



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



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

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biotechnologiques

Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique

Intitulé :

**Utilisation des déchets de tomate et d'orange comme substrat
de fermentation solide pour la production d'enzymes
fongiques.**

Présenté et soutenu par : *-BEDJAOUI MAROUA.*

Le : 07/07/2019

-ZERMANE AYA ROUMEISSA.

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : *Mme BENKAHOUL.M* (Maître de conférences B- UFM Constantine).

Rapporteur : *Mme LEGHLIMI.H* (Maître de conférences A - UFM Constantine).

Examinatrice : *Mme ABDELAZIZ.W* (Maître de conférences B- UFM Constantine).

*Année universitaire
2018 - 2019*

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu ALLAH, le tout Puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail (ELHAMDOU LILLAH).

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Zoologie faculté des sciences de la nature et de la vie. Nous tenons à remercier les responsables de ce laboratoire.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer toute nos reconnaissances et notre profond respect à notre encadreur, Mme. LEGHLIMI. H. Maître de Conférences A à UFM Constantine, à qui nous adressons nos vifs remerciements pour son encadrement, sa confiance, ses efforts et sa patience lors de la correction du manuscrit.

Nos remerciements sont adressés aux membres de Jury qui ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :

Madame BENKAHOUL.M. Maître de Conférences B à UFM Constantine, qui nous a fait l'honneur de présider ce Jury ;

Madame ABDELAZIZ.W. Maître de Conférences B à UFM Constantine, pour l'intérêt qu'il manifeste à ce travail et pour l'honneur qu'il nous a fait en participant à ce Jury.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Tables des matières

Résumés	Page
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Revue bibliographique	
Chapitre1 : Les déchets	
1. Introduction.....	3
2.Déchets de tomates.....	3
2.1. Généralités.....	3
2.2. Les vertus thérapeutiques de la tomate	4
2.3. Production de la tomate en Algérie	4
2.4. Les déchets de tomates.....	4
2.5. Utilisations de déchets de tomates	5
2.5.1. Alimentation	5
2.5.2. Agent antioxydant.....	5
2.5.3. Production d’enzymes.....	6
2.5.4. Production d’huiles.....	6
2.5.5. Traitement de diarrhée.....	6
3. Déchets d’orange.....	6
3.1. Définition.....	6
3.2.Structure morphologique de l’orange	7
3.3. Composition biochimique de l’orange.....	7
3.3.1. Les glucides	7
3.3.2. Les acides organiques	8
3.3.3. Autres composant énergétiques	8
3.3.4. Les vitamines	8
3.3.5. Les minéraux	8
3.3.6. Les oligoéléments	8
3.3.7. Les fibres	8
3.3.8. La flore mésophile	8
3.3.9. Les substances aromatiques	8
3.3.10. Les pigments	8

3.3.11. Les huiles essentielles	9
3.3.12. Les enzymes	9
3.4. Utilisation des déchets d'orange en biotechnologie	9
3.4.1. Production des enzymes.....	9

Chapitre 2 : Les enzymes

1.Généralités sur les enzymes.....	10
1.1. Définition.....	10
1.2. Marché des enzymes.....	10
2.Les Hydrolases	10
2.1. Cellulases	11
2.1.1. Nomenclature et définition de la cellulase.....	11
2.1.2. Enzymes cellulolytiques.....	11
2.1.3. Origine microbienne de la cellulase.....	12
2.1.4. Applications industriel	13
*Production de biocarburants (pour la couverture énergétique)	13
*Industrie agro-alimentaire	13
*Industrie du textile et des détergents	13
*Industrie du papier ou papetière	13
*Nutrition animale	14
*Domaine thérapeutique	14
2.2. L'α-amylase.....	14
2.2.1. Nomenclature et définition.....	14
2.2.2. Origine microbienne de l'α-amylase.....	14
2.2.3. L'utilisation de l'α-amylase.....	15
* Industrie alimentaire	15
* Industries non alimentaires	15
* Domaine médical et pharmaceutique.....	16
* Autre applications	16
2.3. Les protéases	16
2.3.1. Définition.....	16
2.3.2. Origine microbienne des protéases.....	17
2.3.3. Protéase et industrie.....	17
* Industrie alimentaire	17
* Fromageries	17
* Boulangerie	18

* Préparation de produits à base de soja.....	18
* Synthèse de l'aspartam	18
* Industrie pharmaceutique et médicale	18
* Détergents	18
* Tanneries.....	19
* Autres applications	19

Chapitre 3 : La fermentation

1. La fermentation.....	20
2.Fermentation en milieu solide.....	20
3.Avantages et inconvénients des fermentations solides	21
3.1. Avantages.....	21
3.2. Inconvénients	21
4.Facteurs influençant la fermentation en milieu solide	22
4.1. Le type d'inoculum	22
4.2. L'humidité	22
4.3. La température.....	22
4.4. Le pH.....	22
4.5. L'aération et le brassage	23
4.6. L'oxygène et le dioxyde de carbone	23
4.7. Les facteurs nutritionnels	23
4.8. Les substrats	24
4.8. La taille des particules	24
5. Applications de la fermentation en milieu solide	24
5.1. La production d'enzymes.....	24
5.2. La production de métabolites secondaires	25
5.3. La bioremédiation.....	25

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 1 : Matériel et méthodes

1. Microorganisme	26
1.1. Préparation de l'inoculum	26
1.2. Conservation de la souche	27
2. Etude de la production des enzymes par fermentation sur milieu solide	27
2.1. Matière première	27
2.1. Conduite de la fermentation solide	27
3. Mesures et dosages effectués après fermentation	27

3.1. Dosage des activités cellulolytiques	28
* Activité papier filtre (APF)	28
* Activité endoglucanase.....	28
3.2. Mesure de l'activité α -amylasique	29
3.3. Mesure de l'activité protéolytique.....	30
3.4. Mesure des protéines totales	31
3.5. Mesure de l'humidité.....	32
4. Analyse statistique.....	32

Chapitre 2 : Résultats et discussion

1. Effet du substrat et de l'agent humidifiant sur la production des hydrolases.....	33
1.1. Activité cellulase.....	33
1.2. Activité alpha-amylase.....	35
1.3. Activité protéase.....	36
2. Analyse statistique	37
2.1. Effet des facteurs testés (1 : la nature de substrat, 2 : l'agent humidifiant) sur la production de l'endoglucanase.....	38
2.2. Effet des facteurs testés (1 : la nature de substrat, 2 : l'agent humidifiant) sur la production de l'APF.....	39
2.3. Effet des facteurs testés (1 : la nature de substrat, 2 : l'agent humidifiant) sur la production de la protéase.....	40
2.4. Effet des facteurs testés (1 : la nature de substrat, 2 : l'agent humidifiant) sur la production de l'alpha-amylase.....	41

Conclusion générale 44

Références bibliographiques.....46

Annexes

Résumé

La production des enzymes hydrolases recherchées dans cette étude (cellulase, alpha- amylase et protéase) par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* est effectuée par fermentation solide, sur milieu à base de déchets de tomate et déchets d'orange humidifiés par deux agents différents l'eau distillée et l'eau physiologique tweenée. L'influence de la nature du substrat et de l'agent humidifiant est établie. Les déchets de tomate ont donné le maximum de production en activités cellulase et protéase, à savoir 13.6 U/gds d'APF quand ils sont humidifiés avec l'eau physiologique tweenée. 316.613 U/gds d'endoglucanase et 13.274 U/gds de protéase sur ce substrat humidifié à l'eau distillée. Tandis que, les déchets d'orange humidifié à l'eau distillée permettent d'obtenir le maximum en activité alpha-amylase mesurée à 93.572 U/gds. D'après ces résultats, il semble la possibilité de valoriser ces déchets de l'industrie agroalimentaire abandonnés, pour la production d'enzymes (cellulase, protéase et alpha- amylase) à intérêt industriel. Aussi, la possibilité d'humidifier ces substrats avec l'eau distillée pour de bon rendement en enzymes, semble une alternative intéressante pour l'industrie.

Mots clés : Cellulase, protéase, amylase, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation en milieu solide, déchets d'orange, déchets de tomate.

Abstract

The production of the enzymes hydrolase sought in this study (cellulase, alpha-amylase and protease) by the mold *Trichoderma longibrachiatum* is carried out by solid fermentation, on a medium containing tomato waste and orange waste moistened by two different agents water distilled and physiological water tweened. The influence of the nature of the substrate and the wetting agent is established. The tomato waste gave the maximum production in cellulase and protease activities, namely 13.6 U / g of APF when they are moistened with tweened physiological water. 316,613 U / g of endoglucanase and 13,274 U / g of protease on this substrate moistened with distilled water. While, the orange waste moistened with distilled water makes it possible to obtain the maximum alpha-amylase activity measured at 93.572 U / gds. Based on these results, there appears to be the potential for upgrading this abandoned food processing waste for the production of enzymes (cellulase, protease and alpha-amylase) of industrial interest. Also, the possibility of moistening these substrates with distilled water for good enzyme yield, seems an interesting alternative for the industry.

Key words : Cellulase, protease, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation in solid media, orange waste, tomato waste.

يتم إنتاج إنزيمات هيدرولاز المنشودة في هذه الدراسة (السليلاز، الألفا أميليز والبروتياز) بواسطة الفطر الخيطي *Trichoderma longibrachiatum* عن طريق التخمير في وسط صلب، باستعمال مخلفات الطماطم والبرتقال مبللة بعاملين مختلفين هما الماء المقطر والماء الفسيولوجي. سمح تحليل النتائج بتحديد الوسط الأمثل للإنتاج الإنزيمي. أعطت مخلفات الطماطم أقصى إنتاج في أنشطة السليلاز والبروتياز، وهي 13.6U/gds من نشاط الـ APF عند ترطيبها بالماء الفسيولوجي. U / gds 316.613 من نشاط endoglucanase و 13.274U/gds من نشاط البروتياز على هذه الركيزة المبللة بالماء المقطر. في حين أن مخلفات البرتقال المبللة بالماء المقطر تجعل من الممكن الحصول على الحد الأقصى لنشاط الألفا أميلاز الذي يبلغ 93.572 U/gds. بناءً على هذه النتائج، يبدو أن هناك إمكانية لتحديث ومعالجة مخلفات الأغذية الصناعية لإنتاج الإنزيمات (السليلاز والبروتياز والألفا أميلاز) ذات الاهتمام الصناعي. أيضاً، فإن إمكانية ترطيب أوساط التفاعل بالماء المقطر لتحقيق عائد جيد من الإنزيم، يبدو بديلاً مثيراً للاهتمام لهذه الصناعة.

الكلمات المفتاحية: السليلاز، البروتياز، الأميلاز، *Trichoderma longibrachiatum*، التخمير في الوسط الصلب، نفايات البرتقال، نفايات الطماطم.

Liste des abréviations

APF : Activité papier filtre.

BSA : Albumin serum bovine.

CMC : Carboxyméthylcellulose.

DNS : Acide dinitrosalicylique.

EG : Endoglucanases.

FMS : Fermentation sur milieu solide.

Gds : Gramme de substrat.

PDA : Potato dextrose agar.

rpm : Rotation par minute.

T : *Trichoderma*.

U : Unité.

Liste des figures

Figure 1 : coupe longitudinale et schéma descriptif de l'orange (Beton J.C., Brochard G. 1993).....	7
Figure 2 : Modèle proposé pour la diffusion des microorganismes filamenteux dans le substrat Solide (Rahardjo <i>et al.</i> , 2006).....	20
Figure 3 : <i>Trichoderma longibrachiatum</i> cultivée sur milieu PDA, après 3 jours (a :recto ;b :verso) et 6 jours (c :recto ;d :verso) d'incubation à 30°C.....	26
Figure 4 : Courbe étalon de glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase....	29
Figure 5 : Courbe étalon de maltose pour le dosage de l'activité α -amylasique.....	30
Figure 6 : Courbe étalon de tyrosine pour le dosage de l'activité protéase.....	31
Figure 7 : Courbe étalon de BSA pour le dosage des protéines totales.....	32
Figure 8 : Effet du substrat et agent humidifiant sur la production de l'activité Papier filtre (APF) (a) ; et son activité spécifique (b) ; après 4 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types.....	33
Figure 9 : Effet du substrat et agent humidifiant sur la production de l'activité endoglucanase (a) ; et son activité spécifique (b) ; après 4 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts- types.....	34
Figure 10 : Effet du substrat et agent humidifiant sur la production de l'activité alpha-amylase (a); et son activité spécifique (b) ; après 4 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeur moyennes \pm écarts- types.....	36
Figure 11 : Effet du substrat et agent humidifiant sur la production de l'activité protéase (a) ; et son activité spécifique (b) ; après 4 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeur moyennes \pm écarts- types.....	38

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les microorganismes producteur de cellulase (Muhammad <i>et al.</i> , 2016).....	12
Tableau 2 : Classification des protéases (RAO et al., 1998).....	16
Tableau 3 : Analyse de la variance pour l'effet de la nature du substrat (a : déchets de tomates, b : déchets d'orange) et de l'agent humidifiant sur la production de l'endoglucanase par <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	38
Tableau 4 : Analyse de la variance pour l'effet de la nature du substrat (a : déchets de tomates, b : déchets d'orange) et de l'agent humidifiant sur la production de l'APF par <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	39
Tableau 5 : Analyse de la variance pour l'effet de la nature du substrat (a : déchets de tomates, b : déchets d'orange) et de l'agent humidifiant sur la production de la protéase par <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	40
Tableau 6 : Analyse de la variance pour l'effet de la nature du substrat (a : déchets de tomates, b : déchets d'orange) et de l'agent humidifiant sur la production de la protéase par <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	41

Introduction générale

Introduction

La production industrielle des enzymes dans les dernières années, s'est essentiellement orientée vers le processus fermentaire, ce qui est expliqué par le fait que, les enzymes microbiennes présentent de nombreux avantages par rapport à celle d'origine animale et végétale.

En effet, les enzymes microbiennes sont largement utilisées dans les procédés industriels en raison de leur faible coût, grande productivité, protection de l'environnement, la plasticité et la grande disponibilité (Burhan *et al.*, 2003). Par ailleurs, les industries agro-alimentaires utilisant la matière première végétale font régulièrement appel à des systèmes enzymatiques pour produire, soit pour transformer, soit pour améliorer la qualité des produits finis. L'utilisation des micro-organismes dans les procédés de conversion de la matière organique remonte à plusieurs millénaires. Les caractéristiques intéressantes de ces procédés par rapport aux réactions chimiques classiques sont dues aux propriétés du système biologique de pouvoir se multiplier, s'adapter et évoluer très rapidement selon les conditions physico-chimiques environnantes. Les enzymes sont utilisées comme biocatalyseurs dans des conditions douces avec une spécificité très élevée pour le substrat (Kobayashi *et al.*, 1991) et la plupart d'entre-elles, utilisées à l'échelle industrielle, proviennent de micro-organismes aérobies tels que *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. et *Saccharomyces cerevisiae* (Sasson, 1985).

Parmi les enzymes d'intérêt industriel, il existe les cellulases, pour lesquelles l'industrie porte une attention toute particulière grâce à leur grand potentiel biotechnologique, industriel (industries de textile, des détergents, du papier, les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et de l'alimentation animale) et aussi le recyclage de la biomasse cellulosique (Korish, 2003 ; Moussa et Tharwat, 2007), actuellement elles représentent 20% du marché mondiale des enzymes (Lekhchir, 2006).

Les amylases sont, de leurs parts, parmi les enzymes qui occupent une place de choix, et une grande importance en biotechnologie, ce qui constitue une classe d'enzymes industrielles ayant approximativement 25 à 30% du marché des enzymes (Rajagopalan et Krishna, 2008).

Les protéases sont les enzymes les plus recherchées dans la bio-industrie et l'agro-alimentaire. En effet, elles sont les plus dominantes (environ 65%) dans le marché mondial des ventes d'enzymes industrielles, qui se situent entre 50 et 60 milliards d'euros par an (Sahoo *et al.*, 2012).

Par ailleurs, la production des enzymes par des procédés biotechnologiques (voies fermentaires), nécessite non seulement l'identification et la sélection du microorganisme producteur, mais également le choix d'un substrat de fermentation à faible coût d'une part, et d'autre part, convenable en point de vu composition en élément nutritifs nécessaires au développement du microorganisme utilisé, ainsi que la production des enzymes souhaitées.

Notre travail de recherche s'insère dans cette préoccupation et consiste à l'utilisation des déchets agroindustriels à savoir, déchets de tomate et déchets d'orange comme substrat de fermentation pour la production des enzymes hydrolytiques : la cellulase, l'alpha amylase, et la protéase. La production est suivie par culture de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* effectuée par fermentation en milieu solide. Celle-ci présente un certain nombre d'avantages économiques et technologiques dont la faiblesse des couts et la simplicité des équipements, par rapport à la fermentation sur milieu liquide (Durand, 2003).

Dans ce cadre, les objectifs de notre étude sont tracés comme suit :

- La production des enzymes hydrolases choisies (cellulase, alpha-amylase et protéase) est recherchée, par fermentation en milieu solide tout en utilisant des substrats naturels de faible valeur marchande (les déchets de tomate et les déchets d'orange) issus de l'industrie agroalimentaire, qui s'avère de notre jours une alternative intéressante et rentre dans le cadre de la protection de notre environnement ;
- L'effet de la nature de l'agent d'humidification des substrats utilisés, sur la valeur des activités enzymatiques mesurées.

Revue bibliographique

Chapitre 1 :
Les déchets

1. Introduction

Le monde des déchets, complexe et souvent méconnu, est depuis quelques années un domaine en pleine expansion. Le traitement des déchets continuera d'évoluer, ainsi que sa réglementation, au fil de l'amélioration des connaissances.

Le terme déchet vient du verbe « *déchoir* » qui traduit la diminution de la valeur d'un bien, d'une matière ou d'un objet jusqu'au point où il devient inutilisable en un lieu et en moment donné. Ce terme a pour synonymes, rognure, copeau, chute, scorie, le reste, loupé de fabrication, rejet, résidu, effluent, détritus, immondices, sous-produit, co-produit, produit annexe, produit hors-usage, matière première secondaire, etc. Le déchet est défini par celui qui représente un tonnage important, de prix bas, concentré géographiquement et représentant des sources énergiques non négligeables (Sauvant, 1984).

L'exploitation des coproduits agricoles en vue d'une valorisation a bénéficié au cours de ces dernières années d'un regain d'intérêt pour des raisons économiques aussi bien qu'environnementales. L'importance de ces coproduits agricoles réside dans leur abondance, leur faible coût ainsi que dans le fait qu'ils représentent une source organique naturelle disponible partout sur la planète. Cependant, aujourd'hui, l'industrie mondiale utilise moins de 10% de la biomasse végétale produite et des quantités énormes des résidus d'agriculture sont brûlées chaque année, ce qui cause un problème environnemental sérieux. Actuellement, plusieurs pays ont imposé de nouvelles réglementations pour limiter la combustion de ces coproduits en réponse aux restrictions concernant l'émission de gaz à effet de serre à l'origine du réchauffement climatique. Ceci a permis de stimuler l'intérêt pour l'utilisation des coproduits agricoles en tant que ressource naturelle renouvelable. En effet, des coproduits de l'agriculture ont été utilisés comme une source renouvelable d'énergie et pour la production de nombreux composés chimiques, incluant le bioéthanol, le charbon actif. Les résidus agro-industriels ont été aussi utilisés dans les procédés de fabrication de pâte à papier et la production de bio-produits permettant d'une part, de fournir des substrats alternatifs et d'autre part de résoudre le problème de pollution engendré par la non utilisation effective de ces résidus.

La présente étude s'intéresse aux déchets de tomates et les déchets d'orange.

2. Déchets de tomates

2.1. Généralités

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) est une plante originaire d'Amérique du sud ; sa valeur nutritive élevée et ses usages multiples dans les préparations culinaires (utilisée comme salade, dans les préparations alimentaires, jus, soupe, purée, ketchup ou pâte) en font le légume le plus important (Sogi et al., 2005 ; Altan et al., 2008 ; Kaur et al., 2008). La culture de la tomate est très répandue dans le monde entier mais 90% de la production mondiale est obtenue dans l'hémisphère nord

(bassin méditerranéen, Californie et Chine) (Celma et *al.*, 2009). En 2008, environ 130 millions de tonnes de tomates ont été produites dans le monde ; la Chine, le plus grand producteur, représente environ un quart de la production mondiale, suivie par les Etats-Unis et la Turquie (FAO, 2008). La tomate est cultivée aussi bien pour la consommation fraîche que pour la transformation industrielle (Celma et *al.*, 2009).

2.2. Les vertus thérapeutiques de la tomate

Les produits de la tomate contiennent des niveaux élevés en caroténoïdes ; le β -carotène et le lycopène (Eller et *al.*, 2010). Ce dernier est synthétisé massivement pendant la maturation des fruits, il est responsable de la couleur rouge intense de *Lycopersicon esculentum* (GuilGuerrero et Reboloso-Fuentes, 2009). Les résultats de diverses études suggèrent que le lycopène joue un rôle dans la prévention de différents problèmes de santé (maladies chroniques, maladies cardiovasculaires, certains cancers, etc) (Altan et *al.*, 2008 ; Benakmoum et *al.*, 2008 ; Kaur et *al.*, 2008 ; Bicanic et *al.*, 2010). Les β -carotènes ont une activité de pro-vitamine A car ils sont convertis enzymatiquement en rétinol par les mammifères. Autres éléments nutritifs de la tomate sont des minéraux et la vitamine C (Guil-Guerrero et Reboloso-Fuentes, 2009).

2.3. Production de la tomate en Algérie

Les pays de la Méditerranée couvrent 31% de la production mondiale de tomates en 2005, soit un volume global de 39 millions de tonnes environ. L'Algérie se situe au 19ème rang mondial (avec 1% de la production mondiale) (Giove et Abis, 2007). 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 Bône (actuellement Annaba). Les tomates industrielles sont principalement cultivées au nord-est du pays : la région d'El Tarf, Annaba, Guelma, Skikda et Jijel représente 85% de la superficie totale.

2.4. Les déchets de tomates

La transformation commerciale de la tomate pour les jus, la pâte et/ou de ketchup produit une grande quantité de déchets en provenance de canaux d'eau, du lavage, du tri sur table, du pulpeur-raffineur et du nettoyage du matériel (Sogi et *al.*, 2003).

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).

Les déchets de tomates peuvent être séchés facilement à l'air libre sous soleil (Katapodis et *al.*, 2006). Toutefois, pour des applications alimentaires, ils doivent être séchés immédiatement pour réduire l'humidité avant la contamination microbienne afin d'améliorer leur durée de vie, leur

apparence, encapsuler la saveur originale et de maintenir sa valeur nutritionnelle (Al-Muhtaseb et *al.*, 2010).

2.5. Utilisations de déchets de tomates

Les déchets de tomates possèdent de nombreuses utilisations, ce qui leur confèrent un intérêt capital.

2.5.1. Alimentation

De part sa teneur élevée en fibres susceptible d'être digérer par les animaux (AlMuhtaseb et *al.*, 2010), les déchets de tomates sont principalement utilisés dans la nutrition de bétail, en particulier les ovins et les bovins (Celma et *al.*, 2009), et aussi pour l'alimentation des volailles (Mansoori et *al.*, 2008), des vaches laitières (Weiss et *al.*, 1997), des chèvres (Ventura et *al.*, 2009) et des moutons (Denek et Can, 2006). Par ailleurs, les déchets de tomates peuvent représenter une source intéressante de fibres pour la consommation humaine (Alvarado et *al.*, 2001). De leur côté, les graines contiennent environ 40% de protéines (Al-Wandawi Rahman et *al.*, 1985). Par conséquent, les graines de tomates sont recommandées comme source de protéines dans les applications alimentaires pour l'homme (Sogi et *al.*, 2005). En outre, Brodowski et Geisman (1980) ont rapporté que ces déchets contiennent 13% de lysine de plus que les protéines de soja, ce qui pourrait améliorer substantiellement la qualité des protéines des aliments à basse teneur en lysine tels les produits de céréales.

2.5.2. Agent antioxydant

Une grande quantité de caroténoïdes est perdue sous forme de déchets au cours de la transformation des tomates (Baysal et *al.*, 2000). Du fait que, 72–92% du lycopène (le pigment rouge) est associée à la fraction insoluble dans l'eau et à la peau. Ces déchets représentent donc une excellente source de caroténoïdes bon marché. Par conséquent, les extraits de peau sont particulièrement riches en lycopène qui pourrait être extraite par l'utilisation de solvants organiques (Kaur et *al.*, 2008). De plus, la qualité des huiles comestibles pourrait être améliorée les en enrichis par les caroténoïdes de peaux (Benakmoum et *al.*, 2008). Par ailleurs, Knoblich et *al.* (2005) ont montré le transfert de caroténoïdes vers le jaune d'œuf lorsque les poulets sont nourris de peaux et de graines de tomates. D'autre part, King et Zeidler, (2004) ont révélé que les niveaux élevés de l'antioxydant α -tocophérol (vitamine E) dans les déchets de tomates ont réduit la détérioration des lipides au cours du chauffage et permet d'améliorer la durée de conservation de la viande de poulets stockés.

2.5.3. Production d'enzymes

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

2.5.4. Production d'huiles

Les graines de tomates contiennent environ 20% d'huile. C'est une bonne source d'huile de salade à condition qu'elle subisse un raffinage adéquat ; très peu de connaissances sont disponibles sur la capacité antioxydante de l'huile de graines de tomates (Eller *et al.*, 2010). De plus, la réduction du taux de cholestérol chez les cochons de Guinée a été mentionnée, en leur donnant 1 ml d'huile/kg. L'huile de graines de tomates a également été utilisée dans les produits cosmétiques tels que le savon, les lubrifiants, les peintures et les industries de vernis (Giannelos *et al.*, 2005).

2.5.5. Traitement de diarrhée

L'effet anti-diarrhéique des déchets de tomates chez une série de chiens, de visons et de renards a été rapporté (McCay et Smith, 1940). 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 a été déterminé (Lester et Morrison, 1946).

3. Déchets d'orange

3.1. Définition

L'industrie alimentaire de traitement des oranges en Algérie produit et rejette chaque année des centaines de tonnes de déchets d'orange dans la nature. La valorisation et le recyclage de ces résidus disponibles en grande quantité et la diminution de la pollution de l'environnement s'avère indispensable. L'utilisation de ces déchets pour la production de substances à hautes valeurs ajoutées comme les enzymes constituent l'une des moyens de leur valorisation.

Les déchets d'oranges par leur composition en sucres solubles (glucose et saccharose), insolubles (pectine, cellulose) et en source minérale (principalement Ca, K, P et Si) (Nishio et Nagai, 1981 ; Mahmood *et al.*, 1998) ont attiré l'attention de la plupart de chercheurs en biotechnologie. C'est ainsi que, beaucoup de travaux de recherches se sont orientés vers l'utilisation de ces déchets

comme substrat fermentescible : production de polygalacturonases par *Rhizopus oryzae* (Hart *et al.*, 1991), de pectinase par *Tubercularia vulgaris* (Fonsec et Said, 1994), des protéase alcalines et neutres, de polygalacturonate-lyase et d' α -amylase par *Bacillus subtilis* (Mahmood *et al.*, 1998).

3.2. Structure morphologique de l'orange

D'après Robert *et al.*, (1999) elle est constituée de l'extérieur vers l'intérieur de :

3.2.1. L'écorce : constituée de deux parties :

* **L'épicarpe** : c'est la partie colorée appelée « flavedo ». Elle représente 8 à 10 % du fruit, elle contient des glandes à huiles essentielles, des pigments caroténoïdes, des vitamines etc.

* **Le mésocarpe** : le mésocarpe interne est appelé « albédo ». Il représente 12 à 30% du fruit, de couleur blanchâtre, il contient de la cellulose, des sucres solubles, des acides aminés, des vitamines et de la pectine.

3.2.2. La pulpe : c'est la partie comestible représentant 50 à 80 % du fruit, elle est formée par L'endocarpe, constitué de vésicules renfermant le jus, celles-ci sont séparées par des quartiers dont le nombre varie de 9 à 11.

3.2.3. Les pépins : ils représentent 0 à 4 % du fruit et ont une teneur élevée en huile.

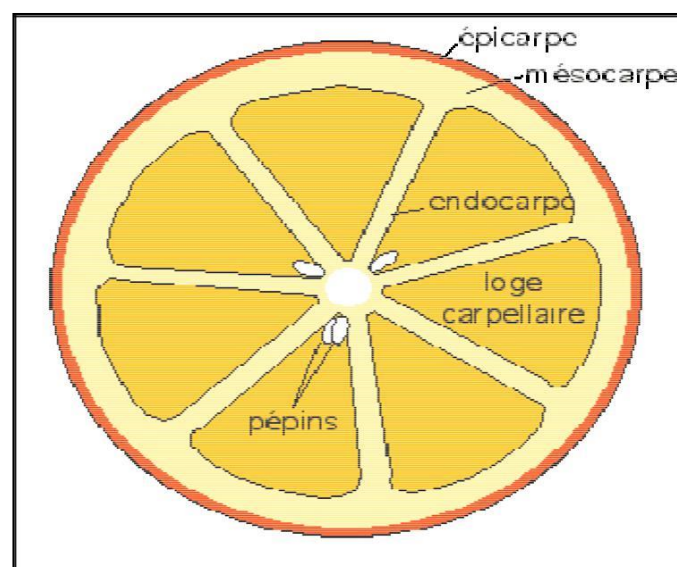


Figure 1 : Coupe longitudinale et schéma descriptif de l'orange (Beton J.C., Brochard G. 1993).

3.3. Composition biochimique de l'orange

Avec plus de 85 % d'eau, l'orange est un fruit désaltérant. C'est dans cette eau de constitution que se trouvent sous forme dissoute les principaux éléments nutritifs (Suschet, 1996).

3.3.1. Les glucides : la teneur en sucres peut varier selon la variété, mais elle est de 8,5 à 12 % dans les fruits matures, les glucides sont représentés par le saccharose (40 %), le fructose et le glucose, ce sont des sucres assimilés qui fournissent rapidement de l'énergie à l'organisme (Beton et Brochard, 1993).

3.3.2. Les acides organiques : ils représentent 1,2 % et c'est essentiellement de l'acide citrique et un peu d'acide malique qui apportent à l'orange sa saveur acidulée.

3.3.3. Autres composant énergétiques : ils ne tiennent qu'une place négligeable dans la composition de l'orange, les lipides sont concentrés dans les pépins et la pulpe qui n'en renferment que des traces, enfin, comme tous les fruits à jus, l'orange contient peu de protéines, c'est pourquoi elle est classée comme fruit peu énergétique avec en moyenne 45 calories pour 100 g (Beton et Brochard, 1993).

3.3.4. Les vitamines : le profil vitaminique de l'orange est dominé par une teneur en vitamine C, l'activité vitaminique est renforcée par la présence de substances dites « Vitamines P » (flavonoïdes et anthocyanes). Ces substances potentialisent l'effet antiscorbutique de la vitamine C et ont par ailleurs, une action protectrice sur les capillaires sanguins (Beton et Brochard, 1993). La vitamine C est protégée par l'activité naturelle du milieu (acides organiques) et par la peau épaisse du fruit qui constitue une barrière efficace vis-à-vis de l'oxygène de l'air.

Les autres vitamines hydrosolubles sont également bien présentes, toutes les vitamines du groupes B en particulier B12 et B9. Pour les vitamines liposolubles, la variété la plus colorée étant la plus riche en provitamine A qui peut atteindre 0,05 à 0,2 mg par 100 g, on trouve aussi de petites quantités de vitamine E (0,24 mg par 100 g.) (Albrigo, 1970).

3.3.5. Les minéraux : très diversifiés ; le calcium occupe une place privilégiée par son abondance (40 mg par 100 g) et de sa forme particulièrement assimilable lorsqu'il est apporté par l'orange (Boileau et Giordan, 1980).

3.3.6. Les oligoéléments : ils sont nombreux, Fer à 0,3 mg, Cuivre, Zinc, Manganèse, Nickel, Iode et des traces de Bore et de Sélénium (Boileau et Giordan, 1980).

3.3.7. Les fibres : sont bien présents dans le fruit avec une teneur de 2,4 % en moyenne, elles ont l'originalité d'être riches en pectines (50 %) particulièrement bien tolérées et qui jouent un rôle régulateur dans le transit intestinal (Boileau et Giordan, 1980).

3.3.8. La flore mésophile : l'oranger contient naturellement une flore mésophile composée de levures et de lactobacilles, indispensables à sa bonne digestion (les *Lactobacillus* font d'ailleurs partie de la flore digestive intestinale) (Larpen, 1985).

3.3.9. Les substances aromatiques : participent à la formation du goût et du parfum de l'orange, ce sont des composés complexes caractéristiques de ce fruit (cithares, liméniens ; aldéhydes, esters), les essences odorantes sont concentrées dans les cellules sécrétrices de la peau et sont employées en alimentation, parfumerie et pharmacie.

3.3.10. Les pigments : ils donnent à la pulpe sa couleur plus ou moins marquée, jaune à orangé pour les flavonoïdes et caroténoïdes, jaune pour les xanthophylles, rouge pour les anthocyanes ou les violoxantines (abondante dans la sanguine).

3.3.11. Les huiles essentielles : ce sont des substances volatiles qui donnent à chaque fruit son odeur particulière (Beton et Brochard, 1993). Les huiles essentielles sont renfermées dans des petites poches, appelées glandes à essences, visibles à l'œil nu sur l'écorce d'orange.

3.3.12. Les enzymes : l'orange contient différents types d'enzymes (Beton et Brochard, 1993) :

-Les enzymes hydrolytiques : les estérases et les protéases.

-Les enzymes oxydases, les peroxydases et la catalase.

-Les enzymes de fermentation.

3.4. Utilisation des déchets d'orange en biotechnologie :

La bioconversion des déchets agricoles en énergie ; attire l'attention du monde durant ces dernières années (Brich, 1976 ; Ghose, 1977). Les déchets d'orange renferment une grande quantité de sucre soluble tel que le glucose et le saccharose et insoluble tel que la pectine et la cellulose (Nishio et Nagai, 1981).

3.4.1. Production des enzymes

Des tonnes de déchets d'orange sont engendrés chaque année par les industries productrices de jus de fruits, ces sous-produits sont utilisés comme substrat pour leur contenance riche en pectine afin de produire des enzymes tel que la pectine estérase et la polygalacturanase à partir de *Talaromyces flavus* (Crotti, 1999). D'autre part après leur analyse ces mêmes déchets ont été utilisés comme substrat dans une culture continue de *Bacillus subtilis* pour la production d'enzymes extracellulaire tel que l'alpha-amylase, les protéases, et aussi la polygalacturonate-lyase (Mahmood, 1998).

Chapitre 2 :
Les hydrolases

1. Généralités sur les enzymes

1.1. Définition

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (Bergmeyer et *al.*, 1979; Pelmont, 1995; Drouin, 2005).

En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (Patel et *al.*, 2005) ; la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (Leisola et *al.*, 2001). Les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés (Sandhya et *al.*, 2005a).

1.2. Marché des enzymes

Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité conserve une forte croissance. Estimé à plus de 1,5 milliards US\$ en l'an 2000. D'après les estimations de Reiss, (2007) le marché mondial des enzymes devait croître de 6,5 % par an ; les ventes mondiales en 2015 s'élèvent à 7,4 milliards USD. En 2015 les lipases constituent 38,5 % du marché mondial, suivies par les amylases à 30,5 % [Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires (Morvan, 2010)]. L' α -amylase et les protéases sont les plus utilisés en bio-industrie (Scriban, 1993 ; Wallach, 1997).

Les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes, soit environ 60% (García-Gómez et *al.*, 2009 ; Rai et Mukherjee, 2010). Les ventes industrielles des protéases sont estimées à plus de 350 millions US\$ annuellement (Kumar et *al.*, 2008b). La part des carbohydrases constituées d' α -amylases, d'isomérases, de pectiques et de cellulases est environ de 40 %. Les secteurs de l'alimentation et les boissons utilisent 90 % des carbohydrases produites. La vente annuelle des α -amylases dans le marché est estimée d'être de 11 millions \$. Et la production mondiale des α -amylases de *B.licheniformis* et d'*Aspergillus sp.*, est environ de 300 tonnes d'enzymes pures par an (Swetha et *al.*, 2006).

2. Les Hydrolases

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). On s'intéresse ici aux enzymes cellulase, alpha-amylase et protéase.

2.1. Cellulases

2.1.1. Nomenclature et définition de la cellulase

***Nom codifié** : EC. 3.2.1.4

***Nom systématique** : 1,4 - (1,3 ; 1,4) - beta-D - Glucan4 –glucanohydrolase

***Nom recommandé** : Cellulase

***Synonymes** : Endoglucanase, Endo-1,4- β -Glucanase, Cellulase carboxyméthylrique, β -1,4-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase, ect. (Schamburg et Salzman, 1991).

Les cellulases des champignons filamenteux se présentent sous la forme de complexes enzymatiques sécrétés dans le milieu de culture. Ces enzymes sont des protéines modulaires constituées d'un module catalytique, permettant l'hydrolyse d'une liaison osidique, d'où l'appellation de glycosides hydrolases, et d'un module de liaison ou CBM (*Carbohydrate Binding Module*), permettant à la fois de localiser et de déstructurer le substrat, facilitant ainsi l'interaction enzyme-substrat. Ces deux modules sont reliés entre eux par un pont peptidique (Lopes, 2008 ; Saddler *et al.*, 2010 ; Ballerini, 2011).

2.1.2. Enzymes cellulolytiques

Le système cellulolytique de référence est celui de *Trichoderma reesei* et repose principalement sur l'action complémentaire de trois types d'enzymes :

A. Les endoglucanases (EGs) ou 1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4) qui hydrolysent de manière aléatoire les parties amorphes de la cellulose, principalement les chaînes de surface des microfibrilles, générant des oligosaccharides de différentes tailles, ainsi que de nouvelles extrémités de chaînes. Ces enzymes n'agissent pas sur la cellulose cristalline et sont mises en évidence sur la carboxyméthylcellulose (CMC : forme soluble de la cellulose), on les appelle également CMCases (Bayer *et al.* 1998).

B. Les exoglucanases ou 1,4- β -D-glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) ou cellobiohydrolases (CBHs) : qui agissent de manière processive et s'adsorbent sur la cellulose en hydrolysant à partir des extrémités réductrices (type I ou CBHI) ou à partir des extrémités non réductrices (type II ou CBHII) pour libérer du cellobiose. Ce sont les seules enzymes agissant sur la cellulose cristalline.

C. Les β -glucosidases (BGs) ou cellobiases ou β -D-glucoside glucohydrolases (EC3.2.1.21) : qui hydrolysent le cellobiose ou les cello-oligosaccharides (DP inférieur à 6) en glucose. Elles n'ont pas d'action sur la cellulose insoluble (Saddler *et al.* 2010 ; Ballerini, 2011). Le complexe cellulolytique de *Trichoderma reesei* se compose de 80% de CBH (50- 60% de CBHI et 12-20% de CBHII par rapport aux cellulases totales), de 20% d'EG (5-10% de EGI et 1-10% de EGII) et de moins de 1% de β -glucosidase (puisque la plupart de ces enzymes sont intracellulaires) (Lopes, 2008).

2.1.3. Origine microbienne de la cellulase

Les micro-organismes cellulolytiques, qui interviennent au niveau de la première étape du processus (qui s'avère être l'étape limitante), constituent un large groupe très disparate comprenant des champignons et des bactéries peuvent être aérobie ou anaérobies, thermophiles ou mésophiles (Beguin *et al.*, 1994). Certains de ces micro-organismes sont récapitulés dans le tableau -1-.

Tableau 1 : Les microorganismes producteur de cellulase (Muhammad *et al.*, 2016).

Groupes	Genres	Espèces
Bactérie	<i>Bacillus</i> <i>Acidothermus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Clostridium</i> <i>Clostridium</i>	<i>Bacillus sp</i> <i>A. Cellulyticus</i> <i>P. Cellulosa</i> <i>C. thermocellum</i> <i>C. acetobutylium</i>
Champignons	<i>Fusarium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Humicola</i> <i>Humicola</i> <i>Trichoderma</i> <i>Trichoderma</i> <i>Trichoderma</i> <i>Trichoderma</i> <i>Trichoderma</i> <i>Trichoderma</i> <i>Sclerotium</i> <i>Acremonium</i> <i>Fusarium</i> <i>Sporotrichum</i> <i>Penicillium</i>	<i>F. solani</i> <i>A. Niger</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. acculeatus</i> <i>A. nidulans</i> <i>H. grisea</i> <i>H. insolens</i> <i>T. reesai</i> <i>T. koningii</i> <i>T. viride</i> <i>T. harjianum</i> <i>T. branchiatum</i> <i>S. rolfsii</i> <i>A. cellulyticus</i> <i>F. solani</i> <i>S. cellulophilum</i> <i>P.fumiculosum</i>
Actinomycètes	<i>Streptomyces</i> <i>Streptomyces</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Thermonospora</i> <i>Thermonospora</i>	<i>S. lividans</i> <i>S. drozdowiejii</i> <i>C. uda</i> <i>C. fimi</i> <i>C. bioajotea</i> <i>T. curvata</i> <i>T. fusca</i>

2.1.4. Applications industrielles

Les principales utilisations industrielles des cellulases sont :

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale (Chesson, 1987) et ensuite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier. Actuellement, elle occupe environ 20 % du marché mondial des enzymes (Bhat, 2000, Lekchiri *et al.*, 2006). Les performances élevées atteintes leur ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (Scriban, 1993), dans les industries de transformation de l'amidon, de brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes (Gao *et al.*, 2008). L'une des applications potentielles des cellulases est la production d'éthanol-carburant à partir de la biomasse lignocellulosique.

***Production de biocarburants (pour la couverture énergétique) :** Les combustibles fossiles, tels que le pétrole et le charbon, sont une source principale d'énergie. Cependant, cette source d'énergie a de nombreux effets néfastes sur l'environnement (pollution atmosphérique, réchauffement de la planète et l'émission de gaz à effet de serre). Dans un effort de réduire ces effets néfastes sur l'environnement, des sources énergétiques alternatives sont mis en évidence (Smeets *et al.*, 2004). Le bioéthanol est l'éthanol élaboré à partir de la biomasse végétale, son rendement énergétique est voisin de celui de l'essence, il est obtenu à partir de substrats fermentescibles (canne à sucre, betterave sucrière, maïs, orge, blé, pomme de terre...), ce biocarburant est appelé carburant de première génération (Thérien, 2006), le carburant de deuxième génération est obtenu à partir de la cellulose (résidus agricoles : la paille ou les cannes de maïs, résidus forestiers) (Pimentel et Patzek, 2005).

***Industrie agro-alimentaire :** En industrie agro-alimentaire, les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibres cellulosiques manipulées par ce type d'industrie (Scriban, 1993). Les cellulases sont employées avec d'autres enzymes dégradant la paroi végétale, dans le traitement des fruits et de légumes et dans l'industrie des boissons.

***Industrie du textile et des détergents :** Depuis 1990, les textiles et les détergents constituent les plus grands marchés mondiaux pour l'utilisation des cellulases. Les cellulases sont employées dans l'industrie du textile pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage (Gusakov *et al.*, 2000), pour ramollir des tissus, pour enlever les noeuds (constituent des défauts de colorant), et dans les détergents de blanchisserie afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (Bhat, 2000 ; Levy *et al.*, 2002).

***Industrie du papier ou papetière :** L'addition de cellulases aux suspensions de pâtes (en cours de lavage) ou en suspension de pâtes de papiers de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1999).

***Nutrition animale** : C'est un autre marché qui pourrait s'ouvrir pour ces enzymes utilisées comme additifs pour l'alimentation de bétail car L'addition de cellulases aux aliments pour volailles ou porcins améliore la digestibilité de leur fraction cellulosique et permet ainsi de réduire à la fois, les consommations de sources d'énergie (amidon) et l'excrétion de cellulose non digérée (la charge polluante des excréta) (Gusakov *et al.*, 2000).

***Domaine thérapeutique** : L'utilisation quasi confidentielle de certaines cellulases dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive (Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1999). Ainsi, des cellulases de *Trichoderma viride* sont utilisées en association avec des α -amylases fongiques, pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Rivière, 1975).

2.2. L' α -amylase

2.2.1. Nomenclature et définition

***Nom codifié** : E.C.3.2.1.1.

***Nom systématique** : 1-4- α -D-glucane,4-glucano hydrolase.

***Nom recommandé** : α -amylase.

***Synonymes** : glucogenase, endoamylase, takaamylase, amylase alpha, fortizyme, maxilase...etc (Schamburg et Slzmann, 1991 ; Brozowski et Davies, 1997 ; Dauter *et al.*,1999).

L' α -amylase comme toutes enzymes, est une macromolécule qui fait partie de la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon. L' α -amylase (E.C.3.2.1.1) est une endoenzyme appartenant à la famille des hydrolases. Elle hydrolyse au hasard, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons α (1,4) D-Glucose (Keating *et al.*, 1998 ; Dauter *et al.*, 1999 ; Franco *et al.*, 2000). En effet, elle attaque les chaines de l'amylose en coupant les liaisons α (1,4) tous les 6 glucoses, maltose et surtout d' α -dextrines (Franco *et al.*, 2000).

2.2.2. Origine microbienne de l' α -amylase

L' α -amylase est une enzyme ubiquitaire, obtenu par extraction à partir de cellules végétales et animales ou par fermentation par des cellules microbiennes (Brozowski et Davies, 1997 ; Dauter *et al.*, 1999).

Les amylases fongiques ont été largement utilisées pour la préparation des aliments orientaux. En dépit de la large distribution des amylases, de source microbienne, à savoir les amylases fongiques et bactériennes ; elles sont utilisées pour la production industrielle en raison du coût-efficacité, la cohérence, moins de temps et d'espace requis pour la production et la facilité de l'optimisation. (Burhan *et al.*, 2008). Parmi les bactéries amylolytiques on trouve, *Bacillus* qui est largement utilisé pour sa production d'alpha amylase thermostable afin de répondre aux besoins industriels.

B. subtilis, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* et *B. amyloliquefaciens* sont connus pour être de bons producteurs d'une amylase et ceux-ci ont été largement utilisés à des fins commerciales. De

même, les champignons filamenteux ont été largement utilisés pour la production des amylases depuis des siècles. Etant donné que ces espèces sont connues pour être des producteurs de protéines extracellulaires, ils sont largement exploités pour la production des enzymes différentes, y compris l'alpha-amylase (Pandey *et al.*, 2003).

Les champignons appartenant au genre *Aspergillus* ont été les plus couramment employées pour la production d'alpha-amylase.

2.2.3. Utilisation de l' α -amylase

La grande spécificité d'action de l' α -amylase et les conditions très douces dans lesquelles elle opère, confèrent un avantage par rapport aux catalyseurs chimiques ordinaires. Aussi, l'usage des préparations enzymatiques s'est considérablement développé dans de nombreux secteurs de la bio-industrie. En effet, de nombreux secteurs d'activité ont mis à profit depuis une trentaine d'année la bio-spécificité de l'enzyme et l'utilise comme agent de production de métabolites comme aides technologiques ou comme outils analytiques. Les industries pharmaceutique, alimentaire et chimique sont les principaux utilisateurs de cette enzyme (Cuveillier, 1999 ; Pandey *et al.*, 2000).

* **Industrie alimentaire :** Les applications de l' α -amylases dans le domaine alimentaire sont nombreuses. En effet les α -amylases bactériennes thermostables sont utilisées dans la liquéfaction (Fogarty et Kelly, 1990 ; Santamaria *et al.*, 1999), elle conduit à la formation de la maltodextrines ou sirops de glucose qui sont caractérisés par leur {dextrose équivalent} (DE) qui représente le nombre de sucres réducteurs exprimé en équivalent glucose. En effet, les maltodextrines qui ont un D'entre 5 à 20 sont appréciés dans la fabrication d'aliments pour enfants (Cuveillier, 1999).

Dans le domaine de sucrerie, l' α -amylase est utilisée pour faciliter les opérations d'extraction et de raffinage de saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre, ainsi pour hydrolyser l'amidon des extraits de fruits évitant la formation de trouble (Bhalla *et al.*, 2000). Les α -amylases bactérienne sont principalement utilisées en brasserie pour liquéfier l'amidon de l'orge, qui est ajouté généralement à l'extrait de malt pour augmenter la concentration en sucres fermentescibles (Sicard, 1982).

* **Industries non alimentaires :** A cause de leurs stabilités à la chaleur, les α -amylases bactériennes conviennent à l'industrie, en dégradant l'apprêt amylicé lors du désencollage (Sicard, 1982). L' α -amylase en papeterie sert à solubiliser l'amidon par liquéfaction servant à l'encollage et au couchage du papier (Sicard, 1982). Dans les détergents d'aujourd'hui de blanchisserie, environ 50 % des détergents liquides et 25 % des détergents en poudre contiennent des enzymes pour aider à la décomposition des tâches, dont il est difficile à enlever avec les agents tensioactifs seuls. En effet, les α -amylase amylases alcalines sont les plus utilisées où elles facilitent la disparition des tâches en dégradent les souillures permettant ainsi l'augmentation du pouvoir blanchissant (Igarashi *et al.*, 1998).

* **Domaine médical et pharmaceutique :** Dans le domaine pharmaceutique, l' α -amylase est utilisée comme agent anti-inflammatoire en soutenant le traitement par des antibiotiques, ou comme un aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Vidal, 2003). L' α -amylase peut être également utilisé dans le traitement du diabète et l'obésité (Cuveillier, 1999). Dans le domaine médical, l' α -amylase dans les liquides biologiques peut déceler certaines maladies : insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas... (Pandey *et al.* 2000).

* **Autre applications :** Les α -amylases peuvent être employées dans les traitements des eaux résiduaires par élimination de l'amidon (Michelen et Castillo, 1984).

2.3. Les protéases

2.3.1. Définition

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Elles sont divisées en deux groupes soit selon leur site d'action, soit selon qu'il s'agit de protéases intracellulaires ou extracellulaires. Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques. Les protéases extracellulaires sont importantes pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement extérieur de la cellule (Kalisz, 1988). Ces dernières sont plus intéressantes à utiliser en industrie, car elles ne nécessitent pas d'étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Une centrifugation suffit pour les séparer des cellules. Les protéases se différencient également selon leur mode d'action en : endopeptidases et exopeptidases.

Les deux types de protéases sont divisés en plusieurs classes et sous-classes (tableau 2).

Tableau 2 : Classification des protéases (Rao *et al.*, 1998).

Type de protéase	Classes et sous-classes
Exopeptidases	Aminopeptidases -Peptidyle peptidases -Dipeptidyle peptidases -Tripeptidyle peptidases
	Carboxypeptidases -Sérine carboxypeptidases -Métallo-carboxypeptidases -Cystéine carboxypeptidases
Endopeptidases	Protéases sérines Protéases cystéines ou protéases thiols Protéases aspartiques ou protéases acides Métallo-protéases

2.3.2. Origine microbienne des protéases

Les protéases sont extraites aussi bien des plantes que des animaux ou des microorganismes (Rao et *al.*, 1998).

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources, car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (Sandhya et *al.*, 2005). Elles sont produites par une grande variété de microorganismes dont les bactéries, les actinomycètes, les moisissures et les levures (Devi et *al.*, 2008). Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial (Sandhya et *al.*, 2005). Le grand succès des protéases microbiennes dans les systèmes biotechnologiques est attribué à la diversité biochimique très large, à la faisabilité de la culture en masse et à la facilité des manipulations génétiques (Ferrero, 2000 ; Wu et *al.*, 2006). Une large proportion des protéases commerciales disponibles, principalement les protéases neutres et alcalines sont dérivées des bactéries, particulièrement de souches de *Bacillus* (Joo et Chang, 2005 ; Laxman et *al.*, 2005 ; Srinubabu et *al.*, 2007). Leurs propriétés sont adaptées à l'usage dans l'industrie des détergents (Rao et *al.*, 1998). Des protéinases à partir de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus subtilis* sont commercialement utilisées (Sinsuwan et *al.*, 2008).

D'autre part, une grande variété des protéases est également élaborée par les moisissures (Rao et *al.*, 1998 ; Wu et *al.*, 2006). Les enzymes d'origine fongiques sont des enzymes extracellulaires, ce qui permet une séparation du mycélium du milieu de fermentation par une simple filtration (Sandhya et *al.*, 2005 ; Devi et *al.*, 2008). En outre, ces moisissures sont des souches GRAS (generally recognised as safe) et peuvent se développer sur des substrats moins chers (Devi et *al.*, 2008).

2.3.3. Protéases et industrie

* **Industrie alimentaire** : Mis à part le cas de la protéase alcaline dans les détergents, 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 principales industries alimentaires utilisant les protéases sont :

* **Fromageries** : L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages (Rao et *al.*, 1998). La présure a été l'enzyme utilisée à cette fin depuis longtemps. Cependant, les fluctuations du prix de caillette et leur pénurie épisodique fait qu'elle est de moins en moins utilisée et tend à être remplacée par des protéases microbiennes (Aviron-Violet et *al.*, 1982). Les protéases utilisées à cette fin sont produites par des microorganismes GRAS tels que *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* et *Endothia parasitica*. Les protéases fongiques acides, alcalines et neutres produites par *A. oryzae* ont également été utilisées en industrie laitière (Aguilar et *al.*, 2008).

* **Boulangerie** : Les endo et les exoprotéinases d'*A. oryzae* sont utilisées pour modifier le gluten de blé par une protéolyse limitée selon les caractéristiques désirées de la pâte ; un tel traitement enzymatique permet de réduire le temps de pétrissage (Aviron-Violet et *al.*, 1982 ; Aguilar et *al.*, 2008). Des protéases bactériennes sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (Rao et *al.*, 1998).

* **Préparation de produits à base de soja** : Les protéases neutres ou alcalines d'origine fongiques sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce de soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Le traitement de ces protéines par la protéase alcaline "*alcalase*" à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats solubles utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans la formulation des aliments diététiques (Rao et *al.*, 1998). Kojizyme™ est un complexe d'exopeptidases et d'endopeptidases dérivées d'*A. oryzae* utilisé dans la fermentation de la sauce de soja (Sumantha et *al.*, 2006).

* **Synthèse de l'aspartam** : Bien que les protéases soient des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse. Sous certaines conditions cinétiques contrôlées, une préparation de thermolysine provenant de *Bacillus thermoprotolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartam (un édulcorant à basse calorie) à partir de l'acide *L*-aspartique et de la *L*-phénylalanine méthyle ester. Il est produit industriellement par Toya Soda (Japon) (Rao et *al.*, 1998; Leisola et *al.*, 2001).

* **Industrie pharmaceutique et médicale** : La grande diversité et spécificité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement des agents thérapeutiques efficaces. Par exemple, des protéases d'*A. oryzae* (Luizim et Nortase) sont utilisées comme aide à la digestion ; des collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des brûlures, plaies et des ulcères dermiques (Rao et *al.*, 1998) ; la « Brinase » (une protéase acide *plasmin-like*) permet l'hydrolyse de la fibrine et la fibrinogène chez les patients souffrant d'une hémodialyse (Sumantha et *al.*, 2006) ; une élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes (Kudrya et Simenenko, 1994) ; etc.

* **Détergents** : A l'heure actuelle, les protéases sont ajoutées comme des ingrédients clés dans la formulation des détergents pour usage domestiques (détergents à lessive, détergents à vaisselles), les produits de nettoyage pour usage industriels et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le marché le plus important au niveau de détergents est de loin celui des détergents à lessive (Kumar et *al.*, 2008b). Une protéase détergente idéal doit avoir une large spécificité de substrat et stable dans l'environnement hostile de la machine à laver (température élevée et pH alcalin) (Rao et *al.*, 1998). Bien que la pepsine soit utilisée depuis 1913 (Hajji et *al.*, 2007), la plupart des protéases ajoutées dans les détergents sont produites par des

souches de *Bacillus* (Gupta et al., 2002). Clear-lens Pro®, une marque de Novozyme Denmark est utilisée pour enlever les dépôts à base de protéines ainsi que les films protéiniques présentent dans les lentilles cornéennes (Sumantha et al., 2006).

* **Tanneries** : Les protéases sont utilisées en tannerie depuis le début du siècle dernier pour leurs capacités à libérer les poils et la laine (Laxman et al., 2005). Les trois traitements de la peau à tanner (le reverdissage, le délainage et le confitage) sont susceptibles de solutions enzymatiques de protéases produites par *B. licheniformis*, *A. oryzae*, *B. amyloliquefasciens*. 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 (Rao et al., 1998 ; Gupta et al., 2002).

* **Autres applications** : Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines (Dalev, 1994 ; Ichida et al., 2001). La protéase neutre de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (Aviron-Violet et al., 1982). Une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir des films photographiques par hydrolyse de la gélatine (Sumantha et al., 2006).

Chapitre 3 :
La fermentation

1. La fermentation

Les procédés biotechnologiques de transformation des aliments mettent en œuvre des microorganismes vivants dont l'activité métabolique permet des transformations biochimiques.

La fermentation est le processus qui permet la décomposition de la matière organique par des microorganismes divers (bactéries, levures, et moisissure). En microbiologie industrielle, le terme fermentation désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou de produits de bioconversions par la culture de microorganismes (Frederic Marie-claire, 2014).

2. Fermentation en milieu solide

La fermentation en milieu solide est généralement définie comme étant la croissance de microorganismes sur des substrats solides en absence totale ou presque d'eau libre (Raimbault, 1998, Pandey *et al.*, 1999). La fermentation en milieu ou en phase solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique (Holker et Lenz, 2004). De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide 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 2).

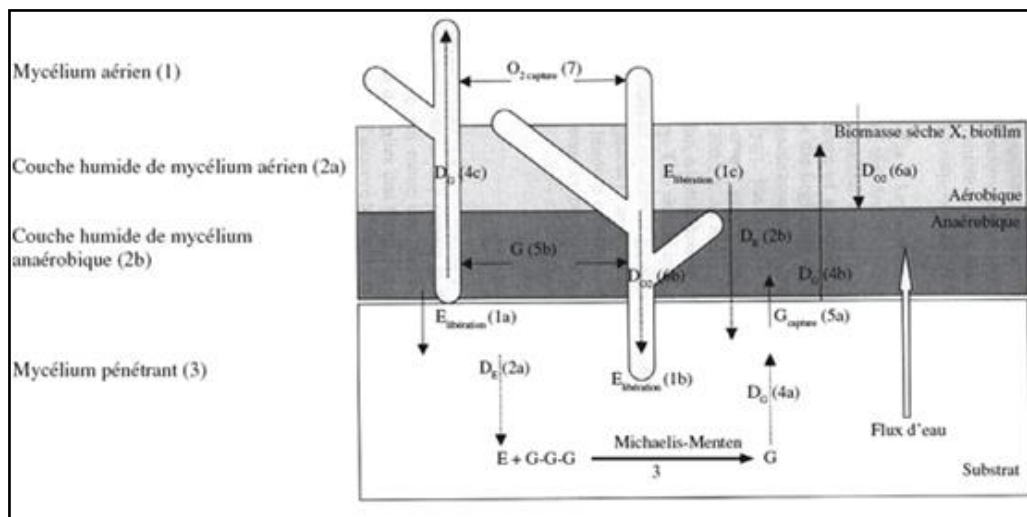


Figure 2 : Modèle proposé pour la diffusion des microorganismes filamenteux dans le substrat solide (Rahardjo *et al.*, 2006).

3. Avantages et inconvénients des fermentations solides

3.1. Avantages

L'utilisation des procédés de fermentation à l'état solide possède plusieurs avantages. En effet, ces derniers sont des procédés simples qui ont recours à des technologies simples. Ils ne demandent pas des équipements sophistiqués et chers pour contrôler les paramètres environnementaux. De plus, les produits de la fermentation en culture solide sont la plupart du temps concentrés, ce qui facilite leur purification. En outre, la faible humidité du milieu et le grand volume utilisés en FMS réduisent la possibilité de contamination par d'autres microorganismes. Cependant, la majorité des bactéries demandent des taux d'humidité élevés pour survivre. De plus, lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides, il n'y a pas de production de mousses en plus que les volumes des déchets générés sont faibles. Les enzymes produites lors d'une fermentation solide sont moins sensibles aux répressions cataboliques et aux inductions (Singhania *et al.*, 2006). Les avantages de la fermentation en culture solide encouragent le recours à ce procédé pour produire des métabolites à haute valeur ajoutée.

3.2. Inconvénients

Bien que la fermentation solide possède plusieurs avantages, ce procédé souffre de quelques limitations. En effet, la fermentation en milieu solide ne peut être effectuée que par un nombre limité de microorganismes, lesquels peuvent se développer facilement à de faibles activités d'eau et d'humidité. De plus, dans un milieu solide, le transfert d'oxygène et de chaleur sont limités, ce qui rend difficile les procédés de cette fermentation à grande échelle. Le transfert de chaleur est ralenti par la faible quantité d'eau disponible dans le milieu, ce qui provoque des problèmes de surchauffe lorsque la fermentation est réalisée à grande échelle. Cette surchauffe provoque l'évaporation de l'eau disponible dans le milieu, limitant ainsi l'utilisation de la fermentation en culture solide à grande échelle. Entre autres, la production de forte concentration de produits par la fermentation en culture solide peut être accompagnée par la production de substances inhibitrices aux microorganismes. Parmi les inconvénients de la FMS, on peut aussi soulever la difficulté de l'estimation de la biomasse et de la croissance des microorganismes, qui sont fortement fixés aux substrats. En outre, contrairement à la fermentation liquide, les paramètres de la fermentation solide ne sont pas suivis directement. Ceci est dû à l'absence de sondes adaptées au suivi direct des paramètres de fermentation solide (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Il est pratiquement difficile d'assurer une distribution parfaitement homogène de substances ajoutées au milieu de culture. Ceci rend plus difficile le contrôle en ligne des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et les concentrations des nutriments.

4. Facteurs influençant la fermentation en milieu solide

4.1. Le type d'inoculum

Il existe deux types d'inoculum. L'inoculum sous forme de cellules végétatives (mycélium) est obtenu après culture du champignon en milieu liquide. L'inoculum sous forme de spores ou conidies est obtenu après « grattage » d'une culture fongique sporulée. Cependant, l'inoculum sous forme de spores ou conidies est décrit, dans les procédés industriels, comme plus avantageux que l'utilisation de cellules végétatives ou mycélium. En effet, l'utilisation de spores ou conidies permet d'une part, une répartition plus homogène du micro-organisme au sein du milieu de fermentation et d'autre part, une meilleure répétabilité de la production obtenue. Cependant, l'utilisation de spores comme inoculum engendre un temps de latence plus long (Wolker *et al.*, 2005). En effet, les spores sont métaboliquement en dormance, la croissance fongique et l'utilisation du substrat ne démarrera que lorsque l'équipement enzymatique nécessaire aura été induit et synthétisé (Krishna, 2005).

4.2. L'humidité

Le besoin en eau dépend du type de micro-organisme utilisé et de la capacité de rétention d'eau du substrat solide. Ainsi, le taux d'humidité d'une fermentation solide se situe dans une fourchette comprise entre 30 et 85% (Krishna, 2005). Il est nécessaire d'avoir une humidité suffisante pour la croissance du micro-organisme mais elle ne doit pas être trop faible (inférieure à 30%) afin d'éviter tout problème de diffusion des nutriments dû à un milieu trop sec. Au contraire, une humidité trop importante (supérieure à 85%) entraîne une agglomération des particules (milieu pâteux) ainsi qu'une limitation du transfert gazeux. Les bactéries ont besoin d'un pourcentage d'humidité supérieur à 70% alors que les champignons se développent à des humidités comprises entre 40 et 70% (Singhania *et al.*, 2009).

4.3. La température

La température est probablement l'un des paramètres les plus importants parmi les facteurs physiques affectant la FMS. Cependant, le suivi de température est difficile à mettre en place pour les cultures en erlen meyer car la croissance du micro-organisme se fait en milieu clos et il n'existe pas de sonde permettant de mesurer directement la température du milieu contrairement aux fermenteurs solides (Krishna, 2005). La température peut avoir une influence sur la croissance du micro-organisme mais également sur la production d'enzyme et de métabolites qui peuvent être très sensibles aux variations de température. Les champignons se développent, généralement, de 20 à 55°C, mais la température optimale de croissance peut être différente de celle de la production.

4.4. Le pH

Chaque micro-organisme a une gamme de pH propre à sa croissance et à son activité métabolique. Les champignons sont capables de se développer à des pH compris entre 2 et 9, avec un optimum entre 3 et 6, ce qui permet donc de débiter une FMS à un pH acide. Ceci peut être un atout afin

d'éviter la contamination bactérienne. La production de métabolites peut faire varier le pH au cours d'une FMS. Le pH est également un paramètre difficile à maîtriser en FMS. Le contrôle est pratiquement impossible en raison de l'hétérogénéité du milieu en absence d'homogénéisation et d'agitation au cours de la FMS. La variation du pH peut aussi être liée à la source d'azote utilisée. Le choix de cette dernière est donc une voie possible pour le contrôle du pH (Krishna, 2005).

4.5. L'aération et le brassage

L'aération a une influence significative en fermentation en milieu solide à cause de la demande continue en oxygène nécessaire à la croissance fongique. Cependant, il est nécessaire d'humidifier le milieu car l'aération entraîne un assèchement du substrat. Cet apport d'eau doit être réalisé de façon la plus homogène possible. Ceci peut être assuré par une agitation du milieu qui facilite également le transfert de masse et de chaleur (Krishna, 2005). Le brassage du milieu est un facteur très important en fermentation aérobie. Il faut qu'il soit bien approprié pour éviter de fractionner le mycélium en morceaux trop petits et entraîner une perte du contenu cytoplasmique provoquant la mort du champignon.

4.6. L'oxygène et le dioxyde de carbone

La quantité en oxygène doit être suffisante pour ne pas limiter le développement des champignons. La technique de fermentation en milieu solide facilite l'accès du micro-organisme à l'oxygène (Krishna, 2005) contrairement à la fermentation en milieu liquide où le transfert d'oxygène est très souvent un facteur limitant.

La mesure de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone fournit une réponse rapide sur le métabolisme du micro-organisme. Elle permet de calculer le quotient respiratoire défini comme le ratio entre le dioxyde de carbone produit et l'oxygène consommé (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Le quotient respiratoire théorique des micro-organismes aérobies est de 1, en dessous de cette valeur le transfert d'oxygène est insuffisant et reflète un faible développement du micro-organisme (Krishna, 2005).

4.7. Les facteurs nutritionnels

Le carbone sert à la fois de source d'énergie et de nutriments pour la croissance du micro-organisme. La source de carbone peut être un glucide simple, comme le glucose, ou des glucides complexes tels que la cellulose ou l'amidon. D'autres sources de carbone telles que le saccharose, le lactose, le glycérol mais encore l'extrait de malt ou le cellobiose peuvent également être utilisées (Couto et Sanroman, 2005). Les sources d'azote telles que le tartrate d'ammonium, le sulfate et le nitrate de sodium, les peptones ainsi que les éléments incluant le sodium, le calcium, le cuivre, le fer, le zinc stimulent la sporulation des champignons.

4.8. Les substrats

Les substrats utilisés en fermentation en milieu solide peuvent être des supports inertes imprégnés par un milieu de culture mais sont, le plus généralement, des matrices naturelles hétérogènes issues de produits ou co-produits agro-industriels (Mitchell *et al.*, 2006). Les supports inertes sont soit des matériaux minéraux comme, par exemple, la perlite, soit des matériaux synthétiques de type mousse de polyuréthane (Durand, 1998). De tels supports permettent principalement l'étude de la croissance fongique. Leur utilisation facilite la récupération du produit d'intérêt. Les substrats naturels employés sont très variés, pulpe de betterave et son de blé sont les principaux. Bagasse (résidus de tige de canne à sucre), tourteaux (résidus de fruits ou de graines), pulpes de café, peau d'agrumes sont utilisés dans les pays du Sud (Durand, 2003). Les résidus agro-industriels sont considérés comme de très bons substrats puisqu'ils fournissent les nutriments nécessaires pour la croissance. Le choix du substrat est influencé par sa disponibilité et son coût. Les résidus agro-industriels sont des ressources renouvelables naturelles et abondantes donc largement disponibles pour la fermentation en milieu solide et dont le coût est peu élevé.

4.8. La taille des particules

La taille et la forme des particules déterminent l'espace vide qui est occupé par l'air permettant l'oxygénation du micro-organisme. Il est donc nécessaire d'avoir une taille de particules convenable, ni trop petite ni trop grosse. En effet, des particules trop petites entraînent une agglomération du substrat diminuant la respiration microbienne et donc le développement. Au contraire, le substrat n'est pas suffisamment accessible si les particules sont trop grosses (Krishna, 2005).

5. Applications de la fermentation en milieu solide

La fermentation en milieu solide permet de produire des acides organiques, des enzymes mais aussi des métabolites secondaires de type antibiotiques. Elle est également utilisée pour la production de biocarburant.

5.1. La production d'enzymes

En 2007, le marché industriel des enzymes représentait 4 milliards \$ par an (Fernandes, 2010). De plus, ce marché est sous-estimé car il existe une production pour un usage interne par certains industriels. La fermentation en milieu liquide est la technique préférée pour la production d'enzymes. Les micro-organismes employés sont généralement des souches génétiquement modifiées. Cependant, il y a un intérêt grandissant pour la production d'une large gamme d'enzymes par fermentation en milieu solide (FMS) car la concentration est plus importante. La stabilité des enzymes est aussi un autre avantage de la production par FMS. De plus, les co-produits agro-industriels sont considérés comme les meilleurs substrats (Krishna, 2005).

5.2. La production de métabolites secondaires

La production de métabolites secondaires est principalement réalisée par fermentation en milieu liquide, cependant, les recherches s'orientent vers la production de ces métabolites par la technique de fermentation en milieu solide. Il est décrit que cette dernière permet de diminuer le temps de culture, d'augmenter le rendement ou encore de réduire le coût de production (Krishna, 2005). Parmi ces métabolites, nous trouvons l'acide gibbéréllique qui est un facteur de croissance chez les plantes mais aussi les alcaloïdes de l'ergot dont la demande

est en constante augmentation car ils sont largement utilisés dans le traitement des maladies comme l'angine de poitrine, la migraine, l'hypertension ou encore le glaucome.

Les antibiotiques, les mycotoxines, telles que l'aflatoxine et l'ochratoxine, peuvent être produits par fermentation en milieu solide. Cette méthode est également employée pour la production de spores utilisées pour la protection des plantes afin de diminuer l'utilisation de pesticides.

5.3. La bioremédiation

Ce domaine est actuellement en plein essor. L'élimination des métaux lourds est un défi majeur pour la dépollution des eaux usées. La présence de cuivre et de plomb est dangereuse pour la santé humaine. L'utilisation de co-produit industriel est un filtre naturel pour la décontamination. La fermentation en milieu solide peut être une alternative moins coûteuse que la dépollution classique par des résines synthétiques (Javed *et al.*, 2012).

Partie expérimentale

Chapitre 1 :
Matériel et méthodes

1. Microorganisme

La moisissure utilisée dans cette étude est *Trichoderma longibrachiatum* isolée au laboratoire de Génie Enzymatique (Université des Frères Mentouri Constantine 1), à partir d'échantillons de sol collectés proche de la source thermale (Hammam Debbagh, Guelma), localisée dans le Nord Est de l'Algérie. Cette souche est identifiée au niveau du laboratoire DSMZ (Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) en Allemagne (Leghlimi, 2013).

1.1. Préparation de l'inoculum

La souche est maintenue sur milieu PDA (Annexe 1), incubées à 30°C jusqu'à ce que la surface de la boîte soit recouverte de spores (Figure 3). Après sporulation de la moisissure, les spores sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée stérile. La suspension de spores va servir à l'inoculation des milieux de cultures et de production des enzymes. La concentration en spores est déterminée par le dénombrement de la dilution appropriée à l'aide d'une cellule de Thoma (Guiraud, 1998).

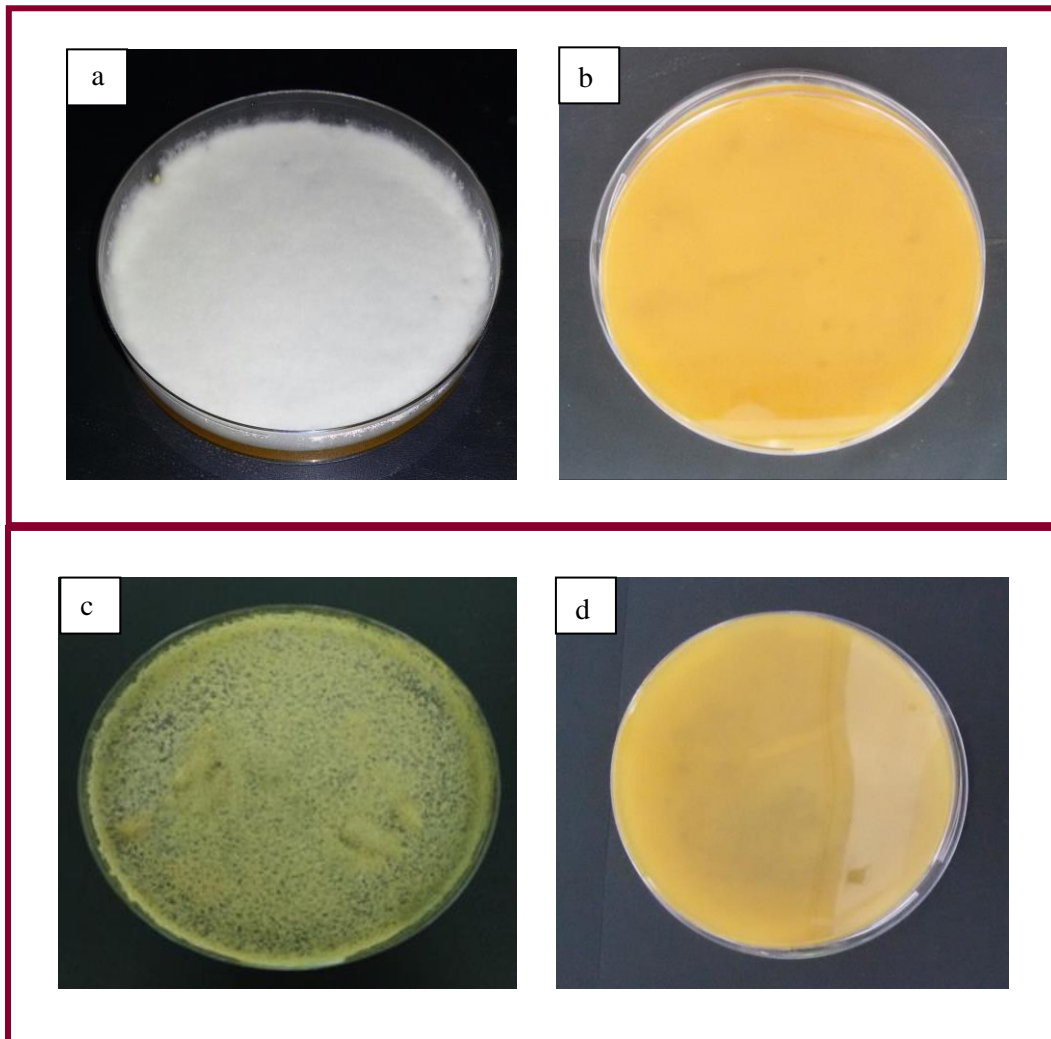


Figure 3 : *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur milieu PDA, après 3 jours (a :recto ;b :verso) et 6 jours (c :recto ;d :verso) d'incubation à 30°C.

1.2. Conservation de la souche

Les suspensions de spores sont ensuite conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990). Pour une conservation à -20°C, les spores sont récupérées par addition de 10 ml d'eau tweenée avec le glycérol à 20% (agent cryoprotecteur) (Annexe 2). Ces suspensions de spores sont ensuite stockées au congélateur (-20°C), afin de garder leur viabilité et de limiter les possibilités de variation, jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990).

2. La production des enzymes par fermentation sur milieu solide

2.1. Matière première

Dans cette étude, les déchets de tomate et d'orange sont les matières premières principalement utilisée comme substrat de fermentation. Les déchets de tomates industrielles composés de graines et de pulpe adhérente à la peau sont gracieusement fournis par le groupe d'Amor Ben Amor (Wilaya d'Annaba), compagne de l'été 2018. Les déchets d'orange constitués de pulpe adhérente à la peau sont obtenus de l'unité de production Ramdane Djamel SIJICO (Wilaya de Skikda), compagne de l'hiver 2019.

Les substrats récupérés à l'état humide sont rincés à l'eau de robinet pour éliminer les impuretés, essorer puis sécher à l'air libre. Les substrats ainsi obtenus sont conservés dans des boîtes hermétiquement fermés, et sont stockées à température ambiante.

2.1. Conduite de la fermentation solide :

La production des enzymes recherchées est réalisée dans des erlens-meyers de 250 ml à raison de 10 grammes de substrats par erlens, imbibés par l'une des solutions humidifiantes, eau distillée ou eau physiologique tweenée selon le cas (Annexe 3) (le taux d'humidification est de 70%). Les milieux humidifiés sont homogénéisés à l'aide d'une tige en verre puis les erlens-meyers sont bouchés avec du coton cardé, recouverts avec du papier aluminium et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Les erlens-meyers vont servir pour l'étude de l'effet du substrat et de l'agent humidifiant sur la production des enzymes, dont le but est de comparer les activités enzymatiques produites par la souche dans les différentes conditions (substrat et agent humidifiant). Après refroidissement, l'inoculation des erlens meyers préparés précédemment est effectuée avec une suspension de spores à raison de $2 \cdot 10^9$ spores par gramme de substrat. Le contenu de chaque erlen meyer doit être bien mélangé à l'aide d'une tige en verre stérile. Les erlens meyers ensemencés sont ensuite incubés à 30°C pendant 4 jours. Toutes les expériences sont réalisées en duplicate.

3. Mesures et dosages effectués après fermentation

A la fin de la fermentation, une quantité connue (5g) de substrat fermenté est mélangée avec 200 ml d'eau distillée. Après broyage à l'aide d'un blinder ménager pendant 1 à 2 minutes, le mélange est centrifugé à 12000 rpm pendant 5 minutes, à 4°C. Le surnageant obtenue (représente l'extrait

enzymatique) est utilisée pour le dosage des activités enzymatiques (papier filtre, endoglucanase, alpha amylase et protéase).

Les expérimentations sont réalisées en triplicate. Le surnageant est conservé à 4 °C jusqu'à utilisation.

3.1. Dosage des activités cellulolytiques

- **Activité papier filtre (APF)** : est utilisée pour déterminer l'activité totale dans un complexe cellulolytique selon la méthode de Ghose (Ghose, 1987) dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés (lors de l'hydrolyse d'un substrat cellulosique). Le mélange réactionnel est constitué d'une solution d'enzyme (0.5 ml), d'1 ml de tampon citrate (0.1M, pH 4.8) (Annexe 4) et de 50 mg de papier filtre Wattman N° 1 (des morceaux de 1 x 6 cm), incubés à 50°C pendant 60 minutes.
- **Activité endoglucanase**: (CMCase, endo 1.4-β-D-glucanase ; EC 3. 2. 1. 4) est mesurée dans un volume total de 1 ml d'un mélange réactionnel contenant 0.5 ml d'extrait enzymatique dilué dans du tampon citrate (0.1 M, pH 4.8) et 0.5 ml d'une solution de CMC (carboxymethylcellulose) à 1 % (W/V) préparé dans le même tampon. Ce mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 30 minutes.

La quantité des sucres réducteurs libérés lors de l'hydrolyse du papier filtre et du carboxymethylcellulose est mesurés selon la méthode de Miller (Miller, 1959) par une réaction colorimétrique due à la présence du réactif : acide dinitrosalicylique (DNS) (Annexe 5).

*L'absorbance de la coloration développée est lue à 540 nm, l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant le glucose comme standard avec une concentration de la solution mère de 0.0167Moles/litre (figure 4). L'activité enzymatique est calculée en **Unité par gramme de matière sèche (U/gds)**.

Une unité de l'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent glucose (lorsque le glucose est utilisé comme étalon sucre réducteur) par minute et par millilitre, à 50°C, pH 4,8. S'il y a une forte couleur rouge brique donc il y a une bonne production des sucres libérés (glucose). Le blanc est préparé de la même façon, sans l'addition de substrat. Chaque dosage est effectué en triplicate.

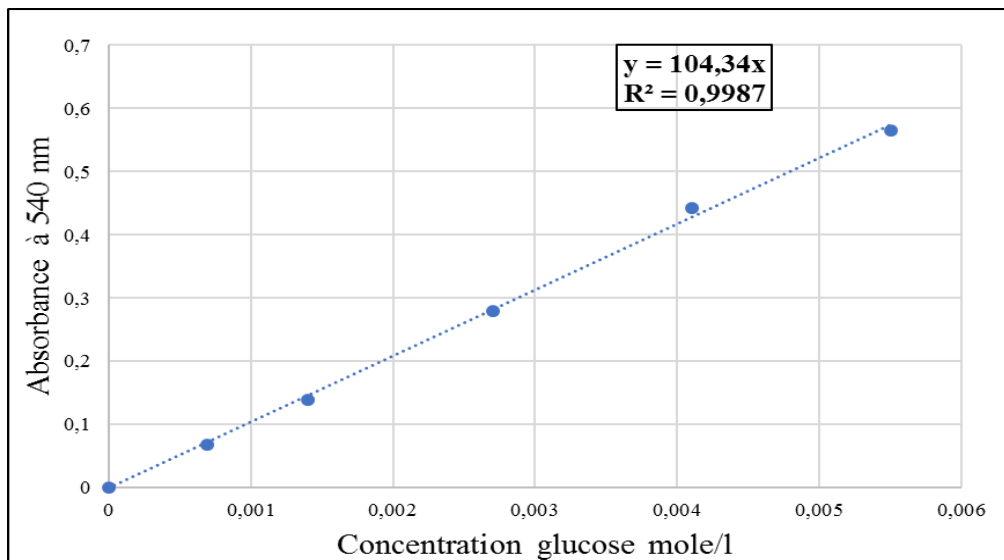


Figure 4 : Courbe étalon de glucose pour la mesure des activités papier filtre et endoglucanase.

3.2. Mesure de l'activité α -amylasique

L'activité α -amylasique est mesurée selon la Méthode de Bernfeld, (1955). Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du pouvoir réducteur du maltose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon. Le dosage des sucres réducteurs est déterminé par une réaction colorimétrique due à la présence de l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS). A 0,5 ml de l'extrait enzymatique dilué dans le tampon phosphate (0.1M, pH6.5) (Annexe 6), sont ajoutés 0,5 ml de substrat (solution d'amidon à 1% préparée dans le même tampon). Le mélange réactionnel est incubé à 40 °C pendant 30 min. La réaction est arrêtée par addition de 1 ml du réactif DNS, suivie d'un chauffage à 100 °C pendant 5 min. Après refroidissement, l'absorbance de la coloration développée est lue à 540 nm contre le blanc (préparé selon les mêmes étapes sans l'addition de substrat). La concentration des sucres réducteurs correspondant est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage (figure 5).

La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de sucre réducteur libéré par la réaction d'hydrolyse. L'activité enzymatique est exprimée en unité internationale correspondant à la quantité d'extrait enzymatique nécessaire pour produire 1 μ mole de sucre réducteur (équivalent au maltose) par minute à 40°C et à pH 5.

L'activité enzymatique calculée est ensuite transformée en **Unité par gramme de matière sèche (U/gds)**.

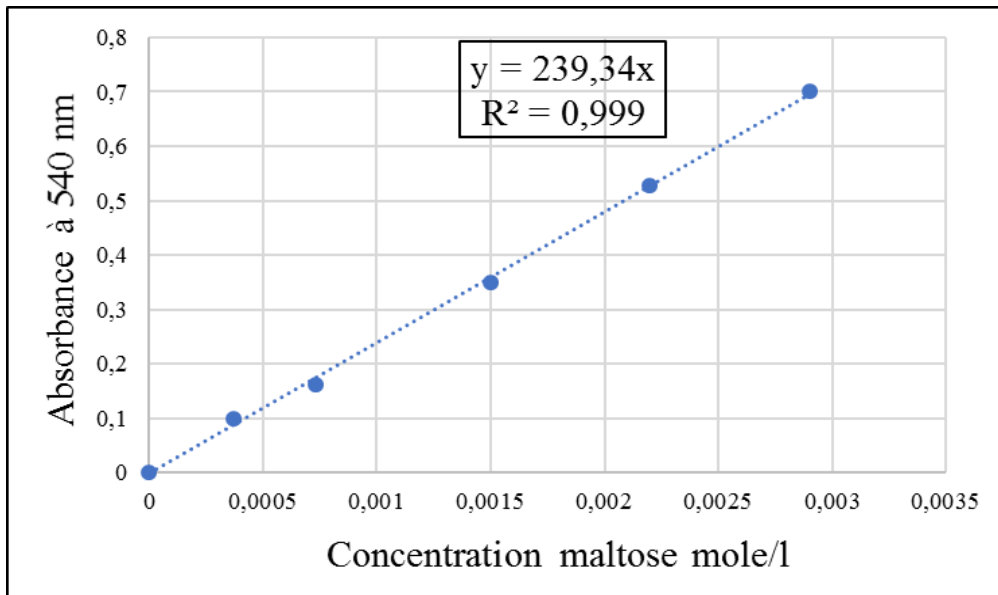


Figure 5 : Courbe étalon de maltose pour la mesure de l'activité α -amylasique.

3.3. Mesure de l'activité protéolytique

L'activité de la protéase dans l'extrait enzymatique brut obtenu est mesurée selon la méthode décrite par Lenoir et Auberger, (1977) et modifiée par Mechakra et *al.*, (1999).

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

• **Réaction enzymatique :** Le mélange réactionnel est préparé par addition de : 1 ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage, 1,5 ml du tampon citrate - phosphate (0,1M / 0,2 M), pH 6,8 (Annexe 7), 2,5 ml de substrat (solution de caséine à 2,5% dans le citrate de sodium à 0,02 M). Après agitation et incubation 1 heure au bain-marie à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid (4%). Le mélange est laissé reposer 30 min dans un bain de glace ou à 4°C (Beynon et Oliver, 2004 ; Wu et *al.*, 2006; Devi et *al.*, 2008), ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées (Sandhya et *al.*, 2005a). Il est ensuite filtré sur papier Whatman n° 1.

• **Protocole de dosage :** Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'Anson, (1938). 0,5 ml du filtrat sont mélangés avec 2,5 ml de Na_2CO_3 à 2% dans le NaOH (0,1N). Après agitation et incubation 15 min à température ambiante, 0,25 ml de réactif de *Folin-Ciocalteu* dilué au 1/4^{ème} sont ajoutés. Les mélanges sont bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant au moins 30 minutes (Sumantha et *al.*, 2005 ;

Paranthaman et *al.*, 2009). L'absorbance de la coloration bleue développée est lue à 750 nm. L'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 100 µg/ml (figure 6). Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1 µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme. Cette enzymatique est par la suite convertie en **Unité par gramme de matière sèche (U/gds)**.

Le blanc est préparé de la même manière, sauf que le TCA est rajouté avant le substrat. Chaque dosage est effectué en triple.

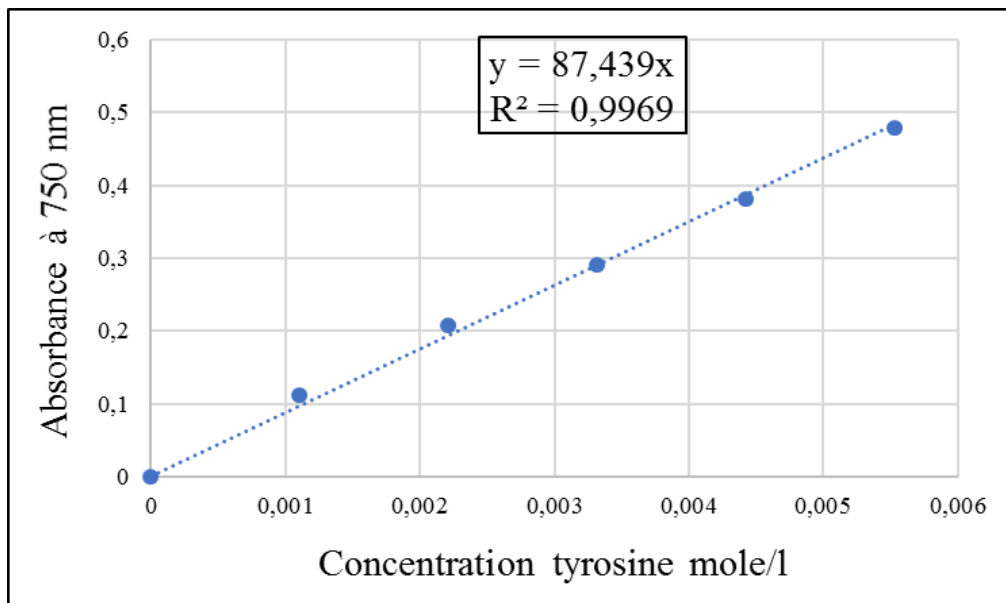


Figure 6 : Courbe étalon de tyrosine pour le dosage de l'activité protéase.

3.4. Dosage des protéines totales

La méthode utilisée est celle de Lowry (1951), dont la principale réaction est la réduction de la tyrosine et le tryptophane entrant dans la composition de la protéine à doser.

A1 ml de l'échantillon est ajouté 1ml de la solution M (annexe 8), après 15 minutes de repos 3 ml du réactif de Folin dilué au 1/10^{ème} sont ajoutés, suivie d'une agitation puis une incubation de 45 minutes à température ambiante et à l'obscurité, la lecture de l'intensité de la couleur bleue développée est mesurée à 750 nm. La concentration en protéines dans les extraits de fermentation obtenus, est mesurée à partir de la courbe d'étalonnage d'une solution de BSA (µg/ml) (figure7).

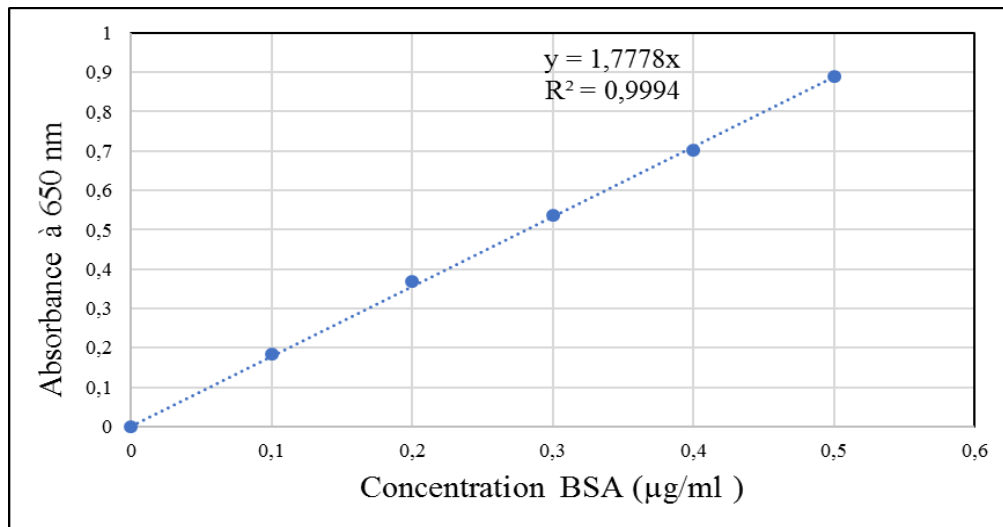


Figure 7 : Courbe étalon de BSA pour le dosage des protéines totales.

3.5. Mesure de l'humidité

L'humidité est un paramètre qui nous renseigne sur le développement du champignon au cours de la culture. En effet, au cours de sa croissance, le champignon produit six molécules d'eau pour une molécule de glucose consommée (Restino, 2012). De plus, la mesure du taux d'humidité permet de déterminer la matière sèche, nécessaire pour le calcul de la production des enzymes. L'humidité est déterminée par la méthode de la mesure du poids sec. 5 g de substrat fermenté de chaque prélèvement est séché par incubation dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant (Audigie *et al.*, 1984). L'humidité correspond au pourcentage que représente la masse d'eau obtenue par calcul après dessiccation par rapport à la masse initiale. D'une part, la matière totale et la matière sèche sont déterminées afin de calculer la production des enzymes. La matière sèche permet également d'avoir des indications concernant la consommation du substrat. D'autre part, l'humidité est un paramètre permettant l'amélioration de la croissance du champignon et/ou de la production de la molécule recherchée.

4. Analyse statistique

Le traitement statistique des résultats obtenus est effectué par le logiciel Minitab 18. mpj.

L'analyse de la variance (ANOVA) est utilisée pour la détermination de :

- Effet de la nature du substrat sur la production des enzymes recherchées par *Trichoderma longibrachiatum*.
- Effet de l'agent utilisé pour l'humidification des substrats de fermentation sur la production des enzymes voulues, par *Trichoderma longibrachiatum*.

Chapitre 2 :
Résultats et discussion

Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus portant sur l'étude de la production des enzymes appartenant à la classe des hydrolases, à savoir : cellulase, alpha-amylase et protéase de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* cultivée par fermentation sur milieu solide.

1. Effet du substrat et de l'agent humidifiant sur la production des hydrolases

Deux déchets de l'industrie agroalimentaire, déchets de tomate et déchets d'orange et deux solutions d'agent humidifiant (eau distillée et eau physiologique tweenée) sont testées pour comparer les activités enzymatiques mesurées (cellulase mesurée par ces deux activités papier filtre et endoglucanase, alpha-amylase et protéase). Ce qui nous permettra, par la suite, d'opter sur le substrat et l'agent humidifiant le plus efficace pour la production des enzymes souhaitées.

Les résultats des activités enzymatiques évaluées sont représentés sous forme de graphiques dans les figures 8, 9, 10 et 11.

1.1. Activité cellulase

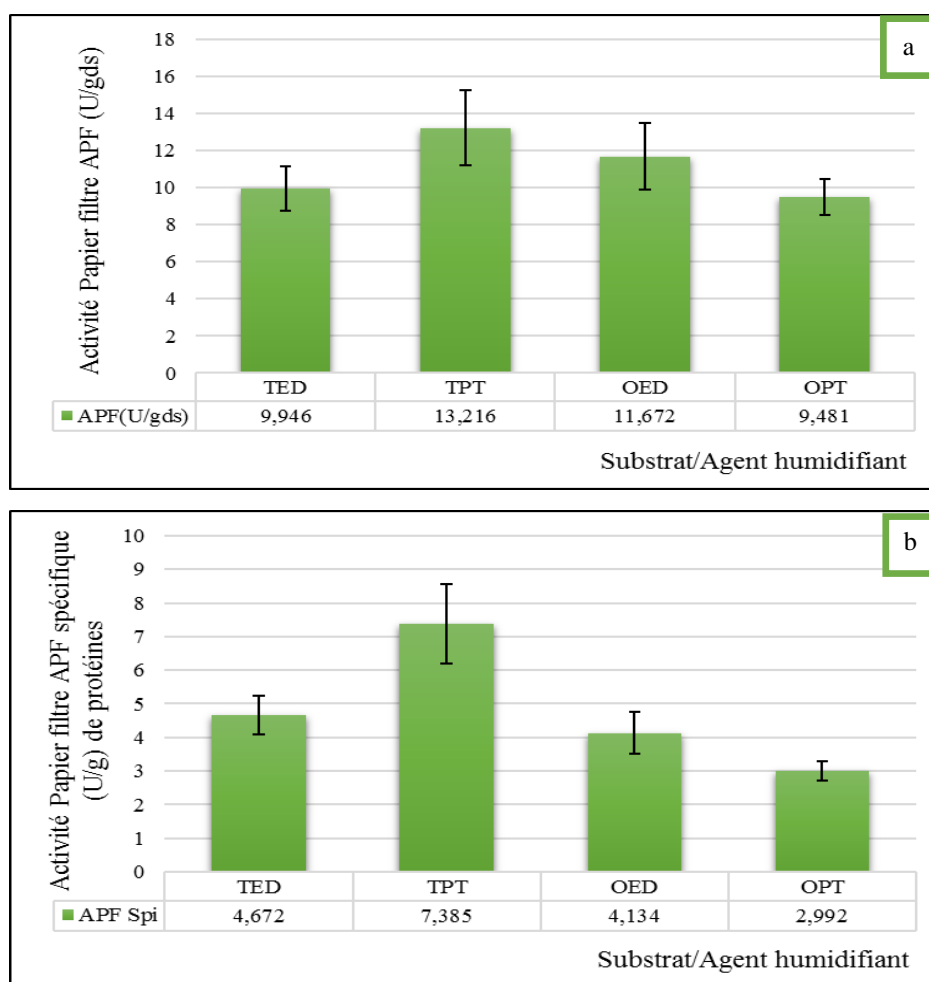


Figure 8 : Effet du substrat et de l'agent humidifiant sur la production de l'activité papier filtre (APF) (a) ; et son activité spécifique (b) ; après 4 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts- types.

TED : tomate/eau distillée.

TPT : tomate/eau physiologique tweené.

OED : orange/eau distillée.

OPT : orange/eau physiologique tweené.

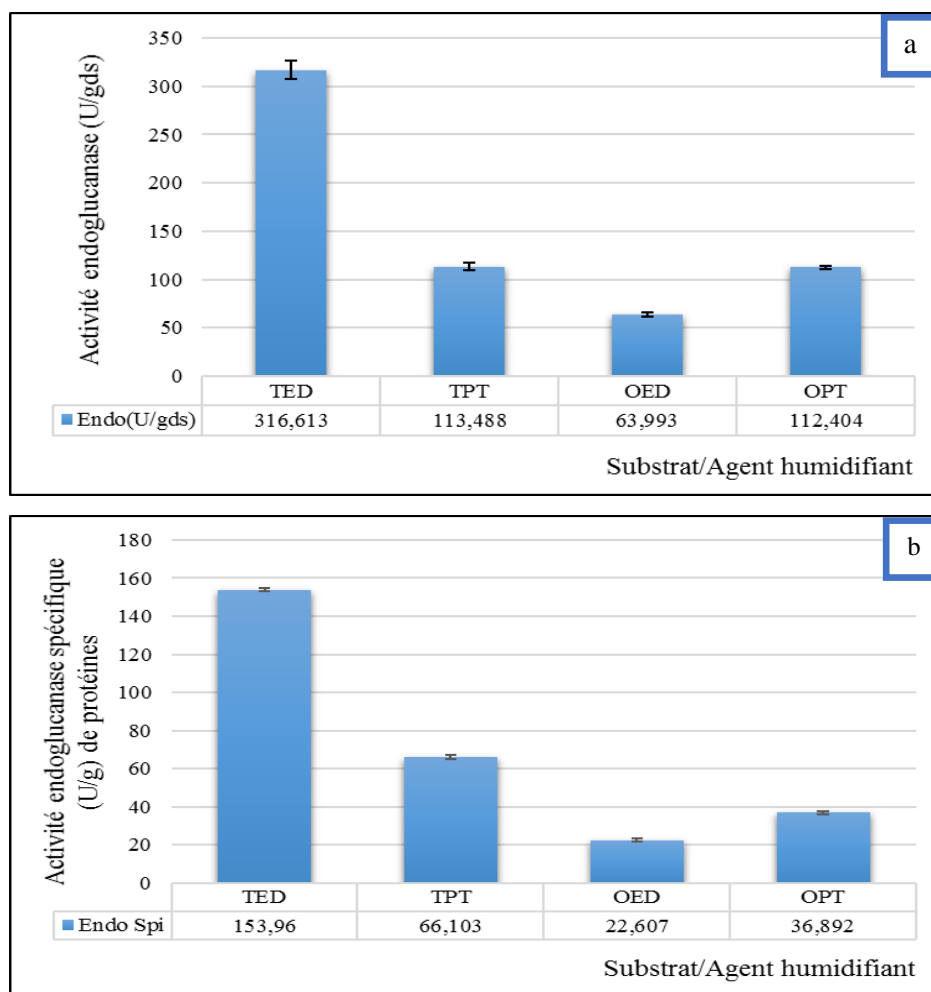


Figure 9 : Effet du substrat et de l’agent humidifiant sur la production de l’activité endoglucanase (a) ; et son activité spécifique (b) ; après 4 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ±écarts- types.

TED : tomate/eau distillée.
 TPT : tomate/eau physiologique tweené.
 OED : orange/eau distillée.
 OPT : orange/eau physiologique tweené.

Les résultats présentés dans les figures 8 et 9 montrent que la production de la cellulase est nettement influencée par la nature du substrat et l’agent humidifiant. Le meilleur substrat pour la production des deux activités APF et endoglucanase est le déchet de tomate, où les activités sont mesurées à **13.216 U/gds** pour l’APF et **316,613 U/gds** pour l’endoglucanase.

Les déchets de tomate humidifiés avec l’eau physiologique tweenée ont donné une meilleure activité APF **13,216 U/gds** par rapport à ceux humidifiés avec l’eau distillée **9.946 U/gds**. Par contre, l’activité APF obtenue par culture de la moisissure sur les déchets d’orange humidifiés avec l’eau distillée **11.672U/gds** est plus élevée que l’activité obtenue sur ceux humidifiés avec l’eau physiologique tweenée **9.481U/gds**.

De l’autre côté, les déchets de tomate humidifiés avec l’eau distillée ont donné une meilleure activité endoglucanase **316,613 U/gds**, presque trois fois plus que celle mesurée sur le même

substrat mais humidifié avec l'eau physiologique tweenée **113,488 U/gds**. Pour les déchets d'orange, la même enzyme est mesurée à **112,404 U/gds**, dont l'humidification est assurée avec l'eau physiologique tweenée et **63,993 U/gds** pour l'humidification à l'eau distillée.

Dans cet extrait enzymatique brut ; on a pu mesurer 7.385 U/g de protéines d'activité globale APF spécifique et 154 U/g de protéines d'activité endoglucanase spécifique.

Par comparaison à la littérature, un maximum d'activité papier filtre (140U/g) est produit par *Trichoderma reesei* NRRL 11460 après 96 heures de culture sur son de blé traité (Singnania *et al.*, 2006), cette valeur est largement supérieure à celle obtenu par notre souche *Trichoderma longibrachiatum* ; par contre l'activité endoglucanase obtenue dans ce travail dépasse largement celle (131.5U/g) produite par *Trichoderma reesei* NCIM 992 après 6 jours de culture sur son de blé (Maurya *et al.*, 2012).

Donc On peut dire que, l'activité des enzymes cellulolytiques dépend de l'origine de la souche elle-même, ainsi que la composition des milieux de culture.

Selon Arnaud et Guiraud (1999), la production des métabolites est régulée par le produit d'hydrolyse. De ce fait, les cellulases de faibles valeurs sont obtenues suite à des phénomènes d'inhibition exercés par les produits d'hydrolyse de cellulose (glucose et cellobiose). D'après Roussos, (1987) le glucose inhibe principalement la synthèse des β - glucosidases et celles des endocellulases, la cellobiose à son tour, inhibe les exoglucanases. Ce qui explique les faibles valeurs obtenues pour l'activité endoglucanase.

En revanche, l'humidification des substrats de fermentation en FMS à l'eau distillée donnant de bon rendements en enzymes, semble une alternative intéressante et économique car le cout de la préparation des milieux de culture constitue un facteur limitant la production à échelle industriel.

1.2. Activité alpha-amylase

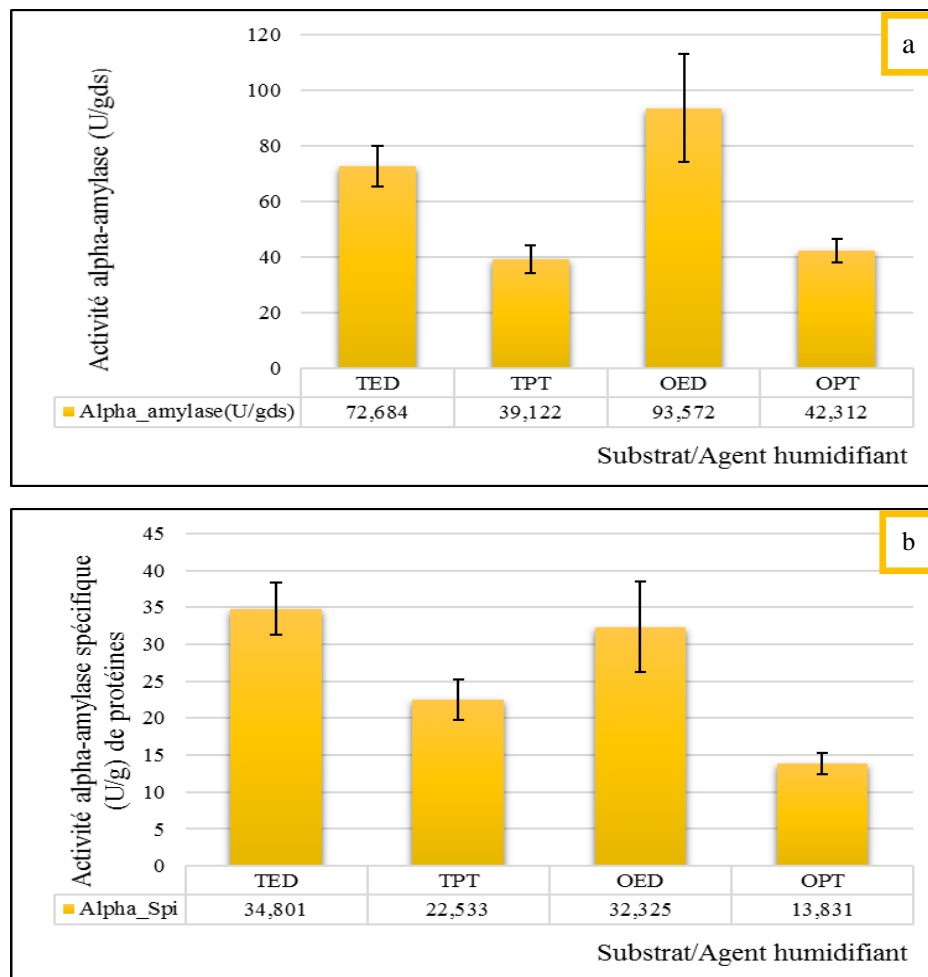


Figure 10 : Effet du substrat et de l'agent humidifiant sur la production de l'activité alpha-amylase (a) ; et son activité spécifique (b) ; après 4 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts- types.

TED : tomate/eau distillée.

TPT : tomate/eau physiologique tweené.

OED : orange/eau distillée.

OPT : orange/eau physiologique tweené.

La figure 10 montre que la production maximale de l'alpha amylase est évaluée à **93,572 U/gds** où le substrat de fermentation est les déchets d'orange. Sur le plan qualitatif la pulpe des déchets d'orange est riche en calcium 1.2 %, qui favorise l'activité de l'enzyme par le maintien de la conformation spatiale de celle-ci (Dakhmouche et *al.*, 2005).

La plus faible activité correspond aux essais où l'humidification est effectuée avec l'eau physiologique tweenée pour les deux substrats ; elle est de **39,122U/gds** pour les déchets de tomate et de **42,312 U/gds** pour les déchets d'orange. Par contre, l'activité la plus importante est enregistrée dans les essais où l'humidification est effectuée avec l'eau distillée ; **72,684U/gds** pour les déchets de tomate, et **93,572U/gds** pour les déchets d'orange.

L'activité alpha-amylase spécifique mesuré dans notre extrait enzymatique est de 34.801 U/g de protéines.

Le tween 80, bien qu'il se combine avec les lipoprotéines membranaires pour rendre la membrane cellulaire perméable, il n'a présenté aucun effet significatif sur la production de l'enzyme. Ceci est dû probablement au fait que l' α -amylase est facilement excrétée dans le milieu extérieur (Scriban, 1999), passage facilité par son faible poids moléculaire 64000 daltons (Lucio de Souza *et al.*, 1996).

La présence du chlorure de sodium (NaCl) dans l'agent humidifiant n'a aucun effet significatif sur la production de l'enzyme, bien que le rôle des sels sur la croissance et la production de métabolites est connu capital : effet tampon, équilibre ionique, constitution de certains enzymes (Belloc *et al.*, 1975 ; Scriban, 1993), ceci peut être expliqué par le fait que les déchets d'orange renferment une quantité suffisante en sels pour couvrir les besoins de la souche (Sauvant, 1984 ; Mahmood, 1998 ; Naouel et Combellas, 1999). Aussi, pour les déchets de tomate qui sont riches en sels minéraux, ce qui est décrits par Jafari *et al.*, (2006) et Del Valle *et al.*, (2006) qui indiquent une teneur en sels de 4,24% et 3,92%, respectivement.

De ces résultats, on peut dire que la présence combinée du tween 80 et du NaCl dans l'agent humidifiant, ne convient pas pour une bonne activité alpha-amylase, peut-être l'utilisation de solution humidifiante à NaCl seul ou tween 80 seul, donnerai de meilleurs résultats.

1.3. Activité protéase

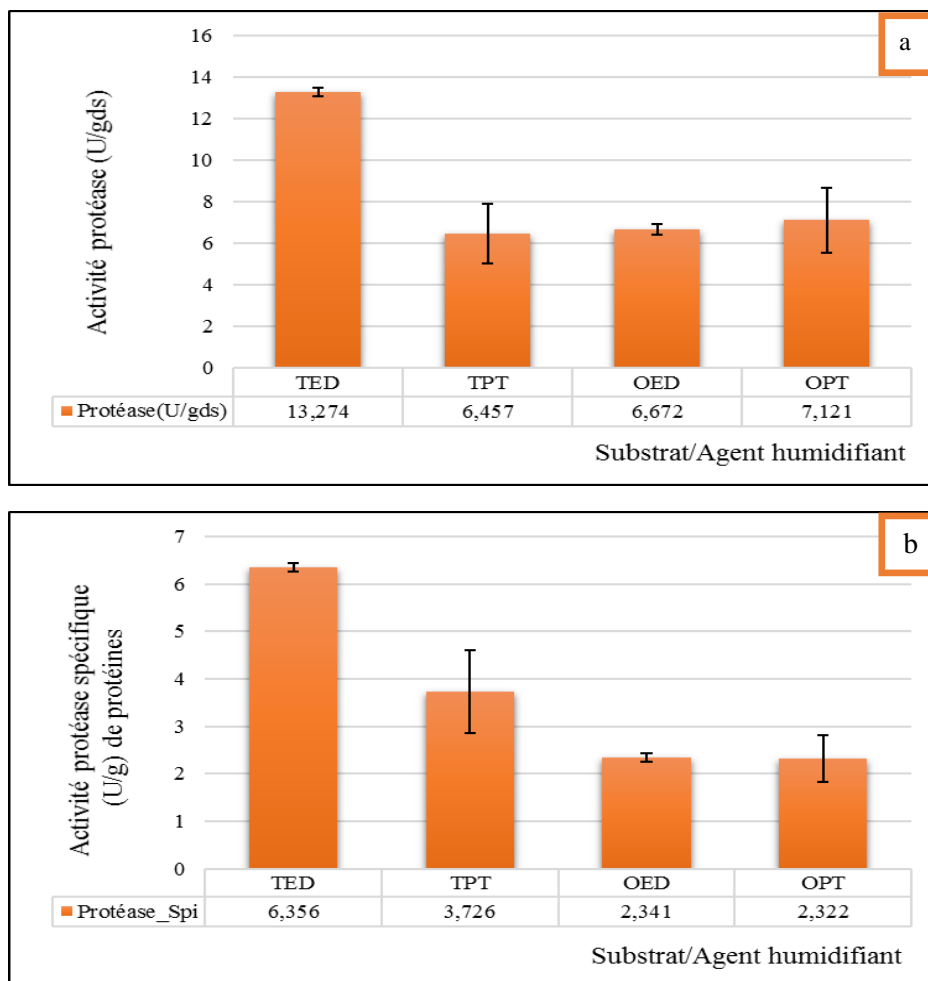


Figure 11 : Effet du substrat et agent humidifiant sur la production de l'activité protéase (a) ; et son activité spécifique (b) ; après 4 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types.

TED : tomate/eau distillée.
 TPT : tomate/eau physiologique tweené.
 OED : orange/eau distillée.
 OPT : orange/eau physiologique tweené.

La figure 11 représente les résultats trouvés pour l'activité protéase produite à partir des deux milieux de fermentation, l'activité protéase maximale de **13,274 U/gds** est trouvée sur les déchets de tomate humidifiés avec l'eau distillée.

Une nette différence existe entre celle-ci et les trois autres activités mesurées : **6,457 U/gds** pour les déchets de tomate humidifiés avec l'eau physiologique tweenée, **6,672 U/gds** pour les déchets d'orange humidifiés avec l'eau distillée et **7,121 U/gds** pour les déchets d'orange humidifiés avec l'eau physiologique tweenée.

L'activité protéase spécifique dans cet extrait enzymatique est évaluée à 6.356U/g de protéines.

D'après Knoblich et *al.*, (2005), les déchets de tomate sont équivalents à la farine de soja comme source de protéine. Christakopoulos et *al.*, (1998) montrent que la teneur en protéines des déchets de tomate est de 13.5 %, de leurs par Kaur et *al.*, (2008) ont marqué une autre valeur proche 14.3%.

On peut conclure que les déchets de tomate sont donc favorables à l'induction de la production des protéases. Par contre l'orange contient peu de protéines, c'est pourquoi elle est classée comme fruit peu énergétique avec en moyenne 45 calories pour 100 g (Beton et Brochard, 1993).

D'un autre coté la quantité en sels minéraux que renferment les écorces d'orange est de 3.46%, valeur indiquée par Dakhmouche et *al.*, 2005. Cette teneur montre que les déchets d'orange sont des sous-produits agricoles très riches en minéraux comparativement à d'autres déchets ; peut-être les sels présents dans les déchets d'orange sont largement suffisants donc on n'aura pas besoin d'humidifier avec un agent qui va apporter encore plus de sels ce qui explique les résultats obtenus.

La présence de NaCl un taux de 1g/l révèle un effet significatif positive sur la production de la protéase alcaline ; les études de Wang et *al.*, (2005a) qui démontrent qu'elle est la concentration optimale pour l'amélioration de la production de la protéase par *Aspergillus oryzae*. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres microorganismes tel que *Aspergillus clavatus* ES1 qui produit une protéase alcaline en présence de 0,3 g/l de NaCl (Hajji et *al.*, 2007). Sumantha et *al.* (2008) et Paranthaman et *al.*, (2009) décrivent l'utilisation de 1 g/l de chlorure de sodium pour la production d'une protéase neutre, les premiers par *A. oryzae* NRRL 2217 sur un mélange de substrats solides, son de blé et déchets d'huile de noix de coco (3 : 1) et les derniers par *A. niger* MTCC 281 sur déchets de riz. Par contre, Sandhya et *al.*, (2005b) décrivent l'utilisation de 5 g/l de NaCl pour la production de la protéase neutre par *A. oryzae* NRRL 1808 sur son de blé (2% ; w/v). Les résultats ont montré que l'utilisation du NaCl (9g/l) a une influence significative mais négativement sur la production des protéases. En effet, la diminution de la production de protéase s'explique par un dépassement de la concentration optimale en NaCl nécessaire à la production des protéases.

On peut conclure que notre extrait enzymatique a donné beaucoup plus d'activité spécifique cellulolytique (APF et endoglucanase) par rapport aux autres activités alpha-amylase et protéase.

2. Analyse statistique

Le traitement statistique par comparaison des différentes activités enzymatiques mesurées sur les substrats solides testés, humidifiés par deux solutions différentes, est donné par des tables d'ANOVA. On se basant sur la valeur du statistique test de Fisher (F) et la probabilité mesurée (p) pour expliquer l'effet de chaque facteur sur la réponse étudiée (activité enzymatique). L'analyse de l'ANOVA qui montre un test de Fisher hautement significatif (avec $p=0$), indique que la réponse souhaité (dans notre cas les activités enzymatiques) est très influencée par le ou les facteurs testés.

2.1. Effet des facteurs testés (1 : la nature de substrat, 2 : l'agent humidifiant) sur la production de l'endoglucanase

Tableau 3 : Analyse de la variance pour l'effet de la nature du substrat (a : déchets de tomates, b : déchets d'orange) et de l'agent humidifiant sur la production de l'endoglucanase par *Trichoderma longibrachiatum*.

A : déchets de tomate

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	1	0.299568	0.299568	383.54	0.000
Erreur	10	0.007811	0.000781		
Total	11	0.307379			

DL : degré de liberté/ SomCar : Somme des carrés/ CM : Moyenne des carrés.

B : déchets d'orange

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	1	0.016060	0.016060	144.92	0.000
Erreur	10	0.001108	0.000111		
Total	11	0.017168			

DL : degré de liberté. SomCar : Somme des carrés. CM : Moyenne des carrés.

L'analyse de la variance (ANOVA) indique que les facteurs, nature du substrat (déchets de tomates) et agent humidifiant, exerce un effet significatif sur la production de l'activité endoglucanase. Les tests de Fisher (F=383.54 ; p=0.000), (F=144.92 ; p=0.000) obtenus sur déchets de tomate (A) et déchets d'orange (B), respectivement, indique que la production de l'endoglucanase est influencée par les deux facteurs substrat et agent humidifiant.

2.2. Effet des facteurs testés (1 : la nature de substrat, 2 : l'agent humidifiant) sur la production de l'APF

Tableau 4 : Analyse de la variance pour l'effet de la nature du substrat (a : déchets de tomates, b : déchets d'orange) et de l'agent humidifiant sur la production de l'APF par *Trichoderma longibrachiatum*.

A : déchets de tomate

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	1	0.012097	0.012097	31.75	0.000
Erreur	10	0.003810	0.000381		
Total	11	0.015907			

DL : degré de liberté. SomCar : Somme des carrés. CM : Moyenne des carrés.

B : déchets d'orange

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	1	0.016060	0.016060	26.68	0.000
Erreur	10	0.006019	0.000602		
Total	11	0.022079			

DL : degré de liberté. SomCar : Somme des carrés. CM : Moyenne des carrés.

L'analyse de la variance (ANOVA) indique que les facteurs, nature du substrat (déchets de tomates) et agent humidifiant, exerce un effet significatif sur la production de l'activité papier filtre (APF). Les tests de Fisher ($F=31.75$; $p=0.000$), ($F=26.68$; $p=0.000$) obtenus sur déchets de tomate (A) et déchets d'orange (B), respectivement, indique que la production de l'APF est influencée par les deux facteurs substrat et agent humidifiant.

2.3. Effet des facteurs testés (1 : la nature de substrat, 2 : l'agent humidifiant) sur la production de la protéase

Tableau 5 : Analyse de la variance pour l'effet de la nature du substrat (a : déchets de tomates, b : déchets d'orange) et de l'agent humidifiant sur la production de la protéase par *Trichoderma longibrachiatum*.

A : déchets de tomate

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	1	0.79722	0.797221	186.83	0.000
Erreur	10	0.04267	0.004267		
Total	11	0.83989			

DL : degré de liberté. SomCar : Somme des carrés. CM : Moyenne des carrés.

B : déchets d'orange

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	1	0.043200	0.043200	53.36	0.000
Erreur	10	0.008097	0.000810		
Total	11	0.051297			

DL : degré de liberté. SomCar : Somme des carrés. CM : Moyenne des carrés.

L'analyse de la variance (ANOVA) indique que les facteurs, nature du substrat (déchets de tomates) et agent humidifiant, exerce un effet significatif sur la production de l'activité protéase. Les tests de Fisher ($F=186.83$; $p=0.000$), ($F=53.36$; $p=0.000$) obtenus sur déchets de tomate (A) et déchets d'orange (B), respectivement, indique que la production de la protéase est influencée par les deux facteurs substrat et agent humidifiant.

2.4. Effet des facteurs testés (1 : la nature de substrat, 2 : l'agent humidifiant) sur la production de l'alpha-amylase

Tableau 6 : Analyse de la variance pour l'effet de la nature du substrat (a : déchets de tomates, b : déchets d'orange) et de l'agent humidifiant sur la production de la protéase par *Trichoderma longibrachiatum*.

A : déchets de tomate

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	1	0.041184	0.041184	41.77	0.000
Erreur	10	0.009861	0.000986		
Total	11	0.051045			

DL : degré de liberté. SomCar : Somme des carrés. CM : Moyenne des carrés.

B : déchets d'orange

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	1	0.18352	0.1835210	28.22	0.000
Erreur	10	0.06503	0.0065030		
Total	11	0.24855			

DL : degré de liberté. SomCar : Somme des carrés. CM : Moyenne des carrés.

L'analyse de la variance (ANOVA) indique que les facteurs, nature du substrat (déchets de tomates) et agent humidifiant, exerce un effet significatif sur la production de l'activité protéase. Les tests de Fisher ($F=41.77$; $p=0.000$), ($F=28.22$; $p=0.000$) obtenus sur déchets de tomate (A) et déchets d'orange (B), respectivement, indique que la production de l'alpha-amylase est influencée par les deux facteurs substrat et agent humidifiant.

Conclusion générale

Conclusion générale

La présente étude constitue une contribution à la production d'enzymes hydrolases à savoir : cellulase (APF et endoglucanase), alpha amylase et protéase par le champignon filamenteux microscopique *Trichoderma longibrachiatum* cultivée par fermentation sur milieu solide (SSF). En effet, de part ses propriétés physiologiques, enzymologiques et biochimiques, les moisissures sont le groupe des microorganismes le plus important utilisé dans les processus SSF. Pour cela, l'objectif visé dans ce travail est la valorisation des déchets de l'industrie agroalimentaire (filières tomate et orange transformées) par fermentation comme substrat à moindre coût telle que l'exige la production d'enzymes industrielles, afin de produire une substance à haute valeur ajoutée comme les hydrolases d'intérêts industriels. Ce procédé permet d'exploiter toute la matière organique de ces déchets agro-industriels disponibles en grande quantité et non utilisés pour cet effet.

Donc ces déchets sont choisis comme matière première en raison des grandes quantités produites annuellement et la nécessité pour les industries de transformation de trouver des alternatives pour leur élimination. D'autre part, ces déchets peuvent être séchés à l'air libre sans aucune consommation d'énergie. Ils présentent un substrat riche en matière organique complexe et minérale très économique, convenable pour la croissance et la production microbienne.

Notre travail porte sur la production des enzymes en utilisant la souche fongique *Trichoderma longibrachiatum*ensemencées dans deux milieux de culture solide différente humidifiés par deux agents : l'eau distillée et l'eau physiologique tweenée.

L'activité APF a donné un maximum de production (13.216 U/gds) où le substrat est les déchets de tomate humidifié avec l'eau physiologique tweenée. Alors qu'avec le même substrat l'activité endoglucanase (316.613 U/gds) et l'activité protéase (13.274 U/gds) ont données un maximum de production mais avec une humidification à l'eau distillée.

La souche utilisé *Trichoderma longibrachiatum* a pu donner aussi une production maximale en alpha-amylase où le substrat est déchets d'orange humidifié avec l'eau distillée (93.572 U/gds).

D'après ces résultats on peut considérez les déchets de tomate et les déchets d'oranges comme des déchets agroalimentaires d'importance industrielle, que l'on peut utiliser pour produire de la cellulase, protéase, alpha amylase, et même d'autres métabolites à intérêt industriel. La possibilité d'humidifier ces substrats avec l'eau distillée pour de bon rendement en enzymes, semble aussi une alternative intéressante pour l'industrie.

Perspectives

Ce travail peut être amélioré et étendu de différentes manières. Il serait souhaitable de :

- Exploiter chez cette souche d'autres enzymes et d'autres métabolites ;
- Faire la production avec d'autres déchets et d'autres agents humidifiant, afin de trouver un procédé économique d'intérêt industriel.
- Réaliser la production avec d'autres microorganismes (levures et bactéries), pour comparer les performances en enzymes produites.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- * **Arnaud A., Guiraud JP. (1999).** Le métabolisme microbien. In : Biotechnologie. Scriban R. 5ème Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp. 43-192.
- * **Aguilar C.N., Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán P.A., Rodríguez-Herrera R., Martínez-Hernandez J.L., Contreras-Esquivel J.C. (2008).** Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American J. Biochem. Biotechnol.*, **4**(4) ; 354-366.
- * **Alvarado A., Pacheco-Delahaye E., Hevia P. (2001).** Value of a tomato byproduct as a source of dietary fiber in rats. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **56** ; 335–348.
- * **Al-Wandawi H., Abdul-Rahman M., Al-Shaikhly K. (1985).** Tomato processing wastes as essential raw materials source. *J. Agric. Food. Chem.*, **33** ; 804–807.
- * **Anson M.L. (1938).** The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, **22** ; 79–89.
- * **Audigie C.L., Fagerella J., Zonszain F. (1984).** Manipulation d'analyse biochimique. P:270. Edition Tec et Doc, Lavoisier. Paris.
- * **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.
- * **Ballerini D. (2011).** *Les biocarburants. Répondre aux défis énergétiques et environnementaux des transports.* Paris (France) : Technip. 381 p. ISBN : 978- 2710809692.
- * **Bayer E.A., Kenig R., Lamed R. (1983).** Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J Bacteriol.* **156** : 818-827.
- * **Baysal T., Ersus S., Starmans D.A.J. (2000).** Supercritical CO₂ extraction of β -carotene and lycopene from tomato paste waste. *J. Agric. Food Chem.*, **48** ; 5507–5511.
- * **Beguín P., Aubert J.P. (1994).** The biological degradation cellulose. FEMS (Federation of European Microbiological Societies). *Microbiology Reviews.* **13** :25-58.
- * **Belloc A., Florent J., Mancy D. et Verrier J. (1975).** New amylase and preparation by fermentation of a *Penicillium*. U. S. Patent 3906 113.
- * **Bellon-Maurel V., Orliac O., & Christen P. (2003).** Sensors and Measurements In Solid-State Fermentation: A Review. *Process Biochem.*, **38**, 881-896.
- * **Benakmoum A., Abbeddou S., Ammouche A., Kefalas P., Gerasopoulos D. (2008).** Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste. *Food Chem.*, **110** ; 684–690.
- * **Bergmeyer H.U., Gawekn K., et al. (1979).** Principes de l'analyse enzymatique. Tech. Et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 17.
- * **Bernfeld P. (1955).** Amylase. In. Clowck S. P and Kaplan N.O.(Ed) : Methods in enzymology. Volume 1. Academic press. New York, pp.149-157.
- * **Beton J. C., Brochard G. (1993).** Paris : L'aventure de l'orange. 19-45.
- * **Beynon R.J., Oliver S. (2004).** Avoidence of proteolysis in extracts. *Methods Mol. Biol.*, **596** ; 81–93.
- * **Bhalla T.C. et Chatanta D.K. (2000).** Application of enzymes in food processing biotechnological applications. Asitech publishers Inc. 121-141.

- ***Bhat M.K. (2000).** Cellulases and related enzymes in Biotechnology. *Biotechnol Adv.* 18 : 355-383.
- ***Bicanic D., Dimitrovski D., Luterotti S., Marković K., van Twisk C., Buijnsters J.G., Dóka O. (2010).** Correlation of trans-lycopene measurements by the HPLC method with the optothermal and photoacoustic signals and the color readings of fresh tomato homogenates. *Food Biophys.*, 5 ; 24–33.
- ***Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P : 34-428.
- ***Brodowski D., Geisman J.R. (1980).** Protein content and amino acid composition of protein of seeds from tomatoes at various stage of ripness. *J. Food Sci.* 45 ; 228–229, 235.
- ***Brzozowski A.M., Davies G. J. (1997).** Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* 36, 10837-10845.
- biotechnological applications. Asitech publishers Inc. 121-141.
- * **Cuveillier G.F. (1999).** Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. In Scriban R. (Ed) :Biotechnologie. Ed. Lavoisier. 401-425.
- ***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.
- ***Chesson A. (1987).** Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In : Hresign W, Cole DJA, editors. Recent Advances in Animal Nutrition. London, Butterworths, p. 71-89.
- ***Christakopoulos P., Tzalas B., Mamma D., Stamatis H., Liadakis G.N., Tzia C., Kekos D., Kolisis F.N., Macris B.J. (1998).** Production of an esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing transesterification reactions in organic solvents. *Proc. Biochem.*, 33 : 729–733.
- ***Crotti LB., Jabor Va., Chellegatti Ma., Fonseca M.j et Said S. (1999).** Studies of pectic enzymes produced by *Talaromyces flavus* in submerged and solid substratr cultures. *J Basic Microbial* 039 (4) : 227-235.
- ***Dalev P. G. (1994).** Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresour. Technol.*, 48 ; 265–267.
- ***Dauter Z., Dauter M., Brzozowski A.M., Christensen S. Borchert T.V., Beier .L., Wilson K.S., Davies G.J.(1999).** X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alphaamylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution. *Biochem.* (38) : 8385-8392
- ***Del Valle M., Cámara M., Torija M.E. (2006).** Chemical characterization of tomato pomace. *J. Sci. Food Agric.*, 86 ; 1232–1236.
- ***Denek N., Can A. (2006).** Feeding value of wet tomato pomace ensiled with wheat straw and wheat grain for Awassi sheep. *Small Ruminant Res.*, 65 ; 260–265.

- ***Devi M.K., Banu A.R., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V., Palaniswamy M.(2008).** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.*, **1**(7) ; 1–6.
- ***Djekrif D. S., Gheribi .A.Z., Merihi E ., Bennamoun L. (2005).** Application of a statistical design to the optimization of culture medium for a-amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.* (73) :190-197.
- ***Drouin M. (2005).** Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de *Maître ès sciences* (M.Sc.). Canada.
- ***Eller F.J., Moser J.K., Kenar J.A., Taylor S.L. (2010).** Extraction and analysis of tomato seed oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **87** ; 755–762.
- ***FAO. (2008).** World crop production statistics. Food and Agricultural Organization of United Nations Statistical Database Online Services.
- ***Ferrero M.A. (2000).** Proteinhydrolysis : Isolation and characterization of microbialproteases. *Food Microbiol. Protocols.*, 14 : 227-232.
- ***Fogarty W.M. et Kelly C.T. (1990).** Recent advances in microbial amylases m. Microbial enzymes and biotechnology. Fogarty W. M. et Kelly C. T 2nd edition Elsevier Applid science, London. 71-133.
- ***Frederic M. C. (2014)** *Ni cru ni cuit.* Histoire et civilisation de l'aliment fermenté, Alma Editeur, 360 p.
- ***Freixo M.R., Karmali A., Arteiro J.M. (2008a).** Production of polygalacturonase from *Corioliolus versicolor* grown on tomato pomace and its chromatographic behavior on immobilized metal chelates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35** ; 475–484.
- ***Freixo M.R., Karmali A., Arteiro J.M. (2008b).** Production and chromatographic behavior of polygacturonase from *Pleurotus ostreatus* on immobilized metal chelates. *Proc. Biochem.*, **43** ; 531–9.
- ***Freixo M.R., Karmali A., Frazão C., Arteiro J.M. (2008c).** Production of laccase and xylanase from *Corioliolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. *Proc. Biochem.*, **43** ; 1265–1274.
- ***Gao J., Weng H., Zhou D., Yuan M., Guan F., Xi Y. (2008).** Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solide state cultivation of corn stover. *Bioressour Technol.* 99 : 7623-7629.
- ***García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L.A. (2009).** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.*, **112** ; 604–608.
- ***Ghose T.K. (1987).** Mesure des activités de la cellulase. *Pure Appl Chem*, **59** , 257-268
- ***Giannelos P.N., Sxizas S., Lois E., Zannikos F., Anastopoulos G. (2005).** Physical, chemical and fuel related properties of tomato seed oil for evaluating its direct use in diesel engines. *Ind. Crops Prod.*, **22** ; 193–199.
- ***Giove R.M., Abis S. (2007).** Place de la Méditerranée dans la production mondiale de fruits et légumes. *Les notes d'analyse du CIHEAM*, N°23.

- ***Guil-Guerrero J.L., Reboloso-Fuentes M.M. (2009).** Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. *J. Food Composition Anal.*, **22** ; 123–129.
- ***Guiraud J. P., (1998).** Microbiologie alimentaire. Donod. Paris. P : 7-330.
- ***Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Markov A.V., Skomarovsky A.A., Sinitsyna O.A., Berlin A.G., Ankudimova N.V. (2000).** Indigo-binding domain in cellulase molecule. *Biocatalysis fundamentals and applications*. 11 (6) : 77-80.
- ***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.
- ***Holker U., Hofer M., Lenz J. (2004),** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 64, n°2, p. 175-186.
- ***Ichida J.M., Krizova L., Lefebvre C.A., Keener H.M., Elwell D.L., Burt Jr E.H., (2001).** Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. Microbiol. Methods.*, **47** ; 199–208.
- ***Igarashi k., Hatada Y., Hagihara H., Saeki K., Takaiwa M., Uemura T., Ara K., Ozaki K., Kawai S., Kobayashi T. et Ito S. (1998).** Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkalophilic isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(9) : 3282-3289.
- ***Jafari M., Pirmohammadi R., Bampidis V., (2006).** The use of dried tomato pulp in diets of laying hens. *Int. J. Poult. Sci.*, **5** ; 618–622.
- ***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.
- * **Kobayashi, M., Kurusu, Y. and Yukawa, H. (1991).** High-expression of a target gene and high-stability of the plasmid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **27** :145-162.
- ***Kalisz H.M. (1988).** Microbial proteinases. *Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnol.*, **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. **Altan.**
- ***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. **Altan**
- ***Kaur D., Wani A.A., Oberoi D.P.S., Sogi D.S. (2008).** Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology. *Food Chem.*, **108** ; 711–718.
- ***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.

- ***Knoblich M., Anderson B., Latshaw D. (2005).** Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids. *J. Sci. Food Agric.*, **85** ; 1166–1170.
- ***Krishna C. (2005).** Solid-State Fermentation System-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, , vol. 25, n°1-2, p. 1-30.
- ***Kudrya V.A., Simonenko I. A. (1994).** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41** ; 505–509.
- ***Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R., Bhalla T.C. (2008b).** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.*, **3**(12) ; 661–672.
- ***Laxman R.S., Sonawane A.P., More S.V., Rao B.S., Rele M.V., Jogdand V.V., Deshpande V.V., Rao M.B., (2005).** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Proc. Biochem.*, **40** : 3152-3158.
- ***Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O. (2001).** Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc. Eng.*, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.
- ***Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O. (2001).** Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc. Eng.*, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.
- ***Lekchiri S., Moueqqit M., Lekchiri A. (2006).** Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.
- ***Lenoir J., Auberger B. (1977).** Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*, II- Caractérisation d'une protéase neutre. *Le lait*, **57** ; 471-489.
- ***Lester M., Morrison M.D. (1946).** The control of diarrhea by tomato pomace. *American J. Digestive Diseases*, **13**(6) ; 196-198.
- ***Lopes F.N. (2008).** Valorisation des ressources renouvelables : de la production d'éthanol au développement de nouveaux bioproduits. *Journal de la Société de Biologie*, vol. 202, n°3, p. 191-199.
- ***Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**(1) ; 265–275.
- ***Lucio de Souza E., Erika M.E.H., Castilho V.M., Delima A., Bellini M.Z., Cruz D., et Cruz Z.R. (1996)** : Production and characterization of α -amylase from *Rhizopus sp.* *Arq. Biol. Technol.*, **39**(4) : 831-839.
- * **Maurya D.P., Single D., Pratap D., Maurya I JP. (2012).** Optimization of solide state fermentation conditions for the production of cellulose by *Trichoderma reesei* . *J. Ewiron . Biol* . **33** P :5-8.
- ***Mahmood A. U., Greenman, J. et Scragg A. I. I. (1998).** Orange and potato peel extrats : analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**(2), 130–137.

- ***Mansoori B., Modirsanei M., Radfar M., Kiaei M.M., Farkhoy M., Honar zad J. (2008).** Digestibility and metabolisable energy values of dried tomato pomace for laying and meat type cockerels. *Animal Feed Sci. Technol.*, **141** ; 384–390.
- ***Mechakra A., Auburger B., Remeuf F., Lenoir J. (1999).** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*, **19** ; 663–675.
- ***Michelen V.V., Castillo E.J. (1984).** Production of amylase by *Aspergillus foetidus* on rice flour medium and characterization of enzyme. *J. Appl. bacteriol.* 56(3) : 395-407.
- ***Miller G.L. (1959).** Utilisation du réactif acide dinitrosalicylique pour la détermination du sucre réducteur. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428. doi: 10.1021 / ac60147a030
- ***Morvan J.** Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires M55B, (2010). <http://www.frost.com>.
- ***Muhammad I., Zahid A., Muhammad I., Muhammad J., Hassan Ashfaq. (2016).** Cellulase Production from Species of Fungi and Bacteria from Agricultural Wastes and Its Utilization in Industry : A Review, n°4, p.44-55.
- ***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.
- ***Nishio N., Nagai S. (1981).** Single cell proteine production from mandarin orange peel. *Eurpean. J. Appl. Microbiol Biotechnol.* 11 :156-160.
- ***Nouel G., et Combellas J., (1999).** Liveweight gain of growing cattle offered maize meal or citrus pulp as supplements to diets based on poultry litter and restricted grazing of low quality pastures. *Livestock Research for Rural Development.* **11(1)**.
- ***Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol U. T., Singh D. et Mohan R. (2000).** Advances in microbial analyses. *Biotechnol. appl. Biochem.* 31(2) : 135-152.
- ***Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R., Nigam P. (1999).** Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.*, **77** ; 149–62.
- ***Paranthaman R., Alagusundaram K., Indhumathi J. (2009).** Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World J. Agric. Sci.*, **5(3)**; 308-312.
- ***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.
- ***Pelmont J. (1995).** Enzymes : catalyseurs du monde vivant. *Presse Universitaire de Grenoble.* pp. 7 ; 621 ; 652–654.
- ***Pimentel D., Patzek T. (2005).** Ethanol production using corn switchgrass, and wood; biodiesel.
- ***Rahardjo Y.S.P., Tramper J. & Rinzema A. (2006).** Modeling Conversion and Transport Phenomena In Solid-State Fermentation : A Review And Perspectives. *Biotechnol. Adv.*, 24 (2), 161-179.

- ***Rai S.K., Mukherjee A.K. (2010).** Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochem. Eng. J.*, 48 ; 173–180.
- ***Raimbault M. (1998).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, *Elec. J. Biotech.*, 1(3); 1–15.
- ***Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 : 597-635.
- ***Reiss T.** Consequences, Opportunities and Challenges of Modern Biotechnology for Europe, Task Main Report, Reference Reports du Centre commun de recherche, IPTS, (2007), Séville.
- ***Restino C. (2012).** Production d'acide itaconique par des souches d'*Aspergilli* par fermentation en milieu solide. Thèse de Doctorat de l'Université de Reims Champagne Ardenne. France.
- ***Rivière J. (1975).** Les applications industrielles de la microbiologie. P : 31-195. Collection sciences agronomiques. Masson et Cie (éd.).
- ***Saddler., Jack N. (2010).** ARANTES, Valdeir, Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis : the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, vol. 3, n°4. production using soybean and sunflower. *Natural Resources Research*. 14 (1) : 65-76.
- ***Sandhya C., Nampoothiri K.M., Pandey A. (2005a).** Microbial proteases. *Methods Biotechnol.*, 17 ; 165–179.
- ***Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. (2005b).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 40 ; 2689–2694.
- ***Santamaria R.I., Del Rio G., Saab G., Rodriguez M.E., Sobren X., Lopez-Maguia a. (1999).** Alcoholysis reactions from starch with alpha-amylases. *FEBS lett.* 452(3) : 346-350.
- ***Sasson A. (1985).** Les biotechnologies : Défis et promesses. Sextant 2. UNESCO.
- ***Sauvant, D. (1984).** Les pulpes de citrus. ITEB, centre d'information sur les sous-produits.
- ***Schamburg D., Salzman M G B F. (1991).** Cellulase. *In* : Enzyme Handbook, Vol IV. Springer-Verlag Berlin, p : 1-11.
- ***Scriban R. (1993).** Biotechnologie. 4ème édition. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. P : 40.
- ***Scriban R. (1993).** **Biotechnologies.** 4 ème édition. Technique et documentation - Lavoisier. 32-39, 59-180, 323-448.
- ***Scriban R. (1999).** Biotechnology. 5ème édition. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. P : 149-156-157-525.
- ***Sicard P. (1982).** Applications industrielles des enzymes. In Durand G et Monson P. (Ed) ; Les enzymes production et utilisation industrielles. Ed. Gauthier –Villars. 121-164.
- ***Singhania R.R., Sukumaran R.K., Pillai A., Prema P., Szakas G., Pandey, A. (2006).** Solide state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulase production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460. *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 332-336.

- ***Sinsuwan S., Rodtong S., Yongsawatdigul J., (2008).** Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Proc. Biochem.*, 43 : 185-192.
- * **Sumantha A., Fontanille P., Larroche C., Pandey A. (2008).** Exploration of fungal spores as a possible storehouse of proteolytic biocatalysts. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24 ; 2897–2901.
- ***Smeets E., Faaij A., Lewandowski I. (2004).** A quickscan of global bioenergy potentials to 2050. Report NWSE2004109, ISBN 9039339090, enzymes in detergent science series. 69. P: 175-202.
- ***Sogi D. S., Bawa A. S. (1998).** Studies on dehydration of tomato processing waste. *Indian Food Packer*, 52(2) ; 26–29.
- ***Sogi D.S., Bhatia R., Garg S.K., Bawa A.S. (2005).** Biological evaluation of tomato waste seed meals and protein concentrate. *Food Chem.*, 89 ; 53–56.
- ***Sogi D.S., Shivhare U.S., Garg S.K., Bawa A.S. (2003).** Water Sorption Isotherm and Drying Characteristics of Tomato Seeds. *Biosystems Eng.*, 84 (3); 297–301.
- ***SRINUBABU G., LOKESWARI N., JAYARAJU K. (2007).** Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. *E-J. Chem.*, 4(2) ; 208-215.
- ***Sumantha A., Larroche C., Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food- grade proteases: a perspective. *Food Technol. Biotechnol.*, 44 (2) : 211-220.
- ***Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. (2005b).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 40 ; 2689–2694.
- ***Swetha S., Dhanya G., Kesavan M.N., Carlos Ricardo Soccol and Ashok Pandey.** α -Amylases from Microbial Sources - An Overview on Recent Developments. *Food Technol. Biotechnol.*, (2006), 44 (2) : 173–184.
- ***Thérien Y. (2006).** Natural resources, mais pour l'éthanol. Le bulletin des agriculteurs. www.lebulletin.com/abonnement2/0611/0611g.cfm (consulté le 15/02/2008).
- ***Ventura M.R., Pieltain M.C., Castanon J.I.R. (2009).** Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 154 ; 271–275.
- ***VIDAL, 2003-**<http://>. Vidal. fr.
- ***Walker G.M., White N.A. (2005).** Introduction to Fungal Physiology in Kavanagh K., *Fungi : Biology and applications*. John Wiley & Sons Ltd. England. pp ; 2.
- ***Wang R., Law R.C.S., Webb C. (2005).** Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Proc. Biochem.*, 40 ; 217–227.
- ***Weiss W.P., Frobose D.L., Koch M.E. (1997).** Wet tomato pomace ensiled with corn plants for dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 80 ; 2896–2900.
- ***Wu T.Y., Mohammad A.W., Jahim J.Md., Anuar N. (2006).** Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microb. Technol.*, 39 ; 1223–1229.

Annexes

Annexe 1 : Gélose PDA

- Extrait de pomme de terre.
- Glucose.....20g.
- Agar.....20g.
- Eau distillé stérile.....1000ml.
- pH= 5.

*Préparation de l'extrait pomme de terre :

200g de pomme de terre non pelées vieilles sont lavés et coupés en petites dés ensuite mis dans un litre d'eau distillée et portés à ébullition pendant 20 min, ils sont enfin écrasés puis filtrés. Le filtrat obtenu représente l'extrait de pomme de terre.

*Préparation du milieu de culture :

L'agar et le glucose dissous à chaud dans l'extrait, compléter à 1L d'eau distillée. Le milieu est ensuite réparti dans des flacons, puis stérilisé à 102°C pendant 20 minutes.

Annexe 2 : Eau tweenée glycérol à 20 %

- Glycérol20ml.
- Tween 800,1ml.
- Eau distillé.

*Préparation

Dans une éprouvette graduée, mettre 20ml glycérol puis compléter à 100ml avec l'eau distillée et rajouter 0,1ml tween 80 (3gouttes) ; répartir dans des tubes à vis, à raison de 10ml par tube. Stérilisé les tubes à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 3 : Agent humidifiant

(Eau physiologique tweenée)

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

*Pour 100ml d'eau physiologique, ajouter 0,1ml de tween 80 (3gouttes).

Annexe 4 : Solution tampon citrate 0.1M, pH =4.8

- Acide citrique (0.1M)23g.
- Citrate de sodium (0.1 M)58,8g.
- Eau distillée.

***Préparation**

-1000 ml acide citrique (0.1M) : 23g acide citrique dans 1000 ml d'eau distillée.

- 2000 ml citrate de sodium (0.1M) : 58,8g citrate de sodium dans 2000ml d'eau distillée.

Dissoudre les produits dans un petit volume puis compléter au volume final avec l'eau distillée.

-Titration à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné de la solution acide par la solution base jusqu'à pH 4.8. La solution tampon est conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

Annexe 5 : Acide dinitrosalicylique (DNS) (Miller, 1959)

-Dissoudre 1g de DNS dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée (NaOH (2N) : 8g NaOH dans 100 ml eau distillée).

-Ajouter 30 g tartrate double Na, K. Compléter à 100ml avec l'eau distillée, agité.

-Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière. Il se conserve environ un mois.

Annexe 6 : Solution tampon phosphate 0.1M, pH =6.5

Sodium phosphate monobasique (0.1M)13.8 g

Sodium phosphate dibasique (0.1M).....26.8 g

Eau distillée

***Préparation**

-1000 ml sodium phosphate monobasique (0.1 M) : 13.8 g dans 1000 ml eau distillée.

-1000 ml sodium phosphate dibasique (0.1 M) : 26.8 g dans 1000 ml eau distillée.

Dissoudre les produits dans un petit volume puis compléter au volume final avec l'eau distillée.

-Titration à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné de la solution acide par la solution base jusqu'à pH 6.5. La solution tampon est conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

Annexe 7 : solution tampon citrate phosphate (0.1M/0.2M), pH =6.8

Solution A : Acide citrique 0.1M : 21.01g d'acide citrique à dissoudre dans 1000 ml eau distillée.

Solution B : Sodium phosphate dibasique 0.2M : 35.6g de sodium phosphate dibasique à dissoudre dans 1000 ml eau distillée.

Faire la titration de la solution A avec la solution B jusqu'à pH 6.8 ; garder le tampon dans un flacon à 4°C jusqu'à utilisation.

Annexe 8 : Solution M pour le Dosage des protéines (Lowry, 1951)

- solution A : 2% de Na_2CO_3 dans du NaOH (0,1N).

- solution B : 1% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans l'eau distillée.

- solution C : 2% de tartare double de sodium et de potassium dans l'eau distillée.

- solution de mélange M : composé de :

- 0.5ml de la solution C.

- 0.5ml de la solution B.

- 50 ml de la solution A.

Thème : Utilisation des déchets agro industrielles comme substrat de fermentation solide pour la production d'enzymes fongiques

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en
Mycologie et biotechnologie fongique

La production des enzymes hydrolases recherchées dans cette étude (cellulase, alpha- amylase et protéase) par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* est effectuée par fermentation solide, sur milieu à base de déchets de tomate et déchets d'orange humidifiés par deux agents différents l'eau distillée et l'eau physiologique tweenée.

L'influence de la nature du substrat et de l'agent humidifiant est établie. Les déchets de tomate ont donné le maximum de production en activités cellulase et protéase, à savoir 13.6 U/gds d'APF quand ils sont humidifiés avec l'eau physiologique tweenée. 316.613 U/gds d'endoglucanase et 13.274 U/gds de protéase sur ce substrat humidifié à l'eau distillée. Tandis que, les déchets d'orange humidifié à l'eau distillée permettent d'obtenir le maximum en activité alpha-amylase mesurée à 93.572 U/gds.

D'après ces résultats, il semble la possibilité de valoriser ces déchets de l'industrie agroalimentaire abandonnés, pour la production d'enzymes (cellulase, protéase et alpha- amylase) à intérêt industriel. Aussi, la possibilité d'humidifier ces substrats avec l'eau distillée pour de bon rendement en enzymes, semble une alternative intéressante pour l'industrie.

Mots clés : Cellulase, protéase, amylase, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation en milieu solide, déchets d'orange, déchets de tomate.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de ZOOLOGIE. Université des Frères Mentouri
Constantine 1. Algérie.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Mme BENKAHOUL.M* (Maître de conférences B- UFM Constantine),
Rapporteur : *Mme LEGHLIMI.H* (Maître de conférences A - UFM Constantine),
Examineur : *Mme ABDELAZIZ.W* (Maître de conférences B- UFM Constantine).

Date de soutenance : 07/07/2019