



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie Biotechnologie Fongique

Intitulé :

---

**Production de la protéase alcaline par *Aureobasidium* sp. sur milieu à base de déchets de tomate.**

---

Présenté et soutenu par : MEDJDOUB Rayan

CHOUAI Ouissem

Le : 26/06/2018

Jury d'évaluation :

Président du jury : LEGHLIMI H.

M.C. Université des Frères Mentouri

Rapporteur : BELMESSIKH A.

M.A. Université des Frères Mentouri

Examinatrice : ABDELAZIZE W.

M.A. Université des Frères Mentouri

*Année universitaire*  
*2017 - 2018*

# ***REMERCIEMENTS***

***Avant toute chose  
Nous remercions DIEU  
Le tout puissant, l'omniscient et le miséricordieux  
De nous avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.***

***« Le présent travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie (RDC), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Des Frères Mentouri Constantine ».***

***Nous remercions vivement et chaleureusement Melle BELMESSIKH Aicha, Maître Assistante à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Des Frères Mentouri Constantine, pour avoir encadré et dirigé ce mémoire avec une grande rigueur scientifique.***

***On la remercie particulièrement pour sa disponibilité, ses conseils judicieux, son soutien ainsi que sa patience, qui ont contribué à la réalisation et l'accomplissement de ce travail.***

***Nous exprimons également notre vive reconnaissance à Mme LEGHLIMI H, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, l'Université Des Frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté de présider le jury de notre soutenance.***

***Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Melle ABDELAZIZ W, Maître Assistante à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, l'Université Des Frères Mentouri Constantine, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire, qu'elle trouve ici nos sincères remerciements.***

***Enfin, nous remercions toute l'équipe des laboratoires de Microbiologie au (RDC), Université Des Frères Mentouri Constantine, qui nous ont accueilli 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.***

*Louange à Allah le miséricordieux*

*A mes très chers parents*

*Qui m'ont mené pas à pas à la réussite et à la concrétisation de mes objectifs*

*Je vous dois tout ce que je suis et tout ce que je serai...*

*J'espère avoir été à la hauteur de vos espérances. Inshallah.*

*A mes charmantes sœurs : Sara et Lidia et mes adorables frères :*

*raouf, zineu et mouhamed*

*et les minions Iyad et Alaa*

*A mon très chère encadreur : Mme Belmessikh Aicha*

*A tous ceux qui m'ont enseignés un jour*

*A ceux qui sont proches de mon cœur : à mes amis...*

*Et à tous ceux qui ... sont très chers*

*Je dédie ce travail*

**RAYANE**

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail à mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma  
profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long  
de mes études, que DIEU les bénisse.*

*A mes chers mes chers frères, je te souhaite un avenir plein de joie, de réussite  
et de bonheur.*

*A tous mes amis*

*A tous mes collègues de promotion*

*A tous ceux que j'aime.*

**OUISSEM**

# Tables des Matières

*Liste des abréviations*

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

	Page
Introduction.....	1
Partie 1. Synthèse bibliographique	
1. Les moisissures.....	3
1.1. Définition et caractéristiques générales.....	3
1.2. Conditions de croissance des moisissures.....	3
1.2.1. Facteurs physicochimiques.....	3
1.2.2. Sources minérales.....	4
1.2.3. Macroéléments.....	5
1.3. Organes de reproduction.....	5
2. Les enzymes.....	5
2.1. Généralités sur les enzymes.....	5
2.1.1 Origine et classification des enzymes .....	6
2.1.2. Les enzymes et l'industrie.....	6
2.2. Les protéases.....	7
2.2.1. Sources des protéases.....	7
2.2.2. Classification des protéases.....	7
2.2.3. Les protéases alcalines .....	8
2.2.4. Applications des protéases alcalines.....	9
3. Le déchet de tomate.....	11

## Tables des Matières

3.1. Généralités sur la tomate.....	11
3.2. Tomate industrielle et Industrie de conserve de tomate en Algérie.....	12
3.2.1. Le déchet de tomate.....	13
3.2.2. Utilisation de déchets de tomate.....	14
4. La fermentation .....	15
4.1. Les types de fermentation.....	15
4.1.1. La fermentation liquide.....	15
4.1.2. La fermentation solide.....	16
4.2. Les réacteurs utilisés en fermentation solide.....	17
4.2.1. Les bioréacteurs utilisés au stade de laboratoire.....	17
4.2.2. Les bioréacteurs utilisés aux stades pilote et industriel.....	17
4.3. Applications de la fermentation solide.....	18
4.4. Avantages et inconvénients de la SSF .....	19
5. Les plans de Plackett et Burman (PB).....	20
5.1. Construction d'un plan de Plackett et Burman.....	20
5.2. Propriétés.....	21
5.2.1. Avantages.....	21
5.2.2. Les inconvénients.....	22
Partie 2. Matériel et méthodes	
1. Matériel biologique .....	23
1.1. Repiquage de la souche.....	23
1.1.1. Réactivation de la souche.....	24
1.1.2. Conservation.....	24
1.2. Préparation de l'inoculum.....	24

## Tables des Matières

1.2.1. La suspension de spore .....	24
1.2.2. Dénombrement des spores .....	24
2. Méthode de fermentation.....	24
2.1. Substrat de fermentation.....	24
2.2. Fermentation solide.....	24
2.2.1. Préparation de milieu d'culture.....	24
2.2.2. Conduite de la fermentation .....	25
2.2.3. Extraction de l'enzyme .....	25
3. Plan de plackett-Burman.....	26
4. Méthodes de dosage.....	28
4.1. Dosage de l'activité protéolytique.....	28
4.1.1. Principe.....	28
4.1.2. Réaction enzymatique.....	28
4.2. Dosage de la protéine selon la méthode de Lowry (1951).....	28
4.2.1. Principe .....	28
4.2.2. Réactifs .....	29
4.2.3. Protocole.....	29
<b>Partie 3. Résultats et discussion</b>	
1. Planification expérimentale de Plackett-Burman (1946).....	30
1.1. Sélection des facteurs influençant la production des protéines.....	32
1.2. Sélection des facteurs influençant la production de la protéase alcaline.....	34
1.3. Sélection des facteurs influençant la variation de pH du milieu de culture.....	35
1.4. Effet de facteurs erreurs.....	36

## Tables des Matières

Conclusion.....	37
Références bibliographiques.....	39
Annexes	
Résumés	



## Liste des abréviations

*PDA* : Potato Dextrose Agar.

*TCA* : TriChloroacetic Acid.

*pH* : potentiel d'Hydrogène.

*rmp* : rotation par minute.

*U* : Unité.

*E.C.* : Enzyme Commission.

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

*aw* : Activity of Water.

*N* : Normalité.

*M* : Molarité.

*FML* : Fermentation sur Milieu Liquide.

*SSF* : Solide State Fermentation.

*gds* : gram dray substrat.

## Listes des figures

<b>Figure 01 :</b> La composition de tomate (Amitom, 2010).....	12
<b>Figure 02 :</b> Modèle proposé pour la diffusion des microorganismes filamenteux dans le Substrat solide (Rahardjo et <i>al.</i> , 2006).....	16
<b>Figure03:</b> Le Bioréacteur typique de laboratoire breveté par (Orstom et Durand, 2003).....	17
<b>Figure 04 :</b> La fermentation solide.....	25
<b>Figure 05:</b> Extraction de l'enzyme dans l'incubateur agitateur.....	26

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Classification des protéases (Rao et <i>al.</i> , 1998).....	8
<b>Tableau 02:</b> Culture maraichère et industrielle de la tomate en Algérie (Madr, 2009).....	13
<b>Tableau 03:</b> Composition chimique déchets de tomates.....	14
<b>Tableau 04:</b> Principales étapes et applications ayant marqué l'évolution de la SSF au cours de l'histoire (Pandey, 1992).....	18
<b>Tableau 05:</b> Table des signes plus et moins pour les plans de Plackett et Burman.....	21
<b>Tableau 06:</b> Matrice d'expérience de plackett-Burman pour l'étude de 7 facteurs avec 8 combinaisons.....	27
<b>Tableau 07:</b> Les différents facteurs étudiés et leurs concentrations correspondantes.....	27
<b>Tableau 08:</b> Résultats de l'activité protéolytique ,de protéines et de pH selon le plan de plackette-Burman.....	30
<b>Tableau 09:</b> Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur l'activité de la protéase alcaline.....	31
<b>Tableau 11:</b> Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production des protéines.....	31
<b>Tableau 12:</b> Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur pH.....	32

## INTRODUCTION

L'industrie des enzymes est en pleine progression et son chiffre d'affaire global croît à un rythme accéléré. La plus grande partie du marché des enzymes est liée aux enzymes de type hydrolytique comme les protéases, les lipases et les cellulases. Environ 40 % des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes parmi les quels, des souches fongiques (García-Gómez et *al.*, 2009). En effet, les moisissures sont considérées comme les microorganismes les plus importants en biotechnologie *Aureobasidium sp.* Est l'une espèces fongiques appliquées dans la production commerciale des enzymes.

Les protéases alcalines produites par *Aureobasidium sp.* Utilisées dans l'industrie alimentaire, occupent actuellement une part importante du marché mondial. Cependant, la compétitivité des enzymes par rapport aux produits chimiques est limitée par leurs coûts de production plus élevés. Afin d'assurer son expansion, il est indispensable que l'industrie parvienne à produire des enzymes à des coûts moindres. Comme une grande partie des coûts de production provient du milieu de culture utilisé, l'emploi d'un milieu de culture moins coûteux et stimulant la production de protéases alcalines permettrait d'abaisser considérablement les coûts de production.

La production d'enzymes industrielles exige la préparation de milieux à moindre coût Ceci peut être atteint par l'utilisation des résidus agroindustriels disponibles et bon marché et par l'optimisation des conditions nutritionnelles et physicochimiques du milieu de culture. C'est ainsi que plusieurs déchets et sous-produits agro-industriels sont appliqués pour la production d'enzymes.

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).

Cependant, la composition des déchets de tomates indique la présence d'une source très significative de lycopène, de lipides, d'acide ascorbique, de fibres et de protéines (Al-Muhtaseb et *al.*, 2010). Cela permet leur exploitation dans plusieurs domaines, en particulier, l'alimentation animale et la production d'enzymes et de vitamines.

De ce fait, l'objectif de notre travail est la production des protéases alcalines par la Moisissure *Aureobasidium sp.* En utilisant les déchets de tomate comme substrat de fermentation solide. Pour atteindre cet objectif, notre travail porte sur les points suivants:

- ❖ Réactivation de la souche fongique sur milieu PDA;
- ❖ Préparation du milieu de culture à base de déchet de tomate;
- ❖ Production des protéases alcalines par fermentation en milieu solide par cette souche;
- ❖ Dosage de l'activité protéolytique des extraits bruts obtenus.

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, les déchets de tomates la fermentation.

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.

*Synthèse  
bibliographique*

## 1. Les moisissures

### 1.1. 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). 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).

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 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).

### 1.2. Conditions de croissance des moisissures

Ces microorganismes sont chimioorganotrophes, se caractérisent par des besoins nutritionnels élémentaires (Madigan et Martinko, 2007).

#### 1.2.1. Facteurs physicochimiques

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

##### ➤ pH

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5-8.0 (Botton et *al.*, 1999), bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH.

### ➤ **Température**

La plupart des moisissures sont mésophiles avec des optima de croissance de 25 à 35°C (Botton et *al.*, 1999 ; Julien, 2002). D'autres sont des psychrophiles se développant à basses températures (entre -5 et 10°C) (Davet, 1996 ; Botton et *al.*, 1999). Seulement quelques espèces de mycètes sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au-dessus de 50°C). En effet, les mycètes thermophiles ont une température de croissance minimale inférieure à 20°C et maximale supérieure à 50°C (Brock, 1995). Par ailleurs, (Tansey et Brock, 1978) ont répertorié 30 espèces fongiques croient à des températures élevées modérément (60°C à 62°C).

### ➤ **Aération**

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

### ➤ **Humidité**

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes. Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation (Davet, 1996).

### ➤ **Lumière**

La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leurs spores (Botton et *al.*, 1999).

#### **1.2.2. Sources minérales**

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



moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, ... (Boiron, 1996).

### **1.2.3. Macroéléments**

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

Tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin et *al.*, 2000).

#### **➤ Source d'azote**

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

### **1.3. 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 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 coté des formes de reproduction sexuée (Guiraud, 1998).

## **2. Les enzymes**

### **2.1. Généralités sur les enzymes**

Les enzymes ont toujours fait partie de la vie quotidienne depuis de nombreuses civilisations. Ce sont des protéines globulaires de hautes masses moléculaires (10 000 à 100 000 daltons). Elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires. Autre fonction

importante, les enzymes sont responsables de la dégradation des molécules complexes en molécules plus facilement assimilables.

Les enzymes agissent comme catalyseurs de plusieurs réactions chimiques. Une caractéristique importante des enzymes est leur très grande sélectivité à catalyser des réactions chimiques précises. En effet, contrairement aux agents chimiques qu'elles tendent à remplacer, les enzymes sont très spécifiques (Meunier, 1999).

### **2.1.1 Origine et classification des enzymes**

Les enzymes industrielles sont d'origine végétale, animale ou microbienne (Coulouly, 1991 ; Rao *et al.*, 1998 ; Meunier, 1999). L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. C'est pourquoi la production d'enzymes à partir de microorganismes est privilégiée par les producteurs puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants. En fait, les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (Meunier, 1999).

Les enzymes sont divisées en plusieurs classes selon leur mode d'action spécifique. Au niveau industriel, la classe d'enzyme la plus exploitée est celle des hydrolases. Parmi ces dernières, les protéases représentent le groupe le plus connu, le plus commercialisé dans le marché mondial des enzymes et le plus utilisé en biotechnologie industrielle (Poole *et al.*, 2009).

### **2.1.2. Les enzymes et l'industrie**

Les enzymes sont de plus en plus utilisées dans le monde industriel. Dans plusieurs procédés industriels, les réactions d'hydrolyse et d'oxydation sont normalement accomplies par des produits chimiques peu spécifiques qui occasionnent des pertes de rendement importantes et génèrent des sous-produits souvent difficiles et coûteux à éliminer. Les enzymes présentent de nombreux avantages au niveau environnemental: biodégradabilité, action spécifique, faible toxicité et formation de sous-produits compatibles avec l'environnement (Barnabé, 2003).

## 2.2. Les protéases

### 2.2.1. Sources des protéases

#### ➤ 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.

#### ➤ 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).

#### ➤ 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).

### 2.2.3 Classification des protéases

Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur site d'action, soit les protéases intracellulaires et extracellulaires. Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques comme la sporulation et la différenciation, la maturation d'hormones et d'enzymes, et la maintenance du pool de protéines cellulaires. Ce type de protéase est moins intéressant à utiliser en industrie car ces enzymes nécessitent une étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Les protéases extracellulaires, excrétées à l'extérieur de la cellule, sont importantes pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement extérieur de la cellule et aident ainsi la cellule à absorber et à utiliser les produits de cette hydrolyse (Kalisz, 1988). Globalement, la classification des protéases peut se représenter comme-ci dans le (tableau 01).

**Tableau 01:** Classification des protéases (Rao et *al.*, 1998).

Type de protéase	Classes et sous-classes
<b>Exopeptidases</b>	<b>Aminopeptidase</b> - Peptidyle peptidase - Dipeptidyle peptidases - Tripeptidyle peptidases
	<b>Carboxypeptidases</b> - Sérine carboxypeptidase - Metallocoarboxypeptidas - Cystéine carboxypeptidase
<b>Endopeptidases</b>	<b>Protéases sérines</b> <b>Protéases cystéines ou protéase thiols</b> <b>Protéases acides ou protéases aspartiques</b> <b>Métallo-protéases</b>

#### 2.2.4 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).

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, des essais de fermentation doivent être réalisés a priori pour pouvoir développer un procédé à grande échelle. 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. Egalement, l'amélioration des souches joue un rôle clé dans le développement commercial

des procédés de fermentation microbienne (Glazer et 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).

### **2.2.5. 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).

#### **➤ Industrie chimique**

Les enzymes dans les milieux organiques rendent possible d'utiliser la biocatalyse dans le domaine de la synthèse chimique. 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).

#### **➤ Industrie du détergent**

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).

#### **➤ Domaine pharmaceutique et médical**

La grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple, des protéases sont utilisées comme aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. Également, des collagénase ou des subtilisines sont

utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement de brûlures et de plaies. Une élastotérase peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes. Enfin, une asparaginase est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie (Kudrya et Simonenko, 1994).

➤ **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).

➤ **Traitement des eaux usées industrielles**

Des essais effectués dans différentes industries alimentaires produisant des rejets riches en protéines ont donné des résultats très intéressants, qui permettent de constater le potentiel des protéases pour le traitement de ces déchets (Kumar et *al.*, 1999). (Dalevi 1994) a utilisé des protéases alcalines provenant pour le traitement des rejets semi-solides des abattoirs de volailles. Des protéases sont aussi utilisées pour traiter les eaux usées riches en kératine provenant des chaînes d'abattage de volailles (Ichida et *al.*, 2001).

➤ **Tanneries**

Les protéases sont utilisées pour leur capacité à libérer les poils et la laine des peaux. Cette opération se fait à des pH élevés, et nécessite donc des protéases alcalines, Après l'enlèvement des poils, les peaux subissent le reverdissage, étape essentielle afin de rendre la peau douce et élastique. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients, dont des impacts majeurs sur la sécurité des travailleurs et sur l'environnement. De plus, l'amélioration des procédés, la découverte et la mise au point de nouvelles protéases plus performantes permettent l'emploi grandissant des enzymes dans cette industrie (Rao et *al.*, 1998; Meunier, 1999; Kumar et *al.*, 1999; Gupta et *al.*, 2002).

### ➤ Industrie alimentaire

Les industries alimentaires constituent aujourd'hui encore le principal domaine d'application des technologies enzymatiques, qui à partir d'un nombre limité de types de réactions catalysées donnent lieu à une grande diversité d'application (Aviron-Violet et *al.*, 1982). Les protéases ont été utilisées dans la préparation d'hydrolysats de protéines à haute valeur nutritionnelle. Tels que ceux produits de la caséine, du lactosérum et de soja, qui 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; Reddy et *al.*, 2008).

### ➤ 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.

## 3. Le déchet de tomate

### 3.1. Généralités sur la tomate

La tomate (*Solanum lycopersicum*) est originaire des vallées fertiles du Mexique. Elle a d'abord été cultivée et améliorée par les indiens du Mexique, sous le nom aztèque «Tomate», avant d'être ramenée en Europe par les conquistadores (De Broglie et Guérault, 2005; Renaud, 2006). La tomate a longtemps été considérée comme toxique, et on lui associait tous types de vertus maléfiques à cause de sa ressemblance avec la mandragore. Par la suite, il s'est avéré qu'elle est un aliment très riche en nutriments (figure 01).

La production et la consommation mondiales de tomates sont devenues très importantes, et depuis les années 90, les consommateurs se plaignent de la standardisation de ce produit et de la perte de goût de la tomate (Degioanni, 1997).

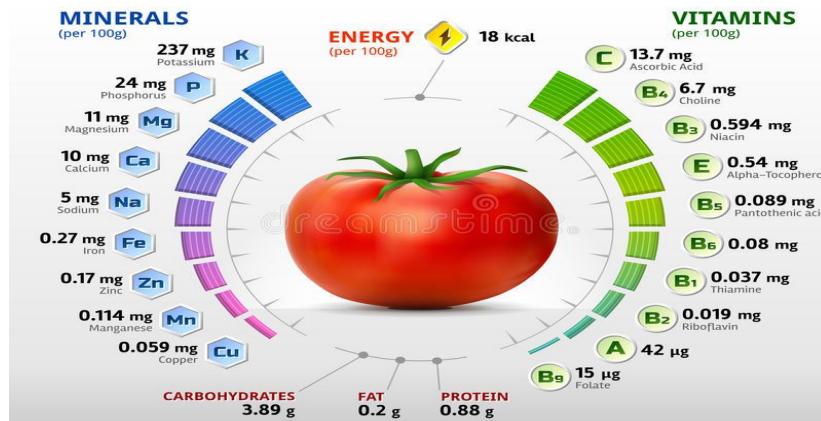


Figure 01: La composition de tomate(Amitom, 2010).

### 3.2. Tomate industrielle et Industrie de conserve de tomate en Algérie

Selon les statistiques de l'organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, 85% de la production de tomate est destinée essentiellement au marché intérieur pour la consommation en frais, le reste est transformé industriellement (Heuvelink, 2009 ; Anonyme 2010).

La culture de la tomate industrielle en Algérie a démarré dans les années 1920, dans la région de l'est avec la création de la première conserverie TOMACOOOP à Annaba. Le nombre d'usines à l'échelle nationale est passé de 5 à 26 entre 1970 et 2000. Les surfaces consacrées à la tomate d'industrie ont également augmenté, pour passer de 100 hectares en 1930 à 2 000 en 1960, pour arriver à une fourchette comprise entre 24 000 et 31 000 hectares les années 2010 (Amitom, 2010). La tomate est, en 2003, la principale culture industrielle. Elle connaît actuellement un renforcement de sa culture en raison du niveau important que connaît la consommation nationale de conserves de tomate.

Le potentiel de production mis en place à travers les unités de fabrication de conserve de tomates est évalué à environ 25 200 tonnes de tomates fraîches /jour. Les unités de transformation sont principalement localisées à l'Est du pays à proximité des lieux de production de tomates. (Rachedi, 2004). La tomate est utilisée dans l'industrie alimentaire pour la préparation des produits à base de tomates tels que la pulpe, le jus, la sauce, la purée, le concentré et la poudre de tomate (Goloubiev et Chebane, 1988).



**Tableau 02:** Culture maraichère et industrielle de la tomate en Algérie (Madr, 2009).

<b>Espèce</b>	<b>Superficies (hectare)Ha</b>	<b>Production (quintaux)Qx</b>
Tomates industrielle	12173 <b>36.93%</b>	3822731 <b>4.97%</b>
Tomate maraichère	20789 <b>63.06%</b>	6410343 <b>8.33%</b>

### 3.3. Le déchet de tomate

Les déchets de tomates représentent, environ 10-30% du poids des fruits fraîches (King et Zeidler, 2004); ils 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). La composition en éléments nutritifs de ce déchet est représentée dans le (tableau 03).

La gestion des déchets est une question importante pour l'industrie alimentaire qui est un secteur important de l'économie mondiale. Au-delà de la manipulation des produits frais, les nouvelles biotechnologies permettent une réutilisation des résidus afin d'obtenir des bioproduits à valeur ajoutée élevée. La dessiccation des résidus solides de tomate produite représente une approche importante pour produire des engrais ; le but de la récupération des ces résidus solides est d'extraire des bio-polymères, du lycopène, de l'huile et la production d'aliments pour le bétail et du compost.

**Tableau 03:** Composition chimique 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
<b>Humidité (%)</b>	7,5	5,74	6,69-	8,1
<b>Protéines(%)MS</b>	13,5	14,3	10-	31,3
<b>Lipides (%) MS</b>	3	3,72	1,7-	1,3
<b>Cendres (%) MS</b>	2,9	1,28	1,13-	4,6
<b>Sucres (%) MS</b>	5,0	3,46	26,7	3,2
<b>Fibres (%) MS</b>	68,1	71,3	46,1-	54,1

MS : Matière Sèche

### 3.3.1. Utilisation de déchets de tomate

Les déchets de tomates connaissent de nombreuses utilisations à savoir :

#### ➤ Agent antioxydant

Les extraits de peau sont particulièrement riches en lycopène qui pourrait réduire le risque d'apparition de certains cancers ainsi que des maladies cardiovasculaires et autres maladies chroniques dont celles liées au vieillissement ( Kaur et *al.*, 2008 ; Zuorro et *al.*, 2013).

#### ➤ Alimentation

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 de tomates

sont recommandées comme source de protéines (40%) dans les applications alimentaires pour l'homme (Al-Wandawi Rahman et *al.*, 1985 ; Sogi 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.

#### ➤ **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 (Eller et *al.*, 2010). 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).

#### ➤ **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). 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.*, 2008).

## **4. La fermentation**

### **4.1. Les types 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).

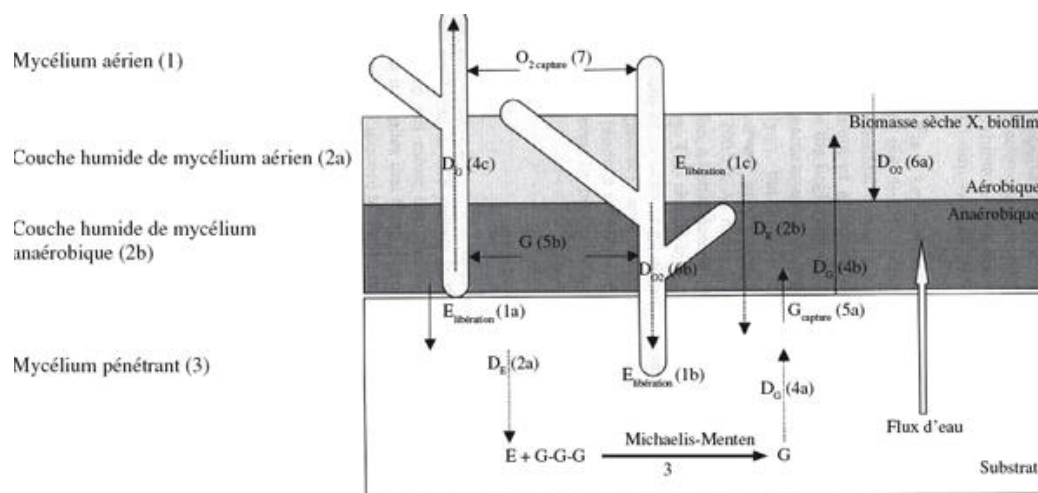
#### **4.1.1. La fermentation liquide**

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).

#### 4.1.2. La fermentation solide

Le terme "fermentation en milieu solide ou en anglais "Solid state fermentation" ou encore "Solid substrate fermentation", par abréviation "SSF". Elle est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (Durand, 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 ou entre celles-ci (Rahardjo et al., 2006) expliquent la diffusion des moisissures filamenteuses dans le substrat solide humide (figure 02).



**Figure 02:** Modèle proposé pour la diffusion des microorganismes filamenteux dans le substrat solide (Rahardjo et al., 2006).

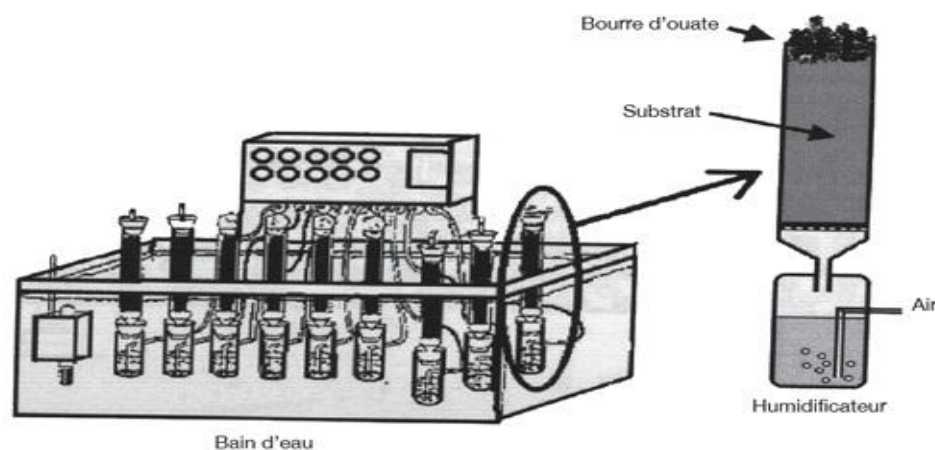
Selon les substrats considérés, l'apparition d'eau libre se manifeste pour des teneurs en eau comprises entre 12 et 90%, soit 0,65 et 0,98 d'activité d'eau ( $a_w$ ) (Mathot, 1996 ; Gervais et al., 2003).

## 4.2. Les réacteurs utilisés en fermentation solide

Les bioréacteurs utilisés en fermentation solide sont classés en deux catégories selon l'échelle de fermentation : les bioréacteurs utilisés au stade de laboratoire (utilisant quelques grammes à quelques kilogrammes de substrat solide) et les bioréacteurs utilisés au stade industriel (utilisant des kilogrammes à des tonnes de substrat solide) (Durand, 2003).

### 4.2.1. Les bioréacteurs utilisés au stade de laboratoire

Ces bioréacteurs sont utilisés lors des premières études. Certains ont fait l'objet de brevets par des chercheurs. Ainsi, le bioréacteur d'ORSTOM des années 1975-1980 composé de petites colonnes ( $\Phi = 4$  cm, 20 cm de long), est rempli avec le milieu de culture préalablement inoculé et placé dans un bain d'eau thermostatisé (figure 03). De l'air saturé en eau traverse chaque colonne.



**Figure 03:** Le bioréacteur typique de laboratoire breveté par (Orstom et Durand, 2003).

### 4.2.2. Les bioréacteurs utilisés aux stades pilote et industriel

Le nombre de réacteurs utilisés aux stades pilote et industriel est limité. A grande échelle, les transferts de chaleur et d'oxygène se font très délicatement. Le nombre de microorganismes pouvant être utilisés à grande échelle est très faible. La nature du substrat, la nécessité de la stérilité du produit final, la quantité d'inoculum nécessaire et la méthode d'inoculation, le nettoyage du réacteur, etc. posent d'énormes difficultés à grande échelle.

### 4.3. Applications de la fermentation solide

La fermentation solide SSF est non seulement utilisée traditionnellement (exemple : maturation des fromages par les moisissures) mais aussi industriellement dans divers procédés comme :

- La production d'enzymes (pectinases, cellulases, lipases...)
- La production de métabolites secondaires (mycotoxines, substances aromatiques...)
- La production de spores (la lutte biologique, biopesticides).

La fermentation solide a subi une évolution très importante en partant du traditionnel à l'industriel et ceci est bien montré dans le tableau suivant:

**Tableau 04:** Principales étapes et applications ayant marqué l'évolution de la SSF au cours de l'histoire (Pandey, 1992).

Période	Développement et Applications de la FMS
2600 avant J.C.	Panification par les Egyptiens.
Avant J.C.	Fabrication du fromage par <i>P. roqueforti</i> .
18ème siècle	L'acide gallique utilisé en tannerie et en parfumerie.
1860-1900	Traitement des eaux usées.
1900-1920	Production d'enzymes à partir de champignons.
1920-1940	Enzymes d'origine fongique, acide citrique, fermenteur à tambour rotatif.
1940-1950	Développement notable dans l'industrie de fermentation. Production de la pénicilline par SSF et SmF.
1950-1960	Transformation de stéroïdes par culture de champignons.
1960-1980	Production de mycotoxines.
Après 1980	Production d'une multitude de produits tels que l'alcool, l'acide gibbérellique et le blanc de champignons comestibles.

#### 4.4. Avantages et inconvénients de la SSF

Parmi ces avantages on note :

- L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes. En effet, la majorité des bactéries réclame des taux d'humidité élevés pour survivre. Par exemple, *Monascus* produit dix fois plus de pigment rouge en milieu solide qu'en fermentation liquide (Mathot, 1996).
- En revanche, les moisissures filamenteuses rendent souvent les milieux liquides fortement visqueux. Ce qui entraîne des problèmes à l'agitation et au transfert d'oxygène (Durand, 1983).
- En cas de production d'aliments pour animaux, tout le produit est utilisé, sans rejet d'eau usée. Les frais de séchage éventuels sont réduits (Mathot, 1996).
- La technologie de production d'enzymes commerciales par SSF est simple, elle ne porte pas sur des micro-organismes génétiquement modifiés (Raimbault, 1980).
- Diminution des risques de contaminations microbiennes à cause de la faible humidité. Et Utilisation directe des spores ou des cellules en suspension comme inoculum (Lonsane et al., 1985 ; Hesseltine, 1987 ; Pandey et Soccol, 2000).

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

- Les microorganismes utilisés sont limités. En effet, seuls les microorganismes se développant bien aux basses humidités peuvent être employés.
- Les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur milieux solides sont faibles.
- La nature solide et hétérogène des substrats utilisés complique le suivi direct des paramètres de fermentation. Les sondes utilisées en fermentation liquide ne sont pas utilisables, même si (Bellon-Maurel et al., 2003) proposent de nouveaux types de sondes adaptées aux cultures solides.

- Il est pratiquement difficile d'assurer une distribution parfaitement homogène de substances ajoutées au substrat et donc du milieu de culture. Les microorganismes étant inséparables du substrat, l'estimation de la biomasse est délicate.
- La quantité d'eau utilisée en début de fermentation doit être mesurée avec une grande précision afin d'obtenir le pourcentage d'humidité le plus favorable possible à la croissance du micro-organisme (Lonsane et *al.*, 1985 ; Pandey et Soccol, 2000).

## 5. Les plans de Plackett et Burman (PB)

Ces plans sont utilisés pour sélectionner les facteurs les plus influents sur la réponse Y et où les interactions sont négligeables ou supposées négligeables. Les plans PB sont quelques fois dits plans de criblage ou matrices d'Hadamard. En effet, ces plans se présentent sous forme de matrices carrées orthogonales dont les éléments sont égaux à  $\pm 1$ . Plus précisément, on a la définition suivante :

Un PB est une fraction d'un plan factoriel complet  $2^k$  qui permet d'estimer un modèle d'ordre 1 pour  $k$  facteurs quantitatifs ou qualitatifs à deux niveaux  $\pm 1$ . Le nombre d'essais  $n$  est un multiple de  $4 > k+1$ . C'est en 1946 que Plackett et Burman ont publié le célèbre article "*The designs of optimal multifactorial experiment*", dans *Biométrie* dans lequel il est décrit comment construire des plans permettant d'étudier un grand nombre de facteurs avec peu d'essais. Ils indiquent toutes les matrices  $(n, n)$  à partir de  $n = 8$  et jusqu'à  $n = 100$  qu'il est possible de construire sauf la matrice  $(96, 96)$ , laquelle était plus tard donnée par Baumert, Golomb et Hall en 1962.

### 5.1. Construction d'un plan de Plackett et Burman

Il s'agit d'utiliser la table des signes  $\pm$  de Plackett et Burman. Le premier essai correspond à la première ligne de la matrice choisie en fonction du nombre  $k$  de facteurs à étudier, les  $n - 2$  suivants sont générés par permutation circulaire et on complète le plan en ajoutant une ligne de signes moins.



**Tableau 05:** Table des signes plus et moins pour les plans de Plackett et Burman.

$N_H$	Séquences de niveaux
4	++ -
8	+++ - + - -
12	++ - + + + - - - + -
16	+++ + - + - + + - - + - - -
20	++ - - + + + + - + - + - - - + + -
24	+++ + - + - + + - - + + - - + - + - - -
32	- - - - + - + - + + + - + + - - - + + + + - - + + - + - - +

La signification de chaque variable sur la production de métabolite désiré est déterminée via le test-*t* de Student. Le niveau de confiance accepté est  $(1 - \alpha) \geq 70\%$ , qui est considéré par plusieurs études (Castro *et al.*, 1992; Bennamoun *et al.*, 2004; Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006). Il peut être égal à  $(1 - \alpha) \geq 95\%$ , comme c'est le cas dans les travaux de (Hajji *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008).

## 5.2. Propriétés

Dans cette partie nous allons donner les différents avantages et inconvénients des PB.

### 5.2.1. Avantages

- Ils sont particulièrement économiques pour détecter les effets principaux.
- Si le nombre d'essais est une puissance de 2, le plan est équivalent à un plan factoriel fractionnaire et où le nombre de facteurs  $k$  est égal au nombre d'expériences moins un (8 essai pour 7 facteurs par exemple).
- Ils sont orthogonaux, permettant ainsi d'estimer les paramètres du modèle avec une précision optimale.
- Ils sont des plans saturés, car ils comportent autant d'essais que de coefficients (correspondant aux effets principaux) à déterminer dans le modèle mathématique et sont de résolution III. Toutefois ils permettent d'étudier les interactions de 2 facteurs si le nombre d'essais  $n$  n'est pas une puissance de deux sans étudier les interactions qui sont confondues avec les facteurs simples.

### **5.2.2. Les inconvénients**

- Ces plans n'utilisent que 2 niveaux uniquement, ne peuvent donc étudier les effets non linéaires.
- Les propriétés des plans du Plackett—Burman sont basées sur celles des matrices d'Hadamard (Annexe 01), cela contraint toutefois l'expérimentateur à un nombre d'essais  $n$  égale à un multiple de 4.



# *Matériel et méthodes*

## Présentation de la partie pratique de notre travail

Notre partie pratique de ce travail a été réalisée 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 :** Réactivation et la purification des moisissures sur milieu PDA.

**Deuxième étape :** Préparation des inocula pour la fermentation .

**Troisième étape :** préparation de milieu de culture a base de déchet de tomate.

**Quatrième étape :** Production des protéases alcalines par fermentation en milieu solide (SSF) par la souche *Aureobasidium sp.*

**Cinquième étape :** Dosage de l'activité protéolytique.

## 1. Matériel biologique

### 1.1. Réactivation de la souche

La souche fongique utilisée dans ce travail est fournie par le laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des frères Mentouri Constantine.

#### 1.1.1. Réactivation de la souche

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.

### 1.1.2. Conservation

Cette étape a été effectuée par la méthode la plus communément utilisée au laboratoire où la moisissure est repiquée 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).

## 1.2. Préparation de l'inoculum

### 1.2.1. La suspension de spore

Elle a été effectuée par récupération des spores à partir des cultures de la moisissure sur milieu PDA en boîtes de pétri ; en ajoutant une solution stérile d'eau physiologique (annexe 03) à raison de 10 ml / boîte d'*Aureobasidium sp.* À l'aide d'une anse de platine stérile on gratte légèrement la surface de la gélose afin d'obtenir la suspension sporale fongique.

### 1.2.2. Dénombrement des spores

Le taux d'inoculation est estimé à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie par dénombrement sous microscope des spores des différentes dilution d' *Aureobasidium sp.*, à l'aide d'une cellule de comptage (la cellule malassez). L'absorbance photométrique de chaque suspension de spore est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 6315 UK) à 650 nm. L'inoculum est fixé à  $2 \times 10^7$  spores /ml de suspension dans chaque erlenmeyer à 250 ml (Annexe 05).

## 2. Méthode de fermentation

### 2.1. Substrat de fermentation

Un milieu à base de déchet de tomate a été choisi comme substrat de fermentation, ce déchet industriel est fourni par la *maison latina* de *Chelgoum l'aid* wilaya de *Mila*, il est séché à l'air libre (25°C- 30°C) pendant 3 - 4 jours. Il se présente sous forme des épilucheurs et des grains.

### 2.2. Fermentation solide

#### 2.2.1. Préparation du milieu de culture

Pour la réalisation des fermentations, cinq gramme de déchet de tomate sont introduits dans chaque erlenmeyer de 250 ml, puis les différents facteurs (pH ajusté avec NaOH 1N,

caséine, NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Agent extractant) sont additionnés selon un plan expérimental. Ces facteurs ont été rajouté sous forme d'une solution minérale a raison de 10ml /erlen. Par la suite, les erlenmeyers sont bouchés par du coton cardé et couverts par le papier aluminium puis autoclavés à 121°C pendant 20 min.

### 2.2.2. Conduite de la fermentation

Après refroidissement des erlenmeyers les milieux de culture sont inoculés par 1 ml de la suspension sporale d'*Aureobasidium sp.* (De l'ordre de  $2 \times 10^7$  spores /ml) le contenu doit être bien mélangé à l'aide d'une tige stérile puis incubés dans l'étuve pendant 96 h à 30 C°.



**Figure 04 :** La fermentation solide.

### 2.2.3. Extraction de l'enzyme

Après incubation 50 ml de l'agent extractant sont ajoutés a chaque erlenmeyer, le mélange est homogénéiser dans un incubateur agitateur à 180 rpm pendant 1h. Ensuite, les milieux de fermentation sont filtrés à travers un papier filtre (whatman n° 1), le filtrat ainsi obtenu représente l'extrait enzymatique brut, il est conservé dans le congélateur pour les dosages ultérieurs.



**Figure 05 :** Extraction de l'enzyme dans l'incubateur agitateur.

### 3. Plan de plackett-Burman

Le plan d'expériences de Plackett et Burman est constitué de matrices carrées ne contenant que des éléments égaux à +1 ou -1. Dans cette étude, la matrice employée étudie 7 facteurs (5 réels et 2 irréels) pour 8 combinaisons (tableau 06). Les facteurs de la dernière combinaison étant toujours pris au niveau (-1). Les concentrations réelles de l'ensemble des facteurs testés sont consignées dans le (tableau 07).

Les effets principaux de chaque variable sur l'activité protéolytique sont estimés comme la différence entre chacune des moyennes des mesures effectuées au niveau supérieur et au niveau inférieur (Annexe 01).

La réponse expérimentale  $\hat{Y}$  s'écrit sous forme d'une équation du premier degré où seules sont retenues les variables explicatives  $X_i$  à effet significatif positif.

$$\hat{Y} = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \varepsilon \quad (1)$$

$\hat{Y}$  la réponse expérimentale.

$\beta_0$  constante.

$\beta_i$  coefficient de régression de la variable explicative  $X_i$ .

$X_i$  variable explicative.

$\varepsilon$  la moyenne des erreurs expérimentales.



**Tableau 06:** Matrice d'expérience de Plackett-Burman pour l'étude de 7 facteurs avec 8 combinaisons.

N° Essai	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>
1	1	1	1	-1	1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1	-1	1
3	1	-1	1	-1	-1	1	1
4	-1	1	-1	-1	1	1	1
5	1	-1	-1	1	1	1	-1
6	-1	-1	1	1	1	-1	1
7	-1	1	1	1	-1	1	-1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

**Tableau07 :** Les différents facteurs étudiés et leurs concentrations correspondantes.

Facteurs	Code du facteur	Niveau (-)	Niveau (+)
Caséine	X <sub>1</sub>	0 g/l	10 g/l
PH	X <sub>2</sub>	8	10
Erreur	X <sub>3</sub>	–	–
Na Cl	X <sub>4</sub>	0 g/l	1 g/l
Erreur	X <sub>5</sub>	–	–
Agent extractant	X <sub>6</sub>	Eau distillé	Eau tweenée 0.1 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	X <sub>7</sub>	0 g/l	6 g/l 3 g/l

## 4. Méthodes de dosage

### 4.1. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité de la protéase alcaline dans l'extrait enzymatique brut a été dosée par la méthode décrite par Charney et Tomarelli (1947).

#### 4.1.1. 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.

#### 4.1.2. Réaction enzymatique

L'activité protéolytique est déterminée par l'utilisation de la caséine comme substrat. Le mélange réactionnel a été préparé par addition de :

- 0,8 ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage.
- 0,8 ml de la solution de caséine 1% dans le tampon à pH 8.

Après agitation, ce mélange a été incubé dans un bain marie à 40°C pendant 30 min, puis la réaction est arrêtée par addition de 1,6 ml de TCA froid (5%). Par la suite, il a été laissé reposer 30 min dans un bain de glace (Dévi 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. L'absorbance est lue à 340 nm.

**Remarque :** Le blanc comprend tous les réactifs dont le TCA est rajouté avant le substrat et sauf incubation dans le bain marie.

### 4.2. Dosage de la protéine selon la méthode de Lowry (1951)

#### 4.2.1. Principe

Cette méthode a pour principe de mesurer la densité optique de la coloration bleue du complexe Folin-ciocalteu (acide phosphomolybdo-tungstique), réduit en présence de protéines. La méthode de lowry est la résultante de deux réactions:

- Réaction de biuret qui, en présence de sulfate de cuivre et en milieu alcalin, permet le dosage de la liaison peptidique des protéines.
- Réaction du réactif sur la tyrosine, le tryptophane et dans une moindre mesure la cystéine et l'histidine. Elle entraîne une réduction, par perte d'un à trois atomes d'oxygène et la fixation du cuivre par chélation, facilitant ainsi le transfert d'électrons vers le réactif de *Folin-Ciocalteu* pour donner naissance à un complexe bleu.

#### 4.2.2. Réactifs

- ✓ Solution A :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% dans NaOH 0,1N.
- ✓ Solution B :  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1%.
- ✓ Solution C : Tartrate double de Na et de K à 2%.
- ✓ Solution M : préparée avec :
  - 50 ml de solution A.
  - 0,5 ml de solution B.
  - 0,5 ml de solution C.
- ✓ Solution E : réactif de *Folin-Ciocalteu* dilué au 1/3<sup>ème</sup>.

#### 4.2.3. Protocole

Ajouter à 1ml d'échantillon, 5 ml de solution M. Homogénéiser et laisser reposer 10 min à température ambiante. Verser alors 0.5 ml de solution E et agiter immédiatement. Laisser la réaction colorée se développer 30 min à température ambiante et à l'obscurité et mesurer la densité optique à 650 nm. Le taux des protéines dans les filtrats des milieux de culture a été estimé par référence à une d'étalonnage préalablement préparée ( Annexe 06).

## *Résultats et discussion*

### 1. Planification expérimentale de Plackett-Burman (1946)

Les résultats des différents essais obtenus après fermentation en Erlenmeyers sont résumés dans le tableau 08, ils expriment l'effet de chacun des facteurs étudiés sur la production de protéines, des protéase alcalin et de pH selon le plan de Plackett-Burman. Le traitement de cette matrice a été réalisé à l'aide du logiciel Minitab (version 16) et les résultats sont représentés dans les tableaux 9, 10, et 11.

**Tableau 08 :** Résultats de l'activité protéolytique, de protéines et de pH selon le plan de Plackett-Burman.

N° Essai	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	Activité		
								protéolytique (U/gds)	Protéine (g/l)	pH (g/l)
1	1	1	1	-1	1	-1	-1	9.6800	2.84400	6.8300
2	1	1	-1	1	-1	-1	1	9.8500	2.78500	6.7400
3	1	-1	1	-1	-1	1	1	9.7000	2.80600	6.6700
4	-1	1	-1	-1	1	1	1	9.6700	2.75300	6.7200
5	1	-1	-1	1	1	1	-1	10.1700	2.71500	6.8800
6	-1	-1	1	1	1	-1	1	10.1000	2.76100	6.6400
7	-1	1	1	1	-1	1	-1	10.6200	2.63600	7.0700
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9.5500	2.74800	6.9300

U :  $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$

**Tableau 09 :** Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur l'activité de la protéase alcaline.

Facteur	Effet	Coef	Er-T Coef	T	P
Constant	19.835	9.91750	0.07653	129.6	0.000
Caséine	-0.135	-0.06750	0.07653	-0.88	0.471
PH	0.75	0.03750	0.07653	0.49	0.673
NaCl	0.535	0.26750	0.07653	3.50	0.073*
Agent extraction	0.245	0.12250	0.07653	1.60	0.251*
Agent humidifiant	-0.175	-0.08750	0.07653	-1.14	0.371

\*effet significatif ( $p < 0.3$ )

**Tableau 10 :** Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production des protéines.

Facteur	Effet	Coef	Ev-T coef	T	P
Constante	5.512	2.75600	0.00957	288.02	0.000
X <sub>1</sub> Caséine	0.063	0.031500	0.009569	3.29	0.081*
X <sub>2</sub> pH	-0.003	-0.001500	0.009569	-0.16	0.890
X <sub>4</sub> NaCl	-0.0635	-0.031750	0.009569	-3.32	0.080*
X <sub>6</sub> Agent extraction	-0.057	-0.028500	0.009569	-2.98	0.097*
X <sub>7</sub> K <sub>2</sub> HPo <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-0.0405	0.020250	0.009569	2.12	0.169*

\*effet significatif ( $p < 0.3$ )

**Tableau 11** : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur pH

Facteur	Effet	Coef	Ev-T coef	T	P
Constante	13.62	6.81000	0.03052	223 .16	0.000
X <sub>1</sub> Caséine	-0.06	-0.03000	0.03052	-0 .98	0.429
X <sub>2</sub> pH	0 .06	0.03000	0.03052	0.98	0.429
X <sub>4</sub> Na Cl	0.045	0.02250	0.03052	0.74	0.538
X <sub>6</sub> Agent extractant	0.045	0.02250	0.03052	0.82	0.499
X <sub>7</sub> K <sub>2</sub> HPo <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> Po <sub>4</sub>	-0 .235	-0.11750	0.03052	-3.85	0.061*

\*effet significatif ( $p < 0.3$ )

### 1.1. Sélection des facteurs influençant la production des protéines

A partir du tableau 09; on observe le taux de protéines le plus élevé (2.844 g/l) correspond au essai 01 contenant caséine et le pH du milieu est ajusté à 10. Le taux le plus bas (2.636 g/l) correspond à l'essai milieu de base 07 contenant pH10, NaCl, Agent extraction eau tweenée 0.1% l'analyse statistique (tableau 11) montre les résultats suivants :

#### ❖ Caséine

L'addition de caséine a un effet légèrement significatif ( $p = 0.081$ ) avec une augmentation de 2.29 % de la production des protéines. La caséine est une protéine phosphorylée et naturellement riche en minéraux et constitue un substrat à une teneur élevée en acide glutamique, en proline, en leucine, qui aide à la production des protéines. En outre, il constitue la source principale de carbone et d'énergie pour plusieurs microorganismes possédant le système  $\beta$ -galactosidase (Luquet et Boudier, 1984 ; Kosikowski, 1988 ; Trystram et *al.*, 1991 ; Lejeune et Baron, 1995).

❖ **pH**

Le PH n'a pas un effet significatif ( $p=0.89$ ) sur la production des protéines, cela se traduit par le fait que chaque protéine possède un pH spécifique pour sa production. D'après Pelmont (1995) le pH intervient à 3 niveaux :

- Il modifie l'intégrité physique de la protéine.
- Il influence l'affinité de l'enzyme pour son substrat (par changement de Km).
- Il varie la vitesse de réaction enzymatique (par changement de Vm).

❖ **NaCl**

Les résultats statistiques ont montré que l'utilisation du NaCl (1g/l) a une influence significative mais négativement sur la production des protéines ( $p= 0.08$ ); bien que le NaCl possède un effet stabilisateur des protéines (Laxman, 2005). En effet, la diminution de la production de protéine s'explique par un dépassement de la concentration optimale des sels nécessaires de la production des protéines. De même, Tomanoga (1966) et benkahoul (2002) ont trouvé que des concentrations élevées en sels minéraux tel que NaCl provoquent l'inhibition de la production des protéines.

❖ **Agent d'extractant**

L'addition de l'eau twéénée 0.1% a un effet significatif mais négativement sur la production des protéines ( $p= 0.097$ ).

❖ **K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**

L'addition de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a une influence significative mais négativement sur la production des protéines ( $p= 0.169$ ). Ceci peut être expliqué par le fait que, le phosphore joue un rôle primordial dans la régulation de la production de plusieurs métabolites primaires et secondaire de microorganismes (Dean, 1972 ; Mertz et Doolin, 1973).

➤ **Modélisation**

La réponse expérimentale s'écrit sous la forme d'une équation du premier degré avec la sélection de six facteurs a effet significatif L'équation de régression est

$$Y_{\text{Protéines}} = 2,76 + 0,0315 X_1 - 0,00150 X_2 - 0,0318 X_4 - 0,0285 X_6 + 0,0203 X_7 + \varepsilon$$

Où : X<sub>1</sub>(caseine), X<sub>2</sub>(PH), X<sub>4</sub>(NaCl), X<sub>6</sub>(l'eau tweenée), X<sub>7</sub>(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)



## 1.2. Sélection des facteurs influençant la production de la protéase alcaline

L'activité protéolytique varie de 9.55 U à 10.62 U (tableau 09). La plus faible activité correspond à l'essai N°8 où le pH 8, eau distillée. Par contre, l'activité la plus importante est enregistrée dans l'essai N°7 où le pH de milieu est 10 et NaCl, Agent extraction par l'eau tweené 0.1%. Aussi nous avons analysé statiquement l'effet de chaque facteur sur la production de cette enzyme (tableau 11).

### ❖ Caséine

La présence de la caséine à 1% (w/v) n'entraîne pas d'effet significatif ( $p= 0.471$ ) sur la production de la protéase alcaline en SSF. Ceci est probablement dû à la nature du substrat azoté ; en effet, les substrats simples tels que la caséine et la gélatine possèdent une faible solubilité et donnent des faibles rendements en activités enzymatiques. Au contraire, les substrats complexes tels que la farine de soja entraînent de bons rendements en activités protéolytiques (Sumantha *et al.*, 2006).

L'induction de l'activité protéolytique par l'enrichissement des substrats en protéines semble être dépendante de la souche microbienne et du type de substrat utilisé pour l'expérience (Agrawal *et al.*, 2005). Les sources d'azotées organiques sont des inducteurs de la production d'une grande quantité de protéase par rapport aux sources inorganiques (Wang *et al.*, 2008).

### ❖ pH

Le pH n'a pas un effet significatif ( $p= 0.673$ ) sur la production de la protéase alcaline. Ceci confirme les résultats rapportés par Hang et Woodam, (1977) où le pH optimal de croissance des moisissures est acide. D'après ces résultats, il apparaît que les conditions optimales de la production des protéases sont différentes de celles de la croissance de la moisissure (Lenoir *et al.*, 1973 ; Mechakra *et al.*, 1999). D'autres travaux réalisés sur la production d'autres enzymes, utilisant les matrices de Plackett et Burman montrent que la variation du pH de 5 à 6 permet une augmentation de l'activité enzymatique, c'est le cas de l'exo-polygalacturonase où les auteurs notent une signification positive de 97,3% (Bennamoun *et al.* 2016).

❖ **NaCl**

La présence de NaCl un taux de 1g/l révèle un effet significatif ( $p=0.073$ ) avec une augmentation de (5.60 %) sur la production de la protéase alcaline. Ce résultat corrobore les études de Wang et al. (2005a) qui démontre que la concentration optimale pour l'amélioration de la production de protéase par *A. oryzae* est de 1%. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres microorganismes tel que *Aureobasidium sp*; c'est le cas de l'archaeon haloalcalophile *Natronococcus occultus* qui sécrète la protéase à 1-2 M de NaCl (Patel et al., 2005) et de *Aspergillus clavatus* ES1 qui produit une protéase alcaline en présence de 0,3 g/l du NaCl (Hajii et al., 2007). Ces résultats peuvent être expliqués par le rôle protecteur des ions  $Na^+$  contre la dénaturation de l'enzyme (Murthy et Naidu, 2010).

❖ **Agent extraction**

L'extraction de l'enzyme ciblée par l'eau tweenée 0.1% possède un effet légèrement significatif ( $p=0.251$ ) avec une augmentation de (2.56%) de l'activité protéolytique.

❖  **$K_2HPO_4$  et  $KH_2PO_4$**

L'addition de  $K_2HPO_4$  et  $KH_2PO_4$  n'a pas un effet significatif ( $p=0.371$ ) sur la production de protéase alcaline. Par ailleurs, Zhang et al. (1983) montrent que la concentration élevée de phosphore dans le milieu, le rend inhibiteur de la production des enzymes microbiennes.

➤ **Modélisation**

La réponse expérimentale s'écrit sous la forme d'une équation du premier degré avec la sélection de six facteurs à effet significatif L'équation de régression est

$$P_{\text{protéase}} = 9,92 - 0,0675 X_1 + 0,0375 X_2 + 0,268 X_4 + 0,123 X_6 - 0,0875 X_7 + \varepsilon$$

Où :  $X_1$ (caséine),  $X_2$ (PH),  $X_4$ (Na Cl),  $X_6$  (l'eau tweenée),  $X_7$  ( $K_2HPO_4$  et  $KH_2PO_4$ ).

**1.3. Sélection des facteurs influençant la variation de pH du milieu de culture**

Les résultats statistique ont montré que l'utilisation du NaCl, la caséine, l'eau tweenée ont une influence non significative, tandis que le  $K_2HPO_4$  et le  $KH_2PO_4$  possèdent un effet significative mais négativement sur les variations du pH (tableau 12). A la fin de fermentation solide, le pH diminue ou augmente selon la composition de milieux et le développement de la souche. Selon Bellon-Maurel et al., (2003), Ces variations du pH résultent d'une

consommation en substrat (hydrolyse des protéines) ou des synthèses métaboliques (synthèse d'acides organiques); elles sont donc des indicatrices des changements dans les activités métaboliques. Nos résultats corroborent ceux de Soccol et *al.*, (1994) et Saito et *al.*, (2003), qui montrent que la diminution du pH à la fin des fermentations est due à la synthèse des acides fumarique et lactique qui s'accumulent dans le milieu. Par contre l'augmentation du pH, surtout dans les milieux associant la caséine est probablement expliquée par la libération des acides aminés et des ions ammonium rendant ainsi le milieu alcalin (Botton et *al.*, 1990).

#### **1.4. Effet de facteurs erreurs**

L'effet des facteurs erreurs doit être nul, néanmoins lorsqu'il est différent de zéro comme dans notre cas nous suggérons qu'il est dû à des erreurs effectués lors des mesures ou des dosages différent ou bien peut être expliqué par l'ordre élevé du fractionnement dans les matrices de Plackett et Burman où l'erreur peut être confondue avec une interaction à effet significatif entre variables, ou bien les erreurs sont dues réellement aux erreurs lors des dosages effectuées. L'erreur moyenne, vaut (0.095) Pour la production de la protéase alcaline, (0.018) Pour la production de protéine avec des valeurs de probabilité non significatives. Cela nous permet de dire que les résultats obtenus dans notre étude sont acceptable et ce plan statistique est idéal pour ce type d'optimisation.

## CONCLUSION

L'objectif de ce travail de recherche est la production de la protéase alcaline à partir *Aureobasiduime Sp* ainsi, de sélectionner les différents facteurs qui ont une influence sur la production de l'enzyme ciblée.

de façon globale, ce projet s'inscrit dans une approche qui consiste à l'exploitation des déchets de tomate et de réduire l'utilisation des produits chimique en favorisant l'émergence d'une nouvelle industries de produits biologique économiquement plus abordables.

L'étude de la composition des déchets de tomates révèle sa richesse en sucres (13,85%) et une teneur importante en protéines (12,33%). Ces proportions en sources carbonées et azotées conviennent donc aussi bien à la croissance microbienne qu'à la production de métabolites. Dans ce cas, la protéase alcaline.

la principale étape sur laquelle devrait reposer l'amélioration de la sécrétion des protéases est l'optimisation du milieu de culture pour la fermentation. Pour cela, une matrice de Plackett-Burman a été employée afin décroître de façon substantielle l'activité protéolytique obtenue dans les milieux contenant que le déchet de tomate en analysant l'effet d'un ensemble de facteurs (pH, caséine, NaCl,  $K_2HPO_4$  et  $KH_2PO_4$ , l'eau tweenée) sur la production enzymatique et des protéines.

L'analyse statistique des résultats révèle que la production de la protéine est influencée par la présence des facteurs suivant : caséine, NaCl,  $K_2HPO_4$  et  $KH_2PO_4$ , l'eau tweenée. La même chose pour la production de la protéase alcaline, celle ci est provoquée par le NaCl, extraction par l'eau tweenée également pour la variation de pH est influencée par  $K_2HPO_4$  et  $KH_2PO_4$ .

par ailleurs, le plan du plackette-Burman nous a permis de sélectionner le NaCl, l'eau tweenée. comme facteur favorisant d'une part la production de la protéase alcaline et d'une autre part la production des protéines, par l'*Aureobasiduim sp*.

Afin de finaliser ces recherches et atteindre complètement les objectifs fixés, d'autres travaux devront être entrepris en se focalisant particulièrement sur :

- ✓ Détermination des optima des facteurs sélectionnés suivant un autre plan statistique composite centré, du Box-Wilson par exemple.
- ✓ Purification de l'enzyme.
- ✓ Une étude de ses caractéristiques.
- ✓ Et ainsi envisager quelques tests d'applications.

La production de protéase alcaline d' *Aureobasiduime Sp* dans le déchet de tomate est prometteuse. Il y a espoir que ce bioprocédé soit éventuellement transféré à l'industrie. Ce bioprocédé deviendra alors un exemple de biotechnologie respectant les fondement du développement durable.

*Références  
bibliographiques*

- 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.
- Amitom., 2010.** Association Méditerranéenne Internationale de la Tomate. La tomate d'industrie en Algérie [archive]. 2P. Site officiel : <http://www.amitom.org>.
- Anonyme., 2009.** Evaluation de la campagne de transformation de tomate en algérie ministère du commerce. Algérie
- Antonio de Falco, Michele Caiazza, Mario Malinconico, Barbara Immirzi, Maurizio Avella, Barbara Nicalaus, Giuseppe Strazzullo, Anna Poli .,2009.** Cost-effective utilization of agro-food processing waste. Eureco European Environmental Company. [www.eurocompany.com](http://www.eurocompany.com). 8P.
- Atherton J.,C.Rudich J., 1986.** The tomato crop. A scientific basis for improvement.2: 142-144.
- Aviron-Violet P., Baret J.L., Bertrand C., Blazy B., Bouvier F., 1982.** Les enzymes : Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. pp. 23; 123; 140–153.
- Barnabé S., 2003.** Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières? Vecteur environnement 36 (2): 50-62.
- Baumert L. Golomb S. W., Hall M., 1962.** Discovery of an Hadamard matrix of order 92. Amer. Math. soc. Bull., 68, 237-238.
- Bellon-Maurel V., Orliac O., Christen P., 2003.** Sensors and measurements in solid-state fermentation: A review. *Process Biochem.* (38), pp.881-896.
- Bellon-Maurel V., Orliac O., Christen P., 2003.** Sensors and measurements in solid-state fermentation: a review. *Process Biochem.*, 38, 881-882.
- Benkahoul M. 2002.** Production de la protease neutre par *Aspergillus oryzae* sur déchets d'oranges. Optimisation du milieu de cultures, purification partielle et étude des propriétés physico-chimique de l'enzyme. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université Mentouri Constantine.

**Bennamoun L., Hiligsmann S., Dakhmouche S., Ait-Kaki A., Labbani F-Z K., Nouadri T., Meraihi Z., Turchetti B., Buzzini P., Thonart P., 2016** Production and Properties of a Thermostable, pH-Stable Exo-Polygalacturonase Using *Aureobasidium pullulans* Isolated from Saharan Soil of Algeria Grown on Tomato Pomace. *Foods* 5(4), p. 72; <https://doi.org/10.3390/foods5040072>

**Bennamoun L., Meraihi Z., Dakhmouche S., 2004.** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. *J. Food Eng.*, 64; 257–264.

**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.* biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 597–635.

**Boiron P., 1996.** Organisation et biologie des champignons. *Edition Nathan.* pp:13-80.

**Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., 1999.** Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. *Masson.* Paris. pp. 12-426 boues d'épuration municipales. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès.

**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,* pp.34-428.

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

**Castro P.M.L., Hayter P.M., Ison A.P., Bull A.T., 1992.** Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38; 84–90.

**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.



- Charney J., Tomarelli R.M., 1947.** A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.* 171, 501–507.
- component through enzyme synergistic degradation. *Renewable and Sustainable Energy.*
- Dalev P.G., 1994.** Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresource Technology* 48: 265-267.
- Davet P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. *INRA.* Paris. pp. 52-57
- De Broglie L. A. Guérault D., 2005.** Tomates d'hier et d'aujourd'hui.P97.
- Dean A.C.R., 1972.** Influence of environment on the control of enzyme synthesis. *J Appl Chem Biotechnol* (22), pp.245-59.
- Degioanni B., 1997.** La tomate. P115, 137.
- Desmas S., 2005.** Analyse comparative de compétitivité : le cas de la filière tomate dans le contexte euro-méditerranéen. Thèse D.A.A., Institut Agronomique Méditerranéen de Montpellier, 68 p.
- Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z., Bennamoun L., 2006.** Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.* 73; 190–197.
- Duchiron F., 2011.** COPINET, Estelle. Fermentation en milieu solide (FMS). Techniques de l'ingénieur [en ligne]. 10 mai 2011. Référence BIO620. Disponible à l'adresse : [http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agroth2/concepts-equipements-et-reglementations-des-biotechnologies-42164210/fermentation-en-milieu-solide-fms-bio620/#\\_afnor](http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agroth2/concepts-equipements-et-reglementations-des-biotechnologies-42164210/fermentation-en-milieu-solide-fms-bio620/#_afnor), Saint-Denis-la-plaine. France, 300 pp.
- Durand A., 1998.** Solid state fermentation. *Biofuture*, 181:41-43.
- Durand A., 2003.** Bioreactor designs for solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 13, 113-125.

- Elvira C., Marianna F., Marie B ., 2006** «HANDBOOK on BIOACTIVE COMPOUNDS from TOMATO PROCESSING RESIDUES». [www.bioactive-net.com](http://www.bioactive-net.com) [Archive] 44P.
- Faostat 2009. World Tomatoes, All: Production By Country, 1990-2005** <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> [archive].
- 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-Barragan L.A., 2009.** Avantages of proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry*, 112(3), p. 604-608.
- Genckal H., Tari C., 2006.** Alkaline protease production from alkalophilic *bacillus* sp. Isolated from natural habitats. *enz. Microbial technol.*, 39 : 703-710.
- Gervais P., Molin P., 2003.** The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 13, 85-101.
- Glazer A.G., Nikaido, H., 1995.** Fundamental of applied Microbiology, Freeman and Company. *Microbial, Biotechnol.*, Washington. pp. 256-259.
- Golouviev V.N., Chibane M., 1988.** Traitement par membrane de pulpe de tomate. *Ind. Alim. agric.* 10 : 929-932.
- Grasselly D., Navez B., Letard M., 2000.** Tomate, pour un produit de qualité. Lavoisier. 25-35.
- Guiraud J P., Rosec J P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire.
- Guiraud J. P., 1998.** Microbiologie alimentaire. *Dunod*. Paris. P. 7-330
- Guiraud J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. *Dunod*, Paris. pp. 79.
- 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.
- Hang Y.D., Woodams E.E., 1977.** Baked-bean waste: a potential substrate for producing fungal amylases. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(6), p. 1293-1294. <http://aem.asm.org/content/33/6/1293>
- Hesseltine C.W., 1972.** "Solid state fermentations". *BioiotechnoL. Bioeng.*, 2, 517 - 532.
- Hesseltine C.W., 1972.** Solid-state Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 14 : 517-532.
- Heuvelink Ep., 2002.** World tomato exports have increased by 30 per cent over the last 5 years. S&G and Rogers (Syngenta).  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.016>.
- Ichida J.M., Krizov A L., Lefebvre C.A., Keener H.M., El Well D.L. Et Burt Jr E.H., 2001.** Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiological Methods* 47: 199-208.
- 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.
- Julien R., 2002.** Les moisissures parlons-en. *Objectif prevention.*, 25(4) : 7-8
- Kalisz H.M., 1988.** Microbial proteinases. *Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnology* 36: 1-65
- 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.

- 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.
- 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.
- Kosikowski F.V., 1988.** Dairy foods research papers. Enzyme behavior utilization in dairy technology. *J. Dairy Sci.*, 71; 557-573.
- Kudrya V.A., Simonenko I.A., 1994.** Alkaline serine protease and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41: 505-509.
- Kumar C.G., Takagi H., 1999.** Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 17: 561-594.
- 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.
- Laterrot Henri., 1998.** la tomate : Origine, diversité, création, Variétal, *Lycopersicon esculentum*, Classification des espèces, société botanique de Vancluse, Bull soc.Bot.Vancluse .INRA, Agronomic : 4-5.
- Laxman R.S., Sonawane A.P., Snehal V.Snehal V. M., 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*. *Process. Biochem.*; 3152-3158.
- Lejeune R., Baron G.V. 1995.** Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43; 249-258.
- Lenoir J., Glenza A., Bergere J.L., Cerf O., Choisy C., Desmazeaud M., Hermier J., Auberger B., Michèle Schmidt., 1973.** Les facteurs de production du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. *Le Lait*, 53(525-526), p. 246-279. <https://doi.org/10.1051/lait:1973525-52612>
- Leveau J.Y., Bouix M., 1993.** Les moisissures. p : 112-163. In : *Florent J.*(ed).

- Lonsane B. K., Ghildyal N. P., Budiartman S. & Ramakrishna S. V., 1985.** Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technoogy*, 7 : 258-265.
- Luquet F., Boudier J. F., 1984.** Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. *Apria.*, 21 ; 1-7.
- Madigan M.T., Martinko J.M., 2007.** Biologie des microorganismes. 11<sup>ème</sup> édition. *Pearson Education. Broek.* France. pp. 478-479.
- Madr., 2009.** (Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural) , Direction des statistiques . P21.
- 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).
- 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*. *Sciences des Aliments*, 19(6), p. 663-675.
- Meunier, N. 1999.** Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. *Lavoisier.* Paris. P. 216-244.
- Mikanowski L.Mikanowski P., 1999.**Tomate. P89-93.
- Mikanowski L.Mikanowski P.,1999.** Tomate. Biol ED. 62-65.neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation.
- 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.

**Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R., 2000.** L'essentiel en microbiologie. Berti. Paris. P : 210-216. *niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.*, 1(7): 1-6.

**Pandey A., Soccol C. R., 2000.** Economic utilization of crop residues for value addition. A futuristic approach. *J. Sci. Ind. Res.*, 59 : 12-22.

**Pandey A., 1992.** Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 27 (2) : 109-117.

**Pandey, Ashok.** Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* [en ligne], mars 2003, vol. 13, n°2-3, p. 81-84. Disponible à l'adresse : [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3).

**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.

**Pecaut P., Philouze J., 1968.** "Les variétés de tomate cultivées en France. PHM 87: 49-59-73. *Process Biochem.*, 40: 2689-2694. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus*.

**Rachedi M.F., 2004.** Cultures maraichères et industrielle in collection études

**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.

**Raimbault M., 1980.** Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. Thèse d'Etat. Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 291p.

**Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3): 597-625.

**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.

*Reviews*. 26: 521–531

- Saito K., Kawamura Y., Oda Y., 2003.** Role of the pectinolytic enzyme in the lactic acid fermentation of potato pulp by *Rhizopus oryzae*. *Id Microbiol Biotechnol* 30 (7), pp.440-444.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A., 2005.** Comparative evaluation of Sciences, maîtrise en Sciences de l'eau. INRS-EAU. Québec. 168 pp.
- 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.
- Singhania R. R., Patel A. K., Soccol C. R., Pandey A., 2009.** Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 44. 13-18.
- Snoussi sid Ahmed., 2010.** Etude de base sur la tomate en Algérie Rapport de mission : 5-10, 34-36.
- Soccol C-R., Marin B., Raimbault M., 1994.** Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. *App. Microbiol. Biotechnol.* (41), pp.330-336.
- Sogi D. S., Bawa A. S., 1998.** Studies on dehydration of tomato processing waste. *Indian Food Packer*, 52(2); 26–29.
- 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.
- Tomonago G., 1966.** Preferential synthesis of extracellular protease by *Aspergillus niger* in sulph deficiency. *Journal of Applied Microbiology*, 12; 267-276.
- Trystram G., Guenneugues P., Brenon M., Bimbenet J.J., 1991.** Optimisation du procédé industriel de fermentation continue de levures sur lactosérums. *E.N.S.I.A. Bel. Industrie Biology.*, 10; 25-39.
- Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa H., Kaneda M., 2001.** Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.*, 382: 1509-1513. Valorization of low quality edible oil with tomato peel waste. *Food Chemistry.*, 110: 684-690.

**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.

**Wang Q., Hou Y., Xu Z., Miao J., Li G., 2008.** Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. *Bioresour. Technol.*, 99; 1926–1931.

**Wang R., Law R.C.S., Webb C., 2005.** Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Proc. Biochem.*, 40; 217–227.

**Zhang Q., Tsukagoshi N., Miyashiro S. et Udaka S., 1983.** Increased production of  $\alpha$ amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of glycine. *Appl Environ Microbiol*, 46, pp.293-5.



# *Annexes*

## Annexe 01 : Plan d'expériences de Plackett et Burman

Mathématiquement l'effet de chaque facteur ainsi que l'erreur est exprimé comme suit :

$$E = \frac{\Sigma \text{réponses au niveau (+)}}{n} - \frac{\Sigma \text{réponses au niveau (-)}}{n}$$

Où  $E$  : Effet de chaque facteur ;

$n$  : Nombre d'apparition du facteur au niveau supérieur ou inférieur,  $n = 4$

La variance du system est définie comme étant la moyenne des carrées des erreurs, qui peut être exprimé par :

$$VE = \frac{\Sigma (\text{erreurs})^2}{N}$$

Où  $VE$  : Variance des effets.

$N$  : nombre des erreurs.

L'erreur standard  $E.S$  est définie comme étant la racine carré de la variance exprimée par :

$$E.S = \sqrt{VE}$$

La signification de chaque facteur est déterminée par le test- $t$  de Student.

$$t = E / E.S$$

Si le test- $t$  est significatif, l'effet est donc dû au changement du niveau du facteur et non pas au hasard ni à l'erreur expérimental. C'est-à-dire le changement du facteur du niveau inférieur au niveau supérieur entraîne un effet positif ou négatif sur la réponse.

## Annexe 02 : Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

- ✓ Pomme de terre .....200 g
- ✓ Glucose .....20 g
- ✓ Agar .....15 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 03 : 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<sup>-1</sup>).

### Annexe 04 : Analyse de régression de l'Activité protéolytique en fonction de X1; X2; X4; X6; X7

S = 0,216449 R carré = 89,5 % R carré (ajust) = 63,4 %

#### Analyse de variance

Source	DL	carrés	CM	F	P
Régression	5	0,80145	0,16029	3,42	0,242
Erreur résiduelle	2	0,09370	0,04685		
Total	7	0,89515			

#### Analyse de régression : Activité protéolytique en fonction de X3; X5

S = 0,400362 R carré = 10,5 % R carré (ajust) = 0,0 %

Prédicateur	effet	Coef	Coef ErT	T	P
Constante	19,835	9,9175	0,1415	70,06	0,000
X3	0,215	0,1075	0,1415	0,76	0,482
X5	-0,025	-0,0125	0,1415	-0,09	0,933

#### Analyse de variance

Source	DL	carrés	CM	F	P
Régression	2	0,0937	0,0469	0,29	0,758
Erreur résiduelle	5	0,8015	0,1603		
Total	7	0,8952			

### Analyse de régression : protéines en fonction de X1; X2; X4; X6; X7

S = 0,0270647 R carré = 94,6 % R carré (ajust) = 81,2 %

#### Analyse de variance

Source	DL	carrés	CM	F	P
Régression	5	0,0257990	0,0051598	7,04	0,129
Erreur résiduelle	2	0,0014650	0,0007325		
Total	7	0,0272640			

### Analyse de régression : protéines en fonction de X3; X5

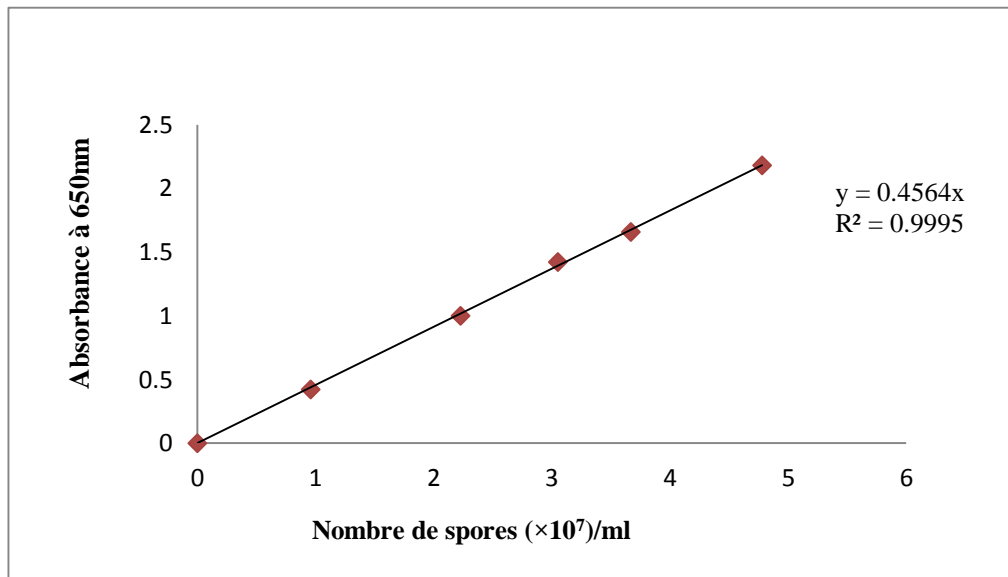
S = 0,0718317 R carré = 5,4 % R carré (ajust) = 0,0 %

Prédicteur	Effet	Coef	Coef ErT	T	P
Constante	5,512	2,75600	0,02540	108,52	0,000
X3	0,0115	0,00575	0,02540	0,23	0,830
X5	0,0245	0,01225	0,02540	0,48	0,650

#### Analyse de variance

Source	DL	carrés	CM	F	P
Régression	2	0,001465	0,000733	0,14	0,871
Erreur résiduelle	5	0,025799	0,005160		
Total	7	0,027264			

### Annexe 05 :



### Courbe d'étalonnage de la souche *Aureobasidium sp.*

### Annexe 06 : . Préparation du courbe étalon

la gamme étalon est établie à partir d'une solution de BSA (*bovine serum Albumine*) dont les concentration sont comprises entre (0 et 500  $\mu\text{g/ml}$ ) selon le tableau suivant :

**Tableau 08 :** Préparation du courbe étalon.

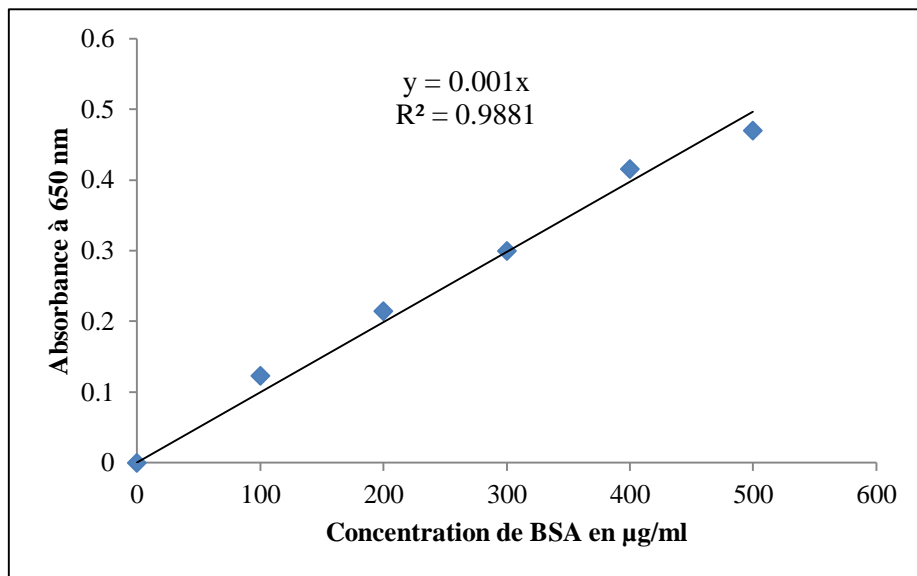
Concentration de BSA ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	200	400	600	800	1000
Solution mère BSA (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillée (ml)	0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Mélange M (ml)	0	5	5	5	5	5

Incubation pendant 10à15min à température ambiante, puis on ajoute:

### Solution E

(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Après agitation rigoureuse, l'échantillon est incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance lue à 750 nm permet de tracer la courbe d'étalonnage des Protéines.



**Courbe d'étalonnage des protéines.**

# *Résumés*

## Résumé

Le but visé lors de cette ébauche consiste à accroître le rendement de production de la protéase alcaline par *Aureobasidium sp.* sous des conditions d'optimisations telles que le pH, sources de carbone et d'azote. A ce diction, des fermentations ont été réalisées en erlenmeyers pendent 96h à 30°C en utilisant les déchets de tomate comme substrat de base pour la production de l'enzyme testée par cette souche fongique par la fermentation solide . une étude a été entreprise dans le but de sélectionner des facteurs influençant la production enzymatique. Le Plan préposé est celui du plackett-burman à N=8 expériences et k facteurs (dont N=k+1); cinq facteurs de production (pH, caséine, NaCl, Agent extractant (eau distillée et eau tweenée), KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, et deux erreurs. Les résultats ont permis de amener l'analyse statistique du plan du Plackett-Burman a autorisé de sélectionner les facteurs qui ont un effet significatif ( $p < 0.3$ ) sur la production de l'enzyme ciblée : une signification positive avec NaCl ( $p=0.073$ ), extraction par l'eau tweenée ( $p=0.251$ ) et négative avec la caséine ( $p=0.471$ ), KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( $p=0.371$ ). Cependant, des effets non significatifs sont semblés avec pH ( $p=0.673$ ). De ce fait, les facteurs choisis qui influent la production de protéase alcaline d'après ce plan sont : NaCl, l'eau tweenée comme Agent extractant. Les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent le plein potentiel du déchet de tomate comme substrat initiateur pour la production de protéase alcaline, et aussi l'effcience du plan de Plackett-Burman.

**Mots Clés :** *Aureobasidium sp* ,Plackett-Burman, protéase, déchet de tomate.



## Abstract

The purpose of this draft is to increase the production yield of the alkaline protease by *Aureobasidium sp.* under optimizing conditions such as pH, carbon and nitrogen sources. To this diction, fermentations were carried out in Erlenmeyer flasks for 96 h at 30 ° C using the tomato waste as base substrate for the production of the enzyme tested by this fungal strain by solid fermentation. a study was undertaken to select factors influencing enzymatic production. The Planned Plan is that of the plackett-burman at N = 8 experiments and k factors (of which  $N = k + 1$ ); five factors of production (pH, casein, NaCl, extractant agent (distilled water and Tweened water), KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and two errors. The results made it possible to bring the statistical analysis of the Plackett-Burman plan authorized to select the factors that have a significant effect ( $p < 0.3$ ) on the production of the targeted enzyme: a positive significance with NaCl ( $p = 0.073$ ), tweened water extraction ( $p = 0.251$ ) and negative with casein ( $p = 0.471$ ), KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( $p = 0.371$ ) However, insignificant effects are shown with pH ( $p = 0.673$ ), so the selected factors that influence alkaline protease production according to this plan are: The results obtained in this study demonstrate the full potential of tomato waste as an initiator substrate for alkaline protease production, as well as the efficiency of the Plackett-Burman plan. Key words: *Aureobasidium sp.*, Plackett-Burman, protease, tomato waste.

**Key-words** : *Aureobasidium sp.* plackett-burman, alkaline protease, tomat pomace.

## ملخص :

الغرض من هذه المسودة هو زيادة إنتاجية البروتينية القلوية بواسطة *Aureobasidium sp.* تحت الظروف المثلى مثل الأس الهيدروجيني ، الكربون ومصادر النيتروجين. في هذا الالقاء، أجريت تخمير في قوارير زجاجية أخرى شفق 96 h في 30 ° C باستخدام النفايات الطماطم باعتبارها الركيزة الأساسية لإنتاج الإنزيم اختبارها من قبل هذه السلالة الفطرية عن طريق التخمير الصلبة. أجريت دراسة لاختيار العوامل المؤثرة على الإنتاج الأنزيمي. خطة المصاحبة هي أن التجارب Plackett-بورمان  $N = 8$  والعوامل ك (بما في ذلك  $N = 1 + ك$ )؛ خمسة المدخلات (درجة الحموضة، الكازين، كلوريد الصوديوم، وكيل مستخلصة (الماء المقطر والماء (tweenée،  $KH_2 PO_4$  و  $K_2HPO_4$ ، واثنين من الأخطاء. واستخدمت نتائج لجعل التحليل الإحصائي للخريطة Plackett-بورمان أذن لتحديد العوامل التي لها تأثير معنوي ( $p < 0.3$ ) على إنتاج إنزيم المستهدفة: أهمية إيجابية مع كلوريد الصوديوم ( $ع = 0.073$ )، واستخراج مع tweenée المياه ( $ع = 0.251$ ) والسالب مع الكازين ( $ص = 0.471$ )، وبالتالي فإن العوامل المحددة التي تؤثر على إنتاج الإنزيم البروتيني القلوي في إطار خطة ل الهيدروجيني ( $ع = 0.673$ ). وبالتالي فإن العوامل المحددة التي تؤثر على إنتاج الإنزيم البروتيني القلوي في إطار خطة ل كلوريد الصوديوم، tweenée المياه وكيل مستخلصة النتائج في هذه الدراسة تثبت الإمكانيات الكاملة من النفايات الطماطم (البندورة) الركيزة المبادر لإنتاج الأنزيم البروتيني القلوية، وأيضاً كفاءة خطة-Plackett-بورمان..

الكلمات المفتاحية: *Aureobasidium sp.*، Plackett-Burman، protease، tomato waste.

**Thème:** Production de la protéase alcaline par *Aureobasidium sp.* sur milieu à base de déchets de tomate.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie Fongique.

### Résumé

Le but visé lors de cette ébauche consiste à accroître le rendement de production de la protéase alcaline par *Aureobasidium sp.* sous des conditions d'optimisations telles que le pH, sources de carbone et d'azote. A ce diction, des fermentations ont été réalisées en erlenmeyers pendant 96h à 30°C en utilisant les déchets de tomate comme substrat de base pour la production de l'enzyme testée par cette souche fongique par la fermentation solide . une étude a été entreprise dans le but de sélectionner des facteurs influençant la production enzymatique. Le Plan préposé est celui du plackett-burman à N=8 expériences et k facteurs (dont N=k+1); cinq facteurs de production (pH, caséine, NaCl, Agent extractant (eau distillée et eau tweenée), KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, et deux erreurs. Les résultats ont permis de amener l'analyse statistique du plan du Plackett-Burman a autorisé de sélectionner les facteurs qui ont un effet significatif ( $p < 0.3$ ) sur la production de l'enzyme ciblée : une signification positive avec NaCl ( $p=0.073$ ), extraction par l'eau tweenée ( $p=0.251$ ) et négative avec la caséine ( $p=0.471$ ), KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( $p=0.371$ ). Cependant, des effets non significatifs sont semblés avec pH ( $p=0.673$ ). De ce fait, les facteurs choisis qui influent la production de protéase alcaline d'après ce plan sont : NaCl, l'eau tweenée comme Agent extractant. Les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent le plein potentiel du déchet de tomate comme substrat initiateur pour la production de protéase alcaline, et aussi l'efficacité du plan de Plackett-Burman.

**Mots clés :** *Aureobasidium sp.* Plackett-Burman, protéase, déchet 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 :

**Président 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 :** 26/06/2018