



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département: Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de

Master Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

**Spécialité : Biotechnologie Fongique / Fermentation et production de substances
fongiques**

Intitulé :

***Production de la protéase alcaline sur milieu solide par des
moisissures isolées de source thermale. Utilisation de déchets de
tomate comme substrat de fermentation***

Présenté et soutenu par :

Le : 19/06/2017

ABDOU Mohamed

MEBAREK AZZAM Ishak

Devant le Jury d'évaluation:

Présidente du jury: Mme. LEGHLIMI H.

M. C. - UFM Constantine

Rapporteur : Melle. BELMESSIKH A.

M. A. - UFM Constantine

Examinatrice : Melle. ABDELAZIZ W.

M. A. - UFM Constantine

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions ALLAH, le tout puissant qui nous avoir accordé la santé, la volonté et la patience pour bien achever ce modeste travail.

En premier lieu, nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre honorable encadreur Melle BELMESSIKH Aicha, Maître Assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté de diriger ce mémoire. Sa rigueur scientifique, sa disponibilité, ses précieuses directives, son soutien et sa patience tout au long de la réalisation de ce travail, ont été pour nous une aide inestimable. Qu'elle trouve dans ce travail le témoignage de notre sincère gratitude et profond respect.

Nous tenons à remercier vivement, Mme LEGHLIMI Hind, Maître de conférences à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Nos remerciements s'adressent également à Melle ABDELAZIZ Ouided, Maître Assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine, qui a accepté d'examiner notre travail avec bienveillance.

Nous remercions aussi l'ensemble du personnel de laboratoires de Microbiologie au (RDC), de Biochimie et de Biologie et Environnement au biopôle de Chaab-Ersass, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine. Nous sommes très reconnaissants pour l'aide et l'appui technique durant toute la période de réalisation de ce travail.

Nos remerciements vont également à toute l'équipe des laboratoires de SARL PAHRMIDAL. ns, leur laboratoire du Contrôle Qualité départements de microbiologie et de physico-chimie, notamment le RCQ Monsieur NOUARA Imed, qui nous ont accueillis et mis à notre disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce mémoire tout au long de la période de recherche. Qu'ils trouvent ici notre respect et notre reconnaissance.

En fin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidé et ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Tout d'abord, je remercie Allah, le tout puissant de m'avoir accordé la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce travail.

Ce mémoire est dédié ;

À mes très chers parents; quoi que je fasse, je ne pourrais pas leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivé là c'est grâce à eux. Rien au monde ne vaut les efforts fournis par vous jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Qu'Allah vous protège et procure bonne santé et longue vie.

À Ma grand - mère **Khokha** ; Votre prière, bénédiction, conseils et soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie. Qu'Allah vous accorde bonne santé et longue vie.

À ma chère femme ; tes sacrifices, ta patience, ton soutien moral et ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Qu'Allah réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

À mon cher petit **Adem Aymen** ; Tu es l'enfant que j'ai toujours rêvé d'avoir, je t'aime beaucoup. Qu'Allah te protège et te garde pour nous.

À mes frères et sœurs.

À toute les membres de ma famille.

À Mes camarades de promotion.

À mon encadreur Melle **BELMESSIKH Aicha**.

À tous ce qui ont enseigné moi au long de ma vie scolaire.

À tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer.

À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.....

Dédicace

Je remercie, tout d'abord, Dieu le tout puissant

Je dédie ce mémoire à ;

*Ma **chère mère** qui s'est tant battue pour mon bien être,
pour sa bienveillance et sa force qu'elle me transmet pour traverser les plus difficiles
épreuves. **À mon père** pour sa tendresse et sa patience.*

Que dieu les garde pour moi.

À mes sœurs

***Samer** et*

***Kamer**, ainsi qu'à mes*

*Frères **Bourhane** et **Oussama**.*

À tous amis l'ancienne combattante et toute ma famille.

*À mon Encadreur Guerrier Melle **Belmessikh Aicha** pour sa patience,
sa compréhension et son soutien sans précédent, tout le respect et l'appréciation
pour elle.*

*À tout le personnel de SARL PHARMIDAL .ns pour leur aide inestimable, notamment
le RCQ **NOUARA Imed** pour son soutien et compréhension, un grand salut pour lui.*

MEBAREK AZZAM Ishak

Table des matières

Introduction.....	1
PREMIERE PARTIE : Synthèse Bibliographique	
I. Les moisissures.....	3
1. Définition et caractéristiques générales.....	3
2. Organes de reproduction.....	4
3. Besoins de croissance et activités biologiques.....	4
3.1. Éléments nutritifs.....	4
3.2. Facteurs physicochimiques.....	5
➤ Température.....	5
➤ Humidité	5
➤ pH	6
➤ Oxygène.....	6
➤ Lumière.....	6
➤ Activité en eau (<i>a_w</i>)	6
4. Tolérance des mycètes à la haute température.....	7
II. Les protéases.....	8
1. Généralités et marché des enzymes.....	8
2. Les enzymes protéolytiques.....	9
3. Sources des protéases.....	9
3.1. Protéases végétales.....	9
3.2. Protéases animales.....	10
3.3. Protéases microbiennes.....	10
4. Classification des protéases.....	10
5. Les protéases alcalines.....	11

5.1. Production des protéases alcalines.....	11
5.2. Augmentation du rendement de production.....	12
5.3. Applications des protéases alcalines.....	12
5.3.1. Industrie du détergent.....	12
5.3.2. Tannerie.....	13
5.3.3. Récupération de l'argent.....	13
5.3.4. Usages médicaux.....	13
5.3.5. Industrie alimentaire.....	13
5.3.6. Traitement des déchets	14
5.3.7. Industrie chimique.....	14
III.La Fermentation.....	15
1. Nature de fermentation.....	15
1.1. Fermentation sur milieu liquide (FML).....	15
1.2. Fermentation sur milieu solide (FMS).....	15
2. Avantages et inconvénients de la fermentation solide.....	16
3. Les micro-organismes utilisés pour la fermentation solide.....	17
IV.Les déchets de tomate.....	18
1. Les déchets de tomate comme ressource végétale.....	18
1.1. Définitions.....	18
1.2. Production mondiale de la tomate.....	18
1.3. Tomate industrielle en Algérie.....	19
1.4. Les sous-produits de la tomate transformée.....	19
1.5. Utilisations de déchets de tomate.....	20
➤ Alimentation.....	21
➤ Agent antioxydant.....	21
➤ Production d'enzymes.....	22
➤ Production d'huiles.....	22
➤ Traitement de diarrhée.....	22
2. Fermentation des déchets de tomate.....	22

DEUXIEME PARTIE : Partie Pratique

I. Matériel et Méthodes.....	25
Présentation de la partie pratique de notre travail.....	25
1. Origine des souches fongiques.....	25
1.1. Réactivation des souches.....	25
1.2. Conservation	25
1.3. Préparation de l'inoculum.....	26
2. Méthode de fermentation.....	26
2.1. Substrat de fermentation.....	26
2.2. Préparation du milieu de culture.....	27
2.3. Conduite de la fermentation.....	27
3. Méthode de dosage de l'activité protéolytique.....	28
3.1. Principe.....	28
3.2. Réaction enzymatique.....	29
3.3. Protocole de dosage.....	29
4. Test d'optimisation du milieu de culture.....	30
II. Résultats et discussion.....	31
1. Résultats des fermentations.....	31
1.1. Résultats du pH.....	33
1.2. Résultats de l'activité protéolytique.....	34
1.3. Effet de la température sur l'activité protéolytique produite.....	37
2. Résultats du test d'optimisation du milieu de culture.....	39
Conclusion générale.....	42
Références bibliographiques.....	44
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

PDA : Potato Dextrose Agar.

TCA : TriChloroacetic Acid.

pH : potentiel d'Hydrogène.

°C : Degré Celsius.

g : gramme.

µg : microgramme.

rpm : rotation par minute.

U : Unité.

ml : millilitre.

mm : millimètre

nm : nanomètre.

L : litre.

E.C.: Enzyme Commission.

I.U.B.: International Union of Biochemistry.

aw: Activity of Water.

N: Normalité.

M : Molarité.

FML : Fermentation sur milieu liquide.

FMS : Fermentation sur milieu solide.

Tris-HCl : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane hydrochloride.

Liste des figures

	Pages
Figure 1 : Distribution des ventes des enzymes.....	8
Figure 2 : Les liaisons peptidiques (entre un azote en bleu et un carbone en vert) sont hydrolysées par les protéases.....	9
Figure 3: Production mondiale de la tomate en 2010 (Bergougnoux, 2013)..	19
Figure 4 : Photos des cultures des neuf (09) souches fongiques utilisées...	24
Figure 5 : Réalisation des fermentations dans des erlenmeyers de 250 ml pour les quatre (04) températures étudiées : 30°C, 35°C, 40°C et 45°C.....	28
Figure 6 : Résultats de l'activité protéasique pour les souches cultivées sous les quatre températures.....	36
Figure 7: Courbes représentant l'effet de la température sur l'activité protéolytique chez les neuf souches testées.....	38
Figure 8 : Effet de la composition du milieu de culture sur l'activité protéolytique.....	38

Liste des tableaux

	Pages
Tableau 1 : Catégories de moisissures selon la température de développement.....	5
Tableau 2 : Exemples des protéases microbiennes.....	10
Tableau 3 : Classification des protéases.....	11
Tableau 4 : Composition chimique de déchets de tomates.....	20
Tableau 5 : Résultats du pH et de l'activité protéolytique à 30°C.....	31
Tableau 6 : Résultats du pH et de l'activité protéolytique à 35°C.....	32
Tableau 7 : Résultats du pH et de l'activité protéolytique à 40°C.....	32
Tableau 8 : Résultats du pH et de l'activité protéolytique à 45°C.....	33
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des résultats du pH.....	34

Introduction

Introduction

Aujourd'hui, les microorganismes jouent un rôle primordial dans plusieurs domaines industriels (chimiques, pharmaceutiques et agroalimentaire). Cependant, les souches fongiques sont considérées comme les microorganismes les plus importants en biotechnologies pour leur fort potentiel de développement. Dans ce contexte, les moisissures prennent une bonne place dans divers secteurs de bioindustrie à savoir production d'enzymes, antibiotiques, hormones et vitamines, etc.

Ces microorganismes peuvent cohabiter dans des environnements extrêmes où les conditions de vie sont particulières : température et pression élevées, pH acides... En effet, ces organismes représentent une importante source à exploiter pour développer des procédés biotechnologiques nouveaux, mais aussi pour comprendre les mécanismes qui permettent aux biomolécules d'être stables et actives dans des conditions extrêmes. Ils peuvent, par exemple, fournir des enzymes thermostables pour des applications dans les procédés industriels qui exigent l'emploi d'enzymes spécifiques et thermostables, non dénaturés à des températures supérieures ou égale à 70°C (Bhat, 2000; Peciulyte, 2007).

Parmi les enzymes hydrolytiques les plus vitales, les protéases, ces dernières occupent une position centrale ; elles représentent environ 60 % du marché global des enzymes (Mahajan et Badgujar, 2010) et offrent de nombreuses possibilités d'utilisation en thérapie (plusieurs études cliniques rapportent leur application en oncologie), en industries alimentaires (panification, brasserie, fromagerie, attendrissage de la viande, ...), en tannerie, en cosmétique, dans les détergents, etc. (Vishwanatha et *al.*, 2010).

Les protéases alcalines sont particulièrement appropriées pour les applications industrielles en raison de leur grande stabilité et activité sous des conditions difficiles telles que température élevée, pH alcalin et en présence d'agents tensio-actifs ou des agents oxydants (Abidi et *al.*, 2008).

La source principale des protéases est bactérienne. Toutefois, l'inconvénient principal des protéases d'origine bactérienne est l'exigence de procédures à coût intensif pour la séparation d'enzymes à partir des cellules, de l'autre côté, les enzymes d'origine fongique offrent un avantage de séparation du mycélium par simple filtration. Par ailleurs, le champignon peut être cultivé sur substrats peu coûteux (Kalpana Devi et *al.*, 2008).

De nombreux sous-produits rejetés par l'industrie alimentaire tels que les déchets de tomate, déchets d'orange et de datte. D'après Van Dyk et *al.* (2013), les sous-produits de la tomate transformée peuvent atteindre plus de 10 millions de tonnes à l'échelle mondiale voir 10 à 30 % du poids des fruits fraîches (Benakmoun et *al.*, 2008). En Algérie, il n'y a pas de statistique officielle sur le volume de ces déchets, mais d'après nos estimations basées sur la récolte de tomate fraîche (campagne 2014-2015), qui est entre 400 000 à 500 000 tonnes (<http://www.djazairiess.com/fr/elwatan/499015>), le volume de ces déchets est estimé à 90 000 tonnes par an. Une partie est utilisée dans l'alimentation animale et le reste est mis à la décharge malgré leur richesse en nutriments comme les protéines, les sucres, les fibres insolubles, les huiles, les caroténoïdes, etc. (Al-Muhtaseb et *al.*, 2010).

Cette richesse nutritive rend ces déchets très favorables pour une utilisation en tant que substrat dans la production de substances à intérêt industriel par fermentation, autrement dit, une valorisation biotechnologique.

De ce fait, l'objectif de notre travail est la production des protéases alcalines par des moisissures isolées à partir de source thermale en utilisant les déchets de tomate comme substrat de fermentation. Pour atteindre cet objectif, notre travail porte sur les points suivants :

- Réactivation des souches fongiques sur milieu PDA ;
- Préparation des inocula pour la fermentation ;
- Production des protéases alcalines par fermentation en milieu solide par ces souches, en utilisant les déchets de tomate comme substrat de base à différentes températures (30°C, 35°C, 40°C et 45°C) ;
- Dosage de l'activité protéolytique des extraits bruts obtenus ;
- Test d'optimisation de milieu de culture pour les souches ayant donné de meilleurs rendements en activité protéolytique;

Dans cette intention, notre manuscrit sera structuré en deux (02) parties dont la première est une synthèse bibliographique contenant des connaissances générales sur les moisissures, les protéases, la fermentation et les déchets de tomates.

La deuxième partie rapporte la méthodologie adoptée lors de la présente étude, et expose nos résultats obtenus avec discussion. Finalement, on termine par une conclusion générale avec des perspectives.

PREMIÈRE PARTIE :
Synthèse
bibliographique

I. Les moisissures

1. Définition et caractéristiques générales

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

Les cellules de moisissures forment des filaments (hyphes) où chacun montre une croissance apicale. La ramification des hyphes au cours de leur croissance sur un substrat donne le mycélium ; un mycélium et ses spores forment le thalle, détectable à l'œil nu (Guiraud, 1998; Perry et *al.*, 2004; Walker et White, 2005). Dans la majorité des cas, la cellule végétative d'un hyphe contient plus d'un noyau, parfois de centaines. La paroi de la plupart des moisissures est chitineuse ; la chitine est un polymère formé d'unité de N-acétyl glucosamine (Madigan et Martinko, 2007).

Durant la croissance, la division des noyaux peut être accompagnée par la formation de *septa* délimitant une cellule. Toutefois, la formation des *septa* est d'ordinaire incomplète laissant un pore central permettant la libre circulation du cytoplasme et des noyaux. Parfois celle-ci n'existe pas ; l'hyphe correspond alors à un tuyau contenant du cytoplasme où baignent les noyaux, le thalle est donc d'organisation *coenocytique* (Scriban, 1993; Perry et *al.*, 2004; Madigan et Martinko, 2007).

Les moisissures sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, protéolytiques, etc.) qui en font des agents de dégradation dangereux mais parfois des agents technologiques utilisés dans l'affinage des fromages et dans la production d'enzymes (Guiraud, 1998 ; Guiraud et Rosec, 2004).

2. Organes de reproduction

La reproduction et la dissémination des moisissures s'effectuent grâce aux spores et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative (Guiraud, 1998). Les conidies sont des spores asexuées, elles peuvent être noires, bleues, vertes, rouges, jaunes ou brunes; leur présence donne au mycélium un aspect poussiéreux (Madigan et Martinko, 2007).

Les spores d'origine végétative assurent la reproduction et la dissémination de l'espèce chez les formes imparfaites (Deutéromycètes) ; mais on les trouve également chez les autres groupes où elles coexistent à côté des formes de reproduction sexuée (Guiraud, 1998).

3. Besoins de croissance et activités biologiques

3.1. Éléments nutritifs

La panoplie enzymatique des champignons est extrêmement riche et leur permet d'utiliser les substrats les plus complexes plus efficacement que les bactéries, tel que : la cellulose, la lignine, la kératine, les acides humiques etc. (Davet, 1997).

Le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le maltose, le saccharose, l'amidon et la cellulose représentent les sucres les plus utilisés par les moisissures comme source de carbone et d'énergie. Ces hydrates de carbone sont dégradés grâce à la glycolyse et le métabolisme aérobie (Boiron, 1996 ; Nicklin et *al.*, 2000). D'autres composés organiques tels que les pesticides, les hydrocarbures, la lignine, la pectine et les lipides sont également dégradés par les moisissures à côté d'autres substrats organiques bon marché comme les déchets issus de l'industrie agroalimentaire (lactosérum, mélasses de canne ou de betterave, amidon de maïs, déchets d'agrumes etc.) (Nishio et Nagai, 1981 ; Joyeau, 1982 ; Hart et *al.*, 1991).

L'azote représente, quant à lui, le second élément chimique le plus important du matériel cellulaire, composé majeur des protéines et des acides nucléiques. Il constitue en moyenne 12% du poids sec cellulaire (Scriban, 1993) ; non assimilable sous forme d'azote atmosphérique par les moisissures. Ces dernières métabolisent le nitrate, l'ammonium, l'urée et les acides aminés plus facilement assimilables (Botton et *al.*, 1990). Les peptides et les protéines ne sont utilisés par les moisissures qu'après leur dégradation (Botton et *al.*, 1990 ; Nicklin et *al.*, 2000). Par ailleurs, des sources naturelles complexes sont souvent utilisées comme source azotée telle que : la caséine, les farines de poissons et de soja, le «*corn steep liquor* » etc. (Joyeau, 1982).

Le cuivre, le magnésium, le sodium, le zinc et le molybdène constituent les micronutriments, et sont disponibles en grande quantité dans l'environnement des moisissures (Nicklin et *al.*, 2000). Ils sont nécessaires à la plupart des espèces fongiques pour la production de cytochromes, des pigments, d'acides organiques, etc.

3.2. Facteurs physicochimiques

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination.

➤ Température

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois, 1989).

Les champignons sont classés selon la gamme de température à laquelle ils se développent. On distingue quatre catégories citées ci-dessous, des plus fréquentes au moins fréquentes, indiquées en tableau (Boudih, 2011).

Tableau 1 : Catégories de moisissures selon la température de développement (Roquebert, 1997).

Types de champignons	Gamme de température	Température optimale
Mésophiles	0 à 50°C	15 à 30°C
Thermophiles	20 à 50°C	35 à 40°C
Thermotolérants	0 à 50°C	15 à 40°C
Psychrophiles	0 à 20°C	0 à 17°C

En plus des catégories citées en tableau 1, il existe des moisissures qui se développent dans des conditions extrêmes. C'est le cas par exemple des thermorésistants pouvant se développer jusqu'à 80°C comme *Aspergillus fischieri* (Conner et Beuchat, 1987).

➤ Humidité

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

➤ **pH**

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 – 8.0, bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acide. Cependant, les enzymes extracellulaires produites dans des milieux complexes peuvent avoir des optima de pH d'activité très différents (plus acides ou plus basiques) (Botton et *al.*, 1999).

➤ **Oxygène**

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

➤ **Lumière**

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

➤ **Activité en eau (*aw*)**

L'*aw* d'un aliment dépend de sa composition chimique, c'est-à-dire de la quantité d'eau retenue par les sels, sucres et protéines, ainsi que de ses caractéristiques physiques (porosité, polarité). Ce paramètre peut varier de 0 (pour les substrats dans lesquels toute l'eau est retenue) à 1 (pour l'eau pure).

Les moisissures sont, de façon schématique, plus xérotolérantes que les autres microorganismes (bactéries, levures). La plupart des moisissures se développent bien pour des activités en eau voisines de 0.85. Par conséquent, beaucoup de produits dont l'activité hydrique ne permet pas la croissance bactérienne peuvent être colonisés par les moisissures. Les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement capables de se développer à des *aw* voisines de 0.7 à 25°C ; elles peuvent donc se développer dans les aliments pauvres en eau comme les céréales au cours de stockage, les fruits secs, les produits dont l'activité hydrique a été réduite (produits de salaison sèche, confitures,...) (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002). Par comparaison, les *Fusarium* ne peuvent se développer qu'à des *aw* supérieures à 0.9.

Il s'agit donc d'espèces se développant au champ, sur les plantes vivantes (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002).

4. Tolérance des mycètes à la haute température

Parmi les organismes eucaryotes, seulement quelques espèces de mycètes peuvent se développer à des températures situées entre 45 °C et 55 °C (Cooney et Emerson, 1964). En effet, les mycètes thermophiles ont une température de croissance minimale inférieure à 20°C et maximale supérieure à 50 °C (Brock, 1995 ; Blochl et *al.*, 1997 ; Maheshwari et *al.*, 2000). Par ailleurs, Tensey et Brock (1978) ont répertorié 30 espèces fongiques croît à des températures élevées modérément (60°C à 62°C). En outre, la majorité de mycètes thermophiles appartiennent aux Zygomycètes (*Rhizomucor miehi*, *R.pussillus*), Ascomycètes (*Chaetomium thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Dactylomyces thermophilus* , *Melanocarpus albomyces*, *Talaromyces thermophilus*, *T. emersonii*, *Thielavia terresteris*), Basidiomycètes (*Phanerochaet chrysosporium*) et Hyphomycètes (*Acremonium almbamensis*, *A. thermophilum*, *Myceliophthora thermophila*, *Thermomyces laginosus*, *Seytalidium thermophilum*, *Malbranchea cinnamonea*) (Tensey and Brock, 1978 ; Mouchacca, 1997 ; 1999).

II. Les protéases

1. Généralités et marché des enzymes

Les enzymes sont des polymères biologiques qui catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 10^6 par rapport à la réaction en leur absence (Granner, 2008). À part un petit groupe de RNA catalytiques, les ribozymes, toutes les enzymes sont des protéines globulaires (Scriban, 1999), ayant des structures primaires, secondaires, tertiaire, voire quaternaires dans certains, parfois, cette partie protéique, appelée *apoenzyme*, n'est pas suffisante pour l'action catalytique et nécessite la présence d'un cofacteur ou coenzyme. Outre leur grande efficacité, les enzymes sont des catalyseurs extrêmement sélectifs. Elles sont à la fois spécifiques du type de réaction catalysée et d'un seul substrat ou d'un petit ensemble de substrats fortement apparentés ; ceci est dû à l'existence d'un environnement taillé sur mesure pour une seule réaction appelé *site actif* (Granner, 2008). Selon l'I.U.B, les enzymes sont répertoriées en six classes :

- Classe 1 : Oxydoréductases.
- Classe 2 : Transférases.
- Classe 3 : Hydrolases.
- Classe 4 : Lyases.
- Classe 5 : Isoméras.
- Classe 6 : Ligases.

De toutes les enzymes industrielles, les protéases sont de loin le groupe le plus important. En effet, les protéases représentent à elles seules entre 60 % du total des ventes d'enzymes. La dominance des protéases dans le marché des enzymes industrielles devrait s'accroître (García-Gómez et al., 2009; Rai et Mukherjee, 2010) (Figure 1). Les ventes industrielles des protéases sont estimées à plus de 350 millions \$ annuellement (Kumar et al., 2008b).

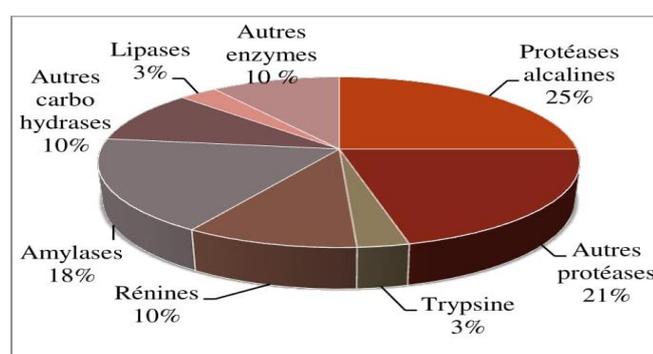


Figure 1 : Distribution des ventes des enzymes (Rao et al., 1998).

2. Les enzymes protéolytiques

Les protéases sont un groupe d'enzymes très complexe, elles appartiennent à la classe d'hydrolases (EC 3.4.21-24.x), formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques (Kumar et al., 2008). Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique, elles scindent les protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés offrant une multitude de structures (Frazier, 1967 ; Scriban, 1999). La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysat de protéines ou d'un mélange d'acides aminés.

Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux (Pelmont, 1995). Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulateurs plus spécifiques (Kumar et al., 2008a).

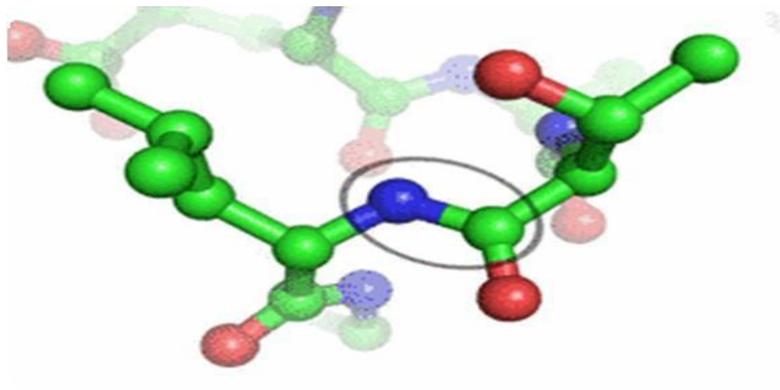


Figure 2 : Les liaisons peptidiques (entre un azote en bleu et un carbone en vert) sont hydrolysées par les protéases (<http://www.Futura-sciences.com>).

3. Source des protéases

3.1. Protéases d'origine végétale

Les enzymes d'origine végétale, en particulier les protéases sont par ordre décroissant en technologie. La papaine, la bromélaïne, la kératinase et la ficine représentent une partie des protéases les plus répandues (Rao et al., 1998).

3.2. Protéases d'origine animale

Une grande partie de protéases animales sont synthétisées par le pancréas sous forme d'un précurseur qui peut s'activer de façon autocatalytique dans des conditions bien déterminés (Rao et *al.*, 1998). Parmi ces protéases on peut citer : la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine.

3.3. Protéases d'origine microbienne

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toute les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (Sandhya et *al.*, 2005). Les protéases peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries (Devi et *al.*, 2008). Le tableau suivant montre quelques exemples.

Tableau 2 : Exemples des protéases microbiennes (Belmessikh et *al.*, 2011).

Sources	Espèces	Références
<ul style="list-style-type: none"> • Moisissures 	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus terreus</i> <i>Bauveria felina</i> <i>Aspergillus clavatus</i> ES1	García-Gómez et <i>al.</i> , 2009 Sathya et <i>al.</i> , 2009 Laxman et <i>al.</i> , 2005 Germano et <i>al.</i> , 2003 Wu et <i>al.</i> , 2006 Agrawal et <i>al.</i> , 2005 Hajji et <i>al.</i> , 2007
<ul style="list-style-type: none"> • Levures 	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida lipolytica</i>	Chi et <i>al.</i> , 2007 Tobe et <i>al.</i> , 1976
<ul style="list-style-type: none"> • Bactéries 	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Virgibacillus</i> sp. SK33 <i>Synergistes</i> sp.	Ferrero et <i>al.</i> , 1996 George et <i>al.</i> , 1995 Soares et <i>al.</i> , 2005 Patel et <i>al.</i> , 2005 Sinsuwan et <i>al.</i> , 2008 Kumar et <i>al.</i> , 2008a
<ul style="list-style-type: none"> • Actinomycètes 	<i>Streptomyces</i> sp. <i>Nocardiosis alkaliphila</i> sp.	Mehta et <i>al.</i> , 2006 Hozzein et <i>al.</i> , 2004

4. Classification des protéases

Les protéases sont classées selon la gamme du pH dans laquelle leur activité est optimale, en protéases acides, neutres et alcalines (Kumar et *al.*, 2008b). Elles se différencient également selon leur site d'action en deux groupes ; les exopeptidases et les endopeptidases (Tableau 3). Les exopeptidases agissent seulement sur les liens peptidiques près des

extrémités de la chaîne peptidique. En se basant sur la nature de l'extrémité N ou C terminale, elles sont classées en amino et carboxypeptidases, respectivement. Par contre, les endopeptidases sont caractérisées par leur action spécifique à l'intérieur de la chaîne peptidique (Rao *et al.*, 1998).

La plupart des enzymes utilisées industriellement sont des endopeptidases. Celles-ci sont divisées en quatre familles en se basant sur le mécanisme catalytique ; les protéases sérines (EC 3.4.21.x), les protéases cystéines (EC 3.4.22.x), les protéases aspartiques (EC 3.4.23.x), et les métalloprotéases (EC 3.4.24.x). Ces dernières forment le groupe de protéases le plus varié (Kumar *et al.*, 2008b).

Tableau 3 : Classification des protéases (Rao *et al.*, 1998).

Type de protéase	Classes et sous-classes
Exopeptidases	Aminopeptidases <ul style="list-style-type: none"> • Peptidyle peptidases • Dipeptidyle peptidases • Tripeptidyle peptidases Carboxypeptidases <ul style="list-style-type: none"> • Sérine carboxypeptidases • Metallocoarboxypeptidases • Cystéine carboxypeptidases
Endopeptidases	Protéases sérines Protéases cystéines ou protéases thiols Protéases aspartiques ou protéases acides Métalloprotéases

5. Les protéases alcalines

Les protéases alcalines sont définies comme étant des enzymes qui sont hautement actives dans une gamme de pH de neutre à alcalin (Sharma *et al.*, 2014). En effet, elles fonctionnent le mieux à un pH de 8 à 11, leur température optimale est d'environ 60°C, et elles ont une large spécificité de substrat (Kumar *et al.*, 2012).

5.1. Production des protéases alcalines

La plupart des microorganismes alcalophiles produisent des protéases alcalines. De ce fait, l'intérêt est limité à ceux pouvant les sécréter à des rendements élevés. Au cours de la production industrielle des protéases alcalines, les milieux de culture synthétiques à des concentrations élevées en hydrates de carbone, en protéines, etc., sont habituellement utilisés (100-150 g (poids sec)/L) (Bezawada, 2010).

5.2. Augmentation du rendement de production

Dans l'optique de produire une technologie économiquement fiable, les efforts de recherche sont concentrés sur : l'amélioration des rendements d'enzyme et l'optimisation des conditions de fermentation et des milieux de culture. Egalement, l'amélioration des souches joue un rôle clé dans le développement commercial des procédés de fermentation microbienne.

Il est généralement admis que les souches sauvages produisent des quantités limitées d'enzymes d'intérêt pour être utilisées à l'échelle industrielle (Glazer and Nikaido, 1995). Beaucoup d'études ont été menées afin d'améliorer le rendement en protéases alcalines. Des approches récentes font intervenir le criblage de souches hyper productrices, en recourant éventuellement au clonage, au mode *fed-batch*, à la fermentation en continu et à l'optimisation des milieux de culture (Gupta et al., 2002).

5.3. Applications des protéases alcalines

Ces enzymes contribuent au développement de produits à hautes valeurs ajoutées en exploitant leur activité de digestion partielle. Les domaines utilisant couramment les protéases dans leurs procédés sont : (Bezawada, 2010).

5.3.1. Industrie du détergent

L'industrie des détergents est actuellement le principal consommateur d'enzymes hydrolytiques agissant en milieu alcalin. Un intérêt particulier a été accordé aux enzymes pour leur capacité à éliminer les tâches protéiques et de ce fait atteindre des bénéfices impossibles à obtenir avec des technologies conventionnelles de fabrication de détergent.

Pour qu'une enzyme soit utilisée dans une formule de détergent, il faudrait qu'elle possède deux principales qualités : elle doit être active à des pH alcalins et doit être compatible avec les différents composants des détergents. L'utilisation principale des protéases compatibles dans les détergent concerne les formulations de lessives pour linge, et aussi les formulations pour vaisselle, là où elles sont très employées (Kirk et al., 2002 ; Joo et al., 2005 ; Genckal, 2006 ; Jaouadi et al., 2009).

Les fournisseurs d'enzymes et les industries de détergents sont toujours à la recherche de nouvelles activités enzymatiques répondant aux besoins d'une meilleure qualité de nettoyage, de meilleures propriétés antimicrobiennes et de protection des tissus exprimées par le consommateur (Bezawada, 2010).

De plus, les préparations pour le nettoyage des lentilles de contact contiennent une protéase alcaline produite par une bactérie marine permettant de réaliser un nettoyage à basses températures (Bezawada, 2010). Gupta et *al.*, (2002), ont rapporté que les firmes Novo Nordisk et Genencor International sont les principaux fournisseurs de protéases avec une production de plus de 95% de la production totale du marché mondial.

5.3.2. Tannerie

La technique chimique pour l'épilage des peaux d'animaux produit un effluent très pollué en plus d'être couteuse et drastique. L'alternative à ce procédé est l'utilisation des enzymes protéolytiques. Cet avantage est préférentiellement possible si la protéase est active en milieu alcalin (pH 11). Il serait aussi préférable qu'elle possède des activités élastolytiques et kératinolytiques. Il a été rapporté que des protéases de certaines microorganismes de nature alcalophiles étaient performants pour accélérer l'opération d'épilage (Nilegaonkar et *al.*, 2007).

5.3.3. Récupération de l'argent

La mise en place d'un bioprocédé de récupération en continu de l'argent à partir de films de rayons X usagés en employant les protéases alcalines, a été rapportée par Fujiwara et *al.*, (1989). En effet, ces pellicules contiennent approximativement 1.5 à 2% (*w/w*) d'argent dans leurs couches de gélatine.

5.3.4. Usages médicaux

Les collagénases à activité protéasique sont de plus en plus utilisées en thérapie dans les formulations de médicaments. Une nouvelle protéase semi alcaline avec une importante activité collagénolytique a été produite par *Aspergillus niger* LCF9. L'enzyme a permis l'hydrolyse de différents types de collagènes sans libération d'acides aminés mais plutôt des peptides à faible poids moléculaire possédant un potentiel thérapeutique (Bezawada, 2010).

De plus, la plupart des espèces du genre *Bacillus* ont été reconnues en tant qu'organismes sans danger pour les humains (Bezawada, 2010) ; elles sécrètent des protéases alcalines ayant des activités fibrinolytiques et qui sont utilisées comme agent thrombolytique (Kim et *al.*, 1996 ; bezawada, 2010).

5.3.5. Industrie alimentaire

Les protéases microbiennes ont beaucoup été exploitées dans l'industrie alimentaire. Ces enzymes ont été utilisées dans la préparation d'hydrolysats de protéines à haute valeur

nutritionnelle. Les hydrolysats de protéines produits de la caséine, du lactosérum et de soja, jouent un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et sont employés dans les formulations des aliments hypoallergéniques pour enfants, dans les produits diététiques et pour l'enrichissement des jus de fruits et des boissons non alcoolisées (Bezawada, 2010 ; Reddy *et al.*, 2008, Neklyudov *et al.*, 2000).

5.3.6. Traitement des déchets

Les protéases alcalines trouvent beaucoup d'applications dans le domaine de la gestion des déchets domestiques et des industries agro-alimentaires. Les protéines fibreuses de poils, de cheveux, d'ongles ou encore de plumes sont des déchets très abondants dans la nature. Ceux-ci peuvent être transformés en biomasse, en concentrés protéiques ou en acides aminés en utilisant l'action des protéases de certains microorganismes (Anwar et Saleemuddin, 1998).

5.3.7. Industrie chimique

Il est maintenant bien établi que les enzymes dans les milieux organiques rendent possible d'utiliser la biocatalyse dans le domaine de la synthèse chimique. Cependant, une conséquence majeure de cette approche est que l'activité enzymatique soit réduite sous des conditions de déshydratation assez poussée. De ce fait, il serait important de découvrir un moyen de garder l'activité enzymatique à son maximum dans un milieu organique.

Certaines études ont montré la possibilité d'utiliser la protéase alcaline pour catalyser la synthèse de peptides en milieu organique. De plus, plusieurs travaux ont été réalisés pour synthétiser des peptides par des enzymes immobilisées sur des supports insolubles (Bezawada, 2010).

III. La Fermentation

1. Nature de fermentation

La nature de la fermentation, solide ou liquide (submergée), influe divers aspects de la croissance des microorganismes ainsi que la production des substances d'intérêt (Sumantha et *al.*, 2005).

1.1. Fermentation sur milieu liquide (FML)

La fermentation sur milieu liquide peut être considérée comme une violation de l'habitat naturel des microorganismes, en particulier les champignons. Elle consiste à faire croître les microorganismes sur un substrat nutritif liquide. Ce type de fermentation a été traditionnellement utilisé pour la production industrielle des enzymes, en raison de la facilité de contrôle des différents paramètres comme le pH, la température, l'aération, l'oxygène dissous et l'humidité (Singhania et *al.*, 2009).

1.2. Fermentation sur milieu solide (FMS)

La fermentation sur milieu solide est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (Durand, 2003 ; Gervais et *al.*, 2003 ; Rahardjo et *al.*, 2006).

De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules. Le développement des champignons filamenteux en fermentation solide se fait par extension et ramification des filaments formant le mycélium. Après l'inoculation d'un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. A partir de ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules (de la matrice solide) ou dans les espaces interparticulaires (par croissance) à la recherche de composés nutritifs, notamment dans les pores remplis de liquide (Holker et Lenz, 2005 ; Rahardjo et *al.*, 2006).

A des taux normaux d'humidité, les espaces entre les filaments aériens sont remplis de gaz (aérobie), tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d'eau (anaérobie). Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Pour finir, les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice

solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (Holker et Lenz, 2005 ; Rahardjo et *al.*, 2006).

Actuellement, les procédés en phase solide connaissent un regain d'intérêt en occident, avec la valorisation des coproduits agricoles pour la production d'enzymes, de nourriture animale et pour la production de produits organiques (Singhania et *al.*, 2009 ; Thomas et *al.*, 2013). Ce procédé est très convenable pour les pays dont l'économie est basée sur l'agriculture. En effet, les résidus agricoles peuvent être hautement valorisés par ce type de transformation (Singh et *al.*, 2008).

2. Avantages et inconvénients de la fermentation solide

La production industrielle des enzymes et d'autres métabolites fait appel aux deux procédés de fermentation. La décision de choisir l'un ou l'autre est probablement basée sur le coût et l'efficacité du processus. Il est donc important de connaître les avantages et les inconvénients de la fermentation sur milieu solide par rapport à la fermentation liquide. Parmi ces avantages on note :

- L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation (Assamoi et *al.*, 2009).
- Le peu d'eau disponible favorise la production de certains métabolites qui n'apparaissent pas ou peu en culture liquide, ainsi il minimise les contaminations bactériennes qui réclament des taux d'humidité élevés pour croître (Mathot, 1996).
- Les opérations de mélange étant facilement modulables, il n'y a pas de production de mousses lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides (Assamoi et *al.*, 2009).
- En calibrant bien les particules du substrat, l'aération peut être assurée passivement et/ou sans agitation ou par agitation discontinue (Durand, 1983).
- La réduction des coûts et du temps consommé pendant l'extraction et la récupération du produit (moins de techniques à appliquées et volumes réduits en solvants d'extraction), ainsi que pour le traitement des effluents (en raison de la faible teneur en eau) (Assamoi et *al.*, 2009).

Dans ces conditions et bien d'autres, la fermentation solide présente de nombreux inconvénients :

- Les microorganismes utilisés sont limités. En effet, seuls qui se développent bien aux basses humidités peuvent être employés, cela s'applique aux champignons filamenteux et aux certaines bactéries xérophiles.
- Il est pratiquement difficile d'assurer le contrôle direct des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration des nutriments, assez aléatoire (Assamoi et *al.*, 2009).
- Les microorganismes étant inséparables du substrat, l'estimation de la biomasse est délicate (Couto et Sanroman, 2006 ; Wang et Yang, 2007 ; Aguilar et *al.*, 2008).

3. Les micro-organismes utilisés pour la fermentation solide

Les bactéries et les champignons peuvent se développer sur des substrats solides et avoir des applications dans des procédés de fermentation en milieu solide.

Les bactéries sont principalement impliquées dans le compostage, l'ensilage et les procédés alimentaires. Les levures sont utilisées pour la production d'éthanol et dans l'alimentation animale ou humaine. Mais les champignons filamenteux restent le groupe de micro-organismes le plus utilisé en fermentation solide avec des applications très variées, grâce à leurs propriétés physiologiques, enzymologiques et biochimiques. Ils sont considérés comme les mieux adaptés à ce type de cultures, car proches de leur habitat naturel. Les différents genres fongiques utilisés dans ce processus de fermentation sont : *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Trichoderma* et certaines espèces de *Penicillium* (Raimbault, 1998; Manpreet et *al.*, 2005).

IV. Les déchets de tomate

1. Les déchets de tomate comme ressource végétale

1.1. Définitions

Les ressources végétales sont toutes les matières premières issues de l'agriculture. Elles présentent l'avantage d'être renouvelables et très largement présentes sur l'ensemble des terres à l'échelle planétaire, à la différence des ressources fossiles et minérales. Actuellement, de nombreux pôles de compétitivité et organismes de recherche se consacrent au développement de nouvelles technologies pour la production et l'innovation en matière de valorisation des agroressources. Ces dernières, sont constituées de molécules aux structures complexes (protéines, polysaccharides, lipides, etc.).

Le terme « agroressource » est souvent utilisé pour évoquer les produits non alimentaires issus des systèmes agricoles. Parmi celles-ci, les cultures lignocellulosiques (luzerne, phalaris, miscanthus, etc.) destinées à l'élaboration de biocarburants et bioproduits, les cultures d'agroressources comestibles (colza, tournesol ou jatropha) peuvent également être transformées en produits non alimentaires (biocarburants de première génération), et les produits agricoles destinés à l'alimentation humaine et animale (Blanc et Goma, 2006).

1.2. Production mondiale de la tomate

La tomate (*Solanum lycopersicum L.*) est originaire de la région Andéenne, en Amérique latine, a été importée en Europe au 16^{ème} siècle. Puis s'est répandue à travers tous les continents. Elle représente l'une des importantes cultures de légumes à l'échelle mondiale donnant le légume-fruit le plus consommé après la pomme de terre. Ses fruits sont destinés à la consommation en frais ou à la transformation en différents produits. La production mondiale de la tomate a atteint la quantité de 160 millions de tonnes en 2011 sur une surface de 4,5 millions d'hectares. La région asiatique produit plus de 57% de la production mondiale en particulier la Chine, le plus grand producteur avec environ 49 millions de tonnes, suivie de l'Inde. Puis, viennent les USA, la Turquie, l'Égypte, l'Iran, l'Italie, le Brésil et l'Espagne (Figure 3) (Bergougnoux, 2013).

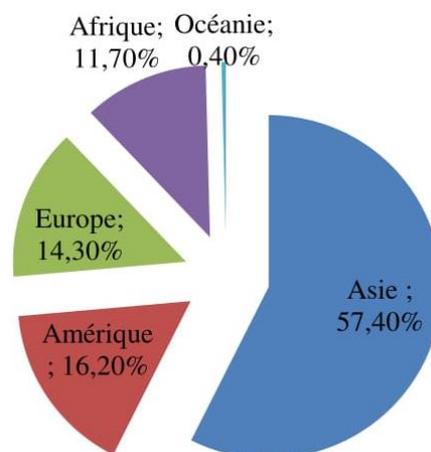


Figure 3: Production mondiale de la tomate en 2010 (Bergougnoux, 2013).

1.3. Tomate industrielle en Algérie

Les tomates d'industrie sont principalement cultivées au Nord-Est du pays : les wilayas d'El Tarf, d'Annaba, de Guelma, de Skikda et de Jijel où elles représentent 85% de la superficie totale consacrée à cette culture. Le reste est réparti entre la région du Centre avec 7% et l'Ouest 3% (INPV).

Une augmentation de la production est constatée au cours de ces dernières années. Selon les statistiques du ministère algérien de l'agriculture la production a atteint 900 000 tonnes en 2012, soit plus que le double de ce qui était produit en 2009 (380 000 tonnes). Ce qui permet de répondre à 50% des besoins nationaux, avec 40 220 tonnes de double concentré de tomate obtenu après transformation depuis 2010 (Djama, 2013).

1.4. Les sous-produits de la tomate transformée

La transformation commerciale de la tomate pour les jus, la pâte et/ou de ketchup produit une grande quantité de déchets en provenance de canaux d'eau, du lavage, du tri sur table, du pulpeur-raffineur et du nettoyage du matériel (Sogi et *al.*, 2003). Cette quantité est évaluée entre 10 et 30% du poids des fruits fraîches selon King et Zeidler (2004) et Benakmoun et *al.* (2008) ; et entre 3 et 7% de la matière première selon Van Dyk et *al.* (2013).

D'après ces derniers, les déchets de tomate peuvent atteindre plus de 10 millions de tonnes à l'échelle mondiale. En Algérie, il n'y a pas de statistique officielle sur le volume de ces déchets, mais d'après nos estimations basées sur la récolte de tomate fraîche (campagne 2014-2015), qui est entre 400 000 à 500 000 tonnes (<http://www.djazairress.com/fr/elwatan/499015>). le volume de ces déchets est estimé à 90 000 tonnes par an. Ils sont mis en décharge et ne sont pas exploités sauf en alimentation animale. Ils sont une excellente source de caroténoïdes. La majorité des travaux réalisés avec

ce sous-produit, sont focalisés sur ces pro-vitamines (lycopène et β -carotène) et sur les composés phénoliques (Kaur et *al.*, 2008).

Ces déchets se composent de 33% de graines, 27% de peaux et 40% de pulpe en plus de tomates vertes non transformées, parfois mélangés à des feuilles. Les déchets de tomates séchés contiennent 44% de graines et le reste, 56% de peaux et de pulpe (Sogi et Bawa, 1998). Le tableau 4 montre quelques différences dans la composition entre la peau et la farine de graines.

Tableau 4 : Composition chimique de déchets de tomates.

Composition	Peau de tomates			Farine de graines de tomates
	Christakopoulos et <i>al.</i> , 1998	Kaur et <i>al.</i> , 2008	Sogi et Bawa, 1998	Liadakis et <i>al.</i> , 1995
Humidité (%)	7,5	5,74	6,69-	8,1
Protéines (%) MS	13,5	14,3	10-	31,3
Lipides (%) MS	3	3,72	1,7-	1,3
Cendres (%) MS	2,9	1,28	1,13-	4,6
Sucres (%) MS	5,0	3,46	26,7	3,2
Fibres (%) MS	68,1	71,3	46,1-	54,1

MS : Matière Sèche

Les déchets de tomates peuvent être séchés facilement à l'air libre sous soleil (Katapodis et *al.*, 2006). Toutefois, pour des applications alimentaires, ils doivent être séchés immédiatement pour réduire l'humidité avant la contamination microbienne afin d'améliorer leur durée de vie, leur apparence, encapsuler la saveur originale et de maintenir sa valeur nutritionnelle (Al-Muhtaseb et *al.*, 2010).

1.5. Utilisations de déchets de tomate

Les déchets de tomates connaissent de nombreuses utilisations à savoir :

➤ Alimentation

De part sa teneur élevée en fibres et grâce à la capacité des animaux à digérer ces fibres (Al-Muhtaseb et *al.*, 2010), les déchets de tomates sont principalement utilisés pour nourrir le

bétail, en particulier les ovins et les bovins (Celma et *al.*, 2009). Leur utilisation a également été évaluée pour l'alimentation des volailles (Mansoori et *al.*, 2008), des vaches laitières (Weiss et *al.*, 1997), des chèvres (Ventura et *al.*, 2009) et des moutons (Denek et Can, 2006).

Par ailleurs, les déchets de tomates peuvent représenter une source intéressante de fibres pour la consommation humaine (Alvarado et *al.*, 2001). De leur côté, les graines contiennent environ 40% de protéines (Al-Wandawi Rahman et *al.*, 1985). Par conséquent, les graines de tomates sont recommandées comme source de protéines dans les applications alimentaires pour l'homme (Sogi et *al.*, 2005). En outre, Brodowski et Geisman (1980) ont rapporté que ces déchets contiennent 13% de lysine de plus que les protéines de soja, ce qui pourrait améliorer substantiellement la qualité des protéines des aliments à basse teneur en lysine tels les produits de céréales.

➤ Agent antioxydant

Baysal et *al.* (2000) ont signalé qu'une grande quantité de caroténoïdes est perdue sous forme de déchets au cours de la transformation des tomates. Du fait que, 72–92% du lycopène (le pigment rouge) est associée à la fraction insoluble dans l'eau et à la peau. Ces déchets représentent donc une excellente source de caroténoïdes bon marché. Par conséquent, les extraits de peau sont particulièrement riches en lycopène qui pourrait être extraite en utilisant des solvants organiques (Kaur et *al.*, 2008). Ces substances sont susceptibles de réduire le risque d'apparition de certains cancers ainsi que des maladies cardiovasculaires et autres maladies chroniques dont celles liées au vieillissement (Chiu et *al.*, 2007 ; Vági et *al.*, 2007 ; Choudhari et Ananthanarayan, 2007 ; Kaur et *al.*, 2008 ; Zuorro et *al.*, 2013).

De plus, la qualité des huiles comestibles pourrait être améliorée en les enrichis par les caroténoïdes de peaux (Benakmoum et *al.*, 2008). Par ailleurs, Knoblich et *al.* (2005) ont montré le transfert de caroténoïdes vers le jaune d'œuf lorsque les poulets sont nourris de peaux et de graines de tomates.

D'autre part, King et Zeidler (2004) ont révélé que les niveaux élevés de l'antioxydant α - tocophérol (vitamine E) dans les déchets de tomates ont réduit la détérioration des lipides au cours du chauffage et permet d'améliorer la durée de conservation de la viande de poulets stockés.

➤ Production d'enzymes

Il y a peu de rapports dans la littérature sur l'utilisation des déchets de tomates pour la production d'enzymes. Certaines études décrivent la production d'enzymes par des souches bactériennes par des fermentations submergées ; c'est le cas de la xylanase (Katapodis et *al.*, 2006). D'autres travaux ont permis le fractionnement des laccases et des xylanases par *Pleurotus ostreatus* et *Coriolus versicolor*. De plus, la quantité de pectine dans les déchets de tomates est suffisamment élevée pour obtenir des niveaux élevés en polygalacturonases par *Coriolus versicolor* (Freixo et *al.*, 2008a, 2008b, 2008c).

➤ Production d'huiles

Les graines de tomates contiennent environ 20% d'huile. Elles seraient une bonne source d'huile de salade à condition qu'elle subisse un raffinage adéquat ; très peu de connaissances sont disponibles sur la capacité antioxydante de l'huile de graines de tomates (Eller et *al.*, 2010).

De plus, la réduction du taux de cholestérol chez les cochons de Guinée a été mentionnée, en leur donnant 1 ml d'huile/kg. L'huile de graines de tomates a également été utilisée dans les produits cosmétiques tels que le savon, les lubrifiants, les peintures et les industries de vernis (Giannelos et *al.*, 2005).

➤ Traitement de diarrhée

En 1940, McCay et Smith ont rapporté l'effet anti-diarrhéique des déchets de tomates chez une série de chiens, de visons et de renards. Par la suite, Lester et Morrison (1946) ont déterminé l'action pharmacologique spécifique des déchets de tomates sur l'intestin comme un recours efficace dans le traitement de nombreux types de diarrhées chez des sujets humains.

2. Fermentation des déchets de tomate

Peu de travaux ont été publiés sur l'utilisation de cette matière première en fermentation. Carvalheiro et *al.* (1994) ont réalisé la bioconversion des déchets de tomate par des cultures mixtes de *Trichoderma reesei* et *Sporotrichum sp.* en FMS. Avelino et *al.* (1997) ont effectué une saccharification de ce substrat par des cellulases commerciales pour la production de la biomasse de la levure *Geotrichum candidum* en FMS. Rawashdeh et *al.* (2005) ont réalisé la production de xylanase par *Streptomyces sp.* Do Rosário Freixo et *al.* (2008 a et b) ont produit la polygalacturonase, la laccase et la xylanase sur milieu à base de déchets de tomate (20 g/l)

par des cultures du champignon *Coriolus versicolor*. Fakas et al. (2008) ont effectué la synthèse de l'acide γ -linoléique sur l'hydrolysate de déchets de tomate en culture submergée par la moisissure *Cunninghamella echinulata*. Iandolo et al. (2011) ont étudié la production des enzymes : laccase, xylanase et protéase sur les mêmes déchets par les champignons *Pleurotus ostreatus* et *Trametes versicolor* en FMS.

DEUXIÈME PARTIE :
Partie Pratique

Matériel et Méthodes



Aspergillus sp.2



Aspergillus sp.3



Aspergillus sp.5



Scedosporium sp.



Aureobasidium sp.



Aspergillus sp.6



Aspergillus sp.1



Penicillium sp.



Trichoderma sp.

Figure 4 : Photos des cultures des neuf (09) souches fongiques utilisées.

Présentation de la partie pratique de notre travail

Notre partie pratique de ce travail a été réalisée entre le mois du Février et Mai de l'année en cours 2017 au niveau du laboratoire de Microbiologie RDC, avec l'aide et l'appui du laboratoire de Biochimie et du laboratoire de Biologie et Environnement au Biopôle de *Chaab-Elrsas*, au sein de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des frères Mentouri Constantine.

Le volet pratique a été réparti sur Cinq (05) étapes successives, à savoir :

- **Première étape :** Repiquage et la purification des moisissures sur milieu PDA;
- **Deuxième étape :** Préparation des inocula pour la fermentation;
- **Troisième étape :** Production des protéases alcalines par fermentation en milieu solide (SSF) par ces souches, en utilisant les déchets de tomate comme substrat de base à différentes températures (30°C, 35°C, 40°C et 45°C) ;
- **Quatrième étape :** Dosage de l'activité protéolytique des extraits bruts résultants ;
- **Cinquième étape :** Réalisation d'un petit test d'optimisation du milieu de culture (milieu contrôlé) pour les souches ayant donné des meilleurs rendements protéolytiques.

1. Origine des souches fongiques

Les neuf (09) souches fongiques utilisées dans ce travail sont fournies par le laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des frères Mentouri Constantine. Ces moisissures avec leurs photos sont présentées dans la figure4.

1.1. Réactivation des souches

Un fragment mycélien de la périphérie des cultures pures de chaque souche en boîtes de Pétri ou en tubes inclinés contenant du PDA (*Potato Dextrose Agar*) (voir Annexe 1), a été prélevé et transféré par touche centrale sur le même milieu coulé dans des boîtes de Pétri sous les conditions d'asepsie. La culture fongique a été incubée pendant sept (07) jours à 30°C. L'opération de ce repiquage a été répétée chaque mois.

1.2. Conservation

Cette étape a été effectuée par la méthode la plus communément utilisée au laboratoire où les moisissures sont repiquées à la fin de leur croissance dans des tubes contenant le milieu de conservation ; le PDA sur gélose inclinée (Botton et *al.*, 1990 ; Parks, 1997). Après une semaine d'incubation à 30°C, les cultures sont conservées à 4°C (Botton et *al.*, 1990).

1.3. Préparation de l'inoculum

Dans ce sens, l'inoculum correspond à la suspension sporale de la moisissure utilisée. Pour ce faire, un volume de 10 ml d'eau physiologique stérile (voir Annexe 2) a été rajouté à la souche cultivée sept (07) jours sur milieu PDA en boîte de Pétri, puis on fait gratter légèrement la surface de la gélose en utilisant d'une anse de platine stérile, afin d'avoir une suspension sporale. Ensuite, à l'aide d'une micropipette, on fait récupérer superficiellement cette suspension.

Le taux d'inoculum choisi pour la fermentation a été approximativement de l'ordre de 2×10^7 spore/ml pour chaque souche fongique étudiée. Ce nombre est obtenu par la réalisation des dilutions sur les suspensions sporales de chaque souche, préparées comme déjà mentionnés ci-dessus et estimé par référence aux courbes d'étalonnage réalisées par Mechehaleh et Yekhlef (2015).

2. Méthode de fermentation

La fermentation a été réalisée dans un milieu solide à base de déchets de tomate dans le but de doser l'activité protéolytique développée par les souches fongiques testées.

2.1. Substrat de fermentation

Ce travail est une contribution sur l'étude du potentiel de production de protéases alcaline sur un milieu solide de neuf (09) souches fongiques sélectionnées pour cet effet. Pour cela, un milieu à base de déchets de tomate a été choisi comme substrat de fermentation vu sa composition en nutriments nécessaires pour le développement des moisissures (voir partie synthèse bibliographique, déchet de tomate).

Les déchets de tomates industriels utilisés dans cette étude sont obtenus de la conserverie « *La Maison Latina* » de *Chelghoum Laid* (wilaya de *Mila*), Les déchets sont séchés à l'air libre (25 – 30°C) pendant 3 - 4 jours.

En ce qui concerne l'étape d'où on a utilisé des déchets de tomate broyé, ces derniers sont

obtenus par broyage à l'aide d'un moulin électrique ménager de manière à avoir un substrat avec des particules de diamètre : un (01) mm (Katapodis et *al.*, 2006 ; Murthy et Naidu, 2010).

2.2. Préparation du milieu de culture

Pour la réalisation des fermentations, cinq (05) grammes de déchets de tomates sont introduits dans un erlenmeyer de 250 ml, puis 10 ml d'eau distillée pH 7 sont additionnés à ce substrat. Cette opération a été effectuée à raison de deux (02) erlenmeyers par souche pour les quatre températures d'incubation (30°C, 35°C, 40°C et 45°C). L'ensemble de tous les erlenmeyers a été bouché par du coton cardé et couvert par le papier aluminium. Ces erlenmeyers contenant les milieux de culture préparés sont stérilisés dans l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

2.3. Conduite de la fermentation

Après refroidissement des erlenmeyers, les milieux de culture sont inoculés par 1 ml de la suspension sporale (approximativement de l'ordre de 2×10^7 spore/ml). Le contenu de chaque erlenmeyer doit être bien mélangé à l'aide d'une tige stérile. L'ensemble des erlenmeyers sont par la suite incubés dans l'étuve pendant 96 h pour les quatre (04) températures étudiées : 30°C, 35°C, 40°C et 45°C (Figure 5). Toutes les expériences sont réalisées en double pour chaque souche fongique.

Après incubation, 50 ml de l'eau distillée stérile sont ajoutés à chaque erlenmeyer. Le mélange est laissé s'homogénéiser dans un incubateur agitateur pendant 1 h à 180 rpm. Ensuite, le mélange est alors filtré à travers un tissu, le filtrat est lui-même clarifié par une autre filtration sur papier filtre (Whatman n°1). Le filtrat clair obtenu constitue l'extrait enzymatique brut ; il est conservé au congélateur pour les dosages ultérieurs.

A la fin des fermentations, les paramètres du pH et activité protéolytique ont été estimés.

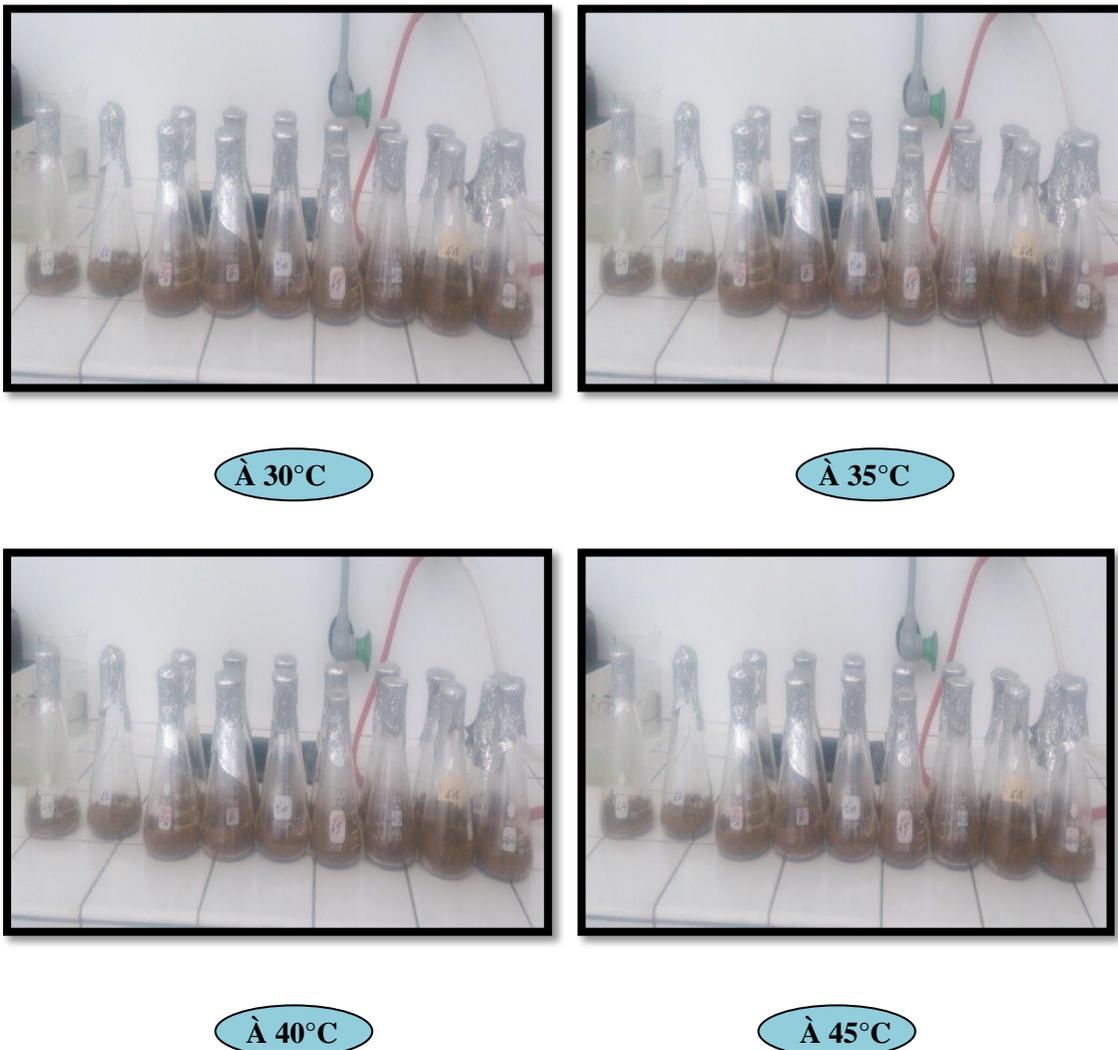


Figure 5 : Réalisation des fermentations dans des erlenmeyers de 250 ml pour les quatre (04) températures étudiées : 30°C, 35°C, 40°C et 45°C.

3. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité de la protéase alcaline dans l'extrait enzymatique brut a été dosée par la méthode décrite par Lenoir et Auberger (1977) et modifiée par Mechakra et *al.* (1999). (voir annexe 3)

3.1. Principe

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines en libérant des peptides simples et des acides aminés libres qui se trouvent dans la phase soluble. Les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA, ce qui permet de récupérer les fragments solubles dans le filtrat. La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines, sa présence dans le filtrat est traduite en activité protéasique par un dosage colorimétrique à l'aide du réactif de *Folin-Ciocalteu*. Celui-ci réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu.

3.2. Réaction enzymatique

Le mélange réactionnel a été préparé par addition de :

- ❖ Extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage..... 1 ml
- ❖ Tampon Tris-HCl (0.2M / 0.1 M), pH 81.5 ml
- ❖ Substrat (solution de caséine 2.5% dans le citrate de sodium à 0.02 M)..... 2.5 ml

Après agitation, ce mélange a été incubé dans un bain marie à 40°C pendant une demie heure, puis la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid (4%). Par la suite, il a été laissé reposer 30 min dans un bain de glace (Beynon et Oliver, 2004 ; Wu et *al.*, 2006 ; Devi et *al.*, 2008) ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées (Sandhya et *al.*, 2005). Le mélange subit ensuite une filtration sur papier Whatman n°1.

Par ailleurs, les témoins ont été parallèlement préparés dans les mêmes conditions en dénaturant l'enzyme ; c'est-à-dire en ajoutant le TCA avant le substrat.

3.3. Protocole de dosage

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'Anson (1938). A cet effet, 0.5 ml du filtrat ont été mélangés avec 2.5 ml de Na₂CO₃ à 2% dans le NaOH (0.1N). Après agitation et incubation 10 min à température ambiante, 0.25 ml de réactif de *Folin-Ciocalteu* dilué au 1/4^{ème} ont été ajoutés. Les mélanges ont été bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant au moins 30 min (Paranthaman et *al.*, 2009).

L'absorbance de la coloration bleue développée a été lue à 750 nm dans un spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1280); l'activité a été calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 100 µg/ml (voir Annexe 4). Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme. Chaque dosage a été effectué en deux (02) répétitions.

4. Test d'optimisation du milieu de culture

Afin d'obtenir de meilleurs rendements protéasiques, les souches ayant donné les activités protéolytiques les plus élevées à travers les quatre températures ont été sélectionnées. Pour les quelles, on a procédé à un test d'optimisation du milieu de culture dont, on a lui rajouté certains composants et modifié quelques paramètres. Par la suite, on a lancé des fermentations et dosé l'activité protéolytique. Ce test d'optimisation a été réalisé comme suit :

Tout d'abord, les cinq (05) meilleures souches sélectionnées pour ce test sont les suivantes:

- *Aureobasidium sp.* ;
- *Aspergillus sp. 2* ;
- *Penicillium sp.* ;
- *Aspergillus sp. 6* ;
- *Scedosporium sp.*

Les milieux de culture ont été préparés en deux types en fonction de diamètre des particules du substrat. Un pour lequel on a utilisé des déchets de tomate non broyés, dont la solution d'humidification contient la caséine (1%), le NaCl (0.1%), le K_2HPO_4 (0.1%) et le KH_2PO_4 (0.1%), pH 8, tandis que pour le deuxième type on a utilisé des déchets de tomate broyés (1 mm) humidifiés par la même solution indiquée.

La conduite de la fermentation et le dosage de l'activité enzymatique ont été déroulés selon les méthodes citées au préalable.

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

1. Résultats des fermentations

Dans cette partie on doit présenter les résultats de chaque fermentation réalisée au niveau des erlen-meyers de 250 ml dans différentes températures. Le filtrat qui en résulte de chaque opération a été exploité pour la mesure du pH et le dosage enzymatique.

Les tableaux suivants (5, 6, 7 et 8) exposent l'ensemble des résultats du pH et ainsi de l'activité protéolytique obtenus à 30°C, à 35°C, à 40°C et à 45°C par les souches testées.

Tableau 5 : Résultats du pH et de l'activité protéolytique à 30°C.

Souche	Activité protéolytique (U)	pH
<i>Aspergillus sp.1</i>	937.2	6.79
<i>Trichoderma sp.</i>	571	6.38
<i>Aspergillus sp.2</i>	814.4	7.36
<i>Aureobasidium sp.</i>	2298.6	8.28
<i>Penicillium sp.</i>	212	7.75
<i>Scedosporium sp.</i>	293.8	7.24
<i>Aspergillus sp.6</i>	2831.2	7.04
<i>Aspergillus sp. 5</i>	313.2	6.55
<i>Aspergillus sp.3</i>	115.6	7.28

Tableau 6 : Résultats du pH et de l'activité protéolytique à 35°C.

Souche	Activité protéolytique (U)	pH
<i>Aspergillus sp.1</i>	239.8	6.7
<i>Trichoderma sp.</i>	9.62	7.37
<i>Aspergillus sp.2</i>	402.4	7.90
<i>Aureobasidium sp.</i>	402.4	8.05
<i>Penicillium sp.</i>	212	6.38
<i>Scedosporium sp.</i>	293.8	7.62
<i>Aspergillus sp.6</i>	238.4	7.60
<i>Aspergillus sp. 5</i>	313.2	7.05
<i>Aspergillus sp.3</i>	115.6	6.90

Tableau 7 : Résultats du pH et de l'activité protéolytique à 40°C.

Souche	Activité protéolytique (U)	pH
<i>Aspergillus sp.1</i>	197.4	7.92
<i>Trichoderma sp.</i>	293.8	7.32
<i>Aspergillus sp.2</i>	344.4	6.29
<i>Aureobasidium sp.</i>	1144.4	7.24
<i>Penicillium sp.</i>	339.6	6.75
<i>Scedosporium sp.</i>	1872.2	6.82
<i>Aspergillus sp.6</i>	1559	7.65
<i>Aspergillus sp. 5</i>	756.6	7.05
<i>Aspergillus sp.3</i>	238.4	7.16

Tableau 8 : Résultats du pH et de l'activité protéolytique à 45°C.

Souche	Activité protéolytique (U)	pH
<i>Aspergillus sp.1</i>	219.2	7.21
<i>Trichoderma sp.</i>	265	7.17
<i>Aspergillus sp.2</i>	378.2	7.02
<i>Aureobasidium sp.</i>	243.2	7.23
<i>Penicillium sp.</i>	245.6	7.19
<i>Scedosporium sp.</i>	457.8	7.11
<i>Aspergillus sp.6</i>	436	7.23
<i>Aspergillus sp. 5</i>	431.2	7.34
<i>Aspergillus sp.3</i>	154.2	7.05

1.1. Résultats du pH

Le tableau 9 montre qu'il y a une légère augmentation du pH du milieu de culture, qui reste globalement dans la neutralité. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les déchets de tomates possèdent un excellent pouvoir tampon, comme c'est le cas pour la plupart des résidus agroindustriels (Chutmanop et *al.*, 2008).

Par ailleurs, le pH le plus élevé a été indiqué chez la souche *Aureobasidium sp.* cultivée à 30°C. Cela pourrait revenir par la production de composants chargés positivement tel que l'ammoniaque résultant de la dégradation des protéines. Ceci est affirmé par une grande activité protéolytique observée par la même souche sous la même température.

De ce fait, le pH du milieu est affecté par les processus métaboliques, notamment enzymatiques. C'est pour cette raison que les variations du pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques (Sandhya et *al.*, 2005).

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des résultats du pH.

Température \ Souche	30°C	35°C	40°C	45°C
<i>Aspergillus sp.1</i>	6.79	6.7	7.92	7.21
<i>Trichoderma sp.</i>	6.38	7.37	7.32	7.17
<i>Aspergillus sp.2</i>	7.36	7.90	6.29	7.02
<i>Aureobasidium sp.</i>	8.28	8.05	7.24	7.23
<i>Penicillium sp.</i>	7.75	6.38	6.75	7.19
<i>Scedosporium sp.</i>	7.24	7.62	6.82	7.11
<i>Aspergillus sp.6</i>	7.04	7.60	7.65	7.23
<i>Aspergillus sp. 5</i>	6.55	7.05	7.05	7.34
<i>Aspergillus sp.3</i>	7.28	6.90	7.16	7.05

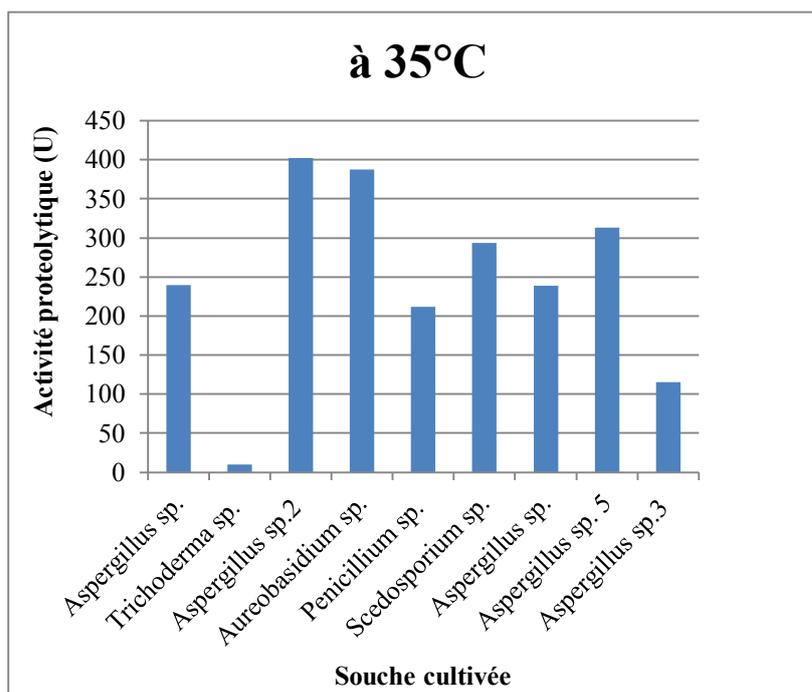
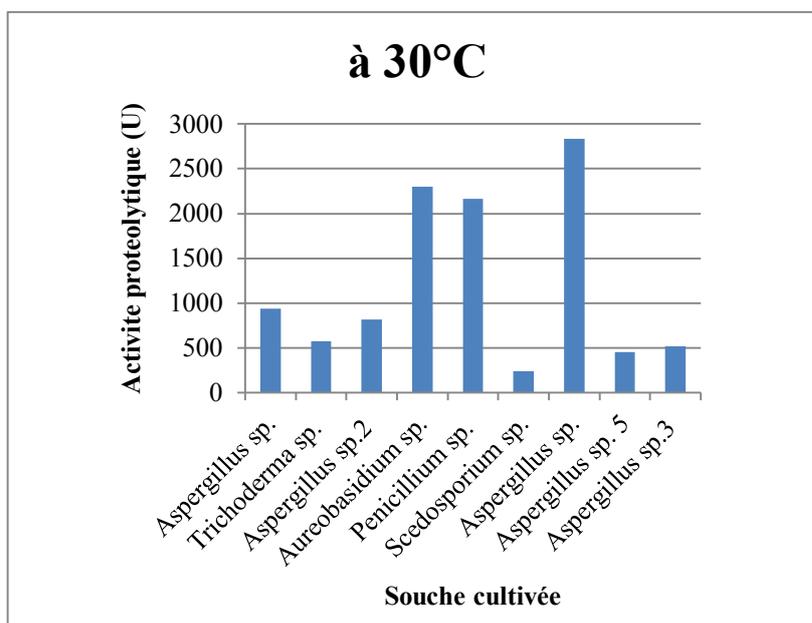
1.2. Résultats de l'activité protéolytique

L'activité enzymatique recherchée dans le milieu de fermentation solide à base de déchets tomates a montré que la production de protéase alcaline diffère d'une température à une autre chez les différentes souches. Les résultats synthétisés dans la figure 6 révèlent que les souches fongiques utilisées disposent de grandes variations entre elles au niveau de rendement en activité protéolytique

La simple observation du graphe obtenu après fermentation à 30°C montre que trois souches produisent des quantités importantes de protéases alcalines ; *Aureobasidium sp.* (2298.6 U), *Penicillium sp.* (1144.4 U) et notamment par la souche *Aspergillus sp. 6* (2831.2 U). Les autres souches présentent de moyennes activités protéolytiques ; *Aspergillus sp.1* (937.2 U). *Aspergillus sp. 2* (814.4 U). Concernant la température 35°C, pas d'activités remarquables ont été signalées.

Par contre, quant à la température 40°C, on constate qu'il y a des activités importantes de l'ordre de plus de 1000 U produites par *Scedosporium sp.* (1872.2 U), *Aspergillus sp. 6* (1559 U) et *Aureobasidium sp.* (1144.4 U).

En ce qui concerne le dosage enzymatique dans les milieux de fermentation à 45°C, les meilleurs résultats ne sont pas assez grands 457.8 U, 436 U et 431.2 U, ils ont été obtenus successivement par *Scedosporium sp.*, *Aspergillus sp. 6* et *Aspergillus sp.5*. Le reste des souches présentent des activités faibles à très faibles.



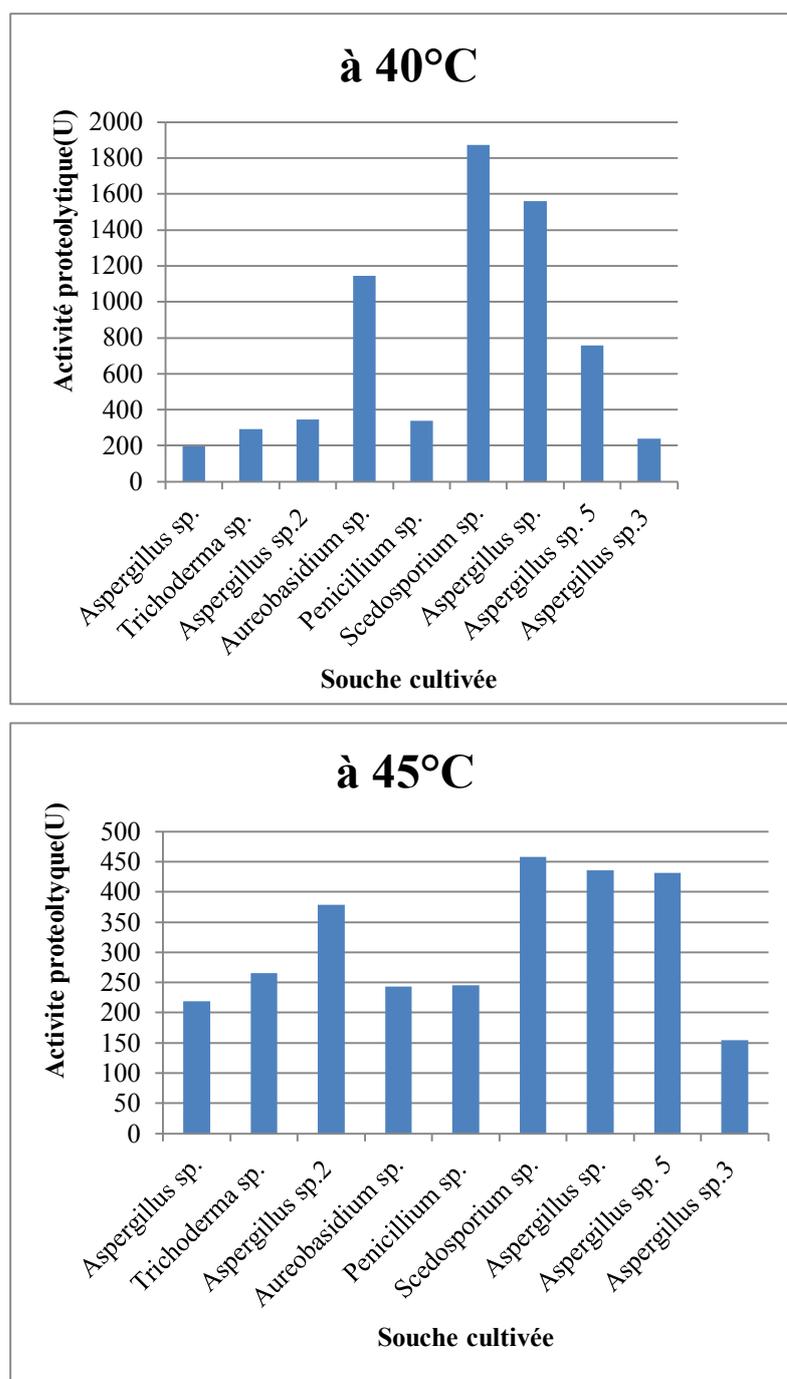


Figure 6 : Résultats de l'activité protéasique pour les souches cultivées sous les quatre températures.

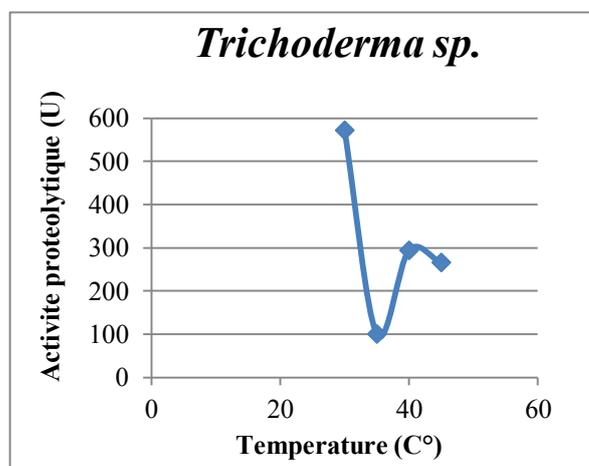
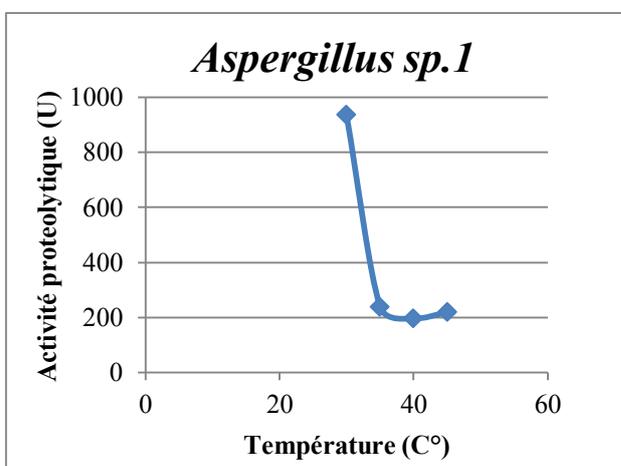
1.3. Effet de la température sur l'activité protéolytique produite

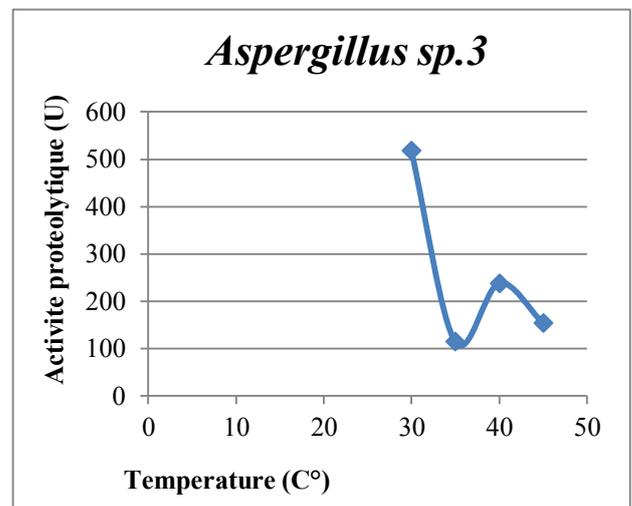
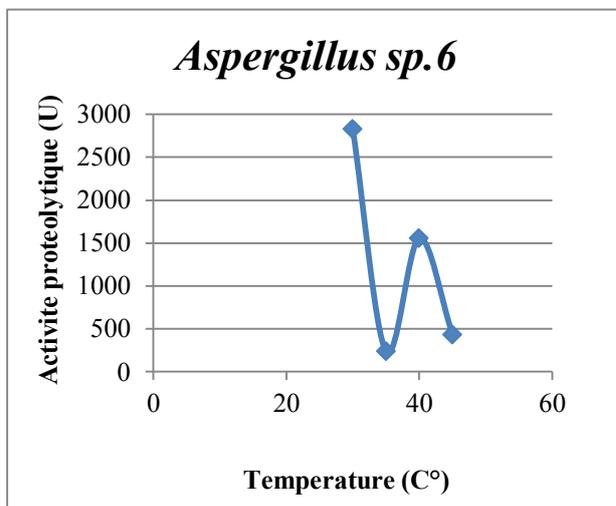
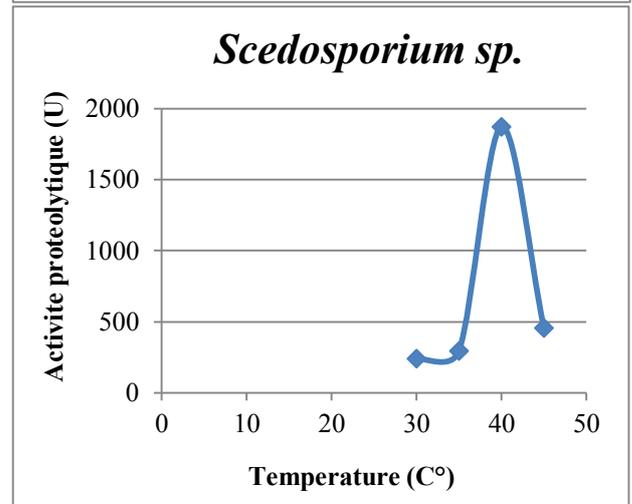
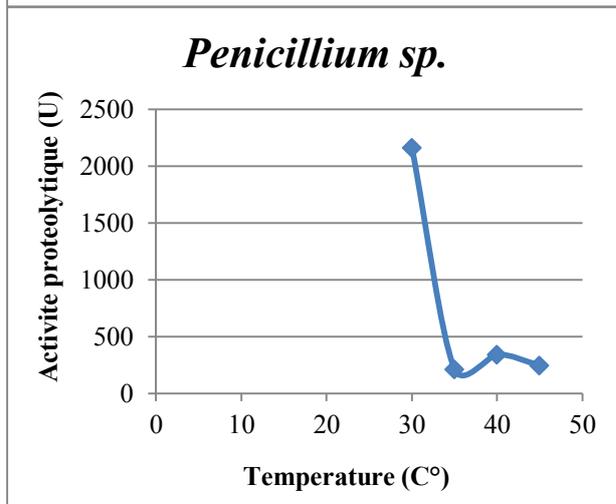
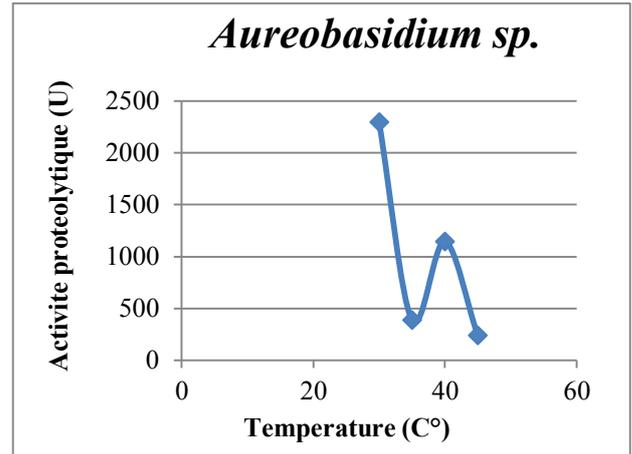
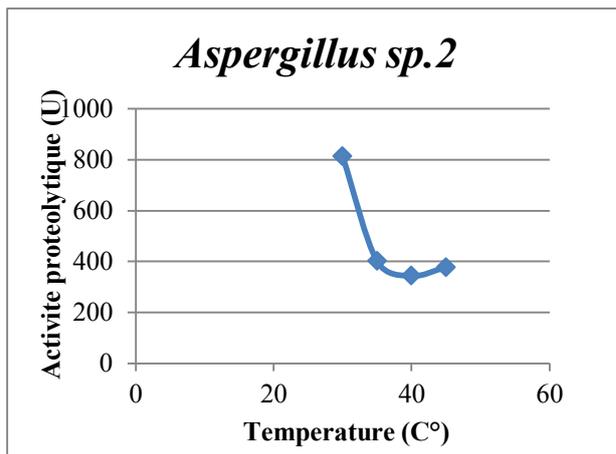
Les graphes mentionnés dans la figure ci-dessous présentent l'évolution de l'activité protéolytique de chaque souche fongique en fonction des températures testées.

Mis à part la courbe de la souche *Aspergillus sp. 5* et la souche *Scedosporium sp.* l'ensemble de toutes les souches fongiques étudiées donnent leurs meilleures activités protéolytiques sous la température 30°C. Au-delà de cette température une forte diminution a été observée. Cela affirme le caractère mésophile des champignons. Néanmoins, les souches *Aureobasidium sp.* et *Aspergillus sp.6* produisent à 40°C plus de 50 % de la quantité de protéases libérée à 30°C. En parlant sur la souche *Scedosporium sp.* elle donne un bon rendement protéolytique à 40°C d'où elle produit 1872.2 U. Ces protéases sont probablement thermostables.

Par conséquent, la température joue un rôle très important sur l'activité protéolytique, car elle a une influence directe sur la sécrétion extracellulaire des enzymes, éventuellement en modifiant les propriétés physiques de la membrane cellulaire. En effet, la température affecte fortement la synthèse d'une protéase, soit de manière non spécifique en influençant les taux de réactions biochimiques ou spécifiquement par induire ou réprimer leur production (Nardello-Rataj et al., 2003).

La comparaison de tous les résultats révèle que les souches *Aureobasidium sp.* *Penicillium sp.* *Aspergillus sp. 2*, *Scedosporium sp.* et *Aspergillus sp. 6* ont donné les activités protéolytiques les plus élevées. C'est en effet qu'elles sont sélectionnées pour la prochaine étape.





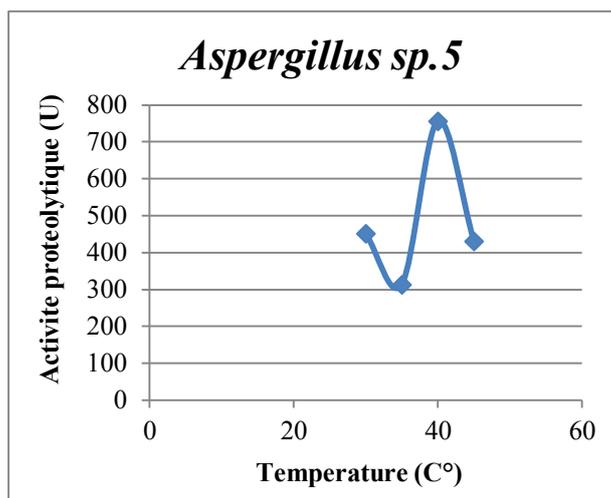


Figure 7: Courbes représentant l'effet de la température sur l'activité protéolytique chez les neuf souches testées.

2. Résultats du test d'optimisation du milieu de culture

Avant d'entamer l'analyse de la figure 8, on rappelle que les composants rajoutés à ce milieu sont la caséine, le NaCl, K_2HPO_4 et KH_2PO_4 avec ajustement du pH de la solution d'humidification à pH 8. En outre, on a testé la même composition avec des déchets de tomate broyés (1 mm de diamètre) et également avec des déchets de tomate non broyés. A signaler aussi que le milieu " contrôle" est un milieu de base qui contient que le substrat (déchets de tomate) sans enrichissement.

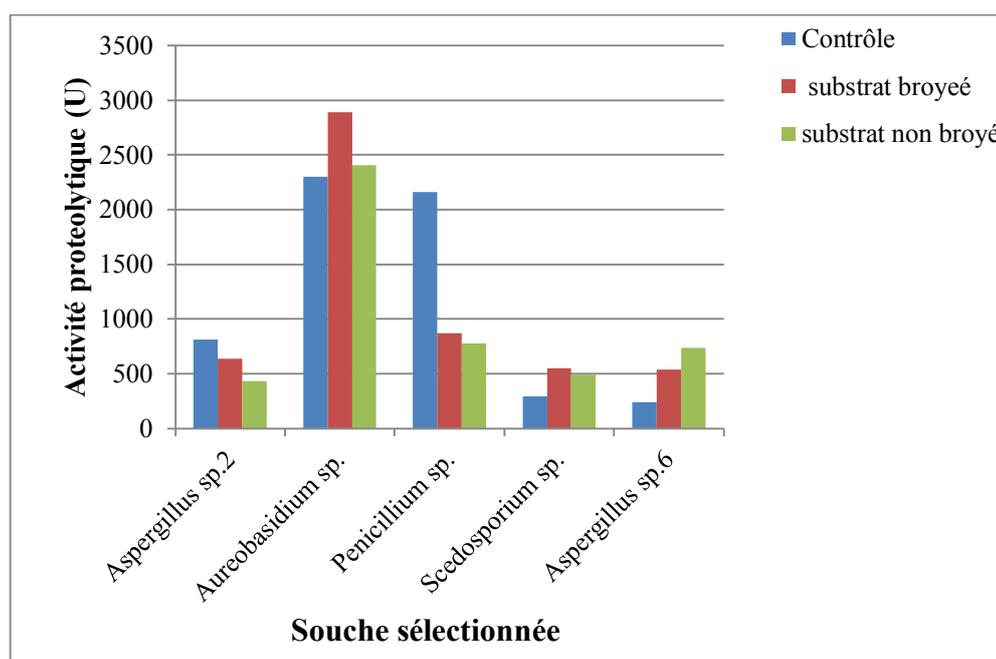


Figure 8 : Effet de la composition du milieu de culture sur l'activité protéolytique.

Si on voit la figure en question, on remarque que parmi les moisissures testées la souche *Aureobasidium sp.* a clairement pu se comporter avec la nouvelle composition du milieu de culture, notamment avec celle où les déchets de tomate sont broyés d'où elle donne 2891.56 U. De l'autre côté elle donne 2407.22 U dans le milieu avec déchets non broyés, soit respectivement une augmentation de 25% et de 54%, sachant que l'activité protéolytique dans le contrôle est 2298 U. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par la bibliographie. En effet, Murthy et Naidu (2010) ont signalé qu'un substrat de 1 mm de diamètre est trouvé le plus convenable pour la production des protéases dans le cas avec différents déchets agro-industriels. D'autre part, Belmessikh et al. (2013) ont rapporté que parmi différents facteurs testés, la caséine et le NaCl supportent fortement la sécrétion d'une protéase neutre par la souche *Aspergillus oryzae* NRRL 2220 sur milieu solide à base de déchets de tomate avec 1 mm de diamètre.

Par ailleurs, la souche *Aspergillus sp.* 6 présente également une augmentation de l'activité protéasique avec les nouveaux milieux, mais dans celle là l'accroissement le plus élevé (79%) est constaté avec le milieu où les déchets de tomate ne sont pas broyés (737.34 U). Concernant la souche *Scedosporium sp.*, il y a aussi des augmentations rapprochées dans la production de protéase dans les deux types du milieu d'environ 54.44% en comparant avec celle du milieu initial.

Par contre, on distingue une chute de l'activité protéolytique chez la souche *Penicillium sp.* avec les deux nouvelles formules du milieu de culture, soit une diminution d'environ 59.73%. Des résultats pareils sont obtenus par la souche *Aspergillus sp.* 2 chez laquelle le déclin de l'activité est au tour de 22.16%. D'autres travaux réalisés par Merheb-Dini et al. (2010) et Zanphorlin et al. (2011) rapportent par contre que l'utilisation de la caséine avec quelques sels donne de bons rendements, respectivement pour la production d'une protéase acide par *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 et d'une protéase alcaline par *Myceliophthora sp.*

De même, des résultats similaires ont été annoncés par Sumantha et al. (2008) et Paranthaman et al. (2009) qui décrivent l'utilisation de 1 g/l de chlorure de sodium pour la production d'une protéase neutre, les premiers par *A. oryzae* NRRL 2217 sur un mélange de substrats solides, son de blé et déchets d'huile de noix de coco (3 : 1) et les derniers par *A. niger* MTCC 281 sur déchets de riz.

En conclusion, la composition du milieu de culture dispose une grande influence sur la production enzymatique soit de manière positive ou bien de manière négative. En outre, dans

le développement industriel des souches, le potentiel de chaque souche est un facteur principal mais pas le seul à prendre en considération. En effet, en absence d'un régime régulé du procédé de fabrication, il est probable d'avoir une bonne souche mais des conditions de fermentation médiocres qui font chuter la production. Il est donc nécessaire de considérer tous les paramètres nutritionnels et environnementaux durant la croissance.

De plus, des essais de fermentation doivent être réalisés a priori pour pouvoir développer un procédé à grande échelle. Ainsi il serait possible d'obtenir de nouveaux mutants plus performants sous des conditions spécifiques au procédé. Ainsi dans toute production d'enzyme, l'objectif principal est la minimisation du coût de production en optimisant le procédé de récupération après fermentation afin de maximiser la production industrielle.

Conclusion générale

Conclusion générale

La transformation industrielle de la tomate génère de millions de tonnes de déchets non utilisés. Le recyclage et la réutilisation de ces résidus agro-alimentaires contribuent, d'un côté à limiter l'impact de cette industrie sur l'environnement et d'un autre côté, à produire, grâce à l'implication des nouvelles biotechnologies des biomolécules à haute valeur ajoutée, notamment des enzymes.

Ce modeste travail porte sur la production de la protéase alcaline en utilisant les déchets de tomate comme un substrat de base. Pour cela, neuf (09) souches fongiques isolées de source thermale ont été ensemencées dans un milieu de culture solide constitué par des déchets de tomate humidifiés par de l'eau distillée, puis incubées à différentes températures : à 30°C, à 35°C, à 40°C et 45°C. L'analyse des résultats du pH et de l'activité protéolytique a révélé que le pH du milieu le plus élevé a été indiqué chez la souche *Aureobasidium sp.* (8.28) cultivée à 30°C en parallèle avec une production importante de la protéase alcaline (2298.6 U), mais la meilleure activité a été notée chez la souche *Aspergillus sp.* 6 (2831.2 U). Cette même souche occupe une deuxième position lors de la production de l'enzyme en question sous la température 40°C (1559 U) après la souche *Scedosporium sp.* (1872.2 U) et suivie par *Aureobasidium sp.* (1144.4 U). Ceci est en parfaite concordance avec la littérature qui classe le genre *Aspergillus*, parmi les genres fongiques les plus importants en termes de production de protéases.

Les protéases des trois souches citées qui ont donné des activités appréciables à la température 40°C pourraient être probablement considérées comme étant thermostables. De ce fait, l'étude de l'effet de la température montre qu'elle joue un rôle très important sur la sécrétion des protéases et des enzymes d'une manière générale, d'où il y a des souches microbiennes produisent l'enzyme à 30°C et pas à 40°C et à 45°C tels qu'*Aspergillus sp.* 1 et *Penicillium sp.*, et vis versa, pas de production de la protéase à 30°C, mais elle existe à 40°C comme par la souche *Scedosporium sp.*

Ce qui en résulte que, cinq souches ont pu donner de bons rendements protéolytiques, qu'on a sélectionné pour le test suivant, à savoir : *Aureobasidium sp.* *Penicillium sp.* *Aspergillus sp.* 2, *Scedosporium sp.* et *Aspergillus sp.* 6.

Afin de maximiser la production de l'enzyme ciblée, ces cinq souches choisies ont été cultivées dans un milieu de culture toujours à base de déchets de tomate dont, on a lui rajouté

d'autres composants : la caséine (1 %), le NaCl (0.1%), le K₂HPO₄ (0.1%) et le KH₂PO₄ (0.1%), pH 8. Sachant qu'on a utilisé un type du milieu où les déchets de tomate sont non broyés et un autre où ces déchets ne sont pas broyés. Bien que dans les deux types, les déchets sont humidifiés par une solution contenant les composants cités préalablement.

Ces facteurs semblent avoir soit une influence positive où il y avait une augmentation de l'activité protéolytique d'une manière significative ; chez la souche *Aureobasidium sp.* dont les déchets de tomate sont broyés et chez la souche *Aspergillus sp.* 6 dont les déchets ne sont pas broyés et ainsi chez la souche *Scedosporium sp.* mais cette fois-ci avec les deux types du milieu, ou bien un effet négatif où au contraire on a observé une diminution de cette activité enzymatique chez les souches *Penicillium sp.* et *Aspergillus sp.* 2

Ces résultats permettent de considérer les déchets tomates comme un substrat favorable pour la production des protéases vu sa richesse en protéines. Dans le but de progresser dans ce domaine, il est indispensable :

- De définir la composition chimique des déchets de tomate.
- D'étudier d'autres facteurs nutritifs afin d'optimiser le milieu de culture.
- De purifier l'enzyme en question et de la caractériser.

*Références
bibliographiques*

- Abidi F., Limam F., Nejib M.M., 2008.** Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: assay as biodetergent. *Process Biochem*, 43: 1202-1208.
- Agrawal D., Patidar P., Banerjee T., Patil S., 2005.** Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Proc. Biochem.*, 40: 1131–1136.
- Aguilar C. N., Gerardo G. S., PLilia A., Raul R. H., José M. H. Juan C. E., 2008.** Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4 (4): 354-366.
- Al-Muhtaseb A.H., Al-Harashsheh M., Hararah M., Magee T.R.A., 2010.** Drying characteristics and quality change of unutilized-protein rich-tomato pomace with and without osmotic pre-treatment. *Ind. Crops Prod.*, 31: 171–177.
- Alvarado A., Pacheco-Delahaye E., Hevia P., 2001.** Value of a tomato byproduct as a source of dietary fiber in rats. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 56: 335–348.
- Al-Wandawi H., Abdul-Rahman M., Al-Shaikhly K., 1985.** Tomato processing wastes as essential raw materials source. *J. Agric. Food. Chem.*, 33: 804–807.
- Amoura A., Baz S., 2014.** Identification des souches fongiques productrices des protéases, isolées à partir de source chaude. Mémoire de Master. *Univ. Constantine I.* Algérie.
- Anson M.L., 1938.** The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J. G. Physiol.*, 19: 446-459.
- Anwar A., Saleemuddin M., 1998.** Alkaline proteases. A review. *Biores. Technol.*, 64: 175-183.
- Assamoi A.A., Destain J., Thonart P., 2009.** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(2): 281–294.
- Avelino A., Teixeira Avelino H., Carlos Roseiro J., Amaral Collaço M.T., 1997** Saccharification of tomato pomace for the production of biomass. *Bioresour. Technol.*, 61: 159-162.
- Baysal T., Ersus S., Starmans D.A.J., 2000.** Supercritical CO₂ extraction of β -carotene and lycopene from tomato paste waste. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 5507–5511.
- Belmessikh A., 2011.** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Thèse de Magister. *Université des Frères Mentouri Constantine.* Algérie.
- Belmessikh A., Boukhalfa H., Mechakra-Maza A., Gheribi-Aoulmi Z., Amrane A., 2013.** Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44: 377-385.

- Benakmoum A., Abbeddou S., Ammouche A., Kefalas P., Gerasopoulos D., 2008.** Valorization of low quality edible oil with tomato peel waste. *Food Chemistry.*, 110: 684-690.
- Bergougnoux V., 2013.** The history of tomato: From domestication to biopharming. *J. Biotechnol. Adv.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.003>
- Beynon R.J., Oliver S., 2004.** Avoidence of proteolysis in extracts. *Mthods mol. Boil.*, 596: 81-93.
- Bezawada J., 2010.** Production améliorée, récupération et application d'une protéase alcaline produite en utilisant les boues d'épuration comme substrat. Thèse de Doctorat. *INRS. Univ. Québec.* Canada.
- Bhat M K. 2000.** Cellulases and related enzymes in Biotechnology. *Biotechnol Adv.*, 18: 355-383.
- Blanc P., Goma G., 2006.** Valorisation non alimentaires de productions agricoles par voie biologique. Pp. 79-98. *In : Colonna P. (Ed.), la chimie verte.* Lavoisier. France.
- Bloch E., Rachel R., Burgraff S., Hafend bradl., Jannasch H.W and Stetta O., 1997.** *Pyrolobus fumarii* gen and sp. Nov presents a novel group of and archa. Extending the upper temperature limite for life to 113°C. *Extremophiles*, 1 : 14-22.
- Boiron P., 1996.** Organisation et biologie des champignons. Edition *Nathan.* p:13-69.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. *Masson.* Paris. pp. 12-426.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. *Masson, Collection Biotechnologies,* p : 34-428.
- Boudih S., 2011.** Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro. Thèse de doctorat. *Université de Paris-Est.* France.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J., 1989.** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. *Lavoisier.* Paris. P. 216-244.
- Brock T.D. 1995.** The road to yellow stone and beyond. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 1-28.
- Brodowski D., Geisman J.R., 1980.** Protein content and amino acid composition of protein of seeds from tomatoes at various stage of ripness. *J. Food Sci.* 45: 228–229, 235.
- Carvalho F., Carlos Roseiro J., Amaral Collaço M.T., 1994.** Biological conversion of tomato pomace by pure and mixed fungal cultures. *Process Biochem.*, 29: 601-605.

Castegnaro M., Pfohl-Leskowicz A. 2002. Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans La sécurité alimentaire du consommateur, *Lavoisier. Tec&Doc.*

Celma A.R., Cuadros F., López-Rodríguez F., 2009. Characterisation of industrial tomato by-products from infrared drying process. *Food Bioproducts Proc.*, **87**; 282–291.

Chi Z., Ma C., Wang P., Li H.F., 2007. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresour. Technol.*, **98**; 534–538.

Chiu Y. T., Chiu C. P., Chien J. T., Ho G. H., Yang J., Chen B. H., 2007. Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly (γ -glutamic acid) as carrier. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 5123-5130.

Choudhari S. M., Ananthanarayan L., 2007. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chemistry*, 102: 77-81.

Christakopoulos P., Tzalas B., Mamma D., Stamatis H., Liadakis G.N., Tzia C., Kekos D., Kolisis F.N., Macris B.J., 1998. Production of an esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing transesterification reactions in organic solvents. *Proc. Biochem.*, 33: 729–733.

Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y., Srinophakun P., 2008. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83: 1012–1018.

Conner D.E., Beuchat L.R., 1987. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischerias* affected by sporulation and heating medium. *International Journal of Food Microbiology*, 4: 303-312.

Cooney D.G, Emerson R., 1964. Thermophilic fungi . An account of their biology activities and classification *W.H Freeman & Co –San Francisco –Clife.*

Couto S. R., Sanromán Á. M., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry- A review.*Journal of food Engineering*, 76. 291-302.

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

Davet R., 1997. La Communauté Fongique : Son organisation et rôle dans l'écosystème. *Marcel Dekker, Inc.* New York.

Denek N., Can A., 2006. Feeding value of wet tomato pomace ensiled with wheat straw and wheat grain for Awassi sheep. *Small Ruminant Res.*, 65: 260–265.

Devi M.K., Banu A.R., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V., Palaniswamy M., 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.*, 1(7): 1-6.

- Devi M.K., Banu A.R., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V., Planiswamy M., 2008.** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.*, 1(7): 1-6.
- Djama Y., 2013.** L'Algérie peut atteindre l'autosuffisance en tomate industrielle dans 5 ans (Laid Benamor). www.maghrebemergent.com/economie/algérie. (visité en novembre, 2013).
- Do Rosario Freixo M., Karmali A., Arteiro J.M. 2008a.** Production of polygalacturonas from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and its chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 475-484.
- Do Rosario Freixo M., Karmali A., Frazao C., Arteiro J.M., 2008b.** Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. *Process Biochem.*, 43: 1265-1274.
- Durand G., Monson P., 1982.** Les enzymes. Production et utilisations industrielles. *Bordas*. Paris. P. 36- 153.
- Durand A., 2003.** Bioreactor designs for solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 13: 113-125.
- Eller F.J., Moser J.K., Kenar J.A., Taylor S.L., 2010.** Extraction and analysis of tomato seed oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 87: 755–762.
- Fakas S., Certik M., Papanikolaou S., Aggelis G., Komaitis M., Galiotou-Panayotou M. 2008.** γ -Linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. *Bioresour. Technol.*, 99: 5986-5990.
- Ferrero M.A., Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D., Sineriz F., 1996.** Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45: 327–32.
- Frazier, W.C. 1967.** Food microbiology. *Academic presse*. London. P: 3-429.
- Freixo M.R., Karmali A., Arteiro J.M., 2008a.** Production of polygalacturonase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and its chromatographic behavior on immobilized metal chelates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 475–484.
- Freixo M.R., Karmali A., Arteiro J.M., 2008b.** Production and chromatographic behavior of polygalacturonase from *Pleurotus ostreatus* on immobilized metal chelates. *Proc. Biochem.*, 43: 531–9.
- Freixo M.R., Karmali A., Frazão C., Arteiro J.M., 2008c.** Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. *Proc. Biochem.*, 43: 1265–1274.
- Fujiwara N., Tsumiya T., Katada T., Hosobuchi T., Yamamoto K., 1989.** Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme *Process Biochem.*, 24: 155-156.

García-Gómez M. J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L. A. 2009. Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.*, 112: 604–608.

Genckal H., Tari C., 2006. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus sp.* Isolated from natural habitats. *Enz. Microbial Technol.*, 39: 703-710.

George S., Raju V., Krishnan M.R.V., Subramanian T.V., Jayaraman K., 1995. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. *Proc. Biochem.*, 30: 457–462.

Germano S., Pandey A., Osaku C.A., Rocha S.N., Soccol C.R., 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, 32: 246–251.

Gervais P., Molin P., 2003. The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 13: 85-101.

Giannelos P.N., Sxizas S., Lois E., Zannikos F., Anastopoulos G., 2005. Physical, chemical and fuel related properties of tomato seed oil for evaluating its direct use in diesel engines. *Ind. Crops Prod.*, 22: 193–199.

Glazer A.G., Nikaido, H., 1995. Fundamental of applied Microbiology, Freeman and Company. *Microbial, Biotechnol.*, Washington. pp. 256-259.

Granner D.K., Murray R.K., Rodwell V.W., 2008. Biochimie de HARPER. 3e édition. *De Boeck*. Bruxelles., pp. 49-51, 483.

Guiraud J P., Rosec J P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire, *Ed. AFNOR, Saint-Denis-la-plaine*. France, 300 pp.

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

Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 15-32.

Hajji M., Kanoun S., Nasri M., Gharsallah N., 2007. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Proc. Biochem.*, 42: 791–797.

Hart H.E., Parish M.E., Burns J.K., Wicker L., 1991. Orange finisher pulp as substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. *Journal of food science.*, 56 (2): 408- 483.

Holker U., Lenz J., 2005. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages *Current Opinion in Microbiology*, 8(3): 301-306.

Hozzein Wael N., Li Wen-Jun, Ali Mohammed I.A., Ola H. M., Ahmed S., X. Li-H., Jiang C.L., 2004. *Nocardiosis alkaliphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycetes isolated from desert soil in Egypt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 247–252.

Iandolo D., Piscitelli A., Sannia G., Faraco V., 2011. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 163: 40-51.

Jaouadi B., Ellouz-Chaabouni S., Ben Ali M., Ben Messaoud E., Naili B., Dhouib A., Bejar S., 2009. Excellent laundry detergent compatibility and highdehairing ability of the *Bacillus pumilus* CBS alkaline proteinase (SAPB). *BiotechnolBioprocess Eng.*, 14: 503-512.

Joo H.S., Chang C.S., 2005. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Proc. Biochem.*, 40: 1263-1270.

Joyeaux A., 1982. Les préparations industrielles d'enzymes. p :22-46.In : Durant G., Monsan. (ed.), Les enzymes production et utilisations industrielles. *Edition Gautier- Villars* .Paris.

Kalpana Devi A., Rasheedha Banu G., Gnanaprabhal B. ., Pradeep., Palaniswamy M., 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. 1(7).

Katapodis P., Christakopoulou V., Christakopoulos P., 2006. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in tomato seed meal using response surface methodology. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 22: 501–506.

Kaur D., Wani A.A., Oberoi D. P. S., Sogi D.S., 2008. Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology. *Food Chemistry*, 108:711–718.

Kim W., Choi K., Kim Y., Park H., Choi J., Lee Y., Oh H., Kwon I., Lee S., 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2482-2488.

King A.J., Zeidler G., 2004. Tomato pomace may be a good source of vitamin E in broiler diets. *California Agric.*, 58(1): 59–62.

Kirk O., Borchert T.V., Fuglsang C.C., 2002. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13: 345-351.

Knoblich M., Anderson B., Latshaw D., 2005. Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids. *J. Sci. Food Agric.*, 85: 1166 –1170.

Kumar D., Krishnaveni K., Balakumaran M., Ramesh S., Kalaichelvan P., 2012. Production and optimization of extracellular Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* isolated from dairy effluent. *Der Pharmacia Lettre.*, 4 (1): 98-109.

- Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R., Bhalla T.C., 2008.** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. of Microbiol*, 3(12): 661–672.
- Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R., Bhalla T.C., 2008b.** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. of Microbiol*, 3(12): 661–672.
- Laxman R.S., Sonawane A.P., More S.V., Rao B.S., Rele M.V., Jogdand V.V., Deshpande V.V., Rao M.B., 2005.** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Proc. Biochem.*, 40; 3152–3158.
- Lenoir J., Auberger B., 1977.** Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*, II- Caractérisation d'une protéase neutre. *Le lait*, 57; 471-489.
- Lester M., Morrison M.D., 1946.** The control of diarrhea by tomato pomace. *American J. Digestive Diseases*, 13(6); 196-198.
- Leveau J.Y., Bouix M., 1993.** Les moisissures. p : 112-163. In : *Florent J.*(ed), Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc
- Liadakis G.N., Tzia C., Oreopoulou V., Thomopoulos C.D., 1995.** Protein isolation from tomato seed meal, extraction optimization. *J. Food Sci.*, 60; 477–482.
- Madigan M.T., Martinko J.M., 2007.** Biologie des microorganismes. 11^{ème} édition. *Pearson Education*. Broek. France. pp. 478; 479.
- Mahajan R.T., Badgajar S.B., 2010.** Biological aspects of proteolytic enzymes.
- Maheshwari R., Bradwa J.G., Bhat M.K., 2000.** Thermophilic fungi their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(3): 461- 488.
- Manpreet S., Sawraj S., Sachin D., Pankaj S., Banerjee U. C., 2005.** Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*. 1 (2). 1-9.
- Mansoori B., Modirsanei M., Radfar M., Kiaei M.M., Farkhoy M., Honarзад J., 2008.** Digestibility and metabolisable energy values of dried tomato pomace for laying and meat type cockerels. *Animal Feed Sci. Technol.*, 141; 384–390.
- Mathot P., 1996.** Modélisation d'un réacteur simplifié pour la fermentation solide de produits et sous-produits agricoles. Valorisation de l'aliment fermenté par le porc. Thèse de doctorat : Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique).
- McCay O.M., Smith S.E., 1940.** Tomato pomace in the diet. *Sci.*, 91; 388.
- Mechakra A., Auberger B., Remeuf F., Lenoir J., 1999.** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*, 19; 663–675.

Mechehaleh F., Yekhlef M., 2015. Production de la protéase alcaline par des moisissures isolées de source thermale sur milieu à base de plumes de poulet. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine. Algérie.

Mehta V.J., Thumar J.T., Singh S.P., 2006. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresour. Technol.*, 97; 1650–1654.

Merheb-Dini C., Gomes E., Boscolo M., Silva R., 2010. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31). *Food Chemistry* 120; 87–93.

Mouchacca J., 1997. Thermophilic fungi. Biodiversity and Taxonomic Status. Cryptogamies. *Mycol.*18:19-69

Mouchacca J., 1999. Thermophilic fungi: present taxonomic concepts in thermophilic moulds in biotechnology, (edn) Johri. S.N. *Satyanarayana and Oren J. Kluver.* Dordrecht.

Murthy P.S., Naidu M.M., 2010. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Appl. Sci. J.*, 8(2); 199-205.

Neklyudov A.D., Ivankin A.N., Berdutina A.V., 2000 Properties and uses of protein hydrolysates (review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, 36: 452–459.

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

Nilegaonkar S.S., Zambare V.P., Kanekar P.P., Dhakephalkar P.K., Sarnaik S.S., 2007. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCMB-326, *Bioresour Technol*, Vol. 98. pp. 1238-1245.

Nishio N., Nagai S., 1981. Single cell protein production from mandarin orange peel. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*1.p: 156-160

Paranthaman R., Alagusundaram K., Indhumathi J., 2009. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World J. Agric. Sci.*, 5(3); 308-312.

Parks C.L., 1997. Handbook of microbiological media. Second edition by CRC. P 339- 400.

Patel R., Dodia M., Singh S.P., 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.*: Production and optimization. *Proc. Biochem.*, 40; 3569– 3575.

Peciulyte D., 2007. Isolation of cellulolytic fungi from waste paper gradual recycling materials. *Ekologija.* 53: 11–18.

Pelmont J., 1995. Enzymes : catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble.

Perry J.J., Staley J.T., Lory S., 2004. Microbiologie. Sinauer associates. Paris. pp. 575–576. pp. 7; 621; 652–654.

Rahardjo Y.S.P., Tramper J., Rinzema A., 2006. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol. Adv.*, 24(2), 161-179.

Rai S.K., Mukherjee A.K., 2010. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochem. Eng. J.*, 48; 173– 180.

Raimbault M., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. 1(3). 174-188.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 597–635.

Rawashdeh R., Saadoun I., Mahasneh A., 2005. Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace. *African J. Biotechnol.* 4: 251-255.

Reddy L.V.A., Wee Y.J., Yun J.S., Ryu H.W., 2008. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour. Technol.*, 99; 2242-2249.

Roquebert M.F. 1997. Les moisissures, nature biologie et contamination <http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/roqueber.htm#Bibliographie>.

Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A., 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem.*, 40: 2689-2694.

Sathya R., Pradeep B.V., Angayarkanni J., Palaniswamy M., 2009. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro- industrial wastes. *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, 14; 765-794.

Scriban, R., 1999. Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.

Scriban, R., 1993. Biotechnologie. 4^e édition. Technique et documentation. Lavoisier. Paris. P. 30-695.

Sharma K.M., Kumar R., Vats S., Gupta A., 2014. Production, partial purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus aryabhatai* K3. *IJAPBC.*, 3(2): 2277-4688.

Sicard P., 1982. Applications industrielles des enzymes ; In : Les enzymes, production et utilisation industrielles .Durand G., Monson P. Editions Gauthier .Villars, Paris. p.110-180.

Singh S.K., Szakacs G., Soccol C.R., Pandey A., 2008. Production of enzymes. pp. 181-204. In: Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi.

Singhania R. R., Patel A. K., Soccol C. R., Pandey A., 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 44. 13-18.

Sinsuwan S., Rodtong S., Yongsawatdigul J., 2008. Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Proc. Biochem.*, 43; 185–192.

Soares V.F., Castilho L.R., Bon E.P.S., Freire D.M.G., 2005. High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol; 121– 124.

Sogi D.S., Bhatia R., Garg S.K., Bawa A.S., 2005. Biological evaluation of tomato waste seed meals and protein concentrate. *Food Chem.*, 89; 53–56.

Sogi D.S., Shivhare U.S., Garg S.K., Bawa A.S., 2003. Water Sorption Isotherm and Drying Characteristics of Tomato Seeds. *Biosystems Eng.*, 84 (3); 297–301.

Sogi D. S., Bawa A. S., 1998. Studies on dehydration of tomato processing waste. *Indian Food Packer*, 52(2); 26–29.

Sumantha A., Fontanille P., Larroche C., Pandey A., 2008. Exploration of fungal spores as a possible storehouse of proteolytic biocatalysts. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24; 2897–2901.

Sumantha A., Sandhya C., Szakacs G. and Pandey A., 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 40. 2689- 2694.

Tensey M.R., Brock T.D., 1978. Microbial life at high temperature, aerological aspect, (edn) Kushner. Life in extreme environments. Academic press. Ltd. London .United Kingdom.

Thomas L., Larroche C., Pandey A., 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>.

Tobe S., Takami T., Ikeda S., Horikoshi K., 1976. Production of some enzymatic properties of alkaline protease of *Candida lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, 40; 1087–1092.

Vági E., Simándi B., Vásárhelyiné K. P., Daood H., Kéry A., Doleschall F., Nagy B., 2007. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products. *J. of Supercritical Fluids*. 40: 218-226.

Van Dyk J. S., Gama R., Morrison D., Swart S., Pletschke B. I., 2013. Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 26: 521–531

Ventura M.R., Pieltain M.C., Castanon J.I.R., 2009. Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 154; 271–275.

Vishwanatha K.S., Appu Rao A.G., Singh S.A., 2010. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC5341: Optimization of process parameters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 129-138.

Walker G.M., White N.A., 2005. Introduction to Fungal Physiology in Kavanagh K., Fungi: Biology and applications. John Wiley & Sons Ltd. England. p; 2.

Wang Q., Wang X., Wang X., Ma H., 2008. Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 43: 280-286.

Weiss W.P., Frobose D.L., Koch M.E., 1997. Wet tomato pomace ensiled with corn plants for dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 80; 2896–2900.

Wu T.Y., Mohammad A.W., Jahim J.Md., 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 Microb. Technol.*, 39; 1223-1229.

Zanphorlin L.M., Cabral H., Arantes E., Assisc D., Julianoc L., Julianoc M.A., Da-Silva R., Gomes E., Bonilla-Rodriguez G.O., 2011. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* *Process Biochemistry*. 46: 2137–2143.

Zuorro A., Lavecchia R., Medici F., Piga L., 2013. Enzyme-Assisted Production of Tomato Seed Oil Enriched with Lycopene from Tomato Pomace. *Food Bioprocess Technol.*, 6: 3499–3509.

Sites internet:

<http://www.Futura-sciences.com>

<http://www.djazairress.com/fr/elwatan/499015>

INPV (Institut National de la Protection des Végétaux) de Annaba. La tomate d'industrie en Algérie. <http://www.amitom.com/amitom/File/algeria.pdf>.

Annexes

Annexe 1 : Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

- Pomme de terre200 g
- Glucose20 g
- Agar15 g
- Eau distillée.....compléter jusqu'à 1000 ml

- Laver la pomme de terre pelée.
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pendant 1 heure.
- D'autre part, faire fondre l'agar-agar dans 500 ml d'eau distillée chaude.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Ajuster le volume à 1000 ml.
- Stériliser par autoclavage à 121°C/20 min.

Annexe 2 : Eau Physiologique

La solution est généralement composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (NaCl) dilué à 9 pour 1000 (= solution à 0.9% (masse/volume) de NaCl, soit 9 g.l⁻¹).

Annexe 3 : Dosage de l'activité protéolytique

- Solutions utilisées

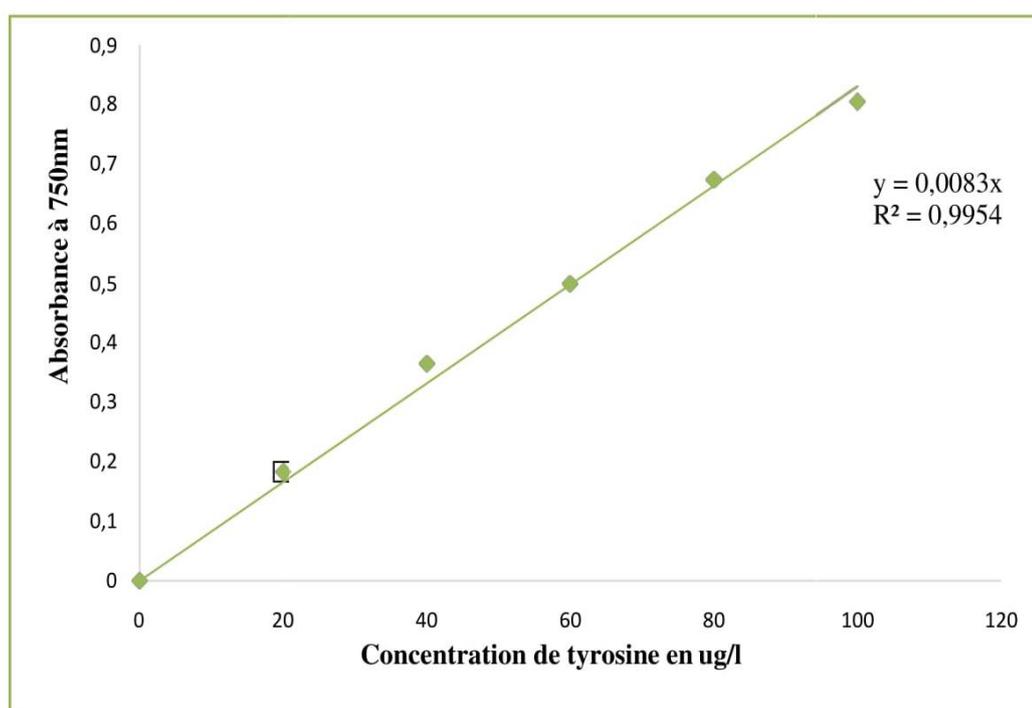
- Caséine 2,5% dans Citrate de Sodium (0,02 M).
- Solution mère 100 µg/ml de Tyrosine.
- TCA 4%.
- Na₂CO₃ 15% dans NaOH (0,1 N).
- Folin-Ciocalteux 1/4éme.

Protocole suivi :

Dilution	Blanc	1	2	3	4	5
Solution mère de Tyrosine (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
TCA (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Na ₂ CO ₃ (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Agitation et incubation pendant 10 min à T° ambiante.						
Folin 1/4	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

Agitation vigoureuse du mélange, puis incubation 30 min à température ambiante à l'obscurité. En fin, lecture de la densité optique à 750 nm.

Une unité de protéolyse correspond à la libération de 1 µg de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans un ml d'échantillon (1µg/h/ml). La concentration déduite de la courbe d'étalonnage correspond à 0.5 ml d'échantillon dilué par les réactifs ajoutés au cours de la première étape.

Annexe 4 : La courbe d'étalonnage de la tyrosine

Résumés

Résumé

Le but visé lors de cette ébauche est de déterminer la capacité des souches fongiques à utiliser à différentes températures les déchets de tomate pour la production de la protéase alcaline. Pour cela, neuf moisissures ont été ensemencées sur un milieu solide à base de ce substrat et incubées statiquement à 30°C, puis à 35°C, ensuite à 40°C et enfin à 45°C pendant 96 h. Le dosage de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques a révélé que la meilleure activité est observée chez la souche *Aspergillus sp. 6* (2831.2 U), suivie par *Aureobasidium sp.* (2298.6 U). Quant à la température 40°C, on a obtenu de bons rendements protéasiques ; 1872.2 U par *Scedosporium sp.*, 1559 U par *Aspergillus sp.6* et 1144.4 U par *Aureobasidium sp.* Par contre, pas de production enzymatique assez importante n'a été constatée à 35°C et également à 45°C par l'ensemble de toutes les souches. Par conséquent, les cinq souches ayant donné les activités les plus élevées ont été sélectionnées, à savoir : *Aureobasidium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp. 2*, *Scedosporium sp.* et *Aspergillus sp. 6*. Par la suite, un test d'optimisation a été appliqué sur ces dernières afin de maximiser la production de l'enzyme en question. De ce fait, l'inoculation de ces moisissures a été faite dans deux types du milieu ; le premier c'est de déchets de tomate non broyés humidifiés par une solution contenant la caséine (1 %), le NaCl (0.1%), le K₂HPO₄ (0.1%) et le KH₂PO₄ (0.1%), pH 8, alors que le deuxième c'est de déchets de tomate broyés (1 mm) humidifiés par la même solution. L'analyse des résultats montre que *Aureobasidium sp.* a donné le meilleur résultat protéolytique quelque soit le type du milieu, mais notamment avec celui où les déchets de tomate sont broyés d'où il y a une augmentation par 25 %. De même, un effet positif est signalé chez *Aspergillus sp. 6* (79 %) sur déchets non broyés et aussi chez *Scedosporium sp.* (54.44 %). Toutefois, les nouveaux composants ont provoqué une diminution de l'activité par 59.73 % chez *Penicillium sp.* et par 22.16 % chez *Aspergillus sp. 2*. La présente étude confirme l'intérêt que présentent les déchets tomate comme milieu de culture alternatif pour la production de protéases vu sa richesse en protéines.

Mots clés: Moisissures, Protéase, Fermentation solide, déchets de tomate.

Abstract

The aim of this draft is to determine the capacity of fungal strains to use at different temperatures industrial tomato waste for the production of alkaline protease. For this purpose, nine molds were inoculated on a solid medium based on this substrate and statically incubated at 30°C., next at 35°C., then at 40°C and finally at 45°C for 96 h. Assay of the proteolytic activity of the enzyme extracts revealed that the best activity is observed with the strain *Aspergillus sp. 6* (2831.2 U), followed by *Aureobasidium sp.* (2298.6 U). As for the temperature 40°C., good protease yields were obtained; 1872.2 U by *Scedosporium sp.*, 1559 U by *Aspergillus sp. 6* and 1144.4 U by *Aureobasidium sp.* On the other hand, no significant enzymatic production was shown at 35°C and also at 45°C by all the strains. Therefore, the five strains that gave the highest activity were selected: *Aureobasidium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp. 2*, *Scedosporium sp.* and *Aspergillus sp. 6*. Thereafter, an optimization test was applied on these lasts in order to maximize the production of the enzyme in question. As a result, the inoculation of these molds was done in two types of medium; the first is tomato waste ungrounded moistened by solution containing casein (1%), NaCl (0.1%), K₂HPO₄ (0.1%), and KH₂PO₄ (0.1%), pH 8, whereas the second it is a grounded tomato waste (1mm) moistened with the same solution. Analysis of the results shows that *Aureobasidium sp.* has yielded the best proteolytic result whatever the type of medium, but especially where tomato waste is grounded and hence there is an increase of 25%. Similarly, a positive effect is reported with *Aspergillus sp. 6* (79%) on ungrounded waste and also with *Scedosporium sp.* (54.44%). However, the new components resulted in a 59.73% decrease in activity by *Penicillium sp.* and 22.16% by *Aspergillus sp. 2*. The present study confirms the value of tomato waste as an alternative culture medium for the production of proteases given its high protein content.

Key words: Molds, Protease, Solid State fermentation, industrial tomato waste.

ملخص

الهدف المرجو من خلال هاته الدراسة هو تحديد قدرة السلالات الفطرية على استخدام في درجات حرارة مختلفة مخلفات الطماطم الصناعية لإنتاج انزيم تحليل البروتين(البروتياز) القلوي. لهذا الغرض، تسع عفنيات قد تم زرعها في وسط صلب مادته الأولية هاته المخلفات، حضنت دون تحريك عند 30 درجة مئوية ثم عند 35 درجة مئوية، فيما بعد عند 40 درجة مئوية وأخيرا عند 45 درجة مئوية لمدة 96 ساعة. كشف فحص نشاط المستخلصات الإنزيمية في تحليل البروتين أن أفضل نشاط ملاحظ كان عند سلالة الرشاشيات (*Aspergillus sp. 6*) (2831.2 U) ، تليها ذهبية الدعامات (*Aureobasidium sp.*) (2298.6 U). أما بالنسبة لدرجة حرارة 40 درجة مئوية ، فقد حققت عوائد بروتينيو تحليلية جيدة، U 1872.2 من قبل *Scedosporium sp.* ، U 1559 من قبل *Aspergillus sp.6* و U 1144.4 من قبل *Aureobasidium sp.* على العكس، لم يلاحظ أي إنتاج أنزيمي معتبر عند 35 درجة مئوية وأيضا عند 45 درجة مئوية عند جميع السلالات. نتيجة لذلك، تم اختيار السلالات الخمس التي أعطت أعلى نشاط، وهي: *Aureobasidium sp.* ، *Penicillium sp.* ، *Aspergillus sp. 2* ، *Scedosporium sp.* et *Aspergillus sp. 6*. في وقت لاحق، تم تطبيق اختبار التحسين عليها لتحقيق أقصى قدر من إنتاج الانزيم المذكور. وهكذا، تم زرع هاته العفنيات في نوعين من الوسط؛ الأول هو مخلفات الطماطم غير مسحوقة مرطبة بمحلول يحتوي على الكازين (1%)، كلوريد الصوديوم (0.1%)، و (*K₂HPO₄* (0.1%) et le *KH₂PO₄* (0.1%)) ودرجة الحموضة 8، في حين أن الثاني هو مخلفات الطماطم مسحوقة (1 مم) ومرطب بنفس المحلول. تحليل النتائج يبين أن *Aureobasidium sp.* قد أعطت أفضل نتيجة تحليل بروتيني في أي نوع من الوسط، ولكن خصوصا مع ذلك الذي فيه مخلفات الطماطم مسحوقة حيث هناك زيادة بنسبة 25%. وبالمثل، لوحظ أثر إيجابي مع فطر *Aspergillus sp. 6* (79%) على مخلفات غير مسحوقة وكذلك عند *Scedosporium sp.* (54.44%). مع ذلك، المكونات الجديدة قد تسببت في انخفاض في النشاط ب59،73% عند *Penicillium sp.* و ب22.16% عند *Aspergillus sp. 2*. تؤكد هذه الدراسة أهمية مخلفات الطماطم كوسط زرع بديل لإنتاج البروتياز نظرا لغناه بالبروتينات.

الكلمات المفتاحية: العفنيات، البروتياز، التخمرات الصلبة، مخلفات الطماطم الصناعية.

Thème : Production de la protéase alcaline sur milieu solide par des moisissures isolées de source thermale. Utilisation de déchets de tomate comme substrat de fermentation

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie Fongique / Fermentation et production de substances fongiques

Résumé

Le but visé lors de cette ébauche est de déterminer la capacité des souches fongiques à utiliser à différentes températures les déchets de tomate pour la production de la protéase alcaline. Pour cela, neuf moisissures ont été ensemencées sur un milieu solide à base de ce substrat et incubées statiquement à 30°C, puis à 35°C, ensuite à 40°C et enfin à 45°C pendant 96 h. Le dosage de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques a révélé que la meilleure activité est observée chez la souche *Aspergillus sp. 6* (2831.2 U), suivie par *Aureobasidium sp.* (2298.6 U). Quant à la température 40°C, on a obtenu de bons rendements protéasiques ; 1872.2 U par *Scedosporium sp.*, 1559 U par *Aspergillus sp.6* et 1144.4 U par *Aureobasidium sp.* Par contre, pas de production enzymatique assez importante n'a été constatée à 35°C et également à 45°C par l'ensemble de toutes les souches. Par conséquent, les cinq souches ayant donné les activités les plus élevées ont été sélectionnées, à savoir : *Aureobasidium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp. 2*, *Scedosporium sp.* et *Aspergillus sp. 6*. Par la suite, un test d'optimisation a été appliqué sur ces dernières afin de maximiser la production de l'enzyme en question. De ce fait, l'inoculation de ces moisissures a été faite dans deux types du milieu ; le premier c'est de déchets de tomate non broyés humidifiés par une solution contenant la caséine (1 %), le NaCl (0.1%), le K₂HPO₄ (0.1%) et le KH₂PO₄ (0.1%), pH 8, alors que le deuxième c'est de déchets de tomate broyés (1 mm) humidifiés par la même solution. L'analyse des résultats montre que *Aureobasidium sp.* a donné le meilleur résultat protéolytique quel que soit le type du milieu, mais notamment avec celui où les déchets de tomate sont broyés d'où il y a une augmentation par 25 %. De même, un effet positif est signalé chez *Aspergillus sp. 6* (79 %) sur déchets non broyés et aussi chez *Scedosporium sp.* (54.44 %). Toutefois, les nouveaux composants ont provoqué une diminution de l'activité par 59.73 % chez *Penicillium sp.* et par 22.16 % chez *Aspergillus sp. 2*. La présente étude confirme l'intérêt que présentent les déchets tomate comme milieu de culture alternatif pour la production de protéases vu sa richesse en protéines.

Mots clés : Moisissures, Protéase, Fermentation solide, déchets de tomate.**Laboratoire de recherche** : Laboratoire de Microbiologie (RDC). Faculté des Sciences de la Nature et de Vie. Université des Frères Mentouri Constantine.

Jury d'évaluation :

Présidente du jury:	Mme. LEGHLIMI H.	M. C. - UFM Constantine
Rapporteur :	Melle. BELMESSIKH A.	M. A. - UFM Constantine
Examinatrice :	Melle. ABDELAZIZ W.	M. A. - UFM Constantine

Date de soutenance : 19/06/2017