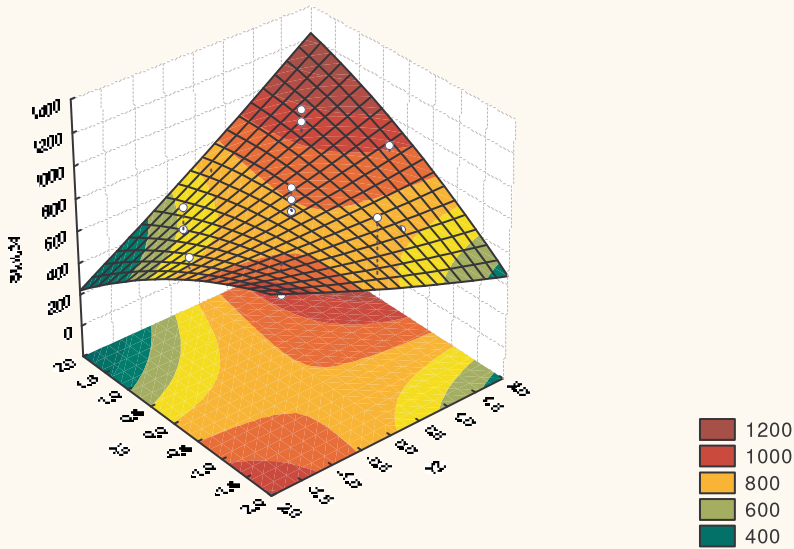




Fitted Surface; Variable: Activité  
 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=42686,36  
 DV: Activité



Fitted Surface; Variable: Activité  
 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=42686,36  
 DV: Activité



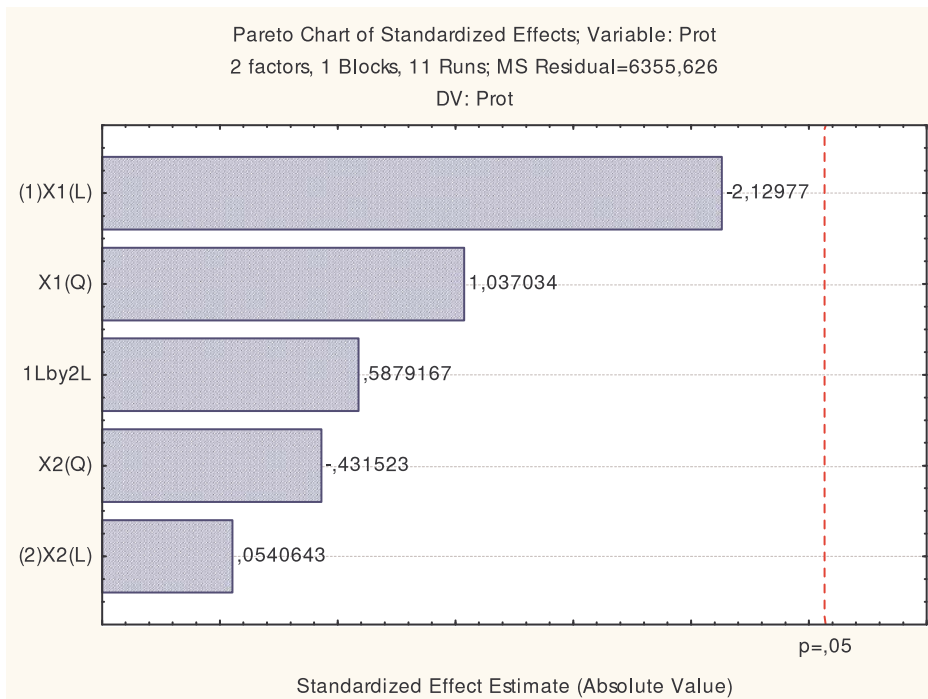
Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Activité (Souche_E.sta)			
Determinant: -86754,0002113			
Factor	1	2	3
	44,31362	28,25409	-69,2901
X1	0,22884	0,91275	-0,3384
X2	-0,81019	-0,01413	-0,5860
X3	-0,53965	0,40827	0,7363

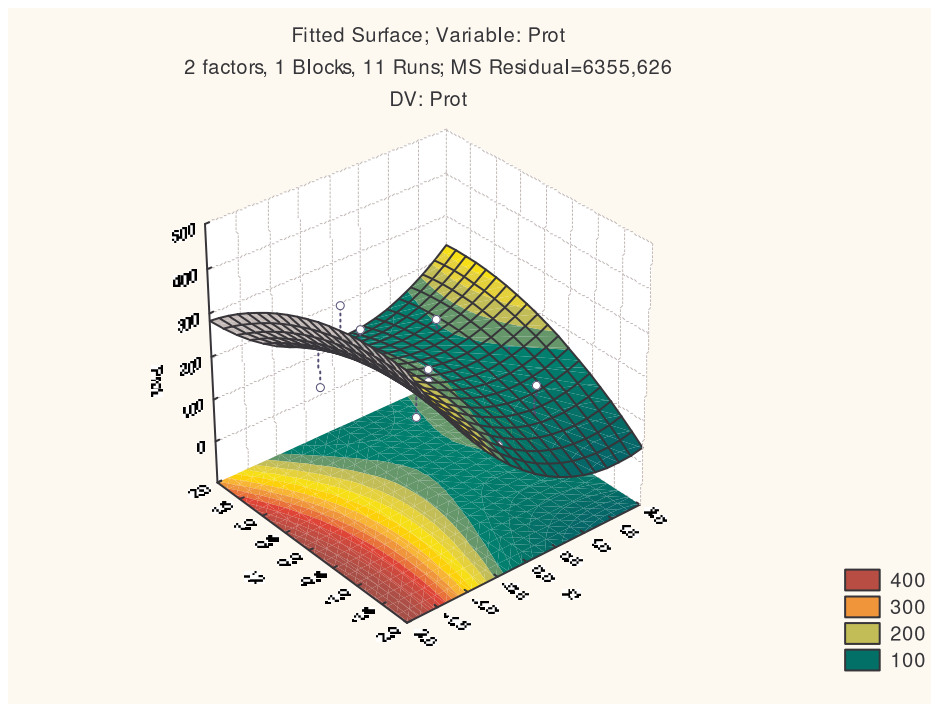
Critical values; Variable: Activité (Souche_E.sta) Solution: saddlepoint Predicted value at solution: 775,5216			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,68200	0,575214	1,682000
X2	-1,68200	-0,340229	1,682000
X3	-1,68200	-0,253683	1,682000

❖ *Aspergillus tamarii*

Effect Estimates; Var.:Prot; R-sqr=,56723; Adj:,13446 (Souche_F.sta) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=6355,626 DV: Prot										
Factor	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	172,449	46,02762	3,74665	0,013340	54,131	290,7670	172,4492	46,02762	54,131	290,7670
(1)X1 (L)	-120,069	56,37635	-2,12977	0,086429	-264,989	24,8513	-60,0343	28,18818	-132,494	12,4257
X1 (Q)	69,595	67,10992	1,03703	0,347246	-102,916	242,1068	34,7976	33,55496	-51,458	121,0534
(2)X2 (L)	3,048	56,37635	0,05406	0,958978	-141,872	147,9680	1,5240	28,18818	-70,936	73,9840
X2 (Q)	-28,959	67,10992	-0,43152	0,684061	-201,471	143,5521	-14,4797	33,55496	-100,736	71,7760
1L by 2L	46,870	79,72218	0,58792	0,582137	-158,062	251,8024	23,4350	39,86109	-79,031	125,9012

ANOVA; Var.:Prot; R-sqr=,56723; Adj:,13446 (Souche_F.sta) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=6355,626 DV: Prot					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	28828,63	1	28828,63	4,535923	0,086429
X1 (Q)	6835,09	1	6835,09	1,075440	0,347246
(2)X2 (L)	18,58	1	18,58	0,002923	0,958978
X2 (Q)	1183,49	1	1183,49	0,186212	0,684061
1L by 2L	2196,80	1	2196,80	0,345646	0,582137
Error	31778,13	5	6355,63		
Total SS	73429,73	10			



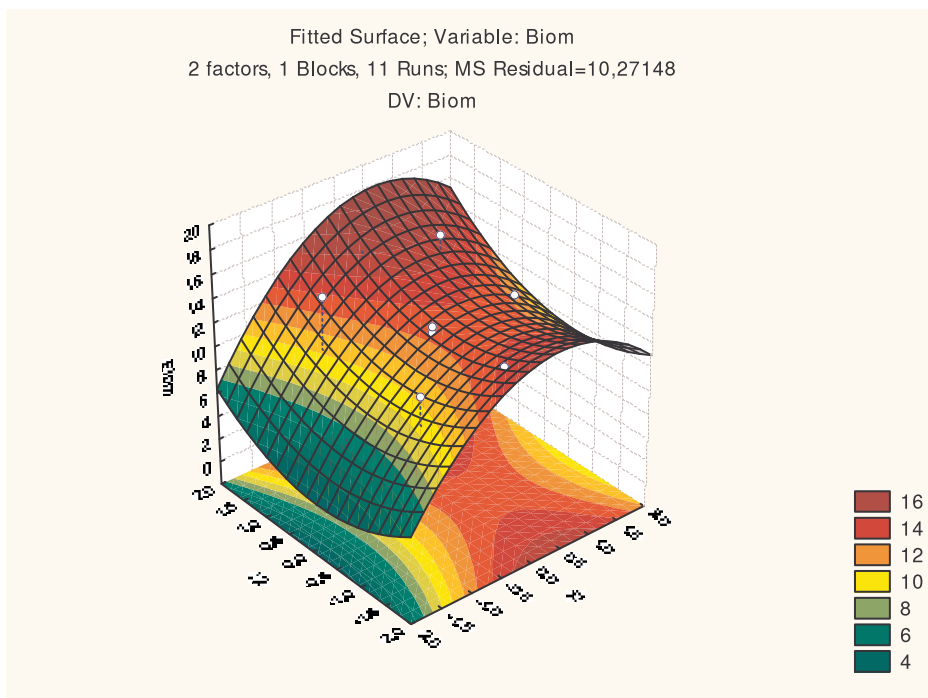
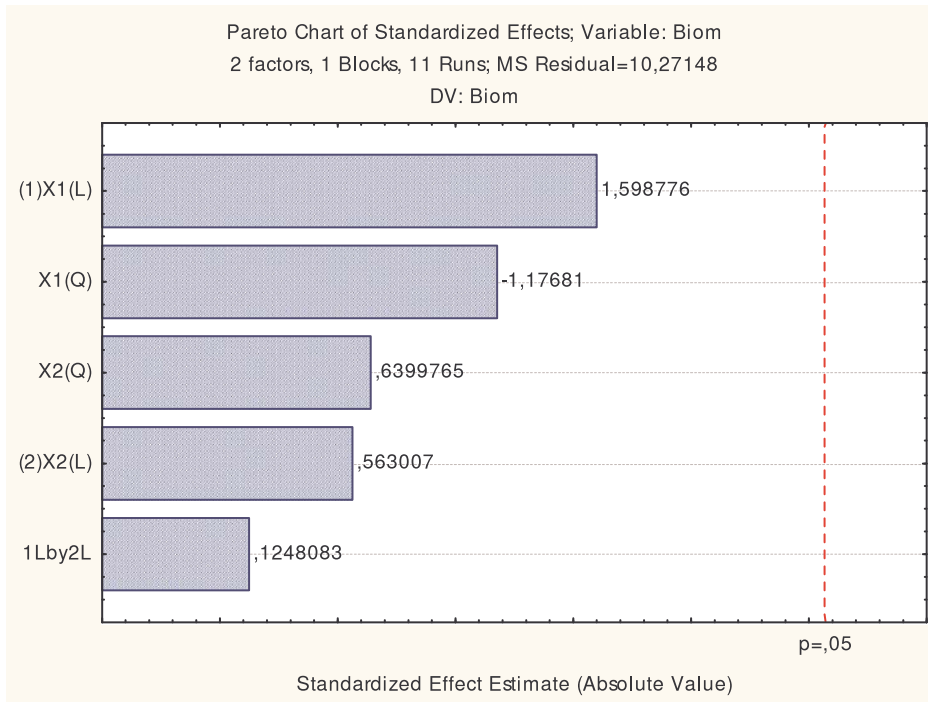


Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Prot (Souche_F.sta)		
Determinant: -641,160570415		
Factor	1	2
	37,44200	-17,1241
X1	0,97547	-0,2201
X2	0,22014	0,9755

Critical values; Variable: Prot (Souche_F.sta)			
Solution: saddlepoint			
Predicted value at solution: 152,9682			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,41400	0,663971	1,414000
X2	-1,41400	0,589933	1,414000

Effect Estimates; Var.:Biom; R-sqr=,51633; Adj:,.03265 (Souche_F.sta)											
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=10,27148											
DV: Biom											
Factor	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	
Mean/Interc.		12,39931	1,850359	6,70103	0,001120	7,6428	17,15580	12,39931	1,850359	7,64281	17,15580
(1)X1 (L)		3,62345	2,266389	1,59878	0,170764	-2,2025	9,44938	1,81172	1,133194	-1,10125	4,72469
X1 (Q)		-3,17489	2,697890	-1,17681	0,292239	-10,1100	3,76025	-1,58745	1,348945	-5,05502	1,88013
(2)X2 (L)		1,27599	2,266389	0,56301	0,597739	-4,5499	7,10193	0,63800	1,133194	-2,27497	3,55097
X2 (Q)		1,72659	2,697890	0,63998	0,550357	-5,2086	8,66173	0,86329	1,348945	-2,60428	4,33087
1L by 2L		0,40000	3,204916	0,12481	0,905538	-7,8385	8,63850	0,20000	1,602458	-3,91925	4,31925

ANOVA; Var.:Biom; R-sqr=,51633; Adj:,03265 (Souche_F.sta 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=10,27148 DV: Biom					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)X1 (L)	26,2548	1	26,25477	2,556084	0,170764
X1 (Q)	14,2247	1	14,22471	1,384874	0,292239
(2)X2 (L)	3,2558	1	3,25582	0,316977	0,597739
X2 (Q)	4,2069	1	4,20689	0,409570	0,550357
1L by 2L	0,1600	1	0,16000	0,015577	0,905538
Error	51,3574	5	10,27148		
Total SS	106,1818	10			



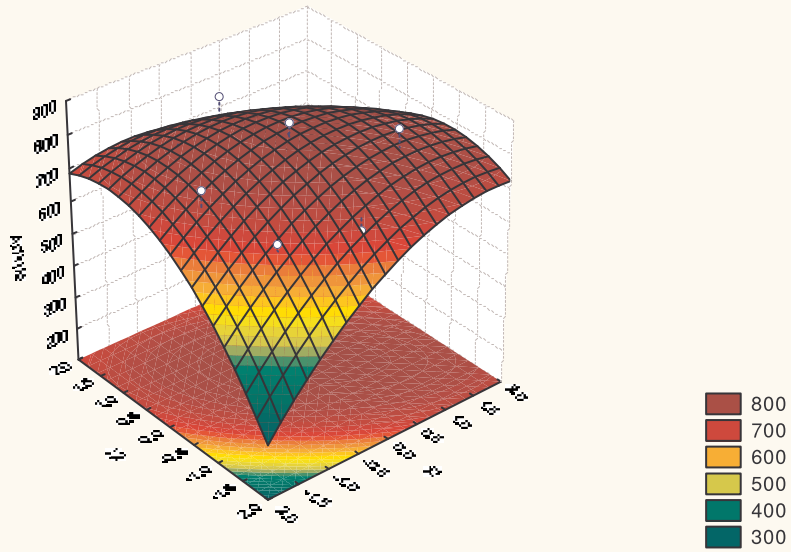
Eigenvalues and eigenvectors ; Variable: Biom (Souche_F.sta)		
Determinant: -1,38043200989		
Factor	1	2
	0,867367	-1,59152
X1	0,040703	0,99917
X2	0,999171	-0,04070

Critical values; Variable: Biom (Souche_F.sta)			
Solution: saddlepoint			
Predicted value at solution: 12,7536			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,41400	0,543398	1,414000
X2	-1,41400	-0,432458	1,414000

Effect Estimates; Var.:Activité; R-sqr=,57823; Adj:,15646 (Souche_F.sta)										
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=3992,768										
DV: Activité										
Factor	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	833,3289	36,48181	22,84231	0,000003	739,549	927,1084	833,3289	36,48181	739,549	927,1084
(1)X1 (L)	45,4619	44,68429	1,01740	0,355638	-69,403	160,3265	22,7309	22,34214	-34,701	80,1632
X1 (Q)	-66,2994	53,19179	-1,24642	0,267821	-203,033	70,4345	-33,1497	26,59590	-101,517	35,2173
(2)X2 (L)	25,4856	44,68429	0,57035	0,593114	-89,379	140,3503	12,7428	22,34214	-44,689	70,1751
X2 (Q)	-89,0312	53,19179	-1,67378	0,155030	-225,765	47,7026	-44,5156	26,59590	-112,883	23,8513
1L by 2L	-90,9100	63,18835	-1,43871	0,209758	-253,341	71,5208	-45,4550	31,59418	-126,670	35,7604

ANOVA; Var.:Activité; R-sqr=,57823; Adj:,15646 (Souche_F.sta)						
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=3992,768						
DV: Activité						
Factor	SS	df	MS	F	p	
(1)X1 (L)	4132,94	1	4132,94	1,035106	0,355638	
X1 (Q)	6203,02	1	6203,02	1,553565	0,267821	
(2)X2 (L)	1298,84	1	1298,84	0,325298	0,593114	
X2 (Q)	11185,86	1	11185,86	2,801531	0,155030	
1L by 2L	8264,63	1	8264,63	2,069899	0,209758	
Error	19963,84	5	3992,77			
Total SS	47333,20	10				

Fitted Surface; Variable: Activité  
 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=3992,768  
 DV: Activité



Critical values; Variable: Activité (Souche_F.sta)			
Solution: maximum			
Predicted value at solution: 837,2954			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
X1	-1,41400	0,376519	1,414000
X2	-1,41400	-0,049105	1,414000

# *Résumés*



## ملخص

سنة سلالات من الفطريات المعزولة من التربة الجزائرية، خمسة من جنس أسبرجلوس و واحدة من جنس البنسليوم تستخدم لإنتاج بروتياز التخثر. و هي *A. niger* ، *A. flavus* ، *A. awamori* ، *A. tubingensis* ، *A. tamaris* و *P. pinophilum*. و قد تم إنتاج الانزيمات عن طريق التخمر على مصّل اللبن على مرحلتين باستخدام تصميمين تجريبيين. تم استخدام أول تصميم ل Plackett et Burman مكون من 11 عاملا و 12 تجربة لتحديد العوامل ذات الأثر الإيجابي والمهم على إنتاج الإنزيمات البروتينية. العوامل، 7 حقيقية [الرقم الهيدروجيني، والإثارة، خلاصة الخميرة، اللاكتوز، بيتون،  $CaCl_2$  وأملاح  $(MgSO_4)$  والحديد  $(FeSO_4)$ ] وأربعة أخطاء. أعطى صندوق التصميم الثاني Box et Wilson العوامل المثلى فاختر عدددهم يختلف من سلالة إلى أخرى. أظهرت النتائج أن كل السلالات الستة قادرة على إنتاج البروتياز خارج الخلية و قادرة على تخثير الحليب بأنشطة هامة (بين 1822U. 2583 U) وتنقيت الانزيمات تتم في ثلاث خطوات: الترشيح الجزيئي على G25 Sephadex ، التبادل الأيوني اللوني على DEAE-sepharose و تقارب اللوني على pepstatin A-الاعاروز. و هذه الأخيرة تلغي أكثر من 92% من البروتين غير نشطة مع عوامل تنقية بين 2 و 6.19. أعطى فصل الانزيمات النقية بواسطة SDS-PAGE الوزن الجزيئي للحمض الأنزيم البروتيني من كل سلالة: 30 كيلو دالتون ل *P. pinophilum* ، 35 كيلو دالتون ل *A. flavus* و *A. tamaris* و 55 كيلو دالتون ل *A. niger* ، *A. awamori* و *A. tubingensis*. وقد سمحت دراسة خواص كل انزيم من تحديد درجة الحموضة المثلى فهي تتراوح بين 4 و 5.5 درجة وكذلك الحرارة المثلى و هي تتراوح بين 30 و 50 درجة مئوية. جميع الانزيمات مستقرة في حوالي 1 ساعة في درجة حرارة النشاط الأمثل. اختبار التخثر في ثلاثة أنواع مختلفة من الحليب في درجة حرارة 35 درجة مئوية ويلاحظ لكل سلالة بعد كل خطوة تنقية. مظهر ولمس كتلة الحليب بعد التخثر مختلفين حسب مصدر البروتياز المستعمل فجميع الانزيمات تسبب تجلط الحليب سريعا و في وقت قصير جدا: 2 دقيقة لانزيم *tamaris* و 5 دقائق لجميع الإنزيمات الأخرى.

الكلمات المفتاحية: فطريات أسبارجلوس، البنسليوم، والنمذجة الأمثل، البروتياز، التخثير.

## Summary

Six strains of fungi isolated from Algerian soil, five of the genus *Aspergillus* and one of the genus *Penicillium* are identified and are used to produce clotting proteases: *A. Niger*, *A. flavus*, *A. awamori*, *A. tubingensis*, *A. tamaritii* and *P. pinophilum*. Enzymes are synthesized by fermentation of whey-based media enriched and optimized in two phases by using two experimental designs. The first plan Plackett-Burman (11 factors and 12 experiments) was used to select factors with a positive and significant effect on the production of proteases. 7 factors are real [pH, agitation, yeast extract, lactose, peptone, CaCl<sub>2</sub> and salts (MgSO<sub>4</sub> and Fe SO<sub>4</sub>)] and four errors. The second plan, Box and Wilson gave the optimum factors selected whose number varies from one strain to another. The optimization showed that each strain is able to produce an extracellular acid protease and coagulating milk with important activities (between 1822.21 U. and 2583.83 U.). The enzymes are then purified in three steps: molecular filtration on Sephadex G25, ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose and affinity chromatography on pepstatin A-agarose. The latter has eliminated up to 92% of non-active protein with purification factors between 2.84 and 6.19. The separation of the purified enzymes by SDS-PAGE showed molecular weight of the acid protease from each strain: 30 kDa for *P. pinophilum*, 35 kDa for *A. flavus* and *A. tamaritii* and 55 kDa for *A. Niger*, *A. awamori* and *A. tubingensis*. The study of the properties has allowed the determination of an optimum pH of between 4 and 5.5 and a temperature optimum between 30 and 50°C. All enzymes are stable 1 h at the temperature of optimum activity. Coagulation tests are performed on three different milks at 35 ° C after each purification step. The coagulation time, the appearance and texture of curdled are different depending on the origin of the protease. All enzymes cause a very rapid coagulation of fresh cow's milk in a very short time: 2 min. for the *A. tamaritii* enzyme and 5 min for all other enzymes.

**Keywords:** Fungi, *Aspergillus*, *Penicillium*, modeling and optimization, proteinases and coagulation.

**BENLOUNISSI Aïcha**

Laboratoire de Biologie de l'Environnement  
Département de Biochimie-Microbiologie  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

**Titre :** Isolement des moisissures productrices de protéases coagulantes. Production et purification des enzymes et étude de leur effet sur la coagulation des laits.

### **Résumé**

Six souches de moisissures isolées à partir du sol algérien, cinq du genre *Aspergillus* et une du genre *Penicillium* sont identifiées puis sont utilisées pour produire des protéases coagulantes. Il s'agit de *A. Niger*, *A. flavus*, *A. awamori*, *A. tubingensis*, et *A. tamaritii* et *P. pinophilum*. Les enzymes sont synthétisées par fermentation de milieux à base de lactosérum enrichis et optimisés en deux phases par l'utilisation de deux plans d'expériences. Le premier, le plan de Plackett-Burman à 11 facteurs et 12 expériences a permis de sélectionner les facteurs ayant un effet positif et significatif sur la production des protéases. Parmi les facteurs, 7 sont réels [pH, agitation, extrait de levure, lactose, peptone, CaCl<sub>2</sub> et sels (MgSO<sub>4</sub> et Fe SO<sub>4</sub>)] et quatre sont des erreurs. Le deuxième, le plan de Box et Wilson a donné les optima des facteurs sélectionnés dont le nombre varie d'une souche à l'autre. Les résultats de l'optimisation ont montré que chacune des six souches est capable de produire une protéase acide exocellulaire capable de coaguler le lait avec d'importantes activités (comprises entre 1822,21 U. et 2583,83 U.). Les enzymes sont ensuite purifiées en trois étapes : filtration moléculaire sur Séphadex G25, chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-Sepharose et chromatographie d'affinité sur pepstatine-A agarose. Cette dernière a permis d'éliminer jusqu'à 92 % des protéines non actives avec des facteurs de purification compris entre 2,84 et 6,19. La séparation des enzymes purifiées par électrophorèse SDS-PAGE a donné le poids moléculaire de la protéase acide de chaque souche: 30 kDa pour *P. pinophilum* ; 35 kDa pour *A. flavus* et *A. tamaritii* et 55 kDa pour *A. niger*, *A. awamori* et *A. tubingensis*. L'étude des propriétés a permis la détermination d'un pH optimal compris entre 4 et 5,5 et une température optimale entre 30 et 50°C. Toutes les enzymes sont stables environ 1 h à leur température d'activité optimale. Les tests de coagulation de trois laits différents à 35°C sont observés pour chaque souche après chaque étape de purification. Les temps de coagulation, l'aspect et la texture des caillés différents selon l'origine de la protéase. Toutes les enzymes entraînent une coagulation très rapide du lait de vache frais en des temps très courts : 2 min. pour l'enzyme d'*A. tamaritii* et 5 min pour toutes les autres enzymes, soit des temps inférieurs à ceux obtenus avec la présure.

**Mots-clés :** Moisissures, *Aspergillus*, *Penicillium*, optimisation et modélisation, protéases et coagulation.