

République Algérienne Démocratique et Populaire



**Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie**

**جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة
والحياة**



DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

LABDI Radhia

Et

BOULANOUAR Malika

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème :

**Analyse des facteurs influençant la production de protéase par des
Aspergillus marins.**

Soutenu le 21/06/2026.

Devant le Jury composé de :

Présidente	Mme.Sidhoum Warda	MCA	U.Mostaganem
Encadrant	Mr.Djibaoui Rachid	Pr	U.Mostaganem
Examinatrice	Mme.Benguenab Asma	MCB	U.Mostaganem

Année universitaire 2025/2026.

Remerciements

Nos premiers remerciements sont adressés à Allah, le Très-Haut, pour nous avoir accordé la force, le courage et la persévérance nécessaires afin de surmonter les difficultés rencontrées et mener ce projet à son terme.

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات

*Nous exprimons notre profonde reconnaissance à Monsieur **Djibaoui Rachid**, qui a accepté de diriger ce mémoire. Son accompagnement rigoureux, son esprit scientifique, sa confiance et ses encouragements permanents ont constitué une source de motivation tout au long de cette étude. Nous lui sommes infiniment reconnaissants pour le temps qu'il nous a consacré et pour la qualité de son encadrement.*

*Nous avons également l'honneur de remercier les membres du jury, Madame **Sidhoum Warda** et Madame **Benguenab Asma**, qui ont accepté d'examiner ce travail. Nous leur sommes reconnaissants pour l'intérêt porté à cette étude et pour les remarques constructives qui contribueront à son amélioration.*

*Notre gratitude s'étend à Monsieur **Hamoum Hakim** et **Arabi Abed**, dont la disponibilité, les orientations pertinentes et les précieux conseils ont été d'un apport considérable durant l'élaboration de ce mémoire.*

*Nous adressons aussi nos sincères remerciements à Madame **T. Amina**, responsable du laboratoire, pour son accueil, son aide précieuse et les conditions de travail favorables qu'elle a mises à notre disposition. Son soutien a joué un rôle important dans la réalisation de nos travaux expérimentaux.*

Nous souhaitons également saluer tous les enseignants qui ont participé à notre formation universitaire. Grâce à leur savoir, leur engagement et leur passion pour la transmission des connaissances, ils ont contribué à façonner notre parcours académique.

Enfin, nous adressons une pensée reconnaissante à toutes les personnes qui ont contribué, même modestement, à la concrétisation de ce mémoire. Qu'elles trouvent ici l'expression de notre profonde estime et de notre sincère gratitude.

Dédicace

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux.

Je dédie ce modeste travail, fruit de plusieurs années d'efforts, de patience et de persévérance, à ceux qui occupent une place irremplaçable dans mon cœur.

À mon très cher père, Tahar,

Aucun mot ne saurait exprimer toute ma gratitude pour les sacrifices consentis, les conseils prodigués et le soutien constant que tu m'as accordés tout au long de mon parcours. Que Dieu te préserve et te récompense pour tout ce que tu as fait pour moi.

À ma très chère mère, Khetra Nehmar,

Toi qui as toujours été une source d'amour, de tendresse et de courage. Merci pour tes prières, ta patience et ton dévouement sans limite. Que Dieu te comble de bonheur, de santé et de sérénité.

À ma chère sœur, Rania,

Pour son affection, son soutien et ses encouragements qui m'ont accompagnée durant toutes ces années. Je lui souhaite une vie pleine de réussite et de bonheur.

À mon cher frère, Riyad,

Pour sa présence, son soutien et sa bienveillance. Puisse Allah lui accorder succès, santé et prospérité.

À ma chère binôme Malika,

En témoignage de notre collaboration, des efforts partagés et des moments que nous avons vécus ensemble durant la réalisation de ce mémoire.

À mes chères amies,

Pour leur amitié sincère, leur soutien et tous les souvenirs inoubliables que nous avons partagés.

Enfin, je dédie ce travail à toutes les personnes qui me sont chères et qui ont contribué, de près ou de loin, à ma réussite.

Avec tout mon amour, mon respect et ma profonde reconnaissance.

Radhia

Dédicace

Je dédie ce travail :

À ma mère Nadia.

Pour son encouragement et son appui constant durant mes études.

À mon père Ahmed

En reconnaissance de son soutien et de son accompagnement tout au long de mon parcours universitaire.

À mes sœurs Roumaïssa et Hafssa.

À mes frères Mohammed, Abdeljalil et Hamza.

Pour leur soutien et leurs encouragements.

À ma binôme Radhia.

En souvenir des efforts partagés et de notre collaboration dans la réalisation de ce mémoire.

À mes enseignants,

Pour les connaissances et les orientations qu'ils m'ont apportées.

Enfin, à mes camarades de la promotion de Master en Microbiologie appliquée, en souvenir des années d'études, des échanges et des moments partagés tout au long de notre formation.

À toutes les personnes ayant contribué, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Avec mes sincères remerciements et ma considération.

Malika

المخلص

تمثل الفطريات الأندوفيتية للطحالب البحرية مورداً واعداداً لإنتاج الإنزيمات المحللة ذات الأهمية الصناعية. هدفت هذه الدراسة إلى تحليل العوامل المؤثرة في إنتاج البروتياز خارج الخلوي بواسطة فطريات معزولة من الطحالب البحرية التي جُمعت من شاطئ السلامندر وسيدي لخضر بولاية مستغانم.

تم اتباع منهجية شملت عزل الفطر وتنقيته، بالإضافة إلى التعرف عليه اعتماداً على الخصائص العيانية والمجهريّة. وقد أتاح التحري النوعي للنشاط البروتيني على وسط الأغار المحتوي على الحليب منزوع الدسم اختيار العزلة ذات أعلى نشاط بروتيني، والتي تم التعرف عليها على أنها *Aspergillus terreus*. بعد ذلك، تم تنمية هذا النوع تحت ظروف التخمير المغمور لتقييم قدرته على إفراز بروتياز خارج خلوي. وتم استرجاع المستخلص الإنزيمي الخام بعد فترة من الحضانة مع التحريك، وذلك بواسطة الترشيح متبوعاً بالطرد المركزي.

تم تقييم تأثير مختلف عوامل الزراعة، بما في ذلك الأس الهيدروجيني (pH) ودرجة الحرارة ومدة التحضين ومصدر الكربون على إنتاج البروتياز. كما تم قياس النشاط الإنزيمي تحت كل شرط تجريبي. وأظهرت النتائج تسجيل أعلى نشاط للبروتياز بلغ 88.018 وحدة/مل (U/mL) تحت الظروف المثلى التالية: أس هيدروجيني 8، ودرجة حرارة 28 °م، ومدة حضانة قدرها 5 أيام، مع استخدام الجلوكوز كمصدر للكربون.

في الختام، أظهرت سلالة *Aspergillus terreus* ذات الأصل البحري والمعزولة في هذه الدراسة إمكانات بيوتكنولوجية واعدة لإنتاج البروتياز. كما أن تحسين عوامل الإنتاج يُعد أمراً أساسياً لزيادة مردودية الإنزيم وتعزيز إمكانيات تطبيقه على المستوى الصناعي.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الأندوفيتية ، الطحالب البحرية، البروتياز خارج الخلوي، *Aspergillus terreus*، الأس الهيدروجيني، درجة الحرارة، مدة التحضين ، مصدر الكربون، التخمير المغمور.

Résumé

Les champignons endophytes des algues marines représentent une ressource prometteuse pour la production d'enzymes hydrolytiques à intérêt industriel. La présente étude vise à analyser les facteurs influençant la production d'une protéase extracellulaire par des champignons isolés à partir d'algues marines collectées sur les plages de Salamandre et de Sidi Lakhdar, dans la wilaya de Mostaganem.

Une approche méthodologique a été menée, incluant l'isolement du champignon, sa purification, ainsi qu'une identification macroscopique et microscopique. Un criblage qualitatif de l'activité protéolytique sur gélose au lait écrémé a permis de sélectionner l'isolat présentant la meilleure activité protéolytique, identifiée comme *Aspergillus terreus*. Cette espèce a ensuite été cultivée en fermentation liquide afin d'évaluer sa capacité à sécréter une protéase extracellulaire. L'enzyme brute a été récupérée après une période d'incubation sous agitation, par filtration puis centrifugation.

L'influence de différents paramètres de culture (pH, température, durée d'incubation et source de carbone) sur la production de la protéase a été évaluée. L'activité enzymatique a été mesurée dans chacune de ces conditions. Les résultats obtenus montrent une activité maximale de 88,018 U/mL, atteinte dans les conditions optimales suivantes : pH 8, température de 28 °C, durée d'incubation de 5 jours et glucose comme source de carbone.

En conclusion, la souche *Aspergillus terreus* d'origine marine isolée dans ce travail présente un potentiel biotechnologique réel pour la production de la protéase. L'optimisation des facteurs de production apparaît essentielle pour améliorer cette productivité en vue d'une application industrielle.

Mots clés : Champignons endophytes, Algues marines, Protéase extracellulaire, *Aspergillus terreus*, pH, température, durée d'incubation, source de carbone, Fermentation.

Abstract

Endophytic fungi associated with marine algae represent a promising resource for the production of hydrolytic enzymes of industrial interest. The present study aimed to investigate the factors affecting the production of an extracellular protease by fungal isolates obtained from marine algae collected from the beaches of Salamandre and Sidi Lakhdar in the Mostaganem province.

A methodological approach was carried out, including fungal isolation, purification, and both macroscopic and microscopic identification. Qualitative screening of proteolytic activity on skim milk agar enabled the selection of the isolate exhibiting the highest proteolytic activity, which was identified as *Aspergillus terreus*. This species was subsequently cultivated under submerged fermentation conditions to evaluate its ability to secrete an extracellular protease. The crude enzyme extract was recovered after an incubation period under agitation through filtration followed by centrifugation.

The influence of different culture parameters, including pH, temperature, incubation time, and carbon source, on protease production was evaluated. Enzymatic activity was determined under each experimental condition. The results revealed a maximum protease activity of 88.018 U/mL under the following optimal conditions: pH 8, temperature of 28 °C, incubation period of 5 days, and glucose as the carbon source.

In conclusion, the marine-derived *Aspergillus terreus* strain isolated in this study demonstrates significant biotechnological potential for protease production. Optimization of production parameters appears essential for enhancing enzyme yield and promoting its potential industrial applications.

Keywords: Endophytic fungi, Marine algae, Extracellular protease, *Aspergillus terreus*, pH, Temperature, Incubation time, Carbon source, Fermentation.

Table des matières

Remerciement

Dédicace

المخلص

Résumé

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Partie 1 : Etude bibliographique.

Chapitre 1 : Classification des protéases.

1.Classification des protéases.....	5
1.1.Selon le site d'action enzymatique.....	5
1.2.Selon la nature du résidu catalytique impliqué dans le site actif.....	6
1.3. En fonction du pH d'activité.....	7
1.4.Selon la localisation cellulaire.....	7
1.5.Selon leur besoin en ATP	7

Chapitre 2: Protéase fongique.

1.les protéases des champignons.....	9
2.Protéase produites par les espèces marines du genre Aspergillus.....	11
2.1.Les protéases acides	11
2.2.Les protéases neutres	11
2.3.Les protéases alcalines.....	12

Chapitre 3 : Facteurs influençant la production des protéases

1.Facteurs influençant la production des protéases	14
2.Facteurs physico-chimiques	14
2.1.PH	14
2.2.Température	15
2.3.Salinité	15
2.4.Influence de l'oxygénation.....	16
3.Facteurs nutritionnels	16
3.1.Source de carbone	16
3.2.Source d'azote.....	17
3.3.Autres nutriments	18
4.Facteurs génétiques	18

Chapitre 4 : Applications industrielles des protéases

1.Applications industrielles des protéases.....	20
2.Protéases alcalines	20
2.1.Industries de détergents	20
2.2.Industrie du cuir	21
2.3.Application dans l'industrie alimentaire	21
2.4.Attendrissement de la viande	21
2.5.Solubilisation de la viande	21
2.6.Produits à base de soja	22
3.Protéases neutres	22
3.1.Application en panification et biscuiterie	23
3.2.Application à la tendérisation de la viande	23

4.Protéases acides	23
4.1.Applications dans l'industrie alimentaire	23
4.2. Application dans l'industrie de boissons.....	24

Partie 2 : Partie expérimentale.

Matériel et Méthodes

1.Introduction	26
2. Présentation de la zone d'étude.....	26
3.Matériel	28
3.1.Matériel non biologiques	28
3.2.Matériel biologiques.....	28
4.Préparation des milieux de cultures	29
4.1.Gélose Sabouraud au chloramphénicol à base de l'eau de mer	29
4.2.Gélose au lait écrimé.....	29
4.3.Gélose au lait écrimé enrichi.....	29
4.4.Milieu de fermentation liquide (yeast extract casein medium).....	30
5.Isolement des champignons endophytes associés aux algues marines..	30
6.Purification des isolats	31
7.Identification des champignons isolés.....	31
7.1.Identification macroscopique	32
7.2.Identification microscopique.....	32
8.Production de protéase	32
8.1.Screening des champignons producteur des protéases	32
8.2.Fermentation liquide	32
8.3.Analyse des facteurs influence la production de la protéase.....	33

8.4.Mesure de l'activité enzymatique	33
--	----

8.5.Établissement de la courbe d'étalonnage de la tyrosine	34
--	----

Résultats et discussion

1.Identification des isolats fongiques marins.....	36
--	----

2.Test d'activité protéolytique	42
---------------------------------------	----

3.Production de protéase en milieu liquide	46
--	----

4.Mesure de l'activité enzymatique.....	48
---	----

Conclusion générale.....	54
---------------------------------	-----------

Les références bibliographiques.....	56
---	-----------

Les Annexes

Listes des figures

Figure 1 : Vue par satellite le site d'échantillonnage « plage de Salamandre » (Google earth, 2026).....	27
Figure 2 : Vue par satellite le site d'échantillonnage « plage de Diancy Sidi Lakhdar » (Google earth, 2026).....	28
Figure 3 : Aspect microscopique de quelques isolats fongiques.....	40
Figure 4: Croissance mycélienne en milieu de fermentation.....	46
Figure 5: L'enzyme brute après centrifugation.....	47
Figure 6: Courbe d'étalonnage de la tyrosine à 660 nm (Merzouk et Akkouda.,2025).....	49

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des protéases.....	6
Tableau 2: Des isolats fongiques marins isolées à partir des algues.....	37
Tableau 3 : Résultats de criblage primaire sur deux milieux de gélose au lait écrémé non enrichie et gélose au lait écrémé enrichie.....	42
Tableau 4: Diamètre des zones de protéolyse (en mm).....	44
Tableau 5 : Les absorbances obtenues pour chaque paramètre.....	48
Tableau 6 : Les absorbances obtenues pour chaque dilution.....	49
Tableau 7: Concentration en tyrosine et activités enzymatiques obtenues sous les différentes conditions expérimentales étudiées (Merzouk et Akkouda.,2025).....	50

Liste des abréviations

pH : Potentiel Hydrogène.

EC : Enzyme Commission.

ATP : Adénosine triphosphate

FMS : Fermentation en milieu solide.

FML : Fermentation en milieu liquide.

A : *Aspergillus*.

P : *Penicillium*.

M : *Mucor*.

°C : Degré Celsius

ATAP : *Aspergillus tubingensis* acid protease.

PMSF : Phénylméthylsulfonyl Fluoride.

U/g : Unité enzymatique/gramme.

Aw : Activité de l'eau.

NCR : Répression catabolique par l'azote.

GRAS : Generally Recognized As Safe.

Psi : Pounds per Square Inch.

tr/min : Tours par minute.

p/v : Poids /volume.

UV : Ultraviolet.

TCA : Acide trichloracétique.

ITS : Espaceur transcrit interne.

DO : Densité optique.

Introduction générale

Introduction

L'environnement marin, qui couvre plus de 70 % de la surface terrestre, est caractérisé par des conditions physico-chimiques extrêmes et très variables : températures basses dans les zones profondes, pressions hydrostatiques élevées, salinité importante (environ 35 g/L), variations de pH, et parfois une faible disponibilité en nutriments (Rampelotto,2013). Ces conditions contraignantes ont conduit les micro-organismes marins à développer des mécanismes d'adaptation uniques, notamment la production d'enzymes aux dotées de propriétés particulières (halostabilité, thermostabilité, psychrotolérance) (Trincone,2011). Ainsi, les mers représentent un réservoir exceptionnel de biodiversité microbienne et de biomolécules aux potentiels biotechnologiques encore largement inexplorés (Dalmaso *et al.*,2015).

Parmi les micro-organismes marins, les champignons ont longtemps été négligés au profit des bactéries. Cependant, on sait aujourd'hui qu'ils sont omniprésents dans les écosystèmes marins : sédiments, eau de mer, éponges, algues, mangroves, etc. (Jones,2011). Les champignons marins, incluant des espèces du genre *Aspergillus*, sont capables de produire une large gamme d'enzymes extracellulaires (protéases, lipases, cellulases, amylases) et de métabolites secondaires bioactifs (Ibrahim *et al.*,2023). Leur intérêt industriel réside dans leur robustesse physiologique : ils tolèrent des concentrations salines élevées, des pH variés et des températures modérées ou basses, tout en présentant des rendements enzymatiques souvent supérieurs à ceux de leurs homologues terrestres (Rani et Panneerselvam,2010).

Les protéases sont des enzymes hydrolytiques qui catalysent la rupture des liaisons peptidiques dans les protéines. Elles représentent environ 60 % du marché mondial des enzymes industrielles, avec des applications majeures dans les détergents, l'agroalimentaire, le tannage du cuir, les industries pharmaceutiques (Razzaq *et al.*,2019). Selon leur site catalytique, on distingue les protéases sérines, aspartiques, cystéiniques et métalloprotéases. Les protéases d'origine marine, en particulier celles produites par *Aspergillus* spp. présentent des caractéristiques remarquables : activité optimale à des températures modérées (30-50 °C), stabilité en présence de sels, et spécificité de substrat intéressante (Siala *et al.*,2012).

La production de protéases par les souches marines du genre *Aspergillus* est conditionnée par un ensemble de paramètres physico-chimiques et nutritionnels dont l'optimisation est indispensable pour envisager une exploitation industrielle rentable.

Parmi les paramètres physico-chimiques, la température, le pH et la salinité jouent un rôle prépondérant. La température optimale de production se situe généralement entre 25 et 30 °C pour la plupart des souches d'*Aspergillus* isolées du milieu marin, bien que certaines espèces thermotolérantes présentent un optimum à 40 °C (Rani et Panneerselvam,2010). Le pH du milieu de culture influence à la fois la croissance fongique et la sécrétion enzymatique ; les *Aspergillus* marins produisent préférentiellement des protéases acides (pH 4,0-5,5), neutres (pH 6,0-7,0) ou alcalains

(pH 7-9) selon l'espèce considérée (Siala *et al.*,2012). La salinité, facteur distinctif des souches marines, constitue un paramètre critique : une concentration en NaCl comprise entre 10 et 35 g/L stimule significativement la production de protéase, tandis que l'absence de sel réduit drastiquement les rendements enzymatiques (dos Santos Marinho *et al.*,2025).

Concernant les paramètres nutritionnels, la nature et la concentration des sources de carbone et d'azote sont déterminantes. Les sucres simples (glucose, fructose) supportent une croissance rapide mais répriment souvent l'expression des protéases par un effet catabolique. À l'inverse, des substrats complexes comme l'amidon, le lactosérum ou les déchets agro-industriels agissent comme inducteurs et améliorent la production enzymatique tout en réduisant les coûts de production (Katz *et al.*,2009). Les sources d'azote organiques (peptone, extrait de levure, caséine) sont généralement plus efficaces que les sels d'ammonium pour la production de protéases (Siala *et al.*,2012).

Le présente travail s'inscrit dans la continuité de l'étude menée par Merzouk et Akkouda, (2025) et vise à améliorer le rendement de la production de protéases par des isolats marins d'*Aspergillus*. Il s'agit d'une étude des facteurs influençant la production de protéases par un isolat fongique appartenant au genre *Aspergillus*. Cet isolat a été isolé à partir d'algues marines prélevées sur deux sites distincts du littoral de Mostaganem : Sidi Lakhdar et Salamandre. L'objectif de ce travail est de déterminer les facteurs influençant la production de protéase, dans une perspective d'application biotechnologique. Pour ce faire, un criblage enzymatique préliminaire a été réalisé sur gélose au lait écrémé, suivi d'une production en fermentation liquide. L'activité protéasique a ensuite été mesurée sur l'extrait brut, ce qui a permis d'évaluer l'impact des différents paramètres physico-chimiques et nutritionnels sur la biosynthèse enzymatique.

Le présent manuscrit est structuré en deux parties.

La première partie, théorique, présente une synthèse bibliographique portant sur : les champignons marins, plus particulièrement le genre *Aspergillus*, les protéases fongiques ainsi que l'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer leur la production.

La seconde partie est consacrée la description des méthodes mises en œuvre pour atteindre les objectifs fixés, ainsi qu'à la présentation et à la discussion des résultats obtenus.

Enfin, une dernière section distincte est dédiée à la conclusion générale de ce travail.

Partie 1 : Etude bibliographique.

Chapitre 1 :
Classification des protéases.

1. Classification des protéases

Les protéases présentent une large distribution dans la nature et au sein des organismes vivants. Leur classification repose sur plusieurs critères : le mécanisme catalytique d'hydrolyse, l'origine biologique, le pH optimal d'activité, ainsi que les caractéristiques structurales et fonctionnelles de leur site actif (Wang *et al.*,2025).

1.1. Selon le site d'action enzymatique

Les protéases peuvent être classées en deux catégories principales en fonction de leur site d'action sur le substrat peptidique : les exopeptidases et les endopeptidases (Mótyán *et al.*,2013;Sethia,2016).

Exopeptidases

Les exopeptidases catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques situées à proximité des extrémités N-terminale ou C-terminale de la chaîne polypeptidique. Elles se divisent en deux groupes : les aminopeptidases et les carboxypeptidases.

Les aminopeptidases agissent près de l'extrémité N-terminale. Elles libèrent soit un acide aminé unique (aminopeptidases, EC 3.4.11), soit un dipeptide ou un tripeptide (dipeptidyl-peptidases et tripeptidyl-dipeptidases, EC 3.4.14). Certaines sont spécifiques de la libération d'une méthionine en position N-terminale, un résidu que l'on retrouve dans les protéines recombinantes mais généralement absent des protéines matures d'origine naturelle (Mótyán *et al.*,2013).

Les carboxypeptidases agissent près de l'extrémité C-terminale. Elles libèrent un acide aminé unique (carboxypeptidases EC 3.4.16, EC 3.4.17 et EC 3.4.18) ou un dipeptide (peptidyl-dipeptidases EC 3.4.15) (Mótyán *et al.*,2013).

Par ailleurs, certaines exopeptidases sont spécifiques de dipeptides particuliers et sont désignées sous le nom de dipeptidases (EC 3.4.13). On distingue également les oméga peptidases (EC 3.4.19), qui hydrolysent les liaisons peptidiques impliquant un résidu d'acide aminé terminal modifié, cyclisé ou engagé dans des ponts iso-peptidiques (Cavasin *et al.*,2004;Szeltner et Polgar.,2008;Bouacem,2016).

Endopeptidases

Les endopeptidases clivent les liaisons peptidiques à l'intérieur de la chaîne polypeptidique, à distance des extrémités terminales (Mótyán *et al.*,2013). Elles sont subdivisées en sept sous-classes selon leur mécanisme catalytique : endopeptidases à sérine (EC 3.4.21), à cystéine (EC 3.4.22), à acide aspartique (EC 3.4.23), à acide glutamique (EC 3.4.23), à asparagine (EC 3.4.23), à métal (EC 3.4.24) et à thréonine (EC 3.4.25). Les endopeptidases dont le mécanisme catalytique reste inconnu sont regroupées dans une sous-classe distincte (EC 3.4.99),(Rao *et al.*,1998;van der Hoorn,2008;Bouacem,2016).

1.2. Selon la nature du résidu catalytique impliqué dans le site actif

Les enzymes protéolytiques peuvent être regroupées en six classes catalytiques distinctes, définies par la nature du nucléophile engagé dans la réaction enzymatique. En 1993, Rawlings et Barrett ont proposé une classification en quatre types catalytiques sérine, cystéine, aspartique et métalloprotéase, s'inscrivant dans la continuité des travaux précurseurs de Hartley.

Dans les peptidases à sérine et à cystéine, le nucléophile est respectivement un groupe hydroxyle (-OH) porté par la chaîne latérale d'un résidu sérine du site actif, ou un groupe thiol (-SH) porté par un résidu cystéine. En revanche, pour les peptidases aspartiques et les métallopeptidases, le nucléophile est une molécule d'eau (H₂O). Dans les peptidases aspartiques, cette eau est activée par deux résidus aspartate ; dans les métallopeptidases, elle l'est par un ou deux ions métalliques (généralement du zinc, mais également du cobalt, du manganèse, du nickel, du cuivre ou du fer).

Un cinquième type catalytique a été identifié en 1995, suite à la résolution structurale du protéasome : trois de ses dix sous-unités se sont avérées être des peptidases possédant une thréonine N-terminale agissant comme nucléophile. Enfin, un sixième type a été décrit en 2004, lorsque certaines endopeptidases fongiques, désormais dénommées épolysines, ont été caractérisées comme des glutamates-peptidases (Rawlings *et al.*, 2011). (Voir Tableau 1).

Tableau 1 : Classification des protéases (Bousmia et Maba., 2021).

Protéases	EC
Exopeptidases	
• Aminopeptidases	3.4.11
- Dipeptidyl peptidase	3.4.14
- Tripeptidyl peptidase	3.4.14
• Carboxypeptidases	3.4.16 - 3.4.18
- Protéases de type sérine	3.4.16
- Métalloprotéase	3.4.17
- Protéase de type cystéine	3.4.18
- Peptidyl dipeptidase	3.4.15
- Dipeptidases	3.4.13
• Oméga peptidases	3.4.19
Endopeptidases	
• Protéase à sérine	3.4.21
• Protéase à cystéine	3.4.22
• Protéase à aspartique	3.4.23
• Métalloprotéase	3.4.24
• Endopeptidases des mécanismes catalytique inconnus	3.4.99

1.3. En fonction du pH d'activité

Les enzymes protéolytiques sont classées en fonction de la gamme de pH pour laquelle leur activité catalytique est optimale. On distingue ainsi les protéases neutres (pH optimal = 7), les protéases acides (pH optimal inférieur à 7, généralement compris entre 2 et 5) et les protéases alcalines (pH optimal supérieur à 7), (Sethia, 2016).

Les protéases alcalines d'origine microbienne revêtent une importance considérable dans divers secteurs industriels. Le genre *Bacillus* constitue une source majeure de ces enzymes et représente très probablement le seul genre exploité commercialement pour leur production.

Les protéases neutres sont majoritairement d'origine végétale, avec une activité optimale proche de la neutralité (pH 6–8). En revanche, les protéases acides sont principalement produites par les champignons, les plus performantes d'entre elles présentant une activité maximale dans une plage de pH allant de 2 à 5, (Alnahdi, 2012).

1.4. Selon la localisation cellulaire

Selon leur localisation au sein ou à l'extérieur de la cellule, les protéases sont classées en deux catégories : intracellulaires et extracellulaires.

A. Protéases intracellulaires

Ces enzymes participent essentiellement à l'élaboration et à la régulation des processus cellulaires et métaboliques. Leur exploitation à l'échelle industrielle reste limitée, car leur extraction nécessite une étape préalable de lyse cellulaire.

B. Protéases extracellulaires

Elles catalysent l'hydrolyse des protéines en petits peptides assimilables. Leur intérêt industriel est majeur, étant donné qu'elles peuvent être extraites sans recourir à la lyse cellulaire (Mala *et al.*, 1998).

1.5. Selon leur besoin en ATP

Cette catégorie regroupe les protéases qui sont composées de plusieurs sous-unités, comportant à la fois des domaines ATPase et des domaines protéolytiques. Il existe également des protéases n'appartenant à aucun groupe de classification, à l'instar des signaux peptidases des lipoprotéines (Kumar *et al.*, 1998).

Chapitre 2:
Protéases fongiques

1. Les protéases des champignons

Les champignons synthétisent une large gamme d'enzymes et de peptides impliqués dans les processus cellulaires fondamentaux tels que la croissance, la sporulation et la régulation métabolique. Selon leur habitat thermique, ils sont classés en trois groupes écophysiologiques : psychrophiles, mésophiles et thermophiles, chacun étant caractérisé par la production d'enzymes aux propriétés biochimiques distinctes (Oliveira *et al.*, 2015), (Zucconi *et al.*, 1996).

Chez les champignons thermophiles, capables de tolérer des températures élevées, on observe une sécrétion notable de protéases thermostables. Ces enzymes présentent une durée de conservation prolongée, ce qui les rend particulièrement attractives pour des applications industrielles variées, notamment dans les secteurs agroalimentaire et pharmaceutique (Lasa *et al.*, 1993). Parallèlement, les champignons psychrophiles isolés des sédiments des grands fonds marins constituent une source prometteuse de protéases actives à basse température (Mikhailova *et al.*, 2014). Enfin, de nombreuses espèces mésophiles participent également à la production à grande échelle de protéases d'intérêt biotechnologique (Srilakshmi *et al.*, 2015).

Ces dernières années, la production de diverses protéases fongiques a été explorée par fermentation en milieu solide (FMS) ou en milieu liquide (FML) à partir de substrats variés. De nombreuses souches fongiques appartenant notamment aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* ont été utilisées. Les paramètres physicochimiques de ces enzymes ont été largement caractérisés.

Les protéases d'origine fongique, en particulier celles du genre *Aspergillus*, ont suscité un intérêt considérable en raison de leur forte capacité de sécrétion enzymatique dans le milieu de culture. Plusieurs de ces enzymes, produites à grande échelle par fermentation submergée, sont utilisées depuis plusieurs décennies dans l'industrie agroalimentaire (Wu *et al.*, 2006). Parmi les espèces les plus étudiées figurent *Aspergillus flavus* (Kranthi *et al.*, 2012; Macchione *et al.*, 2008; Malathi et Chakraborty., 1991), *Aspergillus niger* (O'Donnell *et al.*, 2001; Yang et Lin., 1998) et *Aspergillus oryzae* (Ogawa *et al.*, 1995; Vishwanatha *et al.*, 2010). Cette dernière espèce est considérée comme non toxigène, en raison de son utilisation séculaire dans les fermentations alimentaires, notamment asiatiques, et de son innocuité établie par plus d'un millénaire d'usage. *A. oryzae* se développe efficacement à la surface de matières solides telles que le riz cuit à la vapeur, le soja broyé ou divers coproduits agricoles (son de blé, son de riz, bagasse, etc.), initialement pauvres en sucres et en acides aminés (Vishwanatha *et al.*, 2009). Plusieurs espèces d'*Aspergillus* ont fait l'objet d'études approfondies pour la production de protéases par fermentation en milieu solide (FMS). Il a ainsi été démontré qu'*A. flavus* et *A. oryzae* sont capables de produire des protéases alcalines dans ce type de système.

Les espèces du genre *Penicillium* présentent un fort potentiel biotechnologique pour la production de protéases et d'autres enzymes. Parmi les espèces les plus étudiées figurent *Penicillium* sp, *P. camemberti*, *P. citrinum*, *P. griseoroseum*, *P. restrictum* et *P. roqueforti*. Ces souches ont suscité un intérêt particulier pour la production de protéases alcalines, aussi bien en fermentation en milieu solide (FMS) qu'en fermentation en milieu liquide (FML). Par ailleurs, *P. griseoroseum* et *P. camemberti* sont également connus pour leur capacité à produire des protéases acides dans les mêmes conditions de culture. Une souche innovante de *P. griseoroseum*, dénommée IH-02, a permis d'obtenir des quantités importantes d'une protéase acide extracellulaire lors d'une fermentation en milieu solide sur un substrat composé exclusivement de son de blé et de farine de soja (Ikram et Mukhtar.,2007).

Mucor pusillus et *Mucor miehei* sécrètent dans le milieu de culture des protéases aspartiques, également dénommées présures de *Mucor*. Ces enzymes possèdent une activité coagulante élevée sur le lait et une activité protéolytique faible, ce qui permet leur utilisation comme substituts de la présure animale en industrie fromagère (Andrade *et al.*,2002). Néanmoins, la forte stabilité thermique des présures de *Mucor* constitue un inconvénient majeur : l'activité enzymatique résiduelle observée après la cuisson peut altérer les qualités organoleptiques du fromage au cours de l'affinage prolongé (Maheshwari *et al.*,2000). Par ailleurs, la production de protéases extracellulaires par *Mucor circinelloides* a récemment été décrite, avec le glucose comme substrat carboné. L'enzyme de *M. circinelloides* est stable à pH 5,2 et présente une activité maximale à 25 °C (Andrade *et al.*,2002).

2. Protéases produites par les espèces marines du genre *Aspergillus*

Les micro-organismes marins, adaptés à des conditions environnementales extrêmes comme la salinité et les fluctuations du pH, représentent une source importante d'enzymes d'intérêt biotechnologique. Parmi eux, les champignons du genre *Aspergillus* occupent une place de choix grâce à leur capacité à produire diverses enzymes extracellulaires, dont les protéases. Ces espèces, lorsqu'elles sont isolées de milieux marins tels que les sols de mangroves, présentent un potentiel élevé pour la production de protéases aux propriétés spécifiques, ce qui explique l'intérêt croissant pour leurs applications industrielles et biotechnologiques.

2.1. Les protéases acides

Les protéases acides sont une classe d'enzymes hydrolytiques capables de catalyser la dégradation des protéines en peptides de faible masse moléculaire et en acides aminés, dans des conditions acides, avec un pH optimal bas. D'après l'étude de (Yao *et al.*,2024), le genre fongique le plus fréquemment rapporté pour la production de protéases acides est *Aspergillus*, en particulier les espèces *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae*. Une souche marine, *Aspergillus tubingensis* (MS-6), isolée de sols de mangrove, a montré une forte capacité de production de protéase acide. L'enzyme purifiée, nommée ATAP (*Aspergillus tubingensis* acid protease), présente une activité relative maximale à pH 3,5 et une température optimale comprise entre 35 et 40 °C. Elle est stable dans une gamme de pH 3,0 à 3,5 et de température de 20 à 50 °C. Ces propriétés font de cette enzyme un candidat potentiel pour des applications biotechnologiques nécessitant une activité en milieu acide. (Yao *et al.*,2024).

2.2. Les protéases neutres

Les protéases neutres d'origine fongique, bien que moins fréquemment rapportées que leurs homologues acides ou alcalines chez les souches d'*Aspergillus*, présentent un intérêt industriel majeur en raison de leur affinité pour les acides aminés hydrophobes et de leur efficacité peptidasique. *Aspergillus oryzae*, microorganisme prédominant dans la fermentation de fèves, est reconnu pour sa capacité à produire naturellement une protéase neutre, considérée comme l'enzyme la plus valorisée dans ce contexte. Face à la faible thermostabilité généralement observée chez ces enzymes, des travaux récents ont orienté la recherche vers l'isolement de souches fongiques productrices de protéase neutre stable à haute température, notamment à partir d'écosystèmes fermentaires thermophiles. Ainsi, dans l'objectif d'obtenir une protéase neutre fongique thermorésistante, des souches d'*Aspergillus* issues de fèves fermentées à haute température ont été sélectionnées pour leur forte production de cette enzyme, avant purification et caractérisation (Ao *et al.*,2018).

2.3. Les protéases alcalines

Les protéases alcalines constituent une catégorie d'enzymes hydrolytiques capables de catalyser l'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines, conduisant à la formation de peptides et d'acides aminés, dans des conditions de pH alcalin (généralement supérieur à 7). Elles présentent un intérêt biotechnologique majeur en raison de leur large spectre d'applications industrielles, notamment dans les formulations de détergents, le traitement du cuir et les procédés de transformation alimentaire.

Dans une étude portant sur un isolat d'*Aspergillus oryzae* provenant de sols côtiers de la baie du Bengale (Andhra Pradesh, Inde), la production de protéase alcaline a été mise en évidence par l'apparition de zones claires d'hydrolyse des protéines autour des colonies. Les paramètres physicochimiques optimaux pour la production enzymatique ont été déterminés : un pH de 8, une température de 30 °C, une concentration de 10 % de son de blé et une durée d'incubation de 72 heures. Le ZnSO_4 a été identifié comme un activateur efficace de l'activité protéasique, tandis que le sulfate de sodium a inhibé l'enzyme à plus de 50 %. L'ensemble de ces résultats a permis d'identifier *Aspergillus oryzae* comme un producteur potentiel de protéase alcaline (Raghu *et al.*, 2018).

Une étude menée par Damare et ses collaborateurs (2006) a démontré que le champignon *Aspergillus ustus* (souche NIOCC 20), isolé de sédiments marins profonds, possède une capacité élevée à produire une protéase. La croissance du champignon était substantielle à 30 °C et 50 °C, à la pression atmosphérique normale (1 bar) ainsi qu'à des pressions hydrostatiques élevées. Ce champignon a produit une protéase alcaline tolérante au froid lorsqu'il a été cultivé à 30 °C et à 1 bar. L'enzyme était également active à des combinaisons de 30 °C, 50 °C et d'une pression de 300 bars. L'inhibition totale de l'activité enzymatique en présence de 2 mM de PMSF (un inhibiteur spécifique) indique que cette enzyme appartient à la famille des sérines protéases. Ces résultats montrent qu'*Aspergillus ustus* marin représente une source prometteuse pour la production d'une protéase active dans des conditions extrêmes (pression élevée et froid), ce qui lui confère un intérêt potentiel pour des applications industrielles et environnementales. (Sivakumar et Vanmathi., 2021).

Chapitre 3 :
Facteurs influençant la production des
protéases

1. Facteurs influençant la production des protéases

La production de protéases est principalement régulée par divers paramètres physico-chimiques, tels que l'oxygénation, salinité, pH, température et la durée d'incubation. Par ailleurs, la synthèse des protéases est affectée par des sources de carbone et d'azote rapidement assimilables.

2. Facteurs physico-chimiques

2.1. pH

La sécrétion des enzymes par les souches microbiennes est fortement influencée par le pH extracellulaire. Les variations du pH peuvent entraîner la formation ou la rupture des liaisons inter- et intramoléculaires, ce qui modifie la structure tridimensionnelle de l'enzyme et, par conséquent, son efficacité catalytique. De plus, le transport des nutriments et les processus enzymatiques à travers la membrane cellulaire dépendent étroitement du pH du milieu de culture.

Les résultats obtenus montrent qu'*Aspergillus niger* présente une activité protéasique optimale à pH 9,0. Selon les travaux de (Ekedegba *et al.*, 2022), *A. niger* produit des protéases sur une large gamme de pH allant de 4,4 à 9,0. Quant à *Aspergillus terreus*, son activité optimale a été observée à pH 8,0, ce qui concorde avec les résultats de (Ekedegba *et al.*, 2022).

Le pH du milieu de culture influence de nombreux processus métaboliques liés aux enzymes, y compris la synthèse des protéases extracellulaires et leur transport à travers les membranes cellulaires. Lors de l'étude de l'effet du pH initial sur la production d'une protéase par le champignon *Aspergillus tamarii*, il a été observé que la production maximale de l'enzyme était atteinte à pH 9,0, quel que soit le type de culture. La production sur son de blé (culture solide) était de $1,46 \times 10^4$ U/g, tandis qu'en bouillon de culture (culture liquide) elle atteignait $7,4 \times 10^3$ U/10 ml. Les résultats ont également montré que la culture liquide tolère une large gamme de pH initiaux (7–10) pour une production quasi optimale de l'enzyme. En revanche, en culture solide, la plage de pH permettant une production optimale était beaucoup plus étroite (Anandan *et al.*, 2007).

2.2. Température

Parmi les paramètres environnementaux influençant la synthèse des protéases microbiennes, la température d'incubation occupe une place déterminante. Des températures élevées peuvent exercer des effets défavorables sur l'activité métabolique des micro-organismes producteurs d'enzymes protéolytiques. Néanmoins, certaines souches sont capables de produire des protéases thermostables, conservant leur activité à des températures plus hautes. Cette stabilité thermique serait attribuable soit à la présence d'ions métalliques spécifiques, soit à des adaptations structurales permettant aux enzymes de maintenir leur fonction biologique en conditions de chaleur. En règle générale, les protéases neutres présentent une faible thermostabilité; toutefois, des études ont rapporté l'existence de protéases neutres résistantes à la chaleur, capables d'hydrolyser la caséine de manière optimale entre 60 et 65 °C. Par ailleurs, la production de protéases actives à basse température a également été documentée, bien qu'elle soit associée à des rendements enzymatiques plus faibles (UL-Haq *et al.*,2006).

Dans le cadre de la production de protéase par *Aspergillus niger*, l'utilisation d'une température plus basse présente un avantage certain en réduisant les taux d'évaporation, ce qui prévient toute augmentation indésirable de la température durant la phase d'incubation. En revanche, des températures élevées entraînent des phénomènes inverses : l'élévation de la température au sein de la masse fermentescible, induite par le dégagement de chaleur métabolique, provoque un assèchement du milieu de culture. Il en résulte une diminution de l'activité de l'eau (aw), une réduction de la disponibilité des nutriments, ainsi qu'une limitation de l'aération, conduisant à une croissance fongique restreinte, voire impossible (Bensmail,2012).

2.3. Salinité

Le stress salin (4 % NaCl) crée un environnement isotonique pour les espèces fongiques (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*), ce qui favorise à la fois la croissance cellulaire et la production de protéases extracellulaires (alcalines et acides).

La salinité peut affecter directement la croissance et la sporulation des champignons. Par exemple, à des salinités supérieures à 5 %, on observe une augmentation de la sporulation et de la formation de chlamydospores, ainsi qu'une diminution de la production d'hyphes (Mandeel *et al.*,2006). Lorsque l'osmolarité du milieu est élevée, certains champignons peuvent neutraliser la perte d'eau en accumulant des ions K⁺ dans leurs cellules (Plemenitaš *et al.*,2014). D'autres champignons accumulent des osmolytes (polyols, sucres et acides aminés) en tant que solutés organiques compatibles (Roberts *et al.*,2005).

La forte salinité des milieux hypersalins fait de ces habitats une source potentielle de champignons halophiles capables de produire des enzymes pour des applications

industrielles. Des études sur les enzymes obtenues à partir de champignons halophiles ont permis d'identifier des amylases, des cellulases, des lipases et des protéases (Oren *et al.*,2010).

2.4. Influence de l'oxygénation

Les micro-organismes présentent des besoins variables en oxygène. En effet, l'oxygène moléculaire (O₂) agit comme accepteur terminal d'électrons dans les réactions oxydatives, permettant ainsi la production d'énergie nécessaire aux activités cellulaires. Dans les cultures en flacons agités, la vitesse d'agitation constitue un paramètre physique majeur. Elle influence non seulement le degré de mélange du milieu de culture, mais aussi la disponibilité des nutriments. Une agitation plus élevée améliore généralement le transfert d'oxygène et l'homogénéisation du milieu, ce qui favorise l'assimilation des substrats par les micro-organismes. Toutefois, des vitesses d'agitation excessives peuvent induire un stress mécanique, entraîner une dénaturation d'enzymes extracellulaires ou endommager les cellules microbiennes. Ainsi, la maîtrise de la vitesse d'agitation est essentielle pour optimiser à la fois la croissance microbienne et la production de métabolites d'intérêt, tels que les enzymes protéolytiques (Sepahy *et al.*,2011).

3. Facteurs nutritionnels

3.1. Source de carbone

La nature de la source de carbone influence à la fois le niveau et le profil temporel de la sécrétion de protéase extracellulaire. En présence de glucose (source de référence), l'activité protéasique augmente juste avant l'épuisement du substrat carboné et continue de croître rapidement pendant environ 18 heures après celui-ci, avant de ralentir en fin de culture. Avec le xylose, les tendances cinétiques sont similaires, mais les activités protéasiques maximale et spécifique sont significativement plus faibles. En présence de saccharose, hydrolysé en glucose et fructose, la croissance n'est pas interrompue lors du switch métabolique, mais la production de protéases reste nettement inférieure à celle observée avec le glucose. En revanche, l'acide citrique, le lactose et la proline, des sources de carbone moins favorables, induisent une longue phase de latence (4 à 5 jours) et une croissance ralentie. Dans ces conditions, l'activité protéasique apparaît beaucoup plus tôt, alors même que la source de carbone est encore en excès (comme confirmé pour le lactose avec 40 % de substrat résiduel à l'arrêt de la culture), contrairement au glucose où la production est post-épuisement. Ces résultats suggèrent que la répression catabolique par le glucose retarde l'induction des protéases, tandis que des sources de carbone limitantes ou non préférentielles lèvent cette répression plus précocement, bien qu'elles n'atteignent pas des niveaux d'activité aussi élevés qu'avec le glucose (Braaksma *et al.*,2009).

3.2. Source d'azote

Chez les champignons, la production des protéases est directement influencée par l'azote. Lorsque des sources d'azote facilement assimilables, comme l'ammonium ou les acides aminés, sont présentes, un mécanisme de répression catabolique par l'azote (NCR) réprime l'expression des gènes codant pour les protéases, empêchant ainsi l'utilisation des protéines. En l'absence de ces sources préférentielles, une dérégulation s'opère, entraînant l'activation des gènes responsables de la synthèse des protéases, qui dégradent les protéines en peptides et acides aminés. Par conséquent, la nature et la disponibilité de l'azote conditionnent l'inhibition ou l'induction de la production des protéases (Snyman *et al.*, 2019).

L'effet de différentes sources d'azote (proline, chlorure d'ammonium et nitrate de sodium) sur l'activité des protéases extracellulaires d'*Aspergillus niger* a été évalué à pH 4, en présence de glucose comme source de carbone. Les résultats montrent que, bien que la biomasse maximale soit comparable pour les trois sources testées, l'activité protéasique maximale est significativement plus faible en présence de proline. En revanche, l'utilisation du chlorure d'ammonium est associée à une diminution de l'activité protéasique spécifique.

L'analyse de la cinétique de croissance a révélé que l'ammonium devient un facteur limitant au cours de la culture lorsque sa concentration initiale est de 70,6 mM. Une série d'essais réalisés avec des concentrations croissantes de chlorure d'ammonium a démontré que l'activité protéasique maximale augmente avec la concentration en ammonium. L'effet d'un enrichissement en azote (multiplication par 4 à 8 de la concentration initiale) a également été étudié avec le nitrate de sodium. Dans ce cas, une augmentation considérable de l'activité protéasique est observée aux concentrations élevées de nitrate. Toutefois, contrairement à l'ammonium, la concentration la plus élevée testée n'a pas conduit à une augmentation supplémentaire de l'activité protéasique.

Les résultats ont montré que l'augmentation de la concentration d'ammonium entraîne une augmentation de l'activité protéasique maximale, tandis qu'un phénomène de saturation a été observé avec le nitrate, où les concentrations les plus élevées n'ont pas conduit à une augmentation supplémentaire. Il a également été constaté qu'une faible concentration d'ammonium (70,6 mM) en fait un facteur limitant pour la croissance, ce qui affecte indirectement la production de protéase (Braaksma *et al.*, 2009).

3.3. Autres nutriments

Le soufre constitue un élément essentiel à la prolifération cellulaire ainsi qu'à la biosynthèse d'acides aminés fondamentaux tels que la cystéine et la méthionine. Chez les champignons, des mécanismes métaboliques et régulationnels complexes assurent un approvisionnement continu en cet élément.

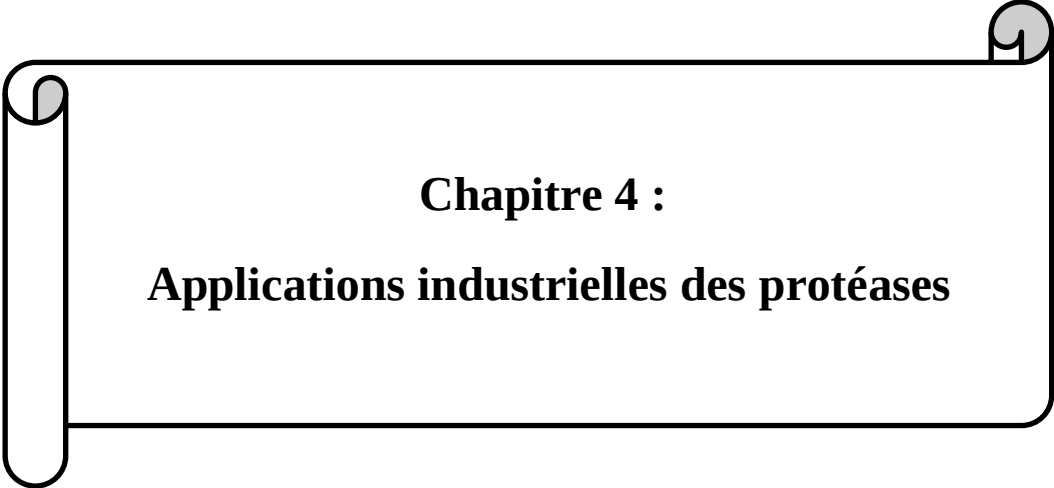
En conditions de carence en soufre, ces microorganismes répondent par l'induction de l'expression et de la sécrétion de protéases extracellulaires. Ces enzymes permettent la dégradation de substrats protéiques, libérant ainsi les acides aminés soufrés nécessaires à la survie cellulaire.

À l'inverse, en présence d'une source suffisante de soufre (par exemple, sous forme de sulfate, cystéine ou méthionine), l'expression des gènes codant ces protéases est réprimée, illustrant un mécanisme de rétrocontrôle métabolique visant à minimiser les dépenses énergétiques inutiles (Snyman *et al.*, 2019).

4. Facteurs génétiques

La production des protéases extracellulaires est un processus énergétiquement coûteux, fait l'objet d'une régulation rigoureuse. Ainsi, les champignons ne les produisent qu'en cas de besoin. Cette régulation intervient principalement au niveau transcriptionnel, via des facteurs de transcription et des voies de signalisation sensibles aux changements environnementaux, notamment la carence nutritive, le pH ou la température.

Chez *Aspergillus*, les mutations induites par mutagenèse classique ou par faisceaux ioniques peuvent entraîner des modifications physiologiques et métaboliques influençant directement la production enzymatique. Dans le cas des protéases, certaines mutations ont permis l'obtention de souches présentant une augmentation significative de la production de protéases acides durant la fermentation, ces améliorations résultant probablement de modifications touchant les mécanismes de régulation génétique, de sécrétion protéique ou de stabilité enzymatique. Ainsi, la mutagenèse constitue une stratégie importante pour sélectionner des souches fongiques à haut potentiel enzymatique dans les applications biotechnologiques et industrielles (Hombergh *et al.*, 1997).



Chapitre 4 :

Applications industrielles des protéases

1. Applications industrielles des protéases

Les protéases d'origine microbienne occupent une place centrale dans de nombreux secteurs industriels et biotechnologiques en raison de leur diversité catalytique et de leur robustesse fonctionnelle. Leurs applications couvrent des domaines aussi variés que la panification, le brassage, la formulation de détergents, le travail du cuir, l'industrie pharmaceutique, la tendérisation de la viande, la cosmétique, ainsi que le diagnostic médical (Christensen *et al.*,2022;Reddy *et al.*,2022;Akram *et al.*,2023;Mubeen *et al.*,2023).

Par ailleurs, l'émergence de nouveaux champs d'application a récemment élargi leur spectre d'utilisation. On les retrouve notamment dans les industries de l'alimentation animale (Bernardeau *et al.*,2022;Cupi *et al.*,2022), dans l'hydrolyse protéique pour la production de peptides bioactifs (Christensen *et al.*,2022), ainsi que dans des procédés liés à la protection de l'environnement, tels que le traitement et la valorisation des déchets (Ariaeenejad *et al.*,2022; Asitok *et al.*,2022;Zhai *et al.*,2022).

2. Protéases alcalines

Parmi les différentes classes de protéases, les protéases alcalines se distinguent par une activité catalytique optimale dans une gamme de pH allant de 8 à 13. Cette caractéristique leur confère un potentiel d'application majeur dans divers secteurs industriels, notamment :

2.1. Industries de détergents

Dans le cadre de l'industrie des détergents, les protéases alcalines constituent le segment prédominant du marché des enzymes, représentant un groupe d'intérêt commercial majeur. Elles sont principalement utilisées comme additifs dans les formulations détergentes (Sharma *et al.*,2017). L'incorporation de protéases alcalines dans les lessives favorise l'élimination des taches d'origine protéique (Matkawala *et al.*,2019;Tanwar *et al.*,2022). Contrairement aux détergents conventionnels, l'ajout de ces protéases permet non seulement une réduction de la consommation énergétique, mais aussi une amélioration de l'efficacité du lavage. Grâce à leur action, des temps d'agitation plus courts et des températures de lavage plus basses peuvent être appliqués après trempage (Mubeen *et al.*,2023). Les protéases alcalines commerciales sont efficaces à des concentrations faibles (0,4–0,8 %) et compatibles avec divers composants détergents, y compris ceux contenant des agents oxydants et séquestrants. Elles présentent également une activité et une stabilité élevées dans une large gamme de pH et de températures, ainsi qu'une longue durée de conservation (Vojcic *et al.*,2015). De plus, ces protéases sont écologiques et exemptes de phosphates ; les lessives en poudre qui en contiennent peuvent être utilisées en nettoyage à sec comme agents détachants (Kumar *et al.*,2016).

2.2. Industrie du cuir

Le traitement des peaux animales repose classiquement sur l'utilisation de réactifs alcalins. En raison de leurs activités kératolytique et élastolytique, les protéases alcalines se révèlent particulièrement efficaces pour le biotraitement du cuir, notamment lors des opérations d'épilage (unhairing) et de confitage (bating) (Tian *et al.*,2019;Srivastava *et al.*,2020).Ces approches enzymatiques présentent des avantages significatifs par rapport aux méthodes conventionnelles qui, basées sur des agents chimiques agressifs, génèrent des difficultés d'élimination des effluents, accroissent les risques pour la sécurité des opérateurs et contribuent à la pollution chimique (Hassan *et al.*,2020). Plusieurs études ont par ailleurs démontré l'efficacité de protéases alcalines issues de souches d'*Aspergillus*, de *Streptomyces* et de *Bacillus* pour le tannage du cuir (Ogino *et al.*,2008);(Paul *et al.*,2016;El-Ghonemy et Ali,2021;Hasan *et al.*,2022),(Zhang *et al.*,2022).

2.3. Application dans l'industrie alimentaire

L'industrie alimentaire constitue le secteur d'application le plus étendu des protéases alcalines.

2.4. Attendrissement de la viande

Les protéases alcalines hydrolysent les protéines des fibres musculaires ainsi que celles du tissu conjonctif. L'attendrissement de la viande est obtenu soit par immersion de celle-ci dans une solution protéasique, soit par saupoudrage d'une poudre enzymatique (Bureros *et al.*,2020). Par ailleurs, le système vasculaire des animaux est fréquemment injecté avec des solutions de protéases, 10 à 30 minutes avant l'abattage (Kalisz,1988), incluant l'élastase alcaline (Qihe *et al.*,2006) et une protéase alcaline thermophile (Wilson *et al.*,1992).

2.5. Solubilisation de la viande

Les hydrolysats de viande solubles et aromatisés, dérivés de l'industrie du cuir, sont obtenus à partir de sources protéiques potentielles telles que les os, les abats (notamment les poumons crus) et les résidus osseux post-désossage mécanique. Parmi les enzymes disponibles, l'alcalase se distingue comme l'enzyme la plus avantageuse en termes de solubilisation, de coût et d'autres critères (Anzani *et al.*,2017). Cette enzyme a également été utilisée avec succès pour produire des hydrolysats protéiques de poisson (Noman *et al.*,2022).

2.6. Produits à base de soja

En Asie, les protéases fongiques sont traditionnellement utilisées pour la préparation de la sauce soja et des produits dérivés du soja (Devanthi et Gkatzionis.,2019).Les protéases alcalines et neutres d'*Aspergillus* jouent un rôle essentiel dans la digestion des protéines de soja et contribuent à la flaveur riche de la

sauce soja authentique (Zhao *et al.*,2020). Elles participent également à l'amélioration de la qualité des produits à base de soja au cours de leur transformation (Xu *et al.*,2013).

3. Protéases neutres

Les protéases neutres constituent une classe d'enzymes hydrolytiques dont l'activité catalytique optimale se situe dans une gamme de pH neutre à légèrement acide ou légèrement alcalin. Leur spécificité pour des conditions physiologiques proches de la neutralité les rend particulièrement adaptées à diverses applications industrielles et biologiques.

3.1. Application en panification et biscuiterie

En technologie boulangère, l'addition combinée de protéases neutres et d'amylases à la farine de blé permet d'améliorer les propriétés rhéologiques de la pâte. Il a été démontré que les protéases neutres augmentent le volume du pain, améliorent l'élasticité de la pâte et optimisent la texture de la croûte (Zadeike *et al.*,2018;Gu *et al.*,2022;Xu *et al.*,2022;Li J *et al.*, 2023;Sun *et al.*,2023). Dans la fabrication de crackers, biscuits et cookies, ces enzymes sont utilisées pour accroître l'extensibilité et la résistance de la pâte, tout en empêchant sa déchirure lors du laminage en fines feuilles. L'obtention d'une pâte souple est par ailleurs essentielle pour éviter la déformation (gauchissement et plissement) des biscuits pendant la cuisson au four (Borrelli *et al.*,2003;Sumantha *et al.*,2006;Mokashe *et al.*,2018;Nikinmaa *et al.*,2019).Une pâte à la fois souple et malléable est également requise pour la formation précise de lettres et d'éléments décoratifs sur les biscuits. Les protéases neutres d'origine bactérienne, notamment celles produites par *Bacillus spp*, sont couramment employées à cet effet (Ehren *et al.*,2009).Leur activité endopeptidasique hautement spécifique les rend particulièrement adaptées aux farines riches en protéines.

3.2. Application à la tendérisation de la viande

Le pH de la viande fraîche étant proche de la neutralité, les protéases neutres sont particulièrement aptes à catalyser l'hydrolyse des protéines myofibrillaires et du tissu conjonctif. La tendérisation de la viande est classiquement attribuée à l'action d'enzymes endogènes, notamment les cathépsines lysosomales neutres ainsi que certaines métalloprotéases et endopeptidases à cystéine actives à pH neutre (Prates *et al.*,2001;Thomas *et al.*,2004;Mikołajczak *et al.*,2019).

4. Protéases acides

Les protéases acides constituent une classe d'enzymes hydrolytiques dont l'activité optimale se situe dans une plage de pH comprise entre 2 et 6. Leur origine microbienne est particulièrement exploitée dans les secteurs agroalimentaires et des boissons.

4.1. Applications dans l'industrie alimentaire

Dans le secteur alimentaire, les protéases acides sont principalement utilisées pour la coagulation du lait lors de la fabrication fromagère. En provoquant la coagulation des protéines lactées, elles induisent la formation d'un caillé solide, puis le lactosérum est éliminé pour obtenir le fromage (Tsuchiya *et al.*,1993;Hellmuth,2006;Theron et Divol.,2014).

Au-delà de leurs applications en fromagerie, ces enzymes interviennent également en panification. Les protéases fongiques servent à détendre la pâte et réduire le temps de pétrissage. Par ailleurs, les protéases acides fongiques sont largement employées pour la production de condiments alimentaires et l'amélioration de la qualité nutritionnelle d'aliments riches en protéines : pains et produits dérivés;(Hamada *et al.*,2013;Purushothaman *et al.*,2019; Wu *et al.*,2022;Li X *et al.*,2023;Niu *et al.*,2023).

4.2. Applications dans l'industrie des boissons

Les protéases acides dégradent les protéines responsables de la turbidité dans les jus de fruits et certaines boissons alcoolisées (Espejo,2021;Pati et Samantaray.,2022;Rasaq *et al.*,2023).Leur efficacité a été démontrée sur divers supports : cassis (Landbo *et al.*,2006), cerise(Pinelo *et al.*,2010), grenade (Cerreti *et al.*,2017), ainsi que les jus de pomme,d'orange, de raisin et de kiwi(Guo *et al.*,2019).L'ajout de ces enzymes réduit significativement la turbidité immédiate.

Partie 2 : Partie expérimentale.

Matériel et méthodes

1. Introduction

Les enzymes protéolytiques (protéases) représentent plus de 60 % de la valeur du marché mondial des enzymes industrielles. Leur importance biotechnologique fondamentale réside dans leur capacité à catalyser l'hydrolyse des liaisons peptidiques, une réaction essentielle à de très nombreux processus biologiques et technologiques. Cette réaction contrôle l'activation, la régulation et le renouvellement des protéines, ce qui confère aux protéases un rôle central tant dans la physiologie cellulaire que dans les bioprocédés industriels.(OP Ward,2011).

Dans ce contexte, le genre fongique *Aspergillus* se distingue comme l'un des microorganismes les plus efficaces pour la production de protéases. Cette efficacité repose sur sa remarquable aptitude à sécréter d'importantes quantités de protéines extracellulaires. (Souza *et al.*,2015). ainsi que sur la reconnaissance de certaines de ses souches comme sûres par les autorités de sécurité sanitaire (statut GRAS).(FDA, 2024).

La diversité enzymatique des protéases produites par *Aspergillus*, incluant des activités acides, neutres et alcalines, associée à la possibilité de moduler leur expression génique par les conditions de culture, fait de ce genre fongique un outil de recherche et une plateforme industrielle incontournables. (Bezerra *et al.*,2021).

Dans le cadre du présent travail de recherche, des souches fongiques marines isolées à partir d'algues récoltées sur les plages de Sidi Lakhdar et Salamandre dans la wilaya de Mostaganem (Algérie), ont été utilisées afin d'étudier les facteurs influençant la production de protéases par ces champignons marins.

L'expérimentation a été menée entre février et mai 2026 au Laboratoire de Recherche de Microbiologie et Biologie Végétale (Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem). La méthodologie adoptée comprend ; l'isolement de souches fongiques endophytes d'algues marines, la mise en culture sur substrat solide, la fermentation en milieu liquide, ainsi que le dosage enzymatique des extraits obtenus. Cette recherche s'inscrit dans une perspective durable d'exploitation de la biodiversité fongique locale pour des applications industrielles ciblées.

2. Présentation de la zone d'étude

La wilaya de Mostaganem est située au nord-ouest de l'Algérie et s'ouvre largement sur la mer Méditerranée par une façade maritime d'environ 124 km. Ce littoral étendu lui confère une importance géographique, économique et touristique considérable.

Elle couvre une superficie totale d'environ 2 269 km² et se trouve limitée par les entités territoriales suivantes :

- au nord : la mer Méditerranée.
- à l'est : la wilaya de Chlef.
- à l'ouest : les wilayas d'Oran et de Mascara.
- au sud : la wilaya de Relizane.

La wilaya de Mostaganem se distingue également par ses ressources naturelles, sa diversité écologique ainsi que par des secteurs économiques clés tels que la pêche maritime, l'agriculture et l'industrie agroalimentaire.

➤ Site d'échantillonnage

L'étude a été réalisée sur le littoral méditerranéen de la wilaya de Mostaganem (nord-ouest de l'Algérie). Deux sites de prélèvement ont été sélectionnés pour leur accessibilité et leur intérêt écologique : la plage de Salamandre et la plage de Sidi Lakhdar.

Plage de Salamandre : Située à proximité du centre-ville de Mostaganem, cette plage se caractérise par un environnement soumis à des influences anthropiques modérées. Son substrat est principalement rocheux par endroits, favorisant le développement d'une diversité d'algues macroscopiques.



Figure 1 : vue par satellite le site d'échantillonnage « plage de salamandre » (Google earth, 2026).

Plage de Sidi Lakhdar : Localisée plus à l'est de la wilaya, cette plage présente des caractéristiques naturelles mieux préservées, avec une moindre pression urbaine. La zone rocheuse intertidale offre un habitat propice à l'installation de communautés algales variées.



Figure 2 : vue par satellite le site d'échantillonnage « plage de Diancy Sidi Lakhdar » (Google earth, 2026).

3. Matériel

3.1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé au cours de ce travail inclut l'ensemble des produits chimiques, réactifs, verrerie et appareillages de laboratoire requis pour les différentes manipulations. Ces éléments sont décrits en détail dans l'Annexe (01). Quant aux milieux de cultures employés et leurs compositions sont présentés dans l'annexe(02).

3.2. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans cette étude est constitué exclusivement d'algues récoltées sur deux plages distinctes de la wilaya de Mostaganem, à savoir Salamandre (algues vertes et brunes) et Sidi Lakhdar (algues rouges). Sur chacun de ces deux sites, un unique prélèvement a été effectué à un instant précis de la période d'étude, garantissant ainsi une représentativité ponctuelle des deux localités.

Trois catégories morphologiques et phylogénétiques d'algues ont été sélectionnées : les algues vertes (Chlorophyta), rouges (Rhodophyta) et brunes (Phaeophyta). Ce choix méthodologique visait à évaluer la diversité des communautés fongiques associées à différents types d'algues dans des zones aux caractéristiques écologiques potentiellement contrastées.

Lors de chaque campagne de prélèvement, des fragments d'algues ont été coupés à l'aide de ciseaux préalablement stérilisés, puis placés dans des récipients en verre propres et stériles. Les échantillons ont été transportés au laboratoire immédiatement après la collecte, dans des conditions contrôlées afin de minimiser tout risque de contamination ou de dégradation. À leur arrivée, ils ont été traités le jour même, ce qui a permis de préserver leur fraîcheur ainsi que l'intégrité des structures biologiques pour les analyses ultérieures.

4. Préparation des milieux de cultures

4.1. Gélose Sabouraud au chloramphénicol à base de l'eau de mer

Une filtration d'un litre d'eau de mer a été réalisée par papier filtre, les différents constituants du milieu (dont la composition est indiquée en annexe (02)) sont pesés puis incorporés successivement à l'eau de mer filtrée, sous agitation magnétique, jusqu'à ce que la dissolution soit complète. Le pH est ajusté à 6,5. L'agar est ensuite ajouté et dissous par chauffage. Le milieu préparé est réparti dans des flacons, puis stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes.

4.2. Gélose au lait écrimie

Le milieu gélose au lait écrimie (skim milk agar) constitue un substrat de référence pour l'évaluation qualitative de l'activité protéolytique extracellulaire chez les champignons filamenteux et les levures. La caséine, protéine majoritaire du lait écrémé, confère à ce milieu un aspect opaque. Lorsque le champignon sécrète des protéases, ces enzymes hydrolysent la caséine, entraînant l'apparition d'un halo de clarification (zone transparente) autour de la colonie. Le milieu a été préparé comme suit : 15 g d'agar ont été dissous dans 800 ml d'eau distillée et autoclavés à 121 °C pendant 15 minutes. Par ailleurs, 10 g de poudre de lait écrémé ont été dissous dans 200 ml d'eau distillée. Le pH du mélange a été ajusté à 6,5 puis celui-ci a été autoclavé à 121 °C pendant 5 minutes, avant d'être mélangé à l'agar stérilisé. (Sedrah *et al.*, 2021) Le milieu obtenu a ensuite été refroidi à 50 °C et coulé dans des boîtes de Pétri pour le criblage primaire en fonction de la zone de clarification.

4.3. Gélose au lait écrimie enrichie

Afin d'évaluer l'activité protéolytique des souches microbiennes lors du criblage primaire, le milieu gélosé a été préparé à partir des composants décrits dans l'annexe(2), selon le protocole détaillé ci-après :

1. Deux solutions ont été préparées avec un pH de 6,5 :
 1. Une solution de 250mL de lait écrémé est stérilisée à l'autoclave à 121 °C pendant 5 minutes sous une pression de 15 psi (Sedrah *et al.*,2021), puis refroidie à 45–50 °C.
 2. Pour la préparation du milieu (annexe 02), tous les composants à l'exception de la solution de lait écrémé, sont dissous dans de l'eau distillée pour un volume final de 850mL. Le mélange est homogénéisé, chauffé doucement jusqu'à ébullition, puis réparti dans des flacons avant stérilisation à l'autoclave (121 °C, 15 min, 15 psi). Après refroidissement à 45–50 °C, 250 ml de solution stérile de lait écrémé, également refroidie, sont additionnés aseptiquement à 850mL de milieu. L'ensemble est homogénéisé, puis coulé dans des boîtes de pétri stériles (Atlas,2010).

4.4. Milieu de fermentation liquide (yeast extract casein medium)

Dans le cadre du criblage quantitatif des souches productrices de protéases, un milieu de production liquide spécifique a été formulé à base d'eau de mer filtrée afin de simuler les conditions halophiles naturelles. Le milieu est composé de : glucose (10 g), caséine (5 g), extrait de levure (5 g), KH_2PO_4 (2 g), K_2HPO_4 (2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g) dissous dans 1 000 ml d'eau de mer filtrée. Le pH a été ajusté à 9.5, puis le milieu a été réparti dans des flacons de 250 ml (100 ml par flacon) et stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes (Sedrah *et al.*,2021).

5. Isolement des champignons endophytes associés aux algues marines

Concernant les échantillons d'algues, deux méthodes distinctes ont été appliquées :

Pour la première méthode, le protocole d'isolement des champignons endophytes a été adapté de la méthode décrite par (Kumari *et al.*,2018). L'ensemble des manipulations a été réalisé en conditions aseptiques.

1. Préparation des échantillons d'algues

Les échantillons d'algues ont été prélevés et transportés au laboratoire dans des récipients en verre stériles contenant de l'eau de mer. Ils ont ensuite été lavés abondamment à l'eau de mer stérile afin d'éliminer les débris et la flore épiphyte. Une désinfection de surface a été effectuée par immersion séquentielle des thalles dans de l'éthanol à 70 % (60 secondes), puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,4 % (30 secondes). Après deux rinçages successifs à l'eau de mer stérile (60 secondes chacun), les échantillons ont été séchés délicatement sur du papier absorbant stérile (Kamat *et al.*,2020).

2. Mise en culture

À l'aide d'une lame stérile, chaque algue a été découpée en fragments d'environ 2 cm de longueur. Cinq fragments par échantillon ont été déposés aseptiquement à la surface de boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé Sabouraud au Chloramphénicol à base de l'eau de mer. Par ailleurs, afin de vérifier l'efficacité de la désinfection de surface, des aliquotes du dernier rinçage à l'eau de mer ont été également ensemencées sur le même milieu (Kamat *et al.*, 2020).

3. Conditions d'incubation

Les boîtes de Pétri ont été incubées à l'obscurité pendant 7 jours à une température de 28°C. (Kamat *et al.*, 2020).

Dans la deuxième méthode les échantillons d'algues ont été rincés à l'eau afin d'éliminer les poussières et les débris superficiels, puis lavés à l'eau stérile. Sous conditions aseptiques, ils ont été découpés en petits fragments. La désinfection de surface a été réalisée par immersion des fragments dans une solution d'éthanol à 70 % pendant trois minutes, suivie de cinq rinçages successifs à l'eau distillée stérile.

Après stérilisation, les fragments ont été pesés. Une quantité d'environ 0,5 g de chaque échantillon a été broyée dans un mortier stérile à l'aide d'un pilon stérile, en présence de 2 ml d'eau distillée stérile, jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène (Sangeetha *et al.*, 2020). Un volume de 0,1 ml de cette suspension a été ensemencé sur milieu gélosé Sabouraud au Chloramphénicol à base de l'eau de mer. Les cultures ont ensuite été incubées à 28°C pendant 7 jours.

6. Purification des isolats

La purification des isolats fongiques, préalablement obtenus à partir de macroalgues marines, a été réalisée sur un milieu de culture spécifique : le Sabouraud au chloramphénicol, préparé à base d'eau de mer filtrée. Chaque isolat a été ensemencé par la technique de l'ensemencement par stries. Les boîtes de Pétri ainsi ensemencées ont été incubées à 28°C pendant 5 jours. À l'issue de cette incubation, les colonies fongiques distinctes ont été repiquées individuellement sur le même milieu pour confirmer leur pureté.

7. Identification des champignons isolés

La culture de mycélium fongique sur milieu solide en boîtes de pétri conduit à la formation de colonies présentant fréquemment des caractéristiques macroscopiques distinctives, notamment des colorations spécifiques liées à la production de spores ou de pigments. L'identification morphologique des espèces fongiques repose sur une évaluation rigoureuse des paramètres culturels (aspect des colonies) et des structures microscopiques, nécessitant une durée d'incubation suffisante. L'observation microscopique révèle alors des structures spécialisées : hyphes, fructifications, phialides, et conidies.

7.1. Identification macroscopique

L'étude des caractères morphologiques macroscopiques a été réalisée par observation à l'œil nu du mycélium aérien et du mycélium de substrat, sur le recto et le verso des boîtes de culture contenant des souches fongiques pures obtenues. Les caractères suivants ont été examinés : le mycélium (couleur et aspect du thalle, couleur du verso de la boîte), les spores (densité sur le thalle, aspect des spores : granuleux, poudreux ou duveteux), l'uniformité de la couleur sporale, ainsi que la présence de pigments diffusibles.

7.2. Identification microscopique

Pour réaliser l'identification morphologique des isolats, des frottis frais ont été préparés à partir de cultures pures, entre lame et lamelle. L'observation microscopique a été effectuée aux grossissements $\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$ si nécessaire. L'observation a porté sur le filament (présence ou absence de cloisons, présence ou absence de ramifications), les organes sporifères (structure, organisation typique, etc.), ainsi que les spores (forme, couleur, mode de regroupement en chaînes, en amas, etc.).(Kedjebo *et al.*,2022).

8. Production de protéase

8.1. Screening des champignons producteurs des protéases

Le criblage qualitatif a permis d'évaluer la capacité des isolats fongiques à produire des enzymes protéolytiques extracellulaires, notamment des protéases. Pour ce faire, le milieu gélosé au lait écrémé (skim milk agar), contenant la caséine comme substrat protéique exclusif, a été utilisé. Les souches fongiques ont été ensemencées par dépôt ponctuel « spot inoculation » à la surface du milieu. Après une incubation de 5 jours à 30 °C, la sécrétion de protéases par une souche se traduit par l'hydrolyse de la caséine autour de la colonie, formant ainsi une zone claire (halo) bien distincte sur le fond opaque du milieu (Sedrah *et al.*,2021).

8.2. Fermentation liquide

La fermentation submergée a été réalisée dans des flacons de 200 ml contenant un milieu de culture composé de : glucose (10 g), de la caséine (5 g), de l'extrait de levure (5 g), du KH_2PO_4 (2 g), du K_2HPO_4 (2 g), du $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g). Le pH initial a été ajusté à 9. Le milieu a été stérilisé par autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes. Après refroidissement, l'inoculation a été effectuée en conditions aseptiques avec une souche d'*Aspergillus terreus*. Les flacons ont ensuite été incubés sous agitation 120 tr/min à 28 °C pendant 5 jours dans un incubateur agité, afin de permettre la croissance fongique en milieu submergé (Sedrah *et al.*,2021).

8.3. Analyse des facteurs influençant la production de la protéase

Afin d'évaluer l'influence de différents paramètres sur la production de protéase, cinq flacons Erlenmeyer ont été préparés. Chaque flacon a été attribué à l'étude d'un facteur spécifique : pH, source de carbone, température, durée d'incubation, et un flacon utilisé comme référence. Pour chaque paramètre étudié, des conditions précises ont été appliquées, les autres facteurs étant maintenus constants.

1.Milieu de fermentation standard : a été préparé avec un milieu de culture contenant les composants sans aucune modification. Le pH a été ajusté à la valeur de 9. L'incubation a été réalisée à une température constante de 28 °C pendant une durée de 5 jours.

2.Effet du PH : Le flacon de milieu consacré à l'étude du pH a été préparé en utilisant le même milieu que celui du milieu standard, à l'exception de la valeur du pH, qui a été ajustée à 8.

3.Effet de la source de carbone: la composition du milieu de culture était strictement identique à celle du milieu de fermentation utilisé, seule la nature du substrat carboné a été modifiée(le saccharose remplaçant le glucose). Toutes les autres conditions (pH, température, durée d'incubation), sont restées constantes.

4.Effet de température : L'influence de la température sur la production de protéase a été évaluée en soumettant un flacon aux mêmes conditions que le milieu standard, à l'exception de la température d'incubation fixée à 25 °C. Les autres paramètres ont été maintenus constants.

5.Effet de la durée d'incubation : L'étude de la durée d'incubation a été réalisée dans des conditions identiques à celles du milieu standard, à l'exception de la durée d'incubation qui a été portée à 7 jours.

8.4. Mesure de l'activité enzymatique

À l'issue de la fermentation, la production de l'enzyme d'intérêt a été évaluée comme suit, les bouillons de culture ont été centrifugés à 8000 tr/min pendant 10 minutes à 4 °C à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée. Le surnageant récupéré a constitué l'extrait enzymatique brut.

L'activité protéasique a été évaluée selon le protocole décrit par la méthode de Lowry en utilisant la caséine comme substrat protéique. Le milieu réactionnel, composé de 2,0 ml d'une solution de caséine à 0,5 % (p/v) dans un tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M (pH 9,5) Annexe (03) et de 1 ml d'extrait enzymatique

brut, a été incubé à 40 °C pendant 5 minutes. La réaction enzymatique a été stoppée par l'ajout de 3 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 % (p/v) Annexe (04). Le précipité obtenu a été éliminé par filtration sur papier Whatman n°1.

Par la suite, 1 ml du filtrat a été mélangé à 5 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 0,4 M Annexe(05) à 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. L'absorbance du mélange a été mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, en prenant comme référence un blanc qui contient les solutions de dosage a part l'enzyme (Sedrah *et al.*,2021).

8.5. Établissement de la courbe d'étalonnage de la tyrosine

Pour quantifier la tyrosine libérée par l'activité protéasique, une courbe d'étalonnage a été réalisée. Une solution mère a été préparée par dissolution de 100 mg de tyrosine dans 100 ml d'eau distillée stérile (concentration de 1mg/ml). À partir de cette solution mère, une série de solutions a été préparée par dilution afin d'obtenir les concentrations suivantes : 10, 50, 100, 150, 200 et 250 µg/ml.

Pour chaque standard, 1 ml de la solution de tyrosine est mélangé à 5 ml d'une solution de carbonate de sodium (0,4 M), puis à 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. L'absorbance de chaque échantillon est mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Le blanc est préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant la solution de tyrosine par 1 ml d'eau distillée stérile. La courbe d'étalonnage obtenue (absorbance en fonction de la concentration) a permis de déterminer la concentration en tyrosine libérée lors des dosages enzymatiques (Merzouk et Akkouda.,2025).

Résultats et discussion

Introduction

Dans la présente étude, des isolats fongiques marins ont été isolée à partir d'algues marines collectées sur les plages Salamandre et Sidi Lakhdar (wilaya de Mostaganem). L'identification préliminaire des champignons a été réalisée par observation macroscopique et microscopique, ce qui a permis de sélectionner l'espèce *Aspergillus*.

Un criblage qualitatif de l'activité protéolytique a ensuite été effectué sur deux types de gélose au lait écrémé. Ce criblage a permis de sélectionner la souche présentant la meilleure performance, caractérisée par une zone claire la plus large, témoignant d'une forte activité protéolytique.

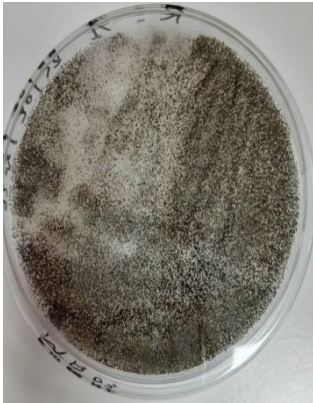
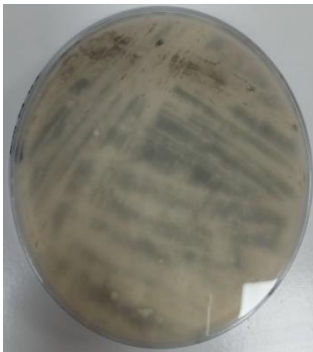
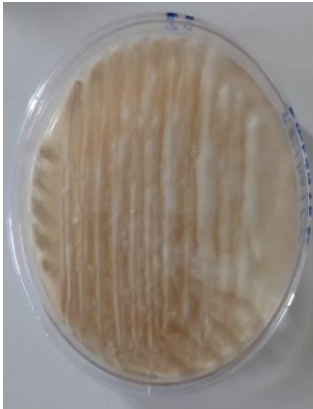
La souche sélectionnée a été cultivée en fermentation liquide sous différentes conditions de culture, notamment en faisant varier le pH, la température, la durée d'incubation et la source de carbone, afin d'évaluer sa capacité à produire une protéase extracellulaire. L'activité protéolytique de l'enzyme brute, récupérée après filtration et centrifugation du milieu de culture, a ensuite été mesurée.

Cette section présente l'ensemble des résultats obtenus et les discute en les comparant aux données de la littérature scientifique. L'objectif est de déterminer les conditions optimales de production de la protéase par *Aspergillus* d'origine marine.

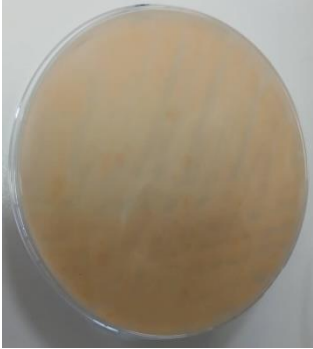
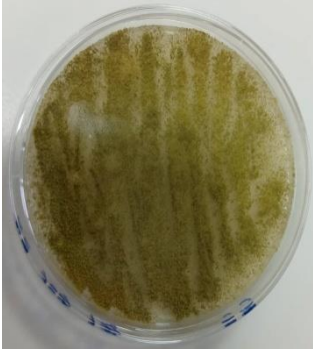
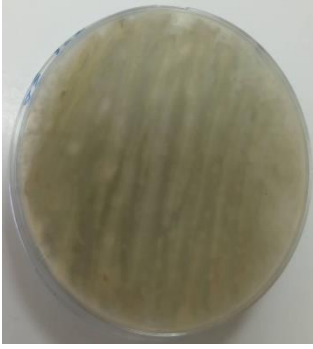
1. Identification des isolats fongiques marins

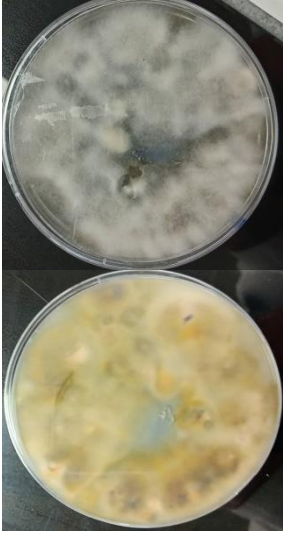
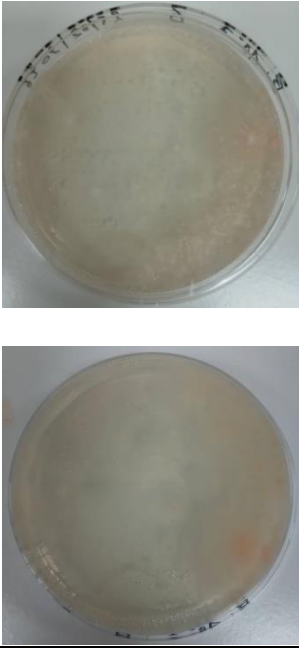
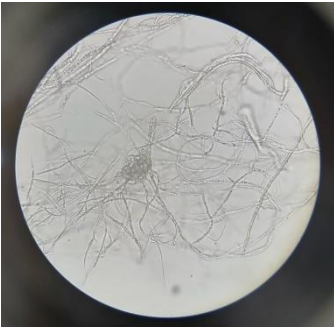
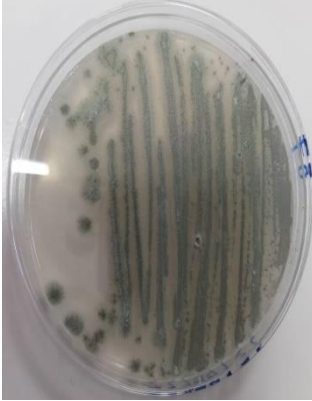
L'identification des champignons endophytes marins isolés à partir d'algues a été réalisée sur la base de l'examen de leurs caractères macroscopiques et microscopiques, observés après culture sur un milieu sabouraud. Les différents isolats obtenus ont révélé une diversité morphologique notable, se traduisant par des variations de couleur, de texture et d'aspect des colonies, ainsi que par des différences dans les caractéristiques microscopiques des structures fongiques. Chaque isolat a été désigné par un code numérique unique afin de faciliter son suivi expérimental et son identification ultérieure. Les résultats de cette identification sont présentés sous forme d'un tableau récapitulatif (Tableau 2), accompagné des observations macroscopiques et microscopiques correspondant à chaque isolat.

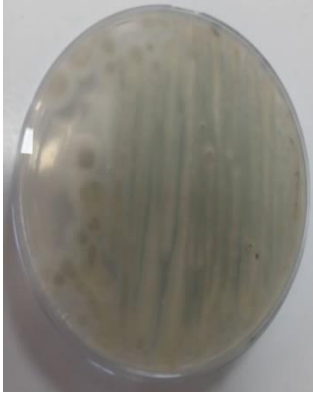
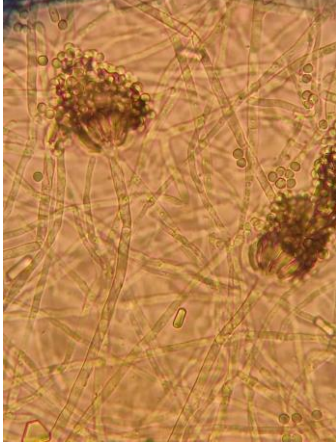
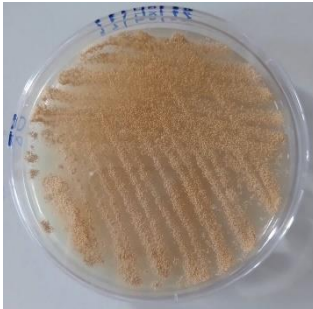
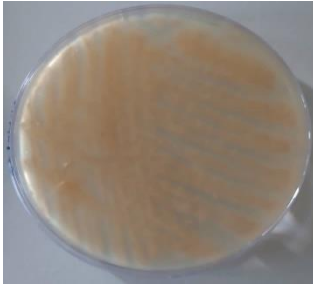
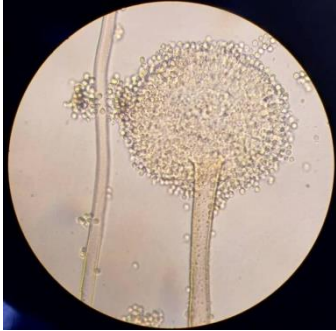
Tableau 2: Des isolats fongiques marins isolées à partir des algues.

Isolats et origines algales	Observation macroscopique.	Observation microscopique.	Caractères macroscopiques et microscopiques	Identification
A 1 (Algues rouges)	 		Aspect de la surface: granuleux Mycélium aérien abondant et dense. La couleur du mycélium aérien : d'abord blanc, puis jaune et enfin noire. (mycélium de substrat) : jaune pâle. Aspect microscopique : Le conidiophore : long, lisse et hyalin, se terminant par une vésicule globuleuse volumineuse. La tête conidienne : globuleuse à radiée, elle est volumineuse et très dense, de couleur noire, masquant initialement la disposition exacte des phialides (tête bisériée suspectée). Les conidies sont abondantes, organisées en chaînes basipètes radiales, de forme globuleuse.	<i>Aspergillus niger</i>
A2 (Algues rouges)			Aspect de la surface : Duveteux à poudreux. La couleur du mycélium aérien : brun jaunâtre. Mycélium de substrat : beige. Aspect microscopique : Hyphe : hyalines, lisse et septées. Conidiophores : De longs filaments dressés et hyalins supportent les structures de fructification. Vésicules : volumineuses, subglobuleuses, Elles sont extrêmement denses en conidies. L'organisation	<i>Aspergillus terreus</i>

Résultats et discussion

			semble radiaire ou sub-globuleuse, avec des chaînes de conidies émanant dans toutes les directions. Conidies : abondantes, sphériques, lisses. Elles sont observées aussi bien en chaînes basipètes compactes formant des têtes dispersées de manière dense dans le champ. Leur diamètre est uniforme.	
A3 (Algues rouges)	 		Aspect de la surface : cotonneux et dense, caractérisé par un mycélium aérien élevé, parsemé de fines granulations. (les spores). Couleur du mycélium aérien : vert olive. Mycélium de substrat : jaune pâle. Aspect microscopique : Conidiophore long, simple et non ramifié, terminé par une vésicule globuleuse. Phialides disposées radialement sur toute la surface de la vésicule. Conidies sphériques à subglobuleuses regroupées en chaînes formant une tête conidienne radiée. Présence d'hyphes septées.	<i>Aspergillus flavus</i>

A4 (Algues vertes)			Aspect de la surface : Cotonneux. La couleur du mycélium aérien : Blanc à fond sombre. Mycélium de substrat : Brun-noirâtre hétérogène. Aspect microscopique : Hyphes hyalines, fines, septées et modérément ramifiées, à diamètre régulier ; absence de structures sporifères.	Mycélium stérile.
A 6 (Algues vertes)			Aspect de la surface : Aspect laineux, avec des hyphes courts. La couleur du mycélium aérien : rose pâle. Mycélium de substrat : rose Aspect microscopique : hyphes hyalines, fines à moyennes, non septées.	Mycélium stérile.
A7 (Algues rouges, vertes et brunes)			Aspect de la surface: Aspect velouté à sub-cotonneux. La couleur du mycélium aérien : vert grisâtre. Mycélium de substrat : jaune pâle. Aspect microscopique : Hyphes : septées, ramifiées et faiblement pigmentées en vert pâle. Conidiophores dressés, allongés, à parois lisses et	<i>Penicillium</i>. Sp.

			septés. L'extrémité supérieure de chaque conidiophore se ramifie en un pénicille (structure en pinceau) composé de métules allongées, portant des phialides parallèles et serrées. À l'apex de ces dernières, les conidies (globuleuses à subglobuleuses) sont organisées en longues chaînes basipètes.	
A8 (Algues rouges)	 		Aspect de la surface : Duveteux a poudreux. La Couleur du mycélium aérien : marron cannelle. Mycélium de substrat : beige. Aspect microscopique : Conidiophore simple et non ramifié, tête conidienne globuleuse et dense, conidies sphériques à subglobuleuses abondantes regroupées en amas compacts, présence d'hyphes septées.	<i>Aspergillus terreus</i>

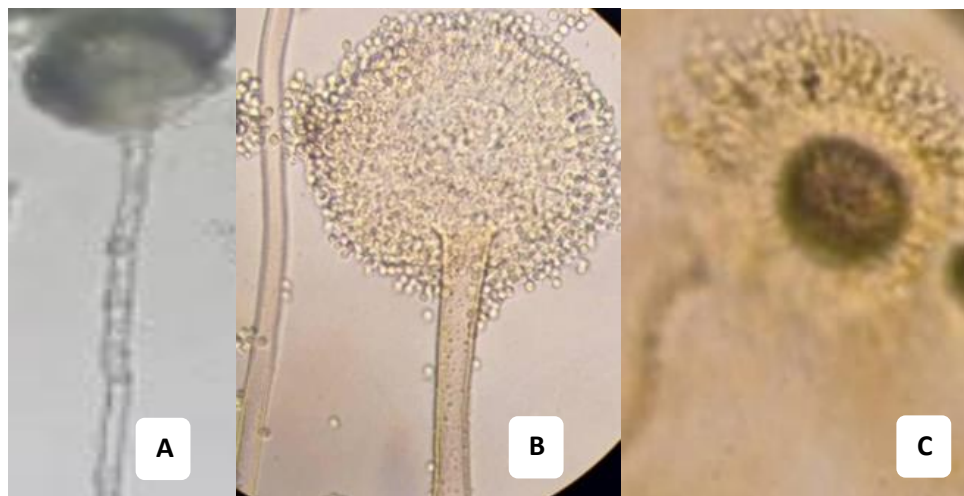


Figure 3 : Aspect microscopique de quelques isolats fongiques.
A et B : *Aspergillus terreus* , **C :** *Aspergillus flavus*

Discussion

L'isolement fongique à partir de trois phyla de macroalgues (algues vertes, rouges et brunes) a permis d'obtenir un total de sept isolats fongiques, révélant une diversité taxonomique notable selon le type d'hôte (Zuccaro *et al.*,2008). Les algues rouges (Rhodophyta) ont montré la richesse spécifique la plus élevée, avec l'identification de quatre espèces distinctes : *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. terreus* et une espèce du genre *Penicillium*. Cette dominance des espèces d'*Aspergillus* chez les rhodophytes pourrait être liée à des interactions écologiques spécifiques ou à des capacités métaboliques adaptées aux composés bioactifs produits par ces algues, souvent riches en polysaccharides sulfatés et en métabolites secondaires (Flewelling *et al.*,2015; Vallet *et al.*,2018).

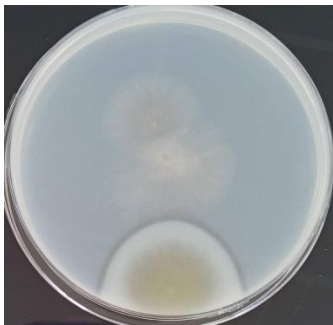
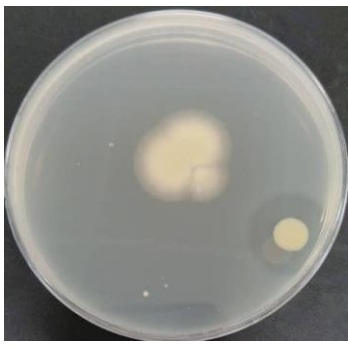
En revanche, les algues vertes (Chlorophyta) ont hébergé un assemblage fongique moins diversifié, composé d'un *Penicillium* sp, et d'un mycélium stérile. La présence de cette forme non sporulante suggère soit des conditions de culture non optimales pour l'induction de la sporulation, soit l'existence de souches cryptiques ou de champignons endophytes difficilement identifiables par les méthodes morphologiques classiques (Suryanarayanan,2012). Quant aux algues brunes (Phaeophyta), seules des moisissures du genre *Penicillium* ont été isolées, indiquant une sélectivité fongique plus stricte, potentiellement liée à la composition chimique particulière des phaeophytes (présence d'alginate, de fucoïdanes et de polyphénols) pouvant inhiber le développement d'autres genres fongiques (Godinho *et al.*,2013).

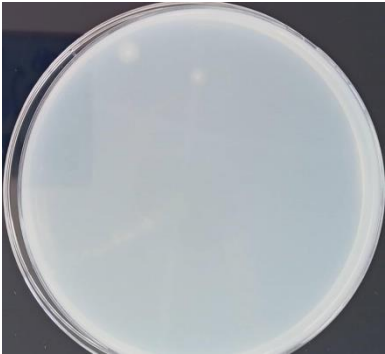
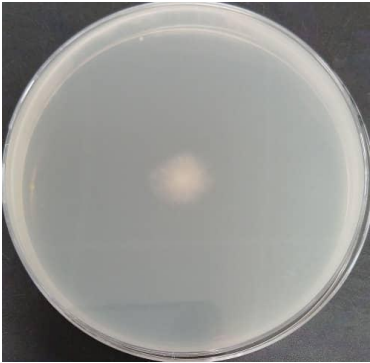
Cette distribution différentielle des communautés fongiques entre les trois groupes d'algues souligne l'influence de la nature de l'hôte sur la structuration du mycobiome associé (Zuccaro *et al.*,2008). L'absence d'*Aspergillus* chez les algues vertes et brunes, contrastant avec leur abondance chez les rouges, pourrait refléter des préférences écologiques ou des mécanismes de compétition interspécifique. Par ailleurs, l'obtention d'un mycélium stérile chez les chlorophytes appelle à des analyses moléculaires complémentaires (séquençage de l'ITS, par exemple) pour une identification précise (Suryanarayanan,2012). Ces résultats préliminaires confirment le potentiel des algues marines, en particulier des rhodophytes, comme réservoirs d'une diversité fongique encore sous-explorée et d'intérêt biotechnologique potentiel (Godinho *et al.*,2013;Flewelling *et al.*,2015).

2. Test d'activité protéolytique

L'activité protéolytique de sept souches fongiques a été évaluée sur deux milieux gélosés distincts, tous deux à base de lait écrémé. Le premier milieu (Milieu1) correspond à un milieu de lait écrémé non enrichi, tandis que le second (Milieu 2) a été enrichi afin d'optimiser la détection de l'activité enzymatique extracellulaire. La dégradation de la caséine, révélatrice de la production de protéases actives, a été estimée par la mesure du diamètre des halos de clarification (zones d'inhibition ou zones transparentes) autour des colonies fongiques. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 3 : Résultats de criblage primaire sur deux milieux de gélose au lait écrémé non enrichie et gélose au lait écrémé enrichie.

Les isolats testés	Milieu 1	Milieu 2
A1		
A2		

A3		
A4		
A6		
A7		

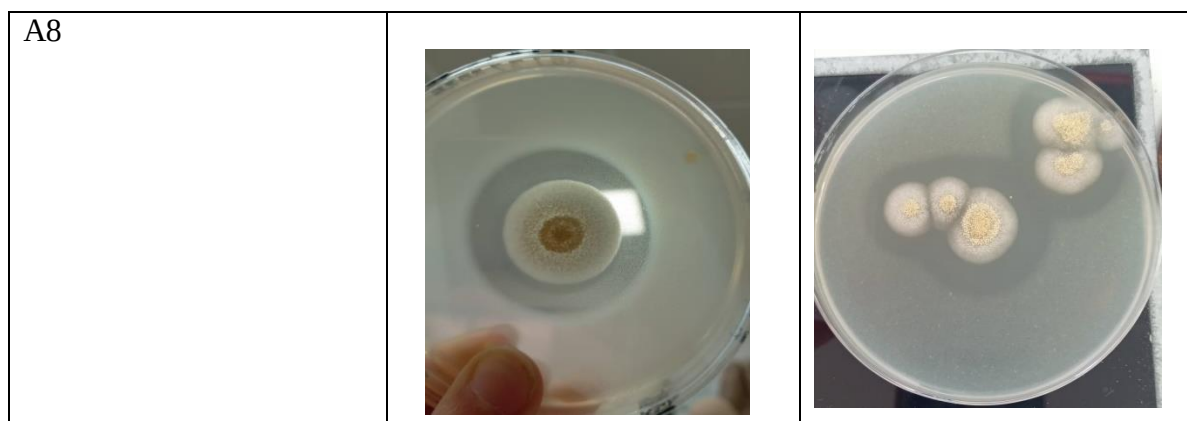


Tableau 4: Diamètre des zones de protéolyse (en mm).

Les isolats	Milieu 1	Milieu 2
A1	0	7
A2	3	0
A3	1	1
A4	0	0
A6	0	0
A7	0	5
A8	10	11

L'analyse des diamètres des halos de protéolyse révèle une grande variabilité de comportement entre les souches :

Aucune zone d'hydrolyse n'a été détectée pour la souche A4, qui n'a présenté aucune croissance sur le milieu non enrichi (0 mm, pas de croissance), alors que sur le milieu enrichi, la souche A4 a montré une absence totale d'activité protéolytique (0 mm) mais avec une croissance normale. La souche A6 n'a montré aucune activité protéolytique ni sur le milieu classique, ni sur le milieu enrichi (0 mm dans les deux cas).

Les souches A1 et A7 ne manifestent une activité protéolytique que sur le milieu enrichi, avec des diamètres de halos respectifs de 7 mm et 5 mm. Aucun halo n'est observé pour ces deux souches sur le milieu non enrichi.

La souche A2 présente une activité uniquement sur le milieu 1, avec un halo mesurant 3 mm, tandis qu'aucune hydrolyse n'est détectée sur le milieu 2 (0 mm).

La souche A3 montre une activité protéolytique faible mais équivalente sur les deux milieux, avec un diamètre de 1 mm dans chaque condition.

Enfin, la souche A8 se distingue par la plus forte activité protéolytique observée, avec des halos respectifs de 10 mm sur le milieu non enrichi et 11 mm sur le milieu enrichi.

- Le criblage primaire sur milieu solide a révélé que cette souche possède une forte capacité d'hydrolyse, avec des diamètres d'halo atteignant 10 mm et 11 mm. Ces résultats prometteurs ont conduit à la sélectionner pour la fermentation submergée.

La souche A8 se distingue par une activité protéolytique élevée et stable sur les deux milieux testés. Ce comportement suggère une production constitutive des protéases, efficace même en l'absence d'enrichissement du milieu. En revanche, les souches A1 et A7 ne présentent une activité détectable que sur le milieu enrichi **voir tableau 4**. Cette observation pourrait refléter un mécanisme d'induction de la sécrétion enzymatique en réponse à des nutriments supplémentaires, tels que les peptones, les sources de carbone ou d'azote. Ce phénomène a été documenté chez *Aspergillus niger*, où l'addition de certains composés organiques active la transcription des gènes codant pour les protéases (Martinez *et al.*,2020).

La souche A4 n'a montré aucune croissance sur le milieu non enrichi, indiquant que ce dernier ne répond pas aux besoins nutritionnels minimaux de cette souche. Sur le milieu enrichi, elle a présenté une croissance normale mais aucune activité protéolytique (0 mm). Plusieurs interprétations peuvent être avancées. Premièrement, cette souche pourrait ne pas sécréter de protéases actives dans les conditions testées, ou bien produire des inhibiteurs enzymatiques. Deuxièmement, une hypothèse alternative et largement documentée est celle de la répression catabolique : la souche A4 utiliserait préférentiellement des sources de carbone ou d'azote facilement assimilables présentes dans le milieu enrichi, ce qui inhiberait l'expression des gènes codant pour les protéases extracellulaires. Ce mécanisme a été décrit chez plusieurs espèces d'*Aspergillus*, où des substrats carbonés simples (glucose, certains acides aminés) répriment la synthèse d'enzymes hydrolytiques (Martinez *et al.*,2020; Sharma *et al.*,2017; Abd El-Aziz *et al.*,2015). Des investigations complémentaires, telles que des cultures en milieu liquide avec des sources de carbone définies, sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

La souche A2 ne produit un halo que sur le milieu 1, un résultat contre-intuitif puisque l'enrichissement est généralement associé à une stimulation de l'activité protéolytique. Une explication potentielle réside dans une modification physico-chimique de la gélose enrichie (texture, précipitation de certains composés) réduisant la visibilité du halo, malgré une activité enzymatique réelle (Dubois et Lefevre,2019).

La souche A3 présente une activité très faible et identique sur les deux milieux (1 mm). Ce profil suggère une production basale de protéases, faiblement inductible par les variations nutritionnelles.

Enfin, l'absence totale d'activité chez A6 sur les deux milieux indique que cette souche ne produit pas de protéases extracellulaires détectables dans les conditions expérimentales employées.

3. Production de protéase en milieu liquide

Suite à l'inoculation d'*Aspergillus terreus* et à la période d'incubation sous agitation, une croissance fongique périphérique distincte a été observée sur les parois internes des flacons de fermentation. Cette biomasse, se présentant sous forme de pellets mycéliens ou de filaments adhérent aux parois, témoigne de l'aptitude de la souche à se développer dans l'ensemble des conditions physicochimiques et nutritionnelles testées (variations de pH, température, sources carbonées et durée d'incubation). Cette observation confirme l'adaptation et la viabilité du métabolisme fongique dans les différents milieux de culture utilisés.



Figure 4 : Croissance mycélienne en milieu de fermentation.

Le protocole de séparation séquentielle mis en œuvre a permis d'obtenir un milieu de culture clarifié, selon les étapes suivantes :

Filtration sur papier Whatman n°1 : élimination de la majeure partie de la biomasse mycélienne macroscopique.

Centrifugation 8 000 tr/min pendant 10 min à 4 °C (Sedrah *et al.*,2021): sédimentation des débris cellulaires résiduels et des spores en suspension. Le surnageant limpide ainsi récolté constitue l'extrait enzymatique brut, contenant l'ensemble des protéases extracellulaires sécrétées par *Aspergillus terreus*.



Figure 5: L'enzyme brute après centrifugation.

Discussion

La croissance périphérique observée dans nos flacons est caractéristique de la morphologie d'*Aspergillus terreus* en fermentation submergée. Ce phénomène résulte de l'agitation orbitale qui, tout en assurant l'homogénéisation et l'oxygénation du milieu, influence directement la structure des pellets fongiques (Bizukojc et Ledakowicz,2015). La morphologie adoptée (pellets ou filaments libres) détermine la viscosité du milieu et, par conséquent, l'efficacité du transfert d'oxygène ainsi que la sécrétion des métabolites secondaires (Ji *et al.*,2009). Nos résultats suggèrent que la croissance périphérique correspond à un compromis optimal entre une viscosité suffisamment faible pour maintenir les échanges gazeux et une surface d'échange active pour la production enzymatique. Toutefois, l'effet du cisaillement mécanique propre à l'agitation orbitale reste à quantifier précisément, car une vitesse excessive pourrait fragmenter les hyphes et réduire la productivité (He *et al.*,2014).

Le maintien d'une température de 4 °C lors de la centrifugation constitue une condition critique pour limiter l'agitation thermique et prévenir la dénaturation des enzymes thermolabiles. Par ailleurs, une vitesse de 8 000 tr/min représente un compromis optimal permettant d'obtenir un surnageant limpide, sans induire de lyse cellulaire des fragments mycéliens résiduels, évitant ainsi toute contamination de l'extrait brut par des enzymes intracellulaires.

(Rao *et al.*,1998) ont montré que la vitesse d'agitation et la température modifient profondément la morphologie du mycélium d'*Aspergillus*, avec des répercussions directes sur le rendement en protéases. En effet, une agitation trop faible limite l'oxygénation du milieu, alors qu'une agitation excessive induit un stress de

cisaillement et une fragmentation hyphale. Ces contraintes conditionnent donc la productivité enzymatique.

La centrifugation réfrigérée constitue la technique de référence pour l'isolement des enzymes protéolytiques brutes d'origine fongique, tel que rapporté par (Sumantha *et al.*,2006) ainsi que (Negi et Banerjee,2010). Ce standard méthodologique confirme la validité du protocole proposé par (Sedrah *et al.*,2021) en matière de préservation de l'intégrité catalytique des enzymes.

4. Mesure de l'activité enzymatique

L'évaluation quantitative de l'activité protéasique de l'extrait enzymatique brut, issu de la culture d'*Aspergillus terreus*, a été réalisée selon le protocole de (Sedrah *et al.*,2021) en utilisant la caséine comme substrat de référence.

La protéase hydrolyse la caséine, libérant des acides aminés dont la tyrosine, qui réagit avec le réactif de Folin-Ciocalteu pour former un chromophore bleu dosé par spectrophotométrie (Cupp-Enyard,2008) un blanc réactif a été utilisé pour la mise à zéro du spectrophotomètre. Les mesures des densités optiques (DO) ont été effectuées à une longueur d'onde de 660 nm.

Les valeurs d'absorbance cinétique obtenues pour les différents paramètres testés sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : Les absorbances obtenues pour chaque paramètre.

Les paramètres	Conditions	Absorbance (660 nm)
PH	9	0,961
	8	1,018
Température	28 °C	0,961
	25 °C	0,399
Durée d'incubation	5j	0,961
	7j	0,718
Source de carbone	Glucose	0,961
	Saccharose	0,718

Une courbe d'étalonnage a été établie à partir de solutions standards de tyrosine (10 à 250 µg/mL). Les absorbances correspondantes sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 : Les absorbances obtenues pour chaque dilution (Merzouk et Akkouda.,2025).

Concentration de tyrosine($\mu\text{g/mL}$)	10	50	100	150	200	250
Absorbance (660 nm)	0,087	0,099	0,421	0,498	0,510	0,539

A partir de la courbe d'étalonnage de la tyrosine (Figure 3), une régression linéaire a été réalisée. L'équation de la droite obtenue est la suivante :

$$y = 0,0021x + 0,0938 \text{ avec } R^2 = 0,823$$

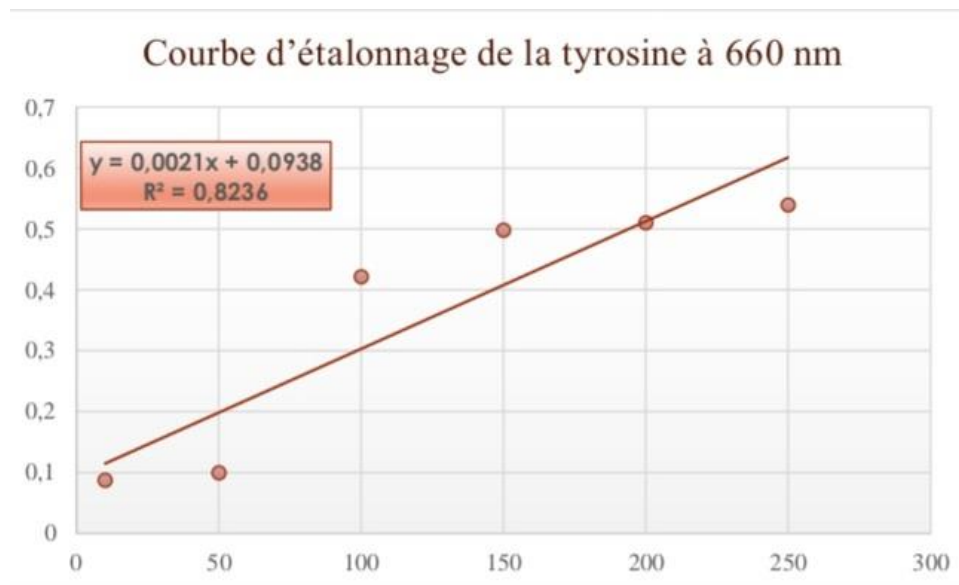


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine à 660 nm (Merzouk et Akkouda.,2025).

Pour évaluer l'effet des conditions de fermentation, les absorbances des échantillons enzymatiques ont été mesurées. Les concentrations en tyrosine libérée correspondantes ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage :

$$\text{Absorbance} = 0,0021 \times [\text{Tyrosine}] + 0,0938$$

Exemple : pour la durée d'incubation.

$$0,718 = 0.0021 \times [\text{tyrosine}] + 0.0938$$

$$[\text{tyrosine}] = \frac{0,718 - 0,0938}{0,0021} = 297,234 \mu\text{g/mL}.$$

Donc, la concentration en tyrosine libérée par l'action enzymatique pour le paramètre de durée d'incubation est : 297,234 $\mu\text{g/mL}$.

L'activité enzymatique exprimée en unités (U), est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μg de tyrosine par minute. L'incubation ayant été réalisée pendant 5 minutes en présence de 1 mL d'enzyme brute (Sedrah *et al.*, 2021), l'activité enzymatique a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité enzymatique U/mL} = \frac{\text{Quantité de tyrosine libérée} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)}{\text{Temps d'incubation (min)}}$$

Pour la durée d'incubation :

$$\text{Activité enzymatique (U/mL)} : \frac{297,234}{5} = 59,447 \text{ U/mL}$$

Les concentrations en tyrosine et les activités enzymatiques des autres conditions ont été déterminées selon la même méthode de calcul. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 7: Concentration en tyrosine et activités enzymatiques obtenues sous les différentes conditions expérimentales étudiées.

Les paramètres	Conditions	Concentration de tyrosine ($\mu\text{g/mL}$)	Activité enzymatique (U/mL)
PH	9	412,95	82,52
	8	440,09	88,018
Température	28 C°	412,95	82,52
	25 C°	145,33	29,06
Durée d'incubation	5j	412,95	82,52
	7j	297,234	59,447
Source de carbone	Glucose	412,95	82,52
	Saccharose	391,52	78,304

Discussion

Effet du pH sur la production de protéases

L'activité enzymatique la plus élevée a été enregistrée à pH 8 (88,018 U/mL), contre 82,52 U/mL au pH de 9, suggérant que le pH optimal pour l'activité enzymatique se situe autour de la neutralité alcaline modérée. Cette observation est en accord avec les données de la littérature. En effet, (Ekedegba *et al.*, 2022) ont rapporté une activité protéasique maximale chez *Aspergillus terreus* à pH 8 (107,90 UI/mL), tandis qu'un pH 9 s'est avéré plus favorable pour *Aspergillus niger*. De même, (Osmolovskiy *et al.*, 2018) ont décrit une activité maximale à pH 8,0 pour les protéases d'*A. terreus*.

- D'un point de vue mécanistique, le pH 9 pourrait être supra-optimal pour la stabilité de l'enzyme, entraînant des modifications conformationnelles au niveau du site actif, voire une dénaturation partielle. La plupart des protéases fongiques alcalines présentent un pH optimum compris entre 7 et 9, avec des variations dépendant de la souche et des conditions de culture. L'amélioration observée à pH 8 indique que la souche étudiée produit une protéase au caractère légèrement alcalin, mais tolérant mal des valeurs plus extrêmes. Ces résultats justifient l'utilisation d'un pH de 8 pour les étapes ultérieures de production enzymatique.

Effet de la température sur la production de protéases

L'incubation à 25°C a entraîné une chute drastique de l'activité protéolytique (29,06 U/mL) par rapport à 28°C (82,52 U/mL). Cette réduction, suggère une sensibilité marquée de la souche aux températures inférieures à son optimum thermique.

- Sur le plan physiologique, une température de 25 °C pourrait ralentir le métabolisme fongique, limitant ainsi la synthèse protéique et la sécrétion enzymatique. La température de 28 °C semble représenter un compromis optimal entre la croissance fongique, l'expression des gènes codant pour les protéases et la stabilité des enzymes produites (Johnvesly et Naik., 2001). La littérature rapporte des optima thermiques variables selon les souches d'*A. terreus* : 30°C (Jyothna et Somashekar., 2017) ou 37°C pour certaines souches alcaliphiles (Sharma *et al.*, 2015). Nos résultats confirment que 28°C est une température adaptée à notre souche et que toute diminution de celle-ci altère significativement la production enzymatique.

Effet de la durée d'incubation sur la production de protéases

L'activité protéasique maximale a été observée après 5 jours d'incubation (82,52 U/mL), avec une diminution notable à 7 jours (59,447 U/mL).

- Ce déclin peut être attribué à une dégradation enzymatique par d'autres protéases extracellulaires, à une répression catabolique liée à l'épuisement des nutriments, ou

encore à l'accumulation de métabolites toxiques en phase de sénescence (Kumar et Takagi.,1999). Notre optimum à 5 jours diffère de celui rapporté par (Ekedegba *et al.*,2022), qui avaient obtenu un pic à 72 heures (3 jours). Cette divergence peut s'expliquer par des différences liées à la souche utilisée, à la composition du milieu de culture ou aux conditions d'aération. Néanmoins, d'autres auteurs ont également rapporté des durées optimales de 5 jours pour des espèces d'*Aspergillus* (Anbu *et al.*,2005). Dans nos conditions expérimentales, la durée de 5 jours reste donc optimale.

Effet de la source de carbone sur la production de protéases

Le remplacement du glucose (82,52 U/mL) par le saccharose (78,304 U/mL) a conduit à une diminution modérée mais notable de l'activité protéasique.

- Bien que (Han *et al.*,2010) aient observé une abondance de la protéase oryzine dans le protéome extracellulaire d'*A. terreus* cultivé en présence de saccharose, nos résultats montrent une préférence pour le glucose. Ce dernier, en tant que, monosaccharide est plus rapidement métabolisé et permet une croissance initiale plus rapide, favorisant ainsi une induction précoce de la machinerie enzymatique (Haq *et al.*,2006). L'écart relativement faible entre les deux sources de carbone suggère cependant que le saccharose reste une source potentiellement exploitable. Dans le cadre de notre protocole témoin, le glucose demeure la source de carbone la plus performante.

Conclusion générale

Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'influence de différents paramètres sur la production de protéases par des souches fongiques marines du genre *Aspergillus*, isolées à partir d'algues marines. Les travaux d'isolement et d'identification ont permis d'identifier trois espèces : *Aspergillus terreus*, *A. flavus* et *A. niger*. Le criblage préliminaire de l'activité protéolytique a montré des différences notables dans les capacités de production de protéases entre les espèces. Parmi celles-ci, *Aspergillus terreus* a présenté l'activité la plus élevée, avec une zone d'hydrolyse mesurant un diamètre de 11 mm, témoignant d'un potentiel enzymatique supérieur à celui des autres isolats- examinés.

L'espèce *Aspergillus terreus* a été sélectionnée pour une étude approfondie de sa production de protéases par fermentation submergée dans différentes conditions. L'activité protéasique mesurée dans l'extrait enzymatique brut a démontré la capacité de la souche à produire des protéases extracellulaires capables de dégrader la caséine, atteignant 88,018 U/mL à 28 °C et à pH 8, en utilisant le glucose comme source de carbone, après 5 jours d'incubation. L'étude a également mis en évidence l'importance de la température, de la durée d'incubation, du pH et de la source de carbone sur la productivité enzymatique. Les différences observées soulignent le rôle crucial de ces paramètres dans la régulation de la biosynthèse des protéases et l'optimisation de leur production.

De plus, les résultats indiquent que l'espèce *Aspergillus terreus* constitué une source prometteuse pour la production de protéases extracellulaires et qu'elle permet d'obtenir un rendement supérieur à celui rapporté par Merzouk et Akkouda (2025). Ces résultats confirment les données de la littérature sur les *Aspergillus* marins et justifient la poursuite de recherches plus approfondies sur leur potentiel de production de cette enzyme, compte tenu de son importance industrielle dans divers secteurs.

Références bibliographique

A

- Abd El-Aziz, A. R., Al-Gendy, A. A., & Fadel, M. (2015). Effect of carbon and nitrogen sources on protease production by *Aspergillus terreus* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Sciences Research*, 11(3), 45-52.
- Akhavan Sepahy, A., & Jabalameli, L. (2011). Effect of culture conditions on the production of an extracellular protease by *Bacillus sp.* isolated from soil sample of Lavizan Jungle Park. *Enzyme Research*, 2011, 219628, 1-7.
- Akram, Z., Asgher, M., & Ahmad, S. Q. (2023). Microbial proteases—robust biocatalytic tools for greener biotechnology. In A. Kumar, M. Bilal, L. F. R. Ferreira, & M. Kumari (Eds.), *Microbial biomolecules: Emerging approach in agriculture, pharmaceuticals and environment management* (p. 405-427).
- Alnahdi, S. (2012). Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus sp.* *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(9), 71-74.
- Anandan, D., Marmer, W. N., & Dudley, R. L. (2007). Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamarii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(5), 339-347.
- Anbu, P., Gopinath, S. C. B., Hilda, A., Lakshmipriya, T., & Annadurai, G. (2005). Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(5-6), 639-647.
- Andrade, V. S., Sarubbo, L. A., Fukushima, K., Miyaji, M., Nishimura, K., & Campos-Takaki, G. M. (2002). Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 106-110.
- Anzani, C., Prandi, B., Tedeschi, T., Baldinelli, C., Sorlini, G., Wierenga, P. A., Dossena, A., & Sforza, S. (2018). Degradation of collagen increases nitrogen solubilisation during enzymatic hydrolysis of fleshing meat. *Waste and Biomass Valorization*, 9(7), 1113-1119.
- Ao, X.-l., Yu, X., Wu, D.-t., Li, C., Zhang, T., Liu, S.-l., Chen, S.-j., He, L., Zhou, K., & Zou, L.-k. (2018). Purification and characterization of neutral protease from *Aspergillus oryzae* Y1 isolated from naturally fermented broad beans. *AMB Express*, 8, 96.
- Ariaeenejad, S., Kavousi, K., Mamaghani, A. S. A., Ghasemitabesh, R., & Hosseini Salekdeh, G. (2022). Simultaneous hydrolysis of various protein-rich industrial wastes by a naturally evolved protease from tannery wastewater microbiota. *Science of the Total Environment*, 815, 152796.
- Ashraf, M., Hussain, N., Baqar, Z., Kumar, A., Ferreira, L. F. R., & Iqbal, H. M. N. (2023). Bioprospecting microbial proteases in various industries/sectors. In A. Kumar, M. Bilal, L. F. R. Ferreira, & M. Kumari (Eds.), *Microbial*

biomolecules: Emerging approach in agriculture, pharmaceuticals and environment management (pp. 301–324).

- Asitok, A. E., Ekpenyong, M. I., Takon, I. S., Antai, S. P., Ogarekpe, N. M., & Antigha, R. E. (2022). Overproduction of a thermo-stable halo-alkaline protease on agro-waste-based optimized medium through alternate combinatorial random mutagenesis of *Stenotrophomonas acidaminiphila*. *Biotechnology Reports*, 35, 00746.
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media* (4th ed.). CRC Press/Taylor & Francis. p. 1575

B

- Bensmail, S. (2012). Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : Purification et caractérisation [Thèse de magistère]. Université M'Hamed Bougara de Boumerdès.
- Bernardeau, M., Hibberd, A. A., Saxer, G., Velayudhan, D. E., Marchal, L., & Vinyeta, E. (2022). O122 intrinsic properties of 3 *Bacillus* spp. strains from animal origin constituent of a direct fed microbials/protease blend having growth performance in pigs fed high fiber diet. *Animal Science Proceedings*, 13, 394–395.
- Bezerra, V. H. S., Cardoso, S. L., Fonseca-Bazzo, Y., Silveira, D., Magalhães, P. O., & Souza, P. M. (2021). Protease Produced by Endophytic Fungi: A Systematic Review. *Molecules*, 26(22), 7062.
- Bizukojć, M., & Ledakowicz, S. (2015). Bioprocess engineering aspects of the cultivation of a lovastatin producer *Aspergillus terreus*. In A. Barredo (Ed.), *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (Vol. 149, p. 133–170).
- Borrelli, R. C., Mennella, C., Barba, F., Russo, M., Russo, G. L., Krome, K., Erbersdobler, H. F., Faist, V., & Fogliano, V. (2003). Characterization of coloured compounds obtained by enzymatic extraction of bakery products. *Food and Chemical Toxicology*, 41(10), 1367–1374.
- Bouacem, K. 2016. Caractérisation de souches bactériennes isolées à partir de sources thermales du Nord-Algérien : Etude des propriétés enzymatiques. Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée, USTHB.
- Bousmia, L. Maba, F. 2021. Les protéases microbiennes : Intérêts biotechnologiques. Mémoire de master, université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie, 44p.
- Braaksma, M., Smilde, A. K., van der Werf, M. J., & Punt, P. J. (2009). The effect of environmental conditions on extracellular protease activity in controlled fermentations of *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 155(10), 3430–3439.
- Bureros, K. J. C., Dizon, E. I., Israel, K. A. C., Abanto, O. D., & Tambalo, F. Z. (2020). Physicochemical and sensory properties of carabeef treated with *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn protease as meat tenderizer. *Journal of Food Science and Technology*, 57(1), 310–318.

C

- Cavasin, M. A., Rhaleb, N.-E., Yang, X.-P., & Carretero, O. A. (2004). Prolyl oligopeptidase is involved in release of the antifibrotic peptide Ac-SDKP. *Hypertension*, 43(5), 1140–1145.
- Cerreti, M., Liburdi, K., Benucci, I., Emiliani Spinelli, S., Lombardelli, C., & Esti, M. (2017). Optimization of pectinase and protease clarification treatment of pomegranate juice. *LWT – Food Science and Technology*, 82, 58–65.
- Christensen, L. F., García-Béjar, B., Bang-Berthelsen, C. H., & Hansen, E. B. (2022). Extracellular microbial proteases with specificity for plant proteins in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 381, 109889.
- Cupi, D., Thorsen, M., Elvig-Jørgensen, S. G., Wulf-Andersen, L., Berti-Sorbara, J., & Cowieson, A. J. (2022). Efficacy and safety profile of a subtilisin protease produced by fermentation in *Bacillus licheniformis* to be used as a feed additive. *Heliyon*, 8,10030.
- Cupp-Enyard, C. (2008). Use of the protease fluorescent detection kit to determine protease activity. *Journal of Visualized Experiments*, (30), e1514.

D

- Dalmaso, G. Z. L., Ferreira, D., & Vermelho, A. B. (2015). Marine extremophiles : A source of hydrolases for biotechnological application. *Marine Drugs*, 13(4), 1925-1965.
- De souza, P. M., Bittencourt, M. L., Caprara, C. C., de Freitas, M., de Almeida, R. P., Silveira, D., Fonseca, Y. M., Ferreira Filho, E. X., Pessoa Junior, A., & Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337–346.
- Devanthi, P. V. P., & Gkatzionis, K. (2019). Soy sauce fermentation: Microorganisms, aroma formation, and process modification. *Food Research International*, 120, 364–374.
- Dos Santos Marinho, J., de Campos Takaki, G. M., de Oliveira Franco, L., Barbosa de Lima, M. A., & Alves da Silva, C. A. (2025). Cheese whey as a sustainable substrate for protease production by *Aspergillus sp.* UCP 1290. *Revista Geama*, 11(1), 12-17.
- Dubois, M., & Lefevre, P. (2019). Influence of culture medium composition on the detection of fungal proteolytic activity. *Mycological Methods*, 8(2), 89-97.

E

- Ehren, J., Morón, B., Martin, E., Bethune, M. T., Gray, G. M., and Khosla, C. (2009). A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. 10.1371.
- Ekedegba, F. E., Ogbonna, A. I., Okoye, C. T., Ogbonna, U. S. A., Onyimba, I. A., & Madu, J. M. (2022). Optimization studies on extracellular protease

production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus* using skim milk casein as substrate. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 25(7), 11–19.

- Ekedegba, O. O., Nwachukwu, I. N., & Udengwu, O. S. (2022). Optimization of protease production from *Aspergillus terreus* isolated from cassava peel dumpsite. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 39(1), 10-18.
- El-Ghonemy, D. H., and Ali, T. H. (2021). Effective bioconversion of feather-waste keratin by thermo-surfactant stable alkaline keratinase produced from *Aspergillus sp.* DHE7 with promising biotechnological application in detergent formulations. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 35:102052.
- Espejo, F. (2021). Role of commercial enzymes in wine production: a critical review of recent research. *J. Food Sci. Technol.* 58, 9–21.

F

- Flewelling, A. J., Currie, J., Gray, C. A., & Johnson, J. A. (2015). Fungal diversity associated with macroalgae from the Western North Atlantic. *Botanica Marina*, 58(1), 45-55.

G

- Godinho, V. M., Furbino, L. E., Santiago, I. F., Pellizzari, F. M., Yokoya, N. S., Pupo, D., & Rosa, C. A. (2013). Diversity and biotechnological potential of fungi associated with marine macroalgae. *Fungal Ecology*, 6(6), 500-511.
- Gu, M., Hong, T., Ma, Y., Xi, J., Zhao, Q., Xu, D., et al. (2022). Effects of a commercial peptidase on rheology, microstructure, gluten properties of wheat dough and bread quality. *LWT – Food Science and Technology*, 160, 113266.
- Guo, Y., Tu, T., Yuan, P., Wang, Y., Ren, Y., Yao, B., & Luo, H. (2019). High-level expression and characterization of a novel aspartic protease from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 and its potential application in juice clarification. *Food Chemistry*, 281, 197–203.

H

- Hamada, S., Suzuki, K., Aoki, N., & Suzuki, Y. (2013). Improvements in the qualities of gluten-free bread after using a protease obtained from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Cereal Science*, 57(1), 91–97.
- Han, S. H., Lee, K. S., Lee, S. J., Kim, J. H., & Kim, S. U. (2010). Identification and characterization of oryzin, a serine protease from *Aspergillus terreus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(2), 339-345.
- Haq, I. U., Mukhtar, H., & Umber, H. (2006). Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 1(2), 23-28.

- Hasan, M. J., Haque, P., & Rahman, M. M. (2022). Protease enzyme based cleaner leather processing: A review. *Journal of Cleaner Production*, 365, 132826.
- Hassan, M. A., Abol-Fotouh, D., Omer, A. M., Tamer, M. T., & Abbas, E. (2020). Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 567–583.
- He, C., Zhang, X., Chen, X., & He, Y. (2014). Relationship between morphology and itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 24(2), 1-9.
- Hellmuth, K. (2006). Industrial scale production of chymosin with *Aspergillus niger*. *Microbial Cell Factories*, 5(Suppl 1), S31.

I

- Ibrahim, S. R. M., Mohamed, S. G. A., Alsaadi, B. H., Althubyani, M. M., Awari, Z. I., Hussein, H. G. A., Aljohani, A. A., Albasri, J. F., Faraj, S. A., & Mohamed, G. A. (2023). Secondary metabolites, biological activities, and industrial and biotechnological importance of *Aspergillus sydowii*. *Marine Drugs*, 21(8), 441.
- Ikram-Ul-Haq, & Mukhtar, H. (2007). Biosynthesis of acid proteases by *Penicillium griseoroseum* IH-02 in solid-state fermentation. *Pakistan Journal of Botany*, 39(7), 2717–2724.

J

- Jia, Z., Zhang, X., & Cao, X. (2009). Effects of carbon sources on fungal morphology and lovastatin biosynthesis by submerged cultivation of *Aspergillus terreus*. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 4(5), 672–677.
- Johnvesly, B., & Naik, G. R. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99. *Process Biochemistry*, 36(12), 1243-1249.
- Jones, E. B. G. (2011). Fifty years of marine mycology. *Fungal Diversity*, 50(1), 73-112.
- Jyothna, N. V., & Somashekar, D. (2017). Production and optimization of protease from *Aspergillus terreus* using solid state fermentation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 3221–3230.

K

- Kalisz, H. M. (1988). Microbial proteinases. In A. Fiechter (Ed.), *Enzyme studies (Advances in biochemical engineering/biotechnology, Vol. 36, pp. 1–65)*.

- Kamat, S., Kumari, M., Taritla, S., & Jayabaskaran, C. (2020). Endophytic fungi of marine alga from Konkan coast, India—A rich source of bioactive material. *Frontiers in Marine Science*, 7, 31.
- Katz, M. E., Evans, C. J., Heagney, E. E., vanKuyk, P. A., Kelly, J. M., & Cheetham, B. F. (2009). Mutations in genes encoding sorting nexins alter production of intracellular and extracellular proteases in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 181(4), 1239–1247.
- Kedjebo, K. B. D., Guehi, T. S., Medie, A. N., & Fankroma, M. F. D. (2022). Identification of molds strains associated with some cereals and oils seeds and their by-products in selected municipalities of Côte d'Ivoire. *American Journal of Food Science and Technology*, 10(4), 162-171.
- Kranthi VS, Rao DM, Jaganmohan P (2012) Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. *Int J Microbiol Res* 3:12–15.
- Kumar, C. G., & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases :From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17(7), 561-594.
- Kumar, C. G., Malik, R. K., & Kumar, T. M. P. (1998). Novel enzyme-based detergents: An Indian perspective. *Current Science*, 75, 1312–1318.
- Kumar, N. S., Devi, P. S. S., & Nair, A. S. (2016). A review on microbial proteases. *International Journal of Advanced Research*, 4(7), 2048–2053.
- Kumari, M., Taritla, S., Sharma, A., & Jayabaskaran, C. (2018). Antiproliferative and antioxidative bioactive compounds in extracts of marine-derived endophytic fungus *Talaromyces purpureogenus*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1777.

L

- Landbo, A. K. R., Pinelo, M., Vikbjerg, A. F., Let, M. B., & Meyer, A. S. (2006). Protease-assisted clarification of black currant juice: Synergy with other clarifying agents and effects on the phenol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6554–6563.
- Lasa, I., & Berenguer, J. (1993). Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. *Microbiología*, 9, 77–89.
- Li, J., Liu, B., Feng, X., Zhang, M., Ding, T., Zhao, Y., et al. (2023). Comparative proteome and volatile metabolome analysis of *Aspergillus oryzae* 3.042 and *Aspergillus sojae* 3.495 during koji fermentation. *Food Research International*, 165, 112527.
- Li, X., Wang, L., Jiang, P., Zhu, Y., Zhang, W., Li, R., et al. (2023). The effect of wheat bran dietary fibre and raw wheat bran on the flour and dough properties: A comparative study. *LWT – Food Science and Technology*, 173, 114304.

M

- Macchione, M. M., Merheb, C. W., Gomes, E., & Da Silva, R. (2008). Protease production by different thermophilic fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146(1-3), 223–230.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., & Bhat, M. K. (2000). Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 461–488.
- Malathi, S., & Chakraborty, R. (1991). Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 712–716.
- Mandeel, Q. A. (2006). Biodiversity of the genus *Fusarium* in saline soil habitats. *Journal of Basic Microbiology*, 46(6), 480–494.
- Martinez, C., Gomez, F., & Rodriguez, L. (2020). Induction of extracellular proteases by nitrogen and carbon sources in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 2101–2112.
- Matkawala, F., Nighojkar, S., Kumar, A., & Nighojkar, A. (2019). Enhanced production of alkaline protease by *Neocosmospora* sp. N1 using custard apple seed powder as inducer and its application for stain removal and dehairing. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101310.
- Merzouk, I., & Akkouda, A. (2025). Production de protéase par *Aspergillus terreus* endophyte des algues marines. Mémoire de master, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, Algérie.
- Mikhailova, A. G., Khairullin, R. F., Demidyuk, I. V., Kostrov, S. V., Grinberg, N. V., Burova, T. V., Grinberg, V. Y., & Rumsh, L. D. (2014). Cloning, sequencing, expression, and characterization of thermostability of oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans*, a novel psychrophilic protease. *Protein Expression and Purification*, 93, 63–76.
- Mikołajczak, B., Iwańska, E., Szychaj, A., Danyluk, B., Montowska, M., Grześ, B., Banach, J. K., Żywica, R., & Pospiech, E. (2019). An analysis of the influence of various tenderizing treatments on the tenderness of meat from Polish Holstein-Friesian bulls and the course of changes in collagen. *Meat Science*, 158, 107906.
- Mokashe, N., Chaudhari, B., & Patil, U. (2018). Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 493–522.
- Mótyán, J. A., Tóth, F., & Tőzsér, J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3, 923–942.

N

- Negi, S., & Banerjee, R. (2010). Optimization of extraction and purification of glucoamylase and protease produced by *Aspergillus* species in a single fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(2), 247–253.

- Noman, A., Wang, Y., Zhang, C., Yin, L., & Abed, S. M. (2022). Fractionation and purification of antioxidant peptides from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) protein hydrolysates prepared using papain and alcalase 2.4L. *Arabian Journal of Chemistry*, 15, 104368.

O

- O'Donnell, D., Wang, L., Xu, J., Ridgway, D., Gu, T., & Moo-Young, M. (2001). Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. *Biochemical Engineering Journal*, 8(3), 187–193
- Ogawa, A., Yasuhara, A., Tanaka, T., Sakiyama, T., & Nakanishi, K. (1995). Production of neutral protease by membrane-surface liquid culture of *Aspergillus oryzae* IAM2704. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(1), 35–40.
- Ogino, H., Otsubo, T., & Ishikawa, H. (2008). Screening, purification, and characterization of a leather-degrading protease. *Biochemical Engineering Journal*, 38, 234–240.
- Oliveira, T. B., Gomes, E., & Rodrigues, A. (2015). Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy. *Extremophiles*, 19, 31–37.
- Oren, A. (2010). Applications industrielles et environnementales des micro-organismes halophiles. *Environmental Technology*, 31, 825–834.
- Osmolovskiy, A. A., Kreyer, V. G., Baranova, N. A., & Egorov, N. S. (2018). Protease complex of *Aspergillus terreus*: Isolation, purification and properties. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 73(1), 28–33

P

- Pati, S., & Samantaray, D. P. (2022). Enzymes in brewing and wine industries. In A. D. Tripathi, K. K. Darani, & S. K. Srivastava (Eds.), *Novel food grade enzymes* (pp. 165–181).
- Paul, T., Jana, A., Mandal, A. K., Mandal, A., Das Mohapatra, P. K., & Mondal, K. C. (2016). Bacterial keratinolytic protease, imminent starter for NextGen leather and detergent industries. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 3, 8–22.
- Pinelo, M., Zeuner, B., & Meyer, A. S. (2010). Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing*, 88, 259–265.
- Plemenitaš, A., Lenassi, M., Konte, T., Kejžar, A., Zajc, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: A molecular perspective. *Frontiers in Microbiology*, 5, 199.

- Prates, J. A. M., Ribeiro, A. M. R., & Correia, A. A. D. (2001). Role of cysteine endopeptidases (EC 3.4.22) in rabbit meat tenderisation and some related changes. *Meat Science*, 57, 283–290.
- Purushothaman, K., Bhat, S. K., Singh, S. A., Marathe, G. K., & Appu Rao, A. G. (2019). Aspartic protease from *Aspergillus niger*: Molecular characterization and interaction with pepstatin A. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 199–212.

Q

- Qihe, C., Guoqing, H., Yingchun, J., and Hui, N. (2006). Effects of elastase from a *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *Food Chemistry*, 98, 624-629.

R

- Raghu Ram, M., & Yepuru, S. K. (2018). Production of alkaline protease from *Aspergillus oryzae* isolated from seashore of Bay of Bengal. *Journal of Applied and Natural Science*, 10(4), 1210–1215.
- Rampelotto, P. H. (2013). Extremophiles and extreme environments. *Life*, 3(3), 482-485.
- Rani, C., & Panneerselvam, A. (2010). Enzyme production by *Aspergillus niger* isolated from marine soil. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 4(2), 785-790.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597–635.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597-635.
- Razaq, S. A., Bahiru, T., Swarna, J., & Amit, K. J. (2023). An overview of industrial enzymes in beverage production and processing. In *Value-addition in beverages through enzyme technology*, 1-26.
- Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2011). MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 40, 353-360.
- Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2011). MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 40, 353–360.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Bioengineered*, 10(1), 259-270.
- Reddy, N., Deekonda, V., Seshagiri, S., Reddy, R., & Gangula, A. K. (2022). Production, characterization and applications of proteases produced by

Bacillus licheniformis, *Acinetobacter pittii* and *Aspergillus niger* using neem seed oil cake as the substrate. *Industrial Crops and Products*, 187, 115403.

- Roberts, M. F. (2005). Compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1(1), 5.

S

- Sangeetha, J., Unnikrishnan, R., Jasmin, H., & Steffi, S. M. (2020). Isolation and morphological identification of culturable endophytic fungal species from mangrove ecosystem. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 8(3), 128–134.
- Sedrah, Z. T., Alshamary, E. I., & Nassri, S. Kh. (2021). Isolation and identification of alkaline protease producing *Aspergillus niger* from Iraqi soils. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 761(1), 012117.
- Sethia, K. (2016). Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus*. *Journal of Taibah University for Science*, 10(5), 571–583.
- Sharma, K. M., Kumar, R., Panwar, S., & Kumar, A. (2017). Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15, 115–126.
- Siala, R., Sellami-Kamoun, A., Hajji, M., Abid, I., Gharsallah, N., & Nasri, M. (2012). Optimization of acid protease production by *Aspergillus niger* I1 on shrimp peptone using statistical experimental design. *The Scientific World Journal*, 2012, 1-6.
- Snyman, C., Theron, L. W., & Divol, B. (2019). Understanding the regulation of extracellular protease gene expression in fungi: A key step towards their biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(14), 5517–5532.
- Srilakshmi, J., Madhavi, J., Lavanya, S., & Ammani, K. (2015). Commercial potential of fungal protease: Past, present and future prospects. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2, 218–234.
- Srivastava, B., Khatri, M., Singh, G., & Arya, S. K. (2020). Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and eco-friendly approach for industrial applications. *Journal of Cleaner Production*, 252, 119847.
- Sumantha, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial applications of food-grade proteases: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 211–220.
- Sun, X., Wu, S., Li, W., Koksel, F., Du, Y., Sun, L., et al. (2023). The effects of cooperative fermentation by yeast and lactic acid bacteria on dough rheology and gas retention: A review. *Food Hydrocolloids*, 135, 108212.
- Suryanarayanan, T. S. (2012). Fungal endosymbionts of seaweeds. In C. Raghukumar (Ed.), *Biology of marine fungi* (pp. 53–69).
- Szeltner, Z., Polgar, L., 2008. Structure, function and biological relevance of prolyloligopeptidase. *Current Protein and Peptide Science*, 9(1), 96-107.

T

- Tanwar, M., Debnath, M., Debnath, S., Sharma, P., Mukhopadhyay, A., Kakar, N., & Ramakrishna, S. (2022). Exploring the utility of nanoprotease as environmentally friendly benign laundry detergent fabric cleaner. *Journal of Cleaner Production*, 334, 130243.
- Theron, L. W., & Divol, B. (2014). Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8853–8868.
- Thomas, A. R., Gondoza, H., Hoffman, L. C., Oosthuizen, V., & Naudé, R. J. (2004). The roles of the proteasome, and cathepsins B, L, H and D, in ostrich meat tenderization. *Meat Sci.* 67, 113–120.
- Tian, J., Xu, Z., Long, X., Tian, Y., & Shi, B. (2019). High-expression keratinase by *Bacillus subtilis* SCK6 for enzymatic dehairing of goatskins. *Int. J. Biol. Macromol.* 135, 119–126.
- Trincone, A. (2011). Marine biocatalysts : Enzymatic features and applications. *Marine Drugs*, 9(4), 478-499.
- Tsuchiya, K., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., & Tamura, G. (1993). Secretion of calf chymosin from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 327–332.

U

- U.S. Food and Drug Administration. (2018, January 4). Microorganisms & microbial-derived ingredients used in food (partial list).

V

- Vallet, M., Chong, Y. M., & Pohnert, G. (2018). Chemically-mediated interactions between macroalgae and their associated fungi. *Frontiers in Marine Science*, 5, 176.
- Van den Hombergh, J. P. T. W., van de Vondervoort, P. J. I., Fraissinet-Tachet, L., & Visser, J. (1997). *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: The problem of proteases. *Trends in Biotechnology*, 15(7), 256–263.
- Van der Hoorn, R. A. L. (2008). Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 191–223.
- Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., & Singh, S. A. (2009). Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114(2), 402–407.
- Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., & Singh, S. A. (2010). Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: Optimization of process parameters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(2), 129–138.

- Vojcic, L., Pitzler, C., Körfer, G., Jakob, F., Martinez, R., Maurer, K.-H., & Schwaneberg, U. (2015). Advances in protease engineering for laundry detergents. *New Biotechnology*, 32(6), 629–634.

W

- Wang, H., Li, Y.-Z., Sun, Y.-Y., & Dong, C.-M. (2025). Classification, expression systems, structure, functions, and applications of proteases. *Life Research*, 8(4), 23.
- Ward, O. P. (2011). Proteases. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive biotechnology* (2nd ed., Vol. 3, pp. 604–615).
- Wilson, S. A., Young, O. A., Coolbear, T., & Daniel, R. M. (1992). The use of proteases from extreme thermophiles for meat tenderisation. *Meat Sci.* 32, 93–103.
- Wu, J., Ren, L., Zhao, N., Wu, T., Liu, R., Sui, W., et al. (2022). Solid-state fermentation by *Rhizopus oryzae* improves flavor of wheat bran for application in food. *J. Cereal Sci.* 107:103536.
- Wu, T. Y., Mohammad, A. W., Jahim, J. M., & Anuar, N. (2006). Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(6), 1223–1229.

X

- Xu, D., Guan, W., Wu, F., Jin, Y., Yang, N., Jin, Z., et al. (2022). Improvement of baked wheat chips quality by protease-mediated enzymatic hydrolysis of wheat flour. *Food Sci. Tech.* 157:113043.
- Xu, D., Li, C., Zhao, M., Fengc, Y., Sun, L., and Wang, Y. (2013). Assessment on the improvement of soy sauce fermentation by *Aspergillus oryzae* HG76. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2, 344–351.

Y

- Yang, F.-C., & Lin, I.-H. (1998). Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(6), 397–402.
- Yao, H., Liu, S., Chang, R., Liu, T., Ma, D., Han, X., Lin, C., Zhou, Z., & Mao, J. (2024). Purification, characterisation and visualisation of soybean protein hydrolysis by aspergillopepsin I from mangrove *Aspergillus tubingensis*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 191, 105798.

Z

- Zadeike, D., Jukonyte, R., Juodeikiene, G., Bartkiene, E., and Valatkeviciene, Z. (2018). Comparative study of ciabatta crust crispness through acoustic and

- mechanical methods: effects of wheat malt and protease on dough rheology and crust crispness retention during storage. *Food Sci. Tech.* 89, 110–116.
- Zhai, W., Li, X., Duan, X., Gou, C., Wang, L., and Gao, Y. (2022). Development of a microbial protease for composting swine carcasses, optimization of its production and elucidation of its catalytic hydrolysis mechanism. *BMC Biotechnol.* 22:36.
 - Zhang, N., Huang, P. H., Wang, P., Yu, Y. Y., Zhou, M., and Wang, Q. (2022). Combined cutinase and keratinolytic enzyme to endow improved shrink-resistance to wool fabric. *Fiber Polym.* 23, 985–992.
 - Zhao, Y., Zhao, X., Sun-Waterhouse, D., Ivan Neil Waterhouse, G., Zhao, M., Zhang, J., et al. (2020). Two-stage selective enzymatic hydrolysis generates protein hydrolysates rich in Asn-pro and ala-his for enhancing taste attributes of soy sauce. *Food Chem.* 345:128803.
 - Zuccaro, A., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Kohlmeyer, J., Draeger, S., & Mitchell, J. I. (2008). Fungal communities of marine macroalgae from the Baltic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 88(3), 517-526.
 - Zucconi, L.; Pagano, S.; Fenice, M.; Selbmann, L.; Tosi, S.; Onofri, S. Growth temperature preferences of fungal strains from Victoria Land, Antarctica. *Polar Biol.* 1996, 16, 53–61.

Les Annexes

Annexe 01

● Les produits utilisés

L'eau distillée.	Agar.	Carbonate de sodium.
L'eau de mer filtrée.	Peptone.	Bicarbonate de sodium.
L'eau d'javel.	Glucose.	Sulfate de magnésium hydraté.
Ethanol.	Chloramphénicol.	Phosphate monopotassique
L'ait écrémé.	Extrait de levure.	Phosphate dipotassique
Folin-Ciocalteu.	Caséine.	Acide trichloroacétique.

● Matériels non biologique

Les boîtes Pétris.	Tube à essais stériles.	Pipettes pasteurs	Mortier.
Ance de platine.	Flacons stériles.	Portoir.	Ph mètre.
Les lames + lamelles.	Ciseau.	Barreau magnétique.	Papier film alimentaire .
Erlenmeyer.	Pince .	Micropipettes et embouts.	Les cuves .
Entonnoir.	Couteau.	Bécher.	Papier Whatman n°1.
Eprouvette graduée .	Surings.	Papier aluminium.	Papier absorbante.

● L'appareillage de laboratoire

- Bec bunsen.
- Plaque chauffante.
- Bain-marie.
- Incubateur agité.
- Balance précise.
- Etuve.
- Autoclave.
- Microscope optique.
- Spectrophotométrie.
- Centrifugeuse réfrigérée.

Annexe 02

Milieu Sabouraud + chloramphénicol à l'eau de mer

Peptone.....10g

Glucose.....20g

Chloramphénicol.....0.5g

Eau de mer filtré et stérilisé 1L

PH :.....6

Gélose au lait écrémé enrichi (Atlas,2010).(Sedrah *et al.*,2021)

Extrait de levure 3g

Peptone 5 g

Agar.....15 g

Lait écrémé 250 mL

Eau distillée 850 ml

Annexe 03

● Tampon Carbonate-Bicarbonate 0,1 M (Bioquest,2025)

Bicarbonate de sodium 1.05 g

Carbonate de Sodium 9.274 g

L'eau distillée 1L

PH.....9.5

Annexe 04

Solution acide trichloroacétique 10%

Acide trichloroacétique.....10g

L'eau distillée.....100 ml

Annexe 05

Solution de carbonate de sodium 0.4 M

Carbonate de sodium.....4.24g

L'eau distillée.....100ml