

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri – Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Département : Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire
Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie

Intitulé :

**Etude de l'optimisation de la production de la
protéase neutre par la levure *Candida sp.* Cultivée
sur milieu solide.**

Présenté par:

HAMLAOUI LINA

et

SAIDOU KENZA

Jury d'évaluation :

Président: Mme DAKHMOUCHE S.

M.C.A, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine 3

Encadreur: Mme BENNAMOUN L.

M.C.B, Université Frères Mentouri, Constantine 1

Examineur: Mme LABBANI F.Z.K.

M.C.B, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine 3

Année universitaire 2020- 2021



Remerciement

Avant tout, nous remercions Le BON DIEU le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce modeste travail.

Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude s'adressent à madame BENNAMOUN Leila qui a accepté de nous encadrer, on la remercie infiniment pour sa grande patience, ses encouragements, son aide et ses conseils judicieux, durant la réalisation du présent travail.

Nos remerciements vont également aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, Mme DAKHMOUCHE S et Mme LABBANI F Z K

Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude



Dédicaces

À maman, Je ne saurais guère t'exprimer mes sentiments, tu es la maman, le pilier de ma vie, Merci, pour tout, je ne serais jamais arrivée là, sans ton soutien, tes efforts, et tes sacrifices. Que dieu te protège, et te garde en bonne santé. Je t'aime.

À mon père, Je n'oublierai jamais tes regards de fierté en vers moi, et je donnerai le meilleur de moi-même pour les mériter. Que dieu te protège, et te garde en bonne santé. Je t'aime.

À mes chers frères Sami Mehdi Daoude tu es mon soutien dans la vie et les plus beaux petits garçons Mohamed Kosay : Yazan : Nidale joie de ma vie .Que dieu te protège Je t'aime.

À ma belle sœur Sara tu es une sœur et une amie et une deuxième mère merci d'être avec moi

À mon binôme kenza Avec qui j'ai passé 5 superbes années, nous avons été très soudées, j'espère que cette entente perdure.

À mes chers cousins et cousines, Nadia khadidja , Asma :Bouba ;Nousa ;Merci à vous,

Et À mes amis ,Houda Donia Silia Radja Chaima Foula Nousa NIhede Roumaissa Feriel Asma feriel mouman Merci à vous d'avoir rendu ces années universitaires aussi fluide, et moins difficile. vous dédie ce travail en expression de mon profond amour, et gratitude

À ma seconde famille Bouraoui , mon père houssine , oumi Nadia , saousane, Hadjor, Noor :azedine ; amina ; somia : zakaria et bien sur a mon fiancé takj edinne , je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

Hamlaoui Lina



Dédicaces

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que je dédie ce mémoire de fin d'étude à :

***Mes chers parents :** vous représentez pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cassé de m'encourager.*

***A ma mère chérie :** maman ton amour et tes conseils m'ont servi de guide toutes ces années , cet ouvre est avant tout la votre . Que dieu te garde et donne longue vie pour que tu puisses bénéficier d'avantage des fruits de tant d'années de sacrifies.*

***A mon père chéri :** papa je suis la personne que je suis maintenant grâce à toi je suis-je suis tellement reconnaissante d'avoir un papa comme toi , merci pour tout ce que tu as fait pour moi .*

***A mon seul et unique frère :** Salim tu es mon soutien dans la vie.*

***A ma famille , surtout à mes cousines :** Kawter , Hind , Bouhra , Merieme , Feriele , Anfel , Chahd , Mayar , chourouk.*

***A ma chère amie depuis l'enfance :** Chaima .*

***A ma chère amie et binôme :** Lina*

***A tous mes collègues et amis :** Romaiissa , ferial , Noussaiba , Fella , Fatima , Rania , pour les merveilleux souvenirs que nous avons partagés ensemble .*

A tous ceux qui me connaissent et qui m'ont encouragé de près ou loin.

Saidou Kenza

Table des matières

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumés

Introduction.....1

Chapitre 1 : Etude bibliographique

1. Les levures.....2

1.1. Généralités 2

1.2. Caractéristiques morphologies des levures.....3

1.3. Applications des levures en biotechnologie.....3

1.4. La levure Candida.....5

1.4.1. Genre.....5

1.4.2. Taxonomie.....5

1.4.3. Habitat.....6

1.4.4. Morphologie.....6

1.4.5. Besoins nutritionnels.....6

a .Source de carbone.....6

b. Source d'azote.....6

c. Vitamines, oligoéléments et minéraux.....7

1.4.6 Caractéristiques physiologiques.....7

2. Les protéases.....9

2.1. Généralités sur les enzymes.....	9
2.2. Marché des enzymes.....	9
2.3. Définition et rôle des protéases.....	9
2.4. Les origines des protéases.....	10
2.4.1. Protéase d'origine végétale.....	10
2.4.2. Protéase d'origine animale.....	10
2.4.3. Protéase d'origine microbienne.....	11
2.5. Classification des protéases.....	12
2.6. Mécanisme d'action des protéases.....	14
2.6.1 Protéase à serine.....	14
2.6.2 Cystéylprotéases.....	16
2.6.3 Aspartylprotéases.....	15
2.6.4 Métalloprotéases.....	16
2.7. Les Applications des protéases.....	17
3. Fermentation.....	19
3.1. Fermentation à l'état solide.....	19
3.1.1 Micro-organismes utilisées dans la FMS.....	19
3.1.2 Facteurs influençant le processus de FMS.....	19
3.1.3 Substrats utilisées dans FMS.....	20
3.1.4 Les avantages et les inconvénients de la FMS.....	20
3.2. Fermentation à l'état liquide.....	21
4. Son de blé.....	25
4.1. Définition.....	25
4.2. Composition chimique.....	25

4.3. Utilisation du son de blé dans l'industrie alimentaire.....	26
5. Avoine.....	26
5.1. Définition.....	26
5.2. Classification.....	27
5.3. Composition nutritionnelle.....	27
5.4 Types d'avoines cultivées.....	28
6. Méthode d'optimisation.....	28
6.1. Méthode OFAT	28
6.2. Plan de Plackett-Burman.....	29
6.3. Plan composite centré.....	30
 Chapitre 2 : Matériel et méthodes	
1. Matériel Biologique.....	31
1.1 Isolement des levures.....	31
1.2 Identification de la levure.....	31
1.3 Préparation de l'inoculum.....	32
1.4 Dénombrement.....	32
2. Méthode de fermentation.....	32
2.1 Fermentation sur milieu solide.....	32
2.1.1 L'extraction des enzymes protéolytiques.....	32
2.1.2 Détermination de la matière sèche.....	33
2.2 Fermentation sur milieu liquide.....	33
2.2.1 Séparation des enzymes protéolytiques.....	33
3. Méthode de dosage.....	33
3.1 Dosage de l'activité protéolytique.....	33

3.2 Dosage des protéines.....	34
4 .Méthode d'optimisation.....	34
4.1 Sélection des variables significatives par le plan d'expérience de Plackett-Burman.....	35
4.2 Détermination des optima par le plan composite centré de Box- Wilson.....	36
Chapitre 3 : Résultats et discussions	
1. Identification de la souche levurienne.....	40
2. Etude de la production des enzymes protéolytiques sur milieu solide et liquide.....	40
2.1 Fermentation sur milieu solide FMS.....	40
2.1.1 Effet des différents substrats sur la production des protéases (acide, neutre et alcaline) par <i>candida sp</i>	40
2.2 Fermentation sur milieu liquide FML.....	42
2.2.1 Effet des différents substrats sur la production des protéases (acide, neutre et alcaline) par <i>candida sp</i>	42
3 Optimisation des conditions de culture pour la production de protéase neutre par la planification expérimentale.....	43
3.1 Optimisation de la production des protéases neutres selon le plan de Plackett- Burman (1946)	43
3.2 Optimisation de la production des protéases neutres selon le plan de Box-Wilson(1951)	46
Conclusion générale.....	58
Références bibliographiques.....	59
Annexes	

Liste d'abréviation

ANOVA: Analyses de la variance.

aw: Activité de l'eau.

AE : Activité enzymatique.

BSA: Bovine Sérum Albumine.

CCD: Central Composite Design

EDTA: Ethylène diamine tétra-acétique acide.

FML: Fermentation en milieu liquide.

FMS: Fermentation en Milieu Solide.

PBD: Plackett-Burman Design.

MS : Matière sèche.

OFAT: Un facteur à la fois.

TCA : Acide Trichloroacétique.

UI : Unité Internationale.

YPGA: Yeast Peptone Glucose Agar.

Liste des figures

N°	Titre des figures	Page
1	Structure cellulaire des levures.	3
2	Applications biotechnologiques des levures.	4
3	La structure de la sérine protéase.	10
4	Protéase produite à partir des différentes sources.	11
5	Les différentes familles des protéases.	13
6	Mécanisme réactionnel des peptidases à sérine.	14
7	Mécanisme réactionnel des peptidases à cystéine.	15
8	Mécanisme réactionnel des protéases acides.	16
9	Mécanisme réactionnel des métalloprotéases.	16
10	Les différents produits du son de blé.	26
11	Les floconnes d'avoines cultivés.	27
12	Image montre l'espèce du genre <i>Avena sativa</i> .	28
13	Lecture de la galerie API32 C après 24 h.	40
14	Effet des différents substrats sur la production de protéase (acide, neutre et alcaline) par FMS par <i>candida sp.</i>	41
15	Effet des différents substrats sur la production de protéase (acide, neutre et alcaline) par FML par <i>candida sp.</i>	42
16	Charte Pareto des effets standardisés des paramètres opératoires sur l'activité protéolytique.	51
17	Graphique de parité montrant la distribution des données expérimentales de l'activité protéolytique par rapport à la valeur prédite par le modèle.	52

18	La courbe de contour (A) et la surface (B).	54
19	Les valeurs optimales des variables de la réponse déterminées par « RSM »	56

Liste des tableaux

N°	Titre des tableaux	Page
1	Différents enzymes produites par les levures.	4
2	Les valeurs de l'activité de l'eau des différents micro-organismes.	8
3	Applications industrielles des protéases	18
4	Les différents avantages et inconvénients de la FMS.	20
5	Comparaison entre les caractéristiques FMS et FML.	21
6	Les protéases produites par FMS avec les substrats et micro-organismes utilisés.	24
7	La composition chimique du son de blé.	25
8	Générateur des matrices (Plackett-Burman).	29
9	Matrice d'expérience de Plackett-Burman pour l'étude de 11 facteurs avec 12 combinaisons.	35
10	Les différents facteurs étudiés et leurs concentrations correspondantes.	36
11	Structure du plan composite centré à 3 facteurs.	38
12	Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels dans le plan composite centré à 3 facteurs.	39
13	Effet des facteurs testées sur la production de la protéase neutre (plan de Plackett-Burman).	44
14	Etude statistique de l'effet des facteurs testées sur la production de protéase neutre.	45
15	Valeurs expérimentales (observées) de l'activité spécifique.	47
16	Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de de la production des protéases neutres.	48
17	Analyse de variance (ANOVA) pour les paramètres de la méthode de surface de réponse adaptée au modèle polynomial quadratique pour l'optimisation de l'activité protéolytique.	50

Résumé

Résumé

Ce travail est une étude comparative de la production d'une protéase par culture d'une souche levurienne *Candida sp* sur milieu solide (FMS) et milieu liquide (FML) à différents pH (acide, neutre et alcaline). Pour cela deux substrats sont testés à savoir : le son de blé et l'avoine avec un taux d'ensemencement de $4 \cdot 10^6$ cellules à 30°C. Dans un premier temps et afin de déterminer le procédé de fermentation et le substrat testé qui donne une production maximale en protéase. La méthode statistique d'un facteur à la fois (OFAT) a montré que les meilleures activités protéolytiques sont obtenues en fermentation solide à base de son de blé. Le dosage des activités protéolytiques à différents pH montre que la meilleure activité est obtenue à pH 7 (protéase neutre).

Dans un second temps, les plans statistiques de Plackett et Burman et de Box et Wilson sont respectivement utilisés pour déterminer et optimiser les facteurs influençant la production de la protéase neutre. Les milieux de cultures sont préparés par l'emploi d'un plan factoriel de Plackett-Burman à N=12 essais et N-1 facteurs : cinq facteurs réels (Température, humidité, Inoculum, Glucose, Corne steep, sulfate d'ammonium, NaCl, incubation) et deux erreurs. Les résultats obtenus montrent que les facteurs significatifs influençant la production d'enzyme par la levure *Candida Sp.* sont: l'humidité, le glucose et le sulfate d'ammonium. Les valeurs optimales des variables étudiées sont déterminées par la méthodologie de surface de réponse à savoir: L'humidité 96.82 %, glucose 0.568 g et le sulfate d'ammonium 0.46.

La validation du modèle a permis d'obtenir une activité de la protéase neutre de 35835.3 UI/ml, soit 2 fois plus élevé que dans les conditions non optimisées.

Ces résultats significatifs confirment l'importance de la conception statistique dans la production de protéase neutre.

Mots-clés : Protéase, FMS, FML, Son de blé, Avoine, *Candida sp*, Optimisation.

Abstract

This work is a comparative study of the production of a protease by culture of a *Candida sp* yeast strain on solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF) at different pH (acid, neutral and alkaline). For this two substrates are tested namely: wheat bran and oats with a seeding rate of $4 \cdot 10^6$ cells at 30 °C. Initially and in order to determine the fermentation process and the substrate tested which gives a maximum production of protease. The statistical method of one factor at a time (OFAT) showed that the best proteolytic activities are obtained in solid state fermentation based on wheat bran. The assay of the proteolytic activities at different pH levels shows that the best activity is obtained at pH 7 (neutral protease).

Secondly, the statistical plans of Plackett-Burman, Box, and Box-Wilson are respectively used to determine and optimize the factors influencing the production of the neutral protease. The culture media are prepared by using a Plackett-Burman factor plan with N=12 tests and N-1 factors: five real factors (Temperature, humidity, Inoculum, Glucose, Corne Steep, ammonium sulfate, NaCl, incubation) and two errors. The obtained results show that significant factors influencing the production of enzyme by yeast *Candida Sp.* Are: moisture, glucose and ammonium sulfate. The optimal values of the studied variables are determined by the response surface methodology namely: Humidity 96.82%, glucose 0.568 g and ammonium sulfate 0.46.

The validation of the model made it possible to obtain a neutral protease activity of 35835.3 IU/ml, which is 2 times higher than under non-optimized conditions.

These significant results confirm the importance of statistical design in the production of neutral protease.

Keywords: Protease, solid-state fermentation (SSF), submerged fermentation (SmF), Wheat bran, Oats, *Candida sp*, Optimization.

ملخص

هذا العمل عبارة عن دراسة مقارنة لإنتاج البروتياز عن طريق زراعة سلالة الخميرة *Candida sp* على وسط صلب (FMS) ووسط سائل (FML) عند درجة حموضة مختلفة (حمضية ، معتدلة و قاعدية). لهذا ، باستخدام نوعين من البقايا الزراعية ، وهما: نخالة القمح والخرطال بمعدل تركيز 4.10^6 خلية عند 30 درجة مئوية. أولاً ومن أجل تحديد عملية التخمر والبقايا الزراعية التي تم اختبارها والتي تعطي أقصى إنتاج للبروتياز. أظهرت الطريقة الإحصائية لعامل واحد في المرة (OFAT) أن أفضل أنشطة التحلل البروتيني يتم الحصول عليها في التخمر الصلب بناءً على نخالة القمح. يُظهر اختبار الأنشطة المحللة للبروتين عند درجة حموضة مختلفة أنه يتم الحصول على أفضل نشاط عند درجة حموضة 7 (البروتياز المعتدل)

ثانياً ، يتم استخدام الخطط الإحصائية Plackett-Burman و Box-Wilson على التوالي لتحديد وتحسين العوامل التي تؤثر على إنتاج البروتياز المعتدل . يتم تحضير وسط زراعي باستعمال مخطط Plackett-Burman مع $N = 12$ تجربة و N-1 عامل خمسة عوامل حقيقية (درجة الحرارة ، الرطوبة ، اللقاح ، الجلوكوز ، *corne steep* ، كبريتات الأمونيوم ، NaCl، الحضانة) واثنين من الأخطاء . بينت النتائج المتحصل عليها ان العوامل المهمة التي تؤثر على انتاج انزيم الخميرة *Candida Sp* هي: الرطوبة ، الجلوكوز وكبريتات الامونيوم. تم تحديد القيم المثلى للمتغيرات المدروسة من خلال منهجية سطح الاستجابة وهي: الرطوبة 96.82% ، الجلوكوز 0.568 جم وكبريتات الأمونيوم 0.46.

مكن التحقق من صحة النموذج الحصول على نشاط بروتياز معتدل يبلغ 35835.3 وحدة دولية / مل ، وهو ضعف ما هو عليه في الظروف غير المحسنة.

تؤكد هذه النتائج المهمة أهمية التصميم الإحصائي في إنتاج البروتياز المعتدل.

الكلمات الرئيسية: البروتياز ، FMS ، FML ، نخالة القمح ، الخرطال ، *candida sp* ، تحسين

Introduction

Les enzymes protéolytiques sont des enzymes catalysant l'hydrolyse des protéines. Environ 40 % des enzymes sont produites par les microorganismes principalement par des souches fongiques (García-Gómez et *al.*, 2009). En effet, les levures sont considérées comme les microorganismes les plus importants en biotechnologie. *Candida sp* est l'une des principales espèces fongiques appliquées dans la production commerciale des enzymes (Buzzini et Margesin, 2014).

Les protéases constituent l'un des groupes les plus importants des enzymes industrielles occupant 60% du total marché global des enzymes. Elles sont applicables dans plusieurs secteurs industriels à savoir : l'industrie des détergents, tannerie, IAA et les industries pharmaceutiques. En effet, le marché mondial des enzymes industrielles dépasse 1,5 milliard de dollars et est enregistré une croissance annuelle de 7,8 % au cours de la période de prévision 2015-2020 (Sharma et *al.*, 2017).

Les enzymes protéolytiques peuvent être produites par la fermentation liquide comme solide (De castro et *al.*, 2014). Le coût de la production des enzymes disponibles dans le commerce par la fermentation submergée est généralement trop élevée pour les applications biotechnologiques à cette raison la fermentation solide est une technique alternative pour la production des enzymes industriels (Mais, 2018).

Les cultures fongiques s'effectuent soit sur substrat solide (FMS) soit en culture submergé (FML) dans le but de produire des métabolites (enzymes). Les cultures solides sont préférées pour les raisons suivantes: simplicité du procédé, le faible coût et les rendements en enzymes sont plus importants (De casro et *al.*, 2014).

D'autre part, la plupart des protéases sont produites soit par des moisissures soit par des bactéries. L'objectif visé dans étude est d'exploiter le potentiel enzymatique des levures, car en industrie il est intéressant d'utilisé de nouvelles molécules répondant aux critères de l'industrie.

Les différentes étapes visées dans ce travail sont :

- Identification de la levure sélectionnée pour la production de protéase.
- Conduite de la fermentation.
- Optimisation de la production de protéase neutre par application des deux plans statistiques : Plackett-Burman, et Box-Willson.

Synthèse Bibliographique

1 Les levures

1.1 Généralités

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes, champignons à thalle unicellulaire immobile, non photosynthétiques et chimio-hétérotrophes, (Kurtzman et *al.*, 2011). Elles sont utilisées dans plusieurs secteurs industriels, biotechnologiques, médicales et environnementales (Ahasanul et *al.*, 2020).

Le nombre de levures décrit augmente chaque année de façon spectaculaire, cependant les applications technologiques ou industrielles sont limitées à un petit nombre des espèces, appartenant principalement à *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* (Lane et Morrissey, 2010; Wagner et Alper, 2016).

Certaines levures ont une reproduction sexuée qui correspond à une phase de leur cycle biologique où on note une alternance des phases haploïdes et diploïdes. La multiplication asexuée est toujours présente, est se fait essentiellement par bourgeonnement aux extrémités des grands axes des cellules si elles sont ovoïdes ou allongées (Bennamoun, 2017).

La fermentation des levures joue un rôle central dans la libération d'un certain nombre de composés tels que : les esters, les lactones, les thiols, les alcools et les composés phénoliques impliqués dans le développement de la saveur caractéristique de la bière (Carrau et *al.*, 2015).

Les avantages de l'utilisation des levures par rapport aux autres microorganismes son :

- La capacité de sécrétion élevée.
- Le taux de croissance élevé sur une grande variété de source de carbone.
- La capacité à réaliser des nombreuses modifications post-traductionnelles.
- Faciles à cultiver dans de petits vaisseaux ou grands bioréacteurs.
- Une purification facile du produit et absence de sensibilité aux agents infectieux comme les bactériophages (Wagner et Alper, 2016).

1.2 Caractéristiques morphologiques des levures

Les levures représentant les eucaryotes les plus simples vus leur composition cellulaire. Elles sont constituées d'enveloppes cellulaires, d'un cytoplasme contenant divers organites, et d'un noyau renfermant les chromosomes (Figure 1) (AL Daccache, 2019).

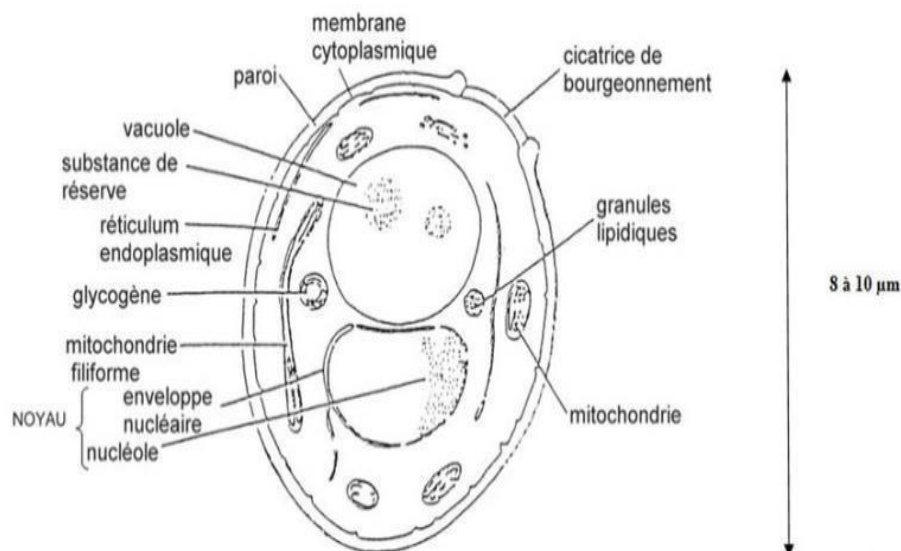


Figure1: Structure cellulaire des levures (Source : <http://www.microbiologie-medicale.fr>)

Les cellules levuriennes sont généralement ovoïdes présentent une paroi cellulaire externe et une membrane interne qui entoure son environnement intracellulaire (Giulia et *al.*, 2021) . Cependant structurellement, leur taille cellulaire varie de quelques microns jusqu' à 25 à 30 microns en forme ovoïdes ou sphériques (Haroldo et *al.* , 2020). l'intérieur de la levure est compartimenté d'un noyau, plusieurs vacuoles, mitochondries, le réticulum endoplasmique, et un nombre de corps vésiculaires (Thumm et *al.* , 2000 ; Li et *al.*, 2009).

1.3 Applications des levures en biotechnologie

Les levures sont utilisées dans plusieurs domaines, traditionnellement sont utilisées pour la fabrication du pain, de la bière, du vin et pour la production d'alcool, mais les levures sont aussi utilisées pour d'autres applications biotechnologiques comme les domaines médicaux (vaccin contre l'hépatite B), Pharmaceutique (capable de fabriquer les médicaments anti-inflammatoire) et environnemental (fabrication du pain) (Antonio, 2018) (Figure 2).

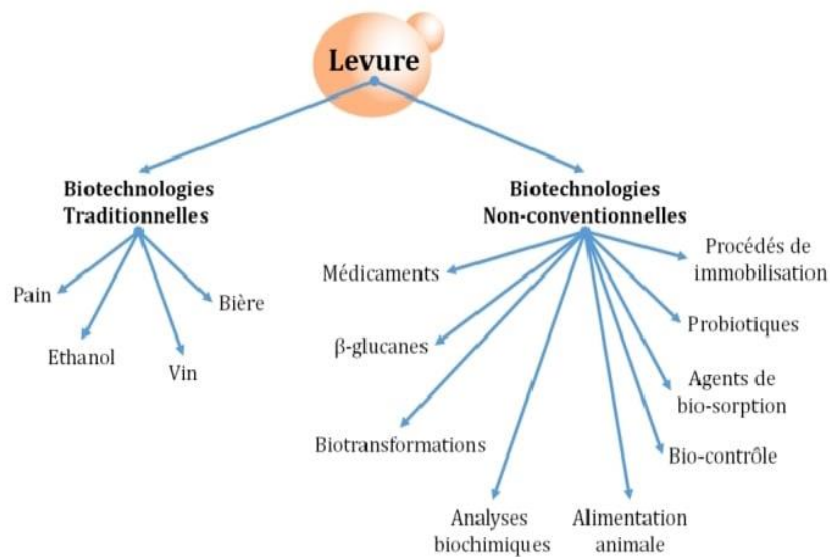


Figure 2 : Applications biotechnologiques des levures.

Les levures participent également à la valorisation des déchets agricoles et industriels pour la production des protéines et des enzymes (Chi et *al.*, 2011). Les différentes enzymes produites par les levures sont rassemblées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Différentes enzymes produits par les levures.

Levure	Enzyme	Référence
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Polygalacturonase	Bennamoun,2017
	Pullulanase	Moubasher et <i>al.</i> ,2013
	Protéases alcalines	Chi et <i>al.</i> , 2007
<i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7	Amylopullulanase	Dakhmouche, 2016
<i>Merschnikowia pulcherrima</i>	Protéase	Louwrens, 2017
<i>K. marxianus</i>	Protéase à sérine	(Foukis et <i>al.</i> , 2012)
	β – galactosidase	(Singh et <i>al.</i> , 2017)
	inulinase	(Hoshida et <i>al.</i> , 2018)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Protéase	Luciana et <i>al.</i> , 2020
<i>Candida digboensis</i> SRD	Protéase	Patel et <i>al.</i> , 2009

1.4. La levure *Candida*

Candida est une levure microscopique polymorphe unicellulaire, opportuniste présente dans plus de 60% des populations. Elle appartient à des groupes de levure appartenant au ascomycète et au basidiomycète (Belmadani, 2018). Différentes espèces de *Candida* isolées chez l'homme et les animaux ont différents types d'activité parasitaire. L'espèce la plus pathogène est *Candida albicans* suivie de *Candida tropicalis* (Sachivkina et al., 2021) .

Elles présentent un fort potentiel dans divers domaines des biotechnologies comme le contrôle biologique, la bioremédiation, et surtout la production de biomolécules valorisables (biocarburants, vitamines, édulcorants, enzymes industrielles) (Defosseab et al ., 2018) .

1.4.1 Genre

Le genre *Candida* contient environ 150 espèces de *Candida* non *albicans* (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, et *C. dubliniensis*) et de *Candida albicans* (*C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* (Berman et al., 2020)).

1.4.2 Taxonomie

La classification des levures est traditionnellement basée sur leurs profils physiologiques et biochimiques, des méthodes moléculaires ont été appliquées avec succès au typage et à l'identification des souches de levure (khater et al ., 2019). La classification phylogénétique de la levure *candida sp* selon (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Broswer.>, 2020) est présenté comme suit :

Règne : *fungi*

Sous-règne : *dikarya*

Division : *ascomycota*

Sous-division : *saccharomycotina*

Classe : *saccharomycetes*

Ordre : *saccharomycetales*

Famille : *debaryomycetaceae*

Genre : *candida*

Espèce : *sp.*

1.4.3 Habitat

La levure *Candida* est de forme variable ronde à allongé. Généralement, les cellules des levures sont plus grandes que les cellules des bactéries (de taille de quelques microns à 30 μ) avec une forme sphérique ou ovoïde (Barnett et *al.*, 2000). Elle est isolée à partir d'une large gamme de substrats dans le sol, l'air et dans les végétaux, Les levures des produits alimentaires ne sont pas pathogènes (pas de production de toxines) mais peuvent produire par leur développement des altérations de la qualité des produits. Elle trouve dans le tube digestif de l'homme, des mammifères et des oiseaux, et aussi retrouvée dans l'environnement à moins d'une contamination par l'homme ou l'animal (Lachance, 2011).

1.4.4 Morphologie

Le genre *Candida* présentent comme des petites levures rondes ou ovalaires des formes variées de 2 à 5 μ m (filaments ou pseudo filaments) et se multiplient par bourgeonnement (Barnett et *al.*, 2000). Ce genre regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral, productrices ou non de pseudomycélium, en plus la capacité de différencier un véritable mycélium (Maruyama et *al.*, 2005).

1.4.5 Besoins nutritionnels

a. Source de carbone

Le carbone est le facteur le plus important influençant les voies métaboliques des micro-organismes et étant nécessaire dans la production d'enzyme (Kurtzman et *al.*, 2011).

Les levures sont utilisé le carbone comme source d'énergie pour leur croissance, sont capable de métaboliser le glucose, le fructose, et du mannose (Walker, 2009).

Les différentes sources de carbone sont le glucose, le fructose, le galactose, le saccharose, le glycérol, le son de soja, l'huile d'olive , le pétrole brut, le diesel , (Ezebuio et *al.*,2019) . Plusieurs espèces de *Candida* poussent sur une variété de substrats, y compris les n-alcanes, les huiles, les acides gras, le xylose et les glucides (Sarazin , 2010) .

b. Source d'azote

L'azote est l'un des principaux paramètres influençant les voies métaboliques des microorganismes et la production d'enzymes (Antonio et *al.*, 2020). Il est important pour la croissance et la production de la protéase (Chellapandian et *al.* , 2021).

Toutes les levures sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ion d'ammonium (chlorure, nitrate, phosphate, mais surtout sulfate qui est le composé idéal puisqu'il apporte également du soufre nécessaire à la synthèse de certains acides aminés). Certaines levures sont capables d'assimiler les nitrites et les nitrates comme seule source d'azote (Kurtzman et al., 2011).

L'apport d'azote est réalisé généralement sous forme de composés organiques azotés : peptone, extrait de levure, corn steep liquor, L'extrait de levure apparaît comme l'élément majeur favorisant la croissance des levures, car il apporte de nombreux acides aminés et d'autres formes d'azote organique (Deak., 2006).

c. Vitamines , oligoéléments et minéraux

les vitamines (la biotine, la thiamine et l'inositol) peuvent être des éléments constitutifs de coenzymes variés ou des groupements prosthétiques d'enzymes essentiels à la croissance des levures (Kurtzman et al., 2011). D'autres facteurs comme les ions métalliques jouent un rôle vital dans le développement car ils agissent comme des cofacteurs enzymatiques et ont également des rôles structurels majeurs (Normando et al., 2021). Parmi les métaux alcalins indispensables on trouve les cations monovalents : K^+ , Na^+ , Li^+ , Cs^+ , Rb^+ , ainsi que les cations bivalents : Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} . Les ions Ca^{2+} ont un rôle dans le fonctionnement des microfilaments, dans l'activité des enzymes et dans la maintenance de l'intégrité structurale des membranes (Leveau et Bouix, 1993).

1.4.6 Caractéristiques physiologiques

Les levures sont sensibles à plusieurs facteurs environnementaux tels que la température, le pH et l'activité d'eau.

- **Effet de la température**

La température optimale de culture des levures se situe en général entre 25 °C et 30 °C, les levures peuvent être classées en :

- Levures mésophiles : peuvent se développer entre 0 à 50°C.
- Levures psychrophiles : la température maximale de croissance se situe entre 5°C et 20°C.
- Levures thermophiles : se développent à comprises entre 45°C à plus de 100°C.

La levure *candida* a une température de croissance comprise entre 24 et 48 °C (Deak, 2006). Cependant, elle existe une autre catégorie des levures qui se développent à des

températures supérieures à 50°C, elles sont appelées levures thermophiles par exemple *Candida tropicalis* (Zahari et al., 2021). D'autres levures mésophiles comme *Candida albicans* à température de 30°C (Calla Salcedo et al., 2021), et *Candida lusitaniae* on considère que la température optimale se situe de 20 °C, elles sont appelées psychrophiles (Scorzoni, 2013).

- **Effet du pH**

Les levures tolèrent une large gamme de pH allant de 2,4 à 8,6. Le pH a également une forte influence sur la production de protéases. Calik et al., 2004 ont démontré que le pH affecte les mécanismes de régulation métabolique de la production de protéases chez *Bacillus licheniformis*. La meilleure production protéasique a été obtenue chez *Aspergillus oryzae* à pH 7 (Benkahoul et al., 2017) le même résultat a été décrit par Yang et al. (2000). Les levures du genre *Candida* se multiplient activement en milieu acide, de pH 2 à pH 6 et peuvent survivre à pH 9. Il est donc nécessaire de maintenir en tout temps le pH à un niveau optimal lors de la fermentation afin d'obtenir de bons rendements de production de protéases (Mathieu, 2005).

- **Influence de l'activité de l'eau**

L'activité de l'eau (A_w) représente l'eau libre dans le produit. L'échelle de mesure de l' A_w est comprise entre 0 et 1 et l'eau pure a une A_w de 1 (Tableau 2), (Durand, 1998). L'influence de ce paramètre est caractérisée à chaque microorganisme par une A_w optimale et une A_w limite (Krishna, 2005).

Tableau 2 : Les valeurs de l'activité de l'eau des différents microorganismes (www.rotrotronic.com).

Activité de l'eau	Organismes
aw = 0.91 ...0.95	Nombreuses bactéries
aw = 0.88	Nombreuses levures
aw = 0.80	Nombreuses halophiles
aw = 0.75	Bactéries halophiles
aw = 0.70	Levures osmiophiles
aw = 0.65	Moisissures xérophiles

2. Les protéases

2.1 Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont des composants essentiels des réactions biologiques et jouent un rôle important dans la mise à l'échelle et l'optimisation des nombreux processus industriels. En raison de leur spécificité de substrat, les enzymes sont couramment utilisées dans plusieurs secteurs (comme la transformation des aliments, les détergents, les produits pharmaceutiques, les biocarburants et la production de papier) pour améliorer, mettre à l'échelle, et optimiser la production industrielle (Giorgio et *al.*, 2019).

2.2 Marché des enzymes

Le marché des enzymes est basé sur l'application, la source, et le type d'enzymes. En 2020 le marché des enzymes industrielles est estimé à 5,9 milliards de dollars et devrait atteindre 8,7 milliards de dollars d'ici 2026, ce qui représente un taux de croissance annuel (TCAC) de 6,5 % (<http://www.petrochemical-news.com> 2020). Dont 7 milliards de dollars seul sera destiné aux applications industrielles (www.bccresearch.com, 2018).

Les protéases sont le principal marché d'enzymes commerciales dans le monde (Contesini et *al.*, 2018; Gurumallesh et *al.*, 2019), représentant près de 65 % des ventes mondiales totales d'enzymes industrielles (Shanmugavel et *al.*, 2016). Le revenu global du marché des enzymes de protéase est attendu être évalué à 3 milliards de dollars américains d'ici 2024 (rapport d'analyse de l'industrie 2021-2026).

2.3 Définition et rôle des protéases

Les protéases, également appelées protéinases ou enzymes protéolytiques (Chee Kuan Ooi et *al.*, 2021). Elles appartiennent de la classe des hydrolases et de sous-classe des hydrolases peptidiques ou peptidase (Barrett, 1994). Ces biocatalyseurs constituent une classe d'enzyme qui possèdent une fonction spécifique dans l'hydrolyse des protéines (Ibrahim et *al.*, 2021).

La fonction principale est le clivage des protéines en fragments plus petits. En raison de leur diversité structurelle et fonctionnelle, ces enzymes remplissent de nombreuses fonctions, notamment la formation ou le recyclage de protéines intracellulaires, la digestion des nutriments et la formation en cascade du système immunitaire (Ravi et *al.*, 2021) (Figure 3).

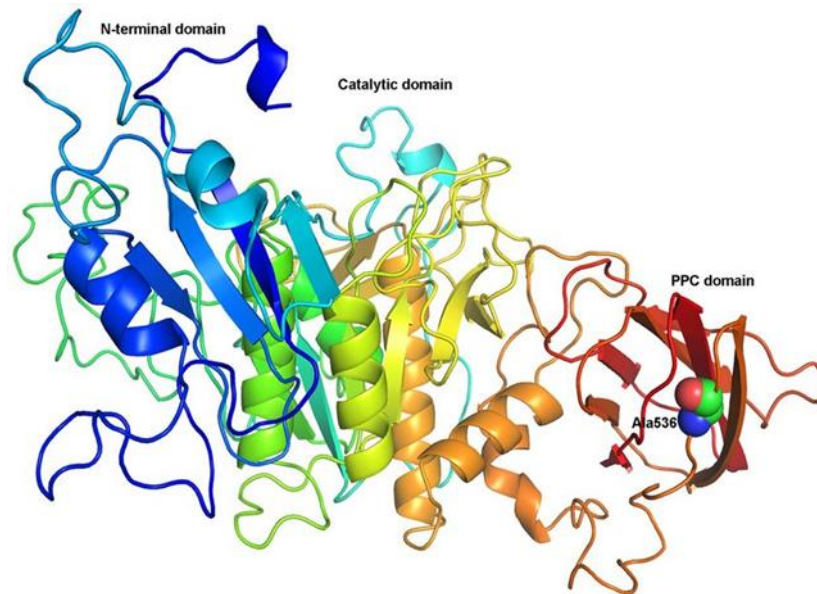


Figure 3 : La structure de la sérine protéase (Cheng et *al.*, 2018).

2.4 Les origines des protéases

Les protéases comme le reste des enzymes, proviennent de diverses sources : végétales, animales et microbiennes, sont représentées dans la Figure 3.

2.4.1 Protéase d'origine végétale

Ces protéases végétales exigent la présence du groupe $-SH-$ libre dans leur site actif (cystéyl-protéase). Les plus connues pour leur intérêt technologique sont la papaïne, la broméline et les kératinases (Sawant et *al.*, 2014). La papaïne est produite à partir de la papaye (*Carica papaya*) elle a des propriétés de la coagulation du lait et la digestion des protéines avec une large gamme de pH. Alors que la broméline est obtenue à partir des tiges et des jus d'ananas (*Ananas comosus*). D'après les travaux de Chanalia et *al.*, 2011 la broméline peut contrôler efficacement la croissance des cellules tumorales . Les kératinases sont produites à partir de groupes botaniques des plantes, qui sont utilisées pour l'épilation, la digestion de la laine et des cheveux (Rao et *al.*, 1998) .

2.4.2 Protéase d'origine animale

Les protéases les plus connus d'origine animale sont la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine. Ceux-ci sont préparés sous forme pure en grande quantités. Mais, la production de ces enzymes dépend de la disponibilité du bétail, qui est gouverné par la politique et les bris d'agriculture (Mala, 1998).

La trypsine est la principale enzyme digestive dans l'intestin qui hydrolyse les protéines alimentaires. La chymotrypsine se trouve dans les produits excréteurs du pancréas est une enzyme coûteuse et est utilisée dans les applications analytiques et diagnostiques.

La pepsine est présent dans l'estomac, la pepsine n'était utilisée que dans les détergents, qui sont maintenant remplacés par une combinaison de les protéases microbiennes (métal) et la serine, qui deviennent résistantes à la dégradation par les conditions alcalines, les détergents et des températures élevées (Adinarayana et al., 2002).

2.4.3 Protéase d'origine microbienne

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).

Ces enzymes sont préférées en raison de la facilité de production, d'extraction et de purification avec moins de coût et de temps (Niyonzima et al., 2015) (Figure 4).

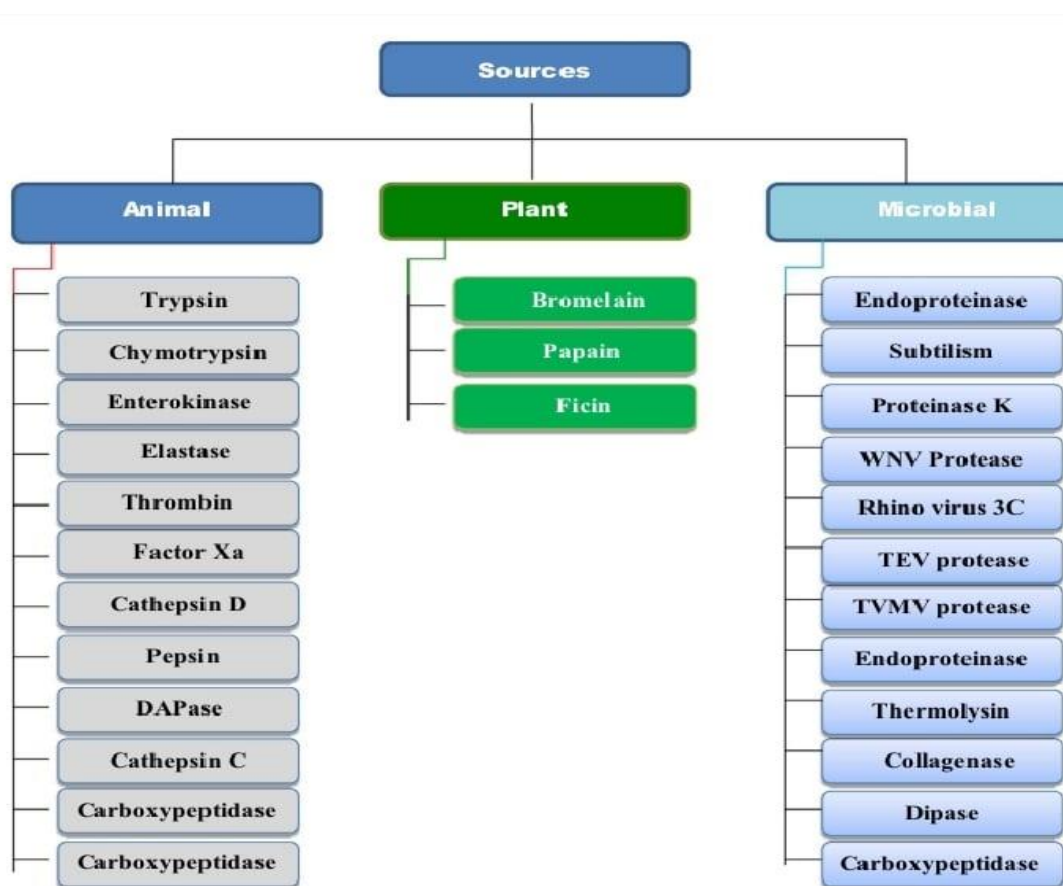


Figure 4 : Protéases produites à partir des différentes sources (Muhammad et al., 2020)

2.5. Classification des protéases

Les protéases peuvent être classées selon trois types de classifications, soit en fonction du pH, soit selon le mode d'action ou selon la nature des résidus impliqués dans le site actif. Dans le premier type on distingue:

Les protéases acides, alcalines et neutres sont les trois classes de protéases en fonction de leur activité acido-basique (Rupali et *al.*, 2015). Les champignons sont les seuls organismes qui produisent des protéases acides, qui ont une gamme de pH d'environ 2,0 à 5,0. Elles ont une plage de pH d'environ 7,0 à 8,0 et sont souvent dérivés de plantes ; tandis que la protéase alcaline et produite par les bactéries a un pH supérieur à 8 (Alnandi ,2012).

Selon leur site d'action, les protéases peuvent être classées en deux groupes exopeptidases et endopeptidases (Sethia, 2016).

A). Les exopeptidases

Agissent uniquement à proximité des extrémités des chaînes polypeptidiques. En distingue les amino-peptidases agissant sur la liaison peptidique N-terminale et les carboxypeptidase clivant la liaison peptidique C-terminale (Monteiro, 2015; Kiran, 2016) :

Amino-peptidases (CE 3.4.14) agissent à une extrémité N-terminale libre de la chaîne de polypeptide et libèrent un résidu d'acide aminé unique, dipeptide, ou d'un tri-peptide. (Monteiro et *al.*, 2015)

Carboxypeptidases agissent à extrémité C-terminale de la chaîne polypeptidique et libèrent un seul acide aminé ou un dipeptide. Il peut être divisés en trois grands groupes, serine peptidases (EC 2.4.16), métallo-peptidases (CE 2.4.17), et les cystéines peptidases (EC 2.4.18), basée sur la nature des résidus d'acides aminés au niveau du site actif des enzymes (Monteiro, 2015).

B). Les endopeptidases

Sont caractérisés par leur action préférentielle au niveau des liaisons peptidiques dans les régions internes de la chaîne de polypeptide (Monteiro, 2015) (Figure 5).

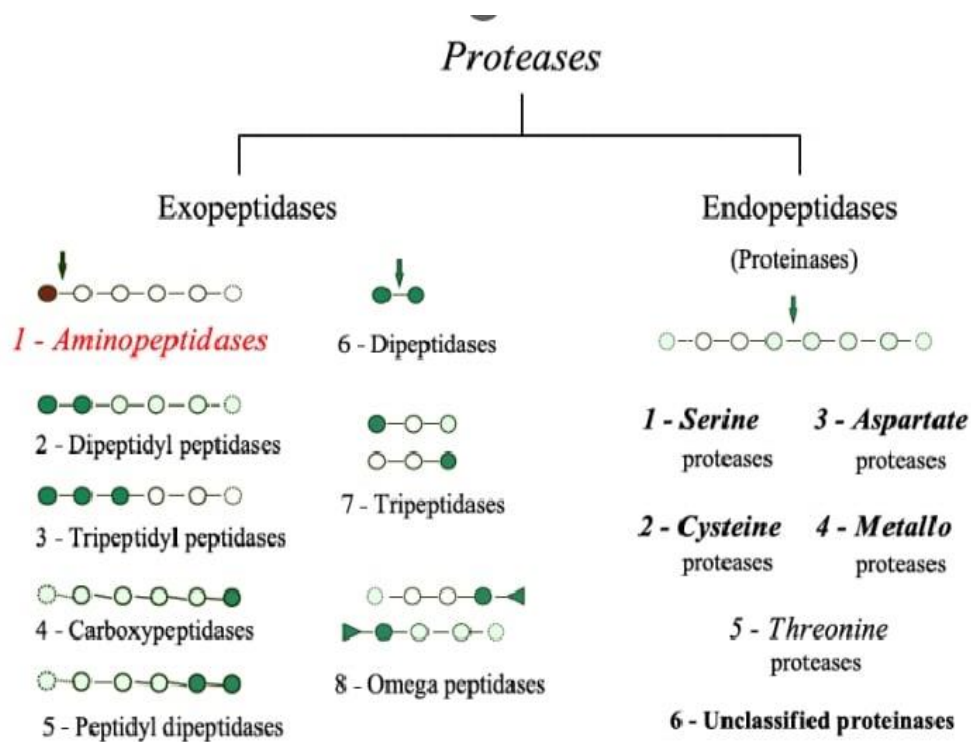


Figure 5 : Les différentes familles des protéases (Monir ,2017).

Le troisième type classe les protéases sur la base de la nature des résidus impliqués dans le site actif. Ainsi, on distingue quatre groupes : protéases à sérine, protéases à cystéine, aspartyl-protéases et métallo-protéases (Jermen Mamo et Fassil Assefa ; 2018).

Protéases à sérines (EC 3.4.21)

Les sérine protéases sont une classe d'enzymes protéolytiques polyvalentes .Elles sont nécessaires au catabolisme des protéines, au renouvellement intracellulaire des acides aminés et à la régulation des protéines impliquées dans divers processus moléculaires et cellulaires à travers les taxons (Rungaroon W et *al.*, 2021) .

Protéases à cystéine (EC 3.4.22)

Les protéases qui utilisent un résidu d'acide aminé cystéine pour hydrolyser les liaisons peptidiques dans les protéines sont appelées protéases à cystéine. Ces protéases sont présentes dans tous les microorganismes. Comme les chiffres l'indiquent, les protéases à cystéine sont diverses et remplissent diverses fonctions, de la dégradation en masse pour maintenir l'homéostasie des protéines au clivage précis pour activer ou faire mûrir les protéines substrats (Sijwali M et *al.*, 2021).

Les aspartyl proteinases (EC 3.4.23)

Les aspartyl proteinases sont des endopeptidases ayant deux résidus d'acides aspartiques

(Asp32 et Asp215) dans leur site actif vital pour leur activité catalytique (Yegin *et al.*, 2011)

Elles sont communément appelée protéases acides (MB Rao *et al.*, 1998). Ces dernières sont classées en trois familles : la pepsine (A1), la rétropepsine (A2) et les enzymes des pararétrovirus (A3) . La plupart des protéases aspartiques (Aps) présentent la meilleur activité à faible pH (pH 3 à 4) et ont des points isoélectriques sur une gamme de pH de 3 à 4,5 (MB Rao *et al.*, 1998).

Les métalloprotéases (EC 3.4.24)

Ce sont des protéases très diversifiés. Elles contiennent des enzymes de différentes origines, telles que les collagénases. Pour leurs actions, elles ont besoin d'ion métallique divalent le plus souvent le zinc, elles exigent du calcium pour leur stabilité (Weron et Divol, 2014).

2.6. Mécanisme d'action des protéases

2.6.1 Protéases à sérines

Le polypeptide s'insère dans la protéase à sérine de telle manière que le groupement carbonyle soit proche de la sérine. Le groupement OH de la sérine attaque le groupement carbonyle et l'azote de l'histidine accepte le OH de la sérine. Une association enzyme-substrat intermédiaire tétraédrique se forme. Puis, l'enzyme est acylée et le premier produit d'hydrolyse est libéré. Dans une réaction finale l'enzyme est décalée et l'extrémité C-terminale est libérée (Lopez, 2008) (Figure 6).

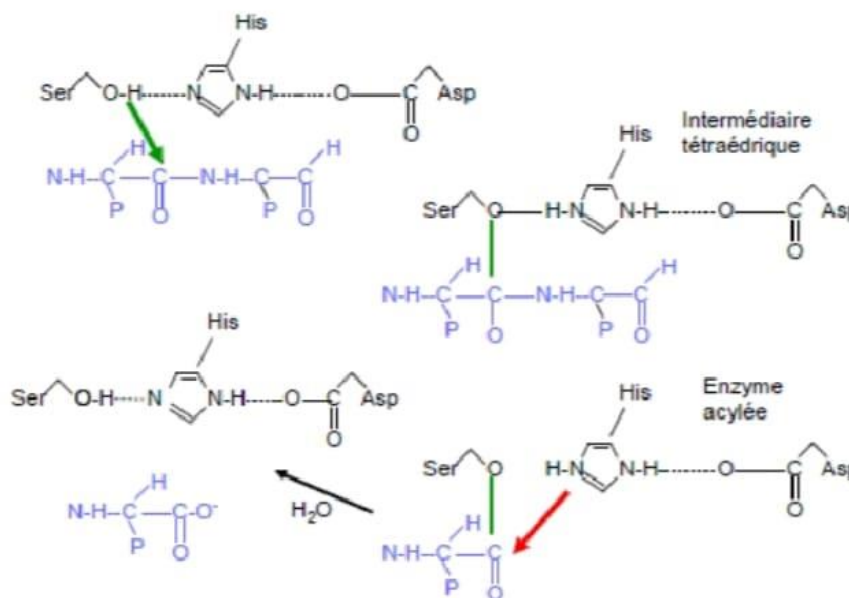


Figure 6: Mécanisme réactionnel des peptidases à sérine (Lopez, 2008).

2.6.2 Cystéylprotéases

Le premier pas du mécanisme catalytique des cystéylprotéases est la déprotonation d'un groupement thiol dans le site actif de l'enzyme, réalisé par une acide amine adjacente possédant une chaîne latérale basique (souvent c'est une histidine). Le deuxième pas consiste en une attaque nucléophile du soufre anionique de la cystéine sur le groupe carbonyle du substrat.

Dans cette étape, un fragment du substrat est libéré (Figure 7). L'histidine dans la protéase est restaurée sous sa forme déprotonnée et un intermédiaire thioester lie l'extrémité carboxy-terminale du substrat à la cystéine. La liaison thioester est hydrolysée pour générer un acide carboxy-terminal et l'enzyme est restaurée (Lopez, 2008).

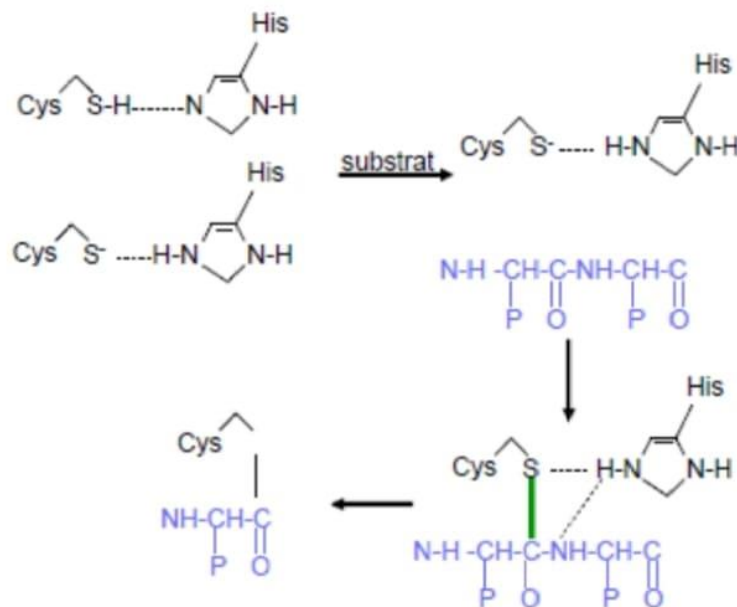


Figure 7: Mécanisme réactionnel des peptidases à cystéine (Lopez, 2008).

2.6.3 Aspartyl protéases

Le mécanisme d'action des aspartylprotéases est généralement de type acide-base, basé sur la coordination d'une molécule d'eau entre les deux aspartates du site actif (Figure 8). Un aspartate active la molécule d'eau par soustraction d'un proton. Cette activation de la molécule d'eau permet une modification du carbone carbonyle du substrat dans la liaison à cliver générant un oxyanion intermédiaire. C'est le réarrangement de cet oxyanion qui permet le clivage (Lopez, 2008).

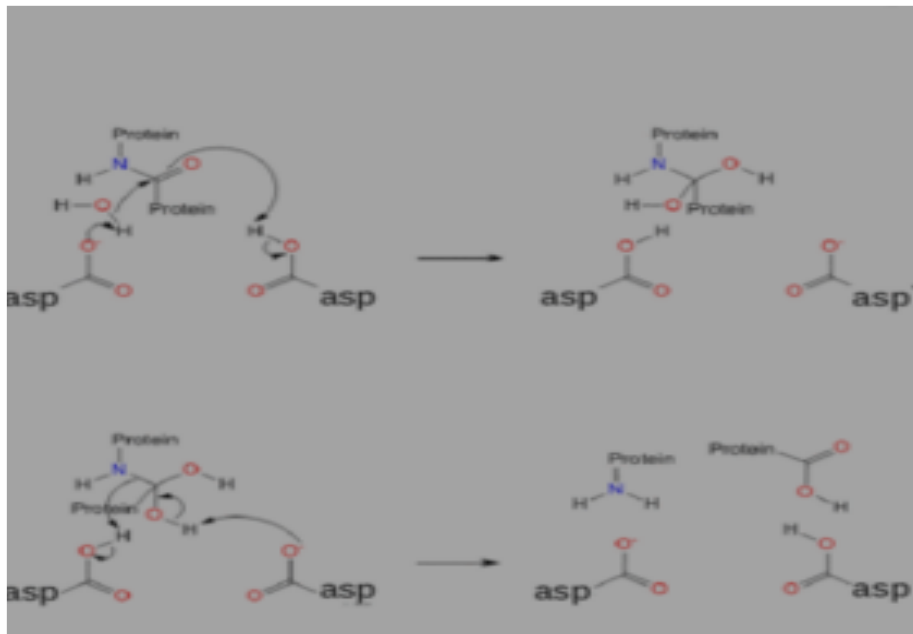


Figure 8: Mécanisme réactionnel des protéases acides (Chabriere ,2010).

2.6.4 Métalloprotéases

Le mécanisme d'action des métalloprotéases se fait en trois étapes :

A) L'histidine est rendu plus basique grâce à l'acide aspartique (protéase a serine). L'histidine active une molécule d'eau qui attaque la liaison peptidique.

B) Le zinc stabilise l'état intermédiaire SP3 et négatif (stabilisation de l'oxyanion). La partie C terminale se dissocie et le proton de l'histidine est transféré vers l'azote de la liaison peptidique.

C) L'azote N-terminale est basique, le groupe carboxylique C-terminale est acide. Comme la réaction est rapide, il y a échange de protons entre ses deux groupes (Figure 9).

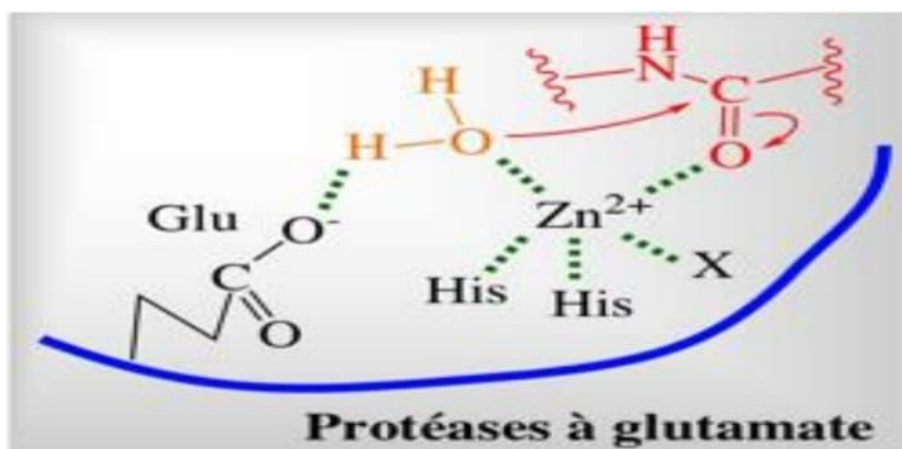


Figure 9: Mécanisme réactionnel des métalloprotéases (Chabriere, 2010).

2.7 Les Applications des protéases

La demande mondiale des enzymes augmente de 6,4 % par an et les protéases représentent la plus grande enzyme exploitée commercialement, ainsi placée en tête de la liste des enzymes d'importance industrielle (Dumorné et *al.*, 2017).

Seuls quelques exemples des applications industrielles des protéases sont décrits ci-dessous.

- **Industrie des détergents**

Les enzymes sont l'élément important des détergents en poudre et liquides, de l'élimination des taches de lessive, des détergents pour le lave-vaisselle automatique, produits de nettoyage médicaux. Les protéases sont l'un des ingrédients les plus importants de toutes sortes de détergents allant des produits ménagers blanchissage aux réactifs utilisés pour le nettoyage des lentilles de contact ou dénature. Les enzymes améliorent l'efficacité des détergents pour les protéines retrait des vêtements souillés de sueur, d'herbe, de lait, d'œuf, de sang, etc (Patel et *al.*, 2018).

- **Industrie du cuir**

L'utilisation de protéases comme alternative aux produits chimiques dangereux tels que le sulfure de sodium s'est avérée efficace pour améliorer la qualité de cuir et réduire la pollution de l'environnement. Les tanneries sont responsables de la pollution de l'environnement. Par conséquent, l'utilisation d'enzymes d'hydrolyse de type protéase dans le traitement du cuir est un processus respectueux de l'environnement qui est moins nocif que les autres processus (Kumar et *al.*, 2018 ; Singh et Bajaj , 2017).

- **Brasserie**

En brasserie, les protéases microbiennes ont deux applications principales. Elles peuvent être utilisées pendant le processus de brassage des céréales pour augmenter le rendement en extrait le taux d'azote -aminé de la verrière produite. La protéase est utilisée dans les étapes de la production de bière , bien que la papaïne, la bromélaïne et la pepsine soient les protéases utilisées dans la protection contre le processus à froid . Les protéases de *Streptomyces fradiae* sont utilisées avec succès pour clarification de la bière (Ami et *al.*, 2019) .

(Ami et *al.*, 2019) .

- **Industrie Agro-alimentaires**

Les protéases sont ajoutées à l'hydrolyse de la caséine kappa pendant la production de fabrication du fromage à partir du lait, pour empêcher la coagulation alors que la stabilisation de la formation de micelle. Dans l'industrie de la boulangerie pour accélérer préparation de pâte son gluten est partiellement hydrolysé par une protéase fongique thermolabile. Préparation d'hydrolysats de protéines à haute valeur nutritionnelle a été obtenue par l'ajout de protéases microbiennes (Abdul Razaaq et *al.*, 2019).

Tableau 3 : Applications industrielles des protéases :(un bilan sur la production de protéase 2021).

Industrie	Enzyme	Application
Détergent	Protéases alcalines	Détergent à lessive pour l'élimination des taches (aliments, sang, sécrétions corporelles)
Cuir	Trypsine Protéases alcalines	L'élimination des protéines non fibrillaires telles que l'albumine et les globulines, dans le prêtannage du cuir .
Laitier	Chymosine	Fabrication de fromage.
Alimentaire	Pepsine	La production du pain, des hydrolysats de soja.
Brasserie	Papaïne	Résistance au froid, élimination de la brume dans les boissons.
Pharmaceutique	Curcain	Agent de cicatrisation des plaies.

3. Fermentation

3.1 Fermentation à l'état solide (FMS)

La fermentation solide est un processus de fermentation dans lequel les micro-organismes se développent sur un matériau solide et humide dans des conditions contrôlées, sans présence d'eau libre ou avec une quantité minimale d'eau. Des matériaux inertes ou non inertes peuvent être utilisés comme substrat solide dans les procédés FMS (Gordana Šelo et *al.*, 2021)

La fermentation à l'état solide peut être définie comme un processus dans lequel des particules solides, avec une phase gazeuse inter-particulaire continue, agissant comme substrat, ou comme support solide à la croissance des micro-organismes, en l'absence d'eau libre (Lopez et *al.*, 2020). Elle produite naturellement par exemple la décomposition de la matière organique solide, les humains sont profitées de la FMS pour la production d'aliments et de boissons tels que dans le cas du pain, du fromage, de la sauce soja ou de le cacao et sa transformation du café (López et *al.*, 2021).

3.1.1 Micro-organismes utilisés dans la FMS

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

Les bactéries sont principalement impliquées dans le compostage, l'ensilage et les procédés alimentaires. Les levures sont utilisées pour la production d'éthanol et dans l'alimentation animale ou humaine. Mais les champignons filamenteux restent le groupe de microorganisme le plus utilisé en fermentation solide avec des applications très variées, grâce à leurs propriétés physiologiques, enzymologiques et biochimiques. Ils sont considérés comme les mieux adaptés à ce type de cultures, car proches de leur habitat naturel. Les différents genres fongiques utilisés dans ce processus de fermentation sont : *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Trichoderma* et certaines espèces de *Penicillium* (Mitchell et *al.*, 2019) .

3.1.2 Facteurs influençant le processus de FMS

Ils existe plusieurs facteurs influençant le processus de FMS sont : l'humidité, l'inoculum, le pH , la température et la concentration d'oxygène , on ajout source de carbone et/ou d'azote et ajout

d'une enzyme spécifique inducteurs pour la croissance des micro-organismes et la production d'enzymes extracellulaires (GordanaŠelo et *al.*, 2021).

3.1.3 Substrats utilisés dans la FMS

Le choix du substrat est généralement déterminé par son coût et sa disponibilité, sa composition et son aptitude à être converti en un produit particulier par des voies biochimiques. Selon l'objectif (production de l'enzyme souhaitée, production des composés phénoliques, acides organiques ou autre produit de valeur souhaite, utilisation pour la production de biocarburants, utilisation pour la transformation des aliments pour animaux), il est important de connaître la composition du substrat et de sélectionner le micro-organisme approprié. Si le substrat ne contient pas les quantités requises de nutriments, certains macro et micronutriments sont ajoutés pour la croissance optimale des micro-organismes (Farinas et *al.*, 2015, Soccol et *al.*, 2017).

Macronutriments (carbone, azote, oxygène, hydrogène, soufre, phosphore, Mg 2+ et K +) sont nécessaires à des concentrations supérieures à 10^4 M, alors que le carbone au milieu de croissance est la principale source d'énergie.

Microéléments (Mo 2+, Zn 2+, Cu 2+, Mn 2+, Ca 2+, Na +) et vitamines, hormones de croissance et métabolisme des précurseurs sont nécessaires en concentration inférieure à 10^4 M (Behera et *al.*, 2019).

3.1.4 Les avantages et les inconvénients de la FMS

Les différents avantages et inconvénients sont résumés dans le tableau suivant : (Rodriguez Couto, S et *al.*, 2008 , Jain, A., 2013 , Behera et *al.* ,2019 , José et *al.* ,2021)

Tableau 4 : les différents avantages et inconvénients de la FMS.

Les avantages	Les inconvénients
L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation.	Les microorganismes utilisés sont limités
productivité plus élevée, coût moindre (grâce à l'utilisation de résidus agro-industriels bon marché comme substrats).	Il est pratiquement difficile d'assurer le contrôle direct des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration des

	nutriments, assez aléatoire
utilisation moindre de produits chimiques, moins de production de déchets et moins de consommation d'énergie.	Les microorganismes étant inséparables du substrat, l'estimation de la biomasse est Délicate.

3.2 Fermentation à l'état liquide (FML)

Fermentation liquide utilise des substrats liquides à écoulement libre, tels que la mélasse et le bouillon. Cette technique de fermentation est la mieux adaptée aux micro-organismes tels que les bactéries, les moisissures et les levures qui nécessitent une teneur en humidité élevée. Un avantage supplémentaire de cette technique est que la purification des produits est plus facile (Subramaniyam R et al, 2012, Azzouz 2016, Liu 2016). La fermentation immergée est généralement effectuée à la vue d'un liquide libre dans lequel des substrats solubles sont dispersés, et constitue la technologie la plus couramment utilisée pour l'énorme gamme de production d'enzymes (Namnuch et Thammasittirong , 2020).

Tableau 5: Comparaison entre les caractéristiques FMS et FML telles que décrites par plusieurs auteurs (De Castro et al 2015, Costa et al 2018, Leite, P et al 2020).

	Fermentation en milieu solide	Fermentation en milieu liquide
Température	-Contrôle compliqué (transfert de chaleur limité par le support, l'air et l'absence d'eau libre) . - Risque de formation de gradients dans le milieu.	-Contrôle aisé. - Température homogène .
PH	- Contrôle compliqué - Régulation partielle possible (ajout de solutions acides ou basiques, utilisation de systèmes tampon : solutions, supports au pouvoir tampon)	- Contrôle aisé - Régulation par l'ajout de solutions acides ou basiques

Aération	<ul style="list-style-type: none"> - Absente, discontinue ou continue - Contrainte de cisaillement limitée - <p>Peut limiter l'hétérogénéité du milieu</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessaire (homogénéisation du milieu + aération pour les cultures aérobies) - Contrainte de cisaillement importante (limitation des souches cultivables) - Problème lié à la rhéologie des milieux (nature du substrat + culture de moisissures)
Antimousse	- Pas nécessaire	- nécessaire
Stérilisation	<ul style="list-style-type: none"> - Possibilité de travailler en condition non stérile ou semi stérile du fait de la faible Aw (limitation des contaminants et de leur développement) et une fois l'implantation de la souche réalisée - - Risque de contamination limité, principalement pour les souches à croissance lente et surtout par d'autres champignons - Prétraitement par cuisson ou traitement à la vapeur pour éliminer les principaux contaminants (flore autochtone) 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessaire - Risque de contamination élevé
Type de culture	- Culture principalement en batch	- Cultures en batch, en fed-batch ou en continues
Microorganisme	<ul style="list-style-type: none"> - Favorable aux organismes pluricellulaires et/ou aux organismes adaptés à une faible Aw et une forte pression osmotique (champignons) 	<ul style="list-style-type: none"> - Favorable aux organismes unicellulaires (bactéries, levures) - Favorable aux souches mutées ou modifiées génétiquement

	<p>filamenteux, supérieurs)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Favorable aux souches sauvages - Culture pure et possibilité de cultures mixtes avec synergie des métabolismes - Culture hétérogène - Inoculation en conidies ou en mycélium 	<ul style="list-style-type: none"> - Cultures pures, peu favorable aux cultures mixtes - Culture homogène - Inoculation en cellules ou en volume de culture
Produit	<ul style="list-style-type: none"> - Productivité élevée (rendement similaire ou supérieur et/ou temps de culture plus court que pour la FML) - Performances accrues : stabilité plus élevée (T, pH même extrême), optimum plus large (T, pH), résistance à l'inhibition, affinité pour le substrat - Expression de molécules inédites (profil protéique riche) - Produit fermenté concentré si utilisation directe et donc pas de nécessité de concentration (liquide) 	-Produit (très) dilué .
Répression catabolique ou dégradation par des protéases	- Faible ou inexistant	-Elevée

Milieu de culture	<ul style="list-style-type: none"> -Hétérogène. - Matière première abondante et bonmarché. - Polymères solides insolubles. - Prétraitement limité ou inexistant(déchets agricoles). - Quantité de substrat importante(concentration élevée, mais problème dediffusion des nutriments ; risque d'une concentration élevée en inhibiteurs). - Quantité d'eau limitante. - Quantité d'air non limitant. 	<ul style="list-style-type: none"> -Homogène (souche, nutriments, métabolites) - Matière première coûteuse. - Soluble ou sous forme de fines particules en suspension. - Prétraitement parfois nécessaire. - Quantité de substrat limitée (faible concentration). - Quantité d'eau non limitante. - Quantité d'air limitante.
--------------------------	---	--

Tableau 6 : Les protéases produites par FMS avec les substrats et les microorganismes utilisés.

Enzyme	Microorganisme	Substrat	Référence
Protéase	Bacillus halodurans	Son de blé	Alagumala <i>et al</i> ., 2021
Protéase alcaline	Bacillus spp	Farine de blé	Kanupria <i>et al</i> ., 2017
Protéase à serine	Mucor subtilissimus	So de blé	José <i>et al.</i> , 2020
protéase	Aspergullus spp	La vermiculite	Alexander <i>et al.</i> , 2020
Protéase neutre	Aspergillus oryzae	Son de blé	Pandey <i>et al.</i> , (2008)

4. Son de blé

4.1 Définition

La consommation de blé devrait s'accroître à l'échelle mondiale d'ici 2028 pour atteindre environ 330 millions de tonnes et continuera d'être destinée principalement à l'alimentation humaine (OCDE-FAO, 2019). Selon Onipe et *al.*, (2015) , le grain est composé de 13 à 17% de son, de 2 à 3% de germe et de 80 à 85% d'endosperme riche en amidon, Les couches externes sont toutes des parties du son .

4.2 Composition chimique

La composition biochimique du son de blé industriel comprend de 22 à 25% de (glucurono) arabinoxylyanes , de 14 à 17% de protéines, de 7 à 11% de cellulose, de 3 à 10% de lignine, des β -glucanes à liaisons mixtes et de 11 à 30% d'amidon résiduel selon le mode de fractionnement. Au total, les polysaccharides hors amidon représentent environ 46% du son de blé industriel, dont près de 70% sont des (glucurono) arabinoxylyanes (Chalamacharla et *al.*, 2018).

Aussi, le son de blé est riche en minéraux tels que le fer, le zinc, le manganèse, le magnésium et le phosphore, et aux vitamines, beaucoup de composés bioactifs et volatils avec des avantages pour la santé (Tableau 7) (Chalamacharla et *al.*, 2018).

Tableau 7 : La composition chimique du son de blé (Biswas et *al.* , 2019).

Composant	pourcentage%
Amidon	10 à 20 %
Polysaccharides non amylacés	41 à 60%
Protéines	15 à 20%

4.3 Utilisation du son de blé dans l'industrie alimentaire

Dans l'industrie alimentaire, le son de blé est utilisé comme alternative des substrats synthétiques utilisés dans le processus de fermentation (Pandey, 1992) ainsi que dans la production d'enzymes et de métabolites secondaires (Prückler et *al.*, 2015).

Cependant, l'application principale du son de blé concerne la nutrition animale : en raison de ses propriétés nutritionnelles, il permet d'améliorer la qualité nutritionnelle des produits alimentaires de source animale (Coda et *al.*, 2014) (Figure 10).

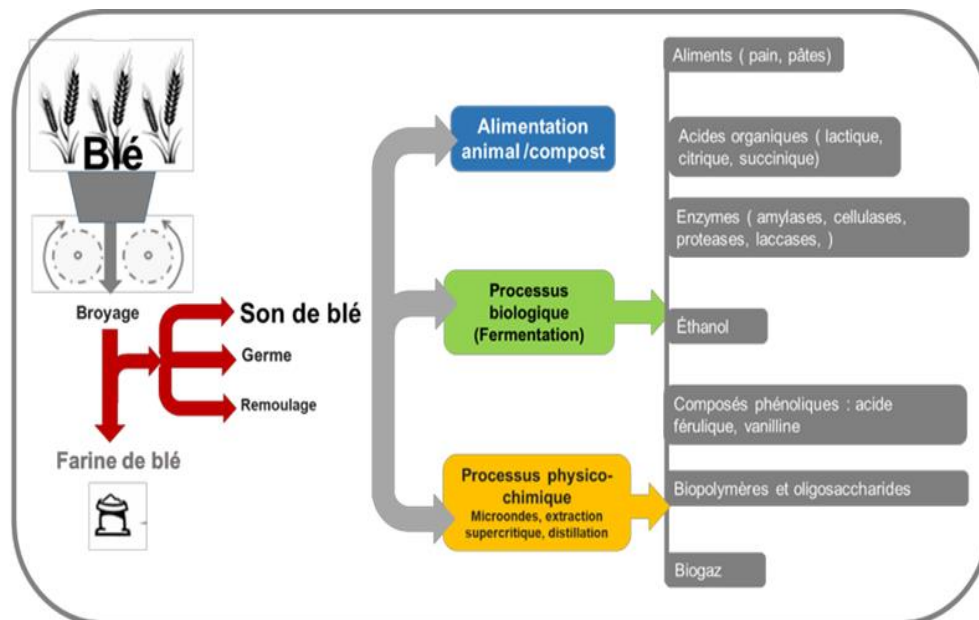


Figure 10 : Les différents produits du son de blé (l'auteure, 2020).

5. Avoine

5.1 Définition

Les flocons d'avoine sont issus de la transformation de la graine d'avoine et particulièrement consommés dans les pays de culture anglo-saxonne agrémentés de lait (Plumey 2021). L'avoine est une des meilleures céréales pour la santé. Naturellement sans gluten, riche en vitamines, en minéraux, en fibres, et en antioxydants (Anais, 2021). En Algérie, l'avoine est classée en quatrième position avec une superficie moyenne de l'ordre de 68095,5 ha après le blé dur qui occupe une superficie moyenne de 1314014 ha très importants par rapport aux autres céréales, et à la surface destinée à la céréaliculture (Direction des Services Agricoles 2016) (Figure 11).



Figure 11 : les Flocons d'avoines cultivées (Al Yasmina 2021).

5.2 Classification

L'avoine est un grain de céréale de la famille des Graminées (Poaceae), sous-famille des pooideae.

Règne : Plantae

Sous-Règne : Tracheobionta

Subdivision : Spermatophia

Division : Mangoliophita

Classe : Liliopsida : Monocotilidone

Sous -classe : Commelinidae

Ordre : Cyperales

Genre : Avena

(Arendt et Zannini , 2013).

5.3 Composition nutritionnelle

La graine d'avoine contient un large éventail de composés bénéfiques pour la santé et la nutrition humaines (Gulvady et *al.*, 2013) . Elle est une riche en des lipides bénéfiques, des fibres solubles, des protéines et des antioxydants (Malachie et al .,2021). Elle est largement considéré comme un aliment sain en raison de sa teneur élevée en fibres solubles, est un principale céréale améliore la santé cardiovasculaire et aide à gérer la glycémie (Kale et *al.*, 2013). L'avoine est

également une bonne source des protéines (12,4 à 24,5 % du poids des graines), d'huiles (3 à 11 %), des vitamines et des minéraux (Gulvady et *al.* ,2013).

5.4 Types d'avoines cultivées

Ils existe plusieurs types d'avoines représentant *Avena fatua* , *Avena nuda* , *Avena sativa* , *Avena sterilis* , *Avena strigosa* , et le types le plus important *l'avena sativa* .

- *Avena sativa*

Avena sativa est une plante herbacée bisannuelle appartenant à la famille des Poacées. Ils sont l'une des cultures représentatives qui poussent dans des conditions climatiques fraîches et humide pour la consommation humaine et animale (Zhou et *al.*, 2019) (Figure 12) .



Figure 12 : Image montre l'espèce du genre *Avena sativa* (Ali meziani., 2014).

6. Méthodes d'optimisation

L'optimisation fait référence à l'amélioration du processus biochimique pour obtenir un produit fiable de manière écologique moins chère. Concevoir une production adaptée milieu et conditions (température, pH et temps d'incubation) est important pour améliorer la productivité et efficacité des métabolites microbiens bioactifs via des processus de fermentation (Naddem et Dimesh., 2016) . Il existe différent plans d'expériences utilisés pour la production de métabolites notamment les enzymes (Hamma et Saoudi, 2016).

6.1 Méthode OFAT (one factor at a time)

La méthode à un facteur à la fois (OFAT) est appliquée pour choisir le variable dynamique. Cette conception dépend de l'étude d'un facteur tout en mettant les autres variables constantes (Abou-Taleb et *al.*, 2018). C'est une approche structurée permettant d'étudier les effets de la modification simultanée des facteurs en limitant le nombre d'essais (Gallo,2017) .

Le facteur peut être : un paramètre physique ou nutritionnel important pour la régulation de la croissance du micro-organisme et son rendement en enzyme (Bhardwaj et *al.*, 2019).

6.2 Plan de Plackett-Burman 1946

Plackett Burman est une méthode de criblage très efficace identifier les facteurs significatifs parmi un grand nombre de facteurs qui influence un processus en utilisant quelques essais expérimentaux (Edulis et *al.* , 2020) . Ce plan permet d'étudier plusieurs facteurs à la fois tout en réduisant le nombre d'expériences et d'exprimer la production selon un modèle mathématique. Cette méthode est considérée comme un outil fiable, reproductible et économique ; elle est utilisée dans l'optimisation de la production de différentes enzymes comme l' α -amylase par *Aspergillus oryzae* et *Rhizopus oryzae* (Francis et *al.*, 2003 ; Ait Kaki El-Hadef El-Okki et *al.*,2017), la chitinase par *Streptomyces griseorubens* (Gasmi et Kitouni, 2016) et les protéases par *Aspergillus oryzae* et *Bacillus subtilis* . Ces protéases sont produites sur des milieux de cultures à base de substrats naturels issus de déchets agricoles et des industries agroalimentaires (Belmessikh et *al.*, 2013 ;Sathishkumar et *al.*, 2015).

Ces matrices permettant d'évaluer l'influence de k facteurs à deux niveaux sur la réponse étudiée avec un nombre d'expériences N, tel que $N = k+1$, donc avec un minimum d'essais. Le plan d'expériences de Plackett et Burman est constitué de matrices carrées dites matrices d'Hadamard ne contenant que des éléments égaux à +1 ou -1, construites par permutation circulaire à partir d'un générateur de base (Tableau 8).

Tableau 8 : Générateur des matrices pour N=8, N=12, N=16, N=20, N=24 essais (Plackett et Burman (1946)).

N=8	+ + + - + - -
N=12	+ + - + + + - - - + -
N=16	+ + + + - + - + + - - + - - -
N=20	+ + - - + + + + - + - + - - - - + + -
N=24	+ + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - -

La signification de chaque variable sur la production de métabolite désiré est déterminée via le test-t de Student. Le niveau de confiance accepté est $(1 - \alpha) \geq 70\%$, qui est considéré par

plusieurs études (Castro et *al.*, 1992; Bennamoun et *al.*, 2004; Djekrif-Dakhmouche et *al.*, 2006). Il peut être égal à $(1 - \alpha) \geq 95\%$, comme c'est le cas dans les travaux de (Hajji et *al.*, 2008; Reddy et *al.*, 2008).

6.3 Plan composite centré (CCD)

Chaque microorganisme possède ses propres conditions pour une production maximale du métabolite désiré. Donc, l'optimisation des composants du milieu doit être réalisée pour maintenir un équilibre entre les diverses composants, ce qui minimise la quantité des substances non utilisés à la fin de la fermentation (Naddem et Dimesh , 2016).

Le plan composite centré est un outil expérimental efficace permettant l'identification des facteurs effectifs, l'étude de leurs interactions et la sélection des conditions optimales d'un système multivariable.

Plusieurs rapports sur les plans composites centrés sont utilisés pour l'optimisation de la production plusieurs enzymes

- Production de la polygalacturonase par *Aurebasidium pullulans* (Bennamoun , 2017).
- Production de protéase par *Aspergillus oryzae* (Benkahoul et al 2017).
- Production de l'amylopullulanase par *Clavispora lusitaniae* ABS7 (Dakhmouche,2016).

Le plan composite centré est originalement introduit par Box et Wilson en 1951. Il est adopté pour déterminer les optima des variables significatives permettant la réponse maximale. Ce plan est formé de trois parties distinctes pour générer un nombre de traitements de combinaisons égal à $2k + 2.k + N$.

- Un plan factoriel à deux niveaux factoriels (-1, +1), habituellement fractionné à partir de k facteur, ce qui forme un plan factoriel complet $2k$.
- $2.k$ points en étoiles, avec des niveaux $(-\alpha)$ et $(+\alpha)$, La valeur du α est fonction du nombre de facteurs k.
- N répétitions du point central (niveau 0). La valeur de N est fonction du nombre de facteurs k.

Matériel et Méthodes

Cette étude est réalisée au niveau du Laboratoire d'Enzymologie et le Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications Université des Frères Mentouri Constantine.

Ce travail est divisé sur trois étapes :

1 ère étape : Identification de la levure sélectionnée pour la production de protéase.

2 ème étape : Conduite de la fermentation et optimisation des conditions de culture.

3 ème étape : L'analyse statistique des résultats.

1 Matériel biologique

1.1 Isolement des levures

La levure utilisée dans cette étude est *Candida sp* isolée de pelure de pomme de terre et conservée dans la Mycothèque du Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications université Mentouri .

1.2 Identification de la levure par la galerie API ID32C

La galerie ID 32C est un système standardisé pour l'identification des levures, contenant 32 tests d'assimilation miniaturisés.

- Principe de la galerie API

La galerie 32C comporte 32 cupules contenant chacune un substrat carboné sous forme déshydraté, remplies d'un milieu semi-solide (API C Medium) préalablement inoculé.

Quelques colonies sont transférées dans de l'eau distillée stérile jusqu'à une opacité Mac

Farland 2. 250 µl de cette suspension sont transférés dans une ampoule de milieu semi-solide

API C fournie par le fabricant. Après homogénéisation, chaque cupule de la galerie est inoculée par 135µl de milieuensemencé. La galerie recouverte d'un couvercle est mise à

incuber à 30°C pendant 48h.

Des lectures visuelles sont réalisées après 24 h d'incubation. La présence éventuelle d'un trouble est notée après comparaison au contrôle (O) (position 1.F sur la galerie).Une

cupule plus trouble que le témoin indique une réaction positive et la fermentation du composé.

La composition de la galerie et le mode opératoire sont présentés en Annexe. Les résultats obtenus de l'API 32C sont interprétés en utilisant le téléchargement d'APIWEB fourni par le fabricant.

1.3 Préparation de l'inoculum

La souche levurienne est repiquée sur un milieu YPGA (Annexe 1). 50 ml de YPGA sont réparties en erlen-meyers de 250 ml. Le milieu est ensuiteensemencé avec une souche pure et incubée à 30 °C pendant 48 h, 25 ml d'eau distillée stérile sont ajoutées et les cellules sont homogénéisées par agitation manuelle.

1.4 Dénombrement

Le dénombrement des cellules s'effectue par comptage direct à l'aide d'une cellule de Thoma (0.1 mm, 1/400 mm^2).

2 Méthode de fermentation

2.1 Fermentation sur milieu solide

La fermentation est réalisée sur milieu solide à base de son de blé, d'avoine et de mélange d'avoine et de son de blé.

Les cultures sont réalisées dans des Erlen-meyers de 250 ml à raison de 5 g de substrat avec un taux d'humidité de 60 % d'eau distillée. Les Erlen-meyers sont ensuite stérilisés à 121 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement du milieu les Erlen-meyers sont inoculés avec une suspension de levure à raison de $4 \cdot 10^6$ cellules/ml, et incubés à 30 °C pendant 48 h.

2.1.1 L'extraction des enzymes protéolytiques

Après fermentation, une quantité de 2.5 g de substrat fermenté est mélangée avec 25 ml de solution de Tween 80 (0.02 %) le mélange est mixé pendant 2 minutes et centrifugé à 10000 tour / min à 4 °C pendant 20 minutes (Demir et Tari , 2014). Le surnageant obtenu constitue l'extrait enzymatique brut, il est conservé au congélateur et sert pour l'analyse des activités protéolytiques.

2.1.2 Détermination de la matière sèche

La matière sèche est déterminée par séchage d'un échantillon de 2.5 g introduit dans une boîte de pétri en verre séchée et placée dans une étuve à 30°C jusqu'à poids constant.

2.2 Fermentation sur milieu liquide

La fermentation est réalisée sur milieu liquide à base de son de blé, d'avoine et de mélange d'avoine et de son de blé.

Les cultures sont réalisées dans des Erlen-meyers de 250 ml à raison de 5 g de substrat sont mis un volume de 200 ml d'eau distillées et bien mélangées à l'aide de l'agitateur magnétique pendant 30 minute à 50 °C, ensuite son filtrées à travers un entonnoir avec deux couches de papier filtre, 50 ml de la solution sont prélevées dans des Erlen-meyres de 250 ml.

Ensuite stérilisés à 121 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement du milieu les Erlen-meyers sont inoculés avec une suspension de levure à raison de 4×10^6 cellules/ml et incubés dans un Shaker à 30 °C avec une agitation de 150 rpm/min pendant 48 h.

2.2.1 Séparation des enzymes protéolytiques

Après incubation les échantillons sont centrifugés à 10000 tours/mn pendant 20 minutes le surnageant est récupéré pour le dosage de l'activité protéolytique.

3. Méthodes des dosages

3. 1. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est dosée selon la méthode décrite par Auberger et *al.*, 1995 et

Modifiée par Mmechakra et *al* 1999 (Voir Annexe 4).

Le principe de la réaction est le suivant. Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines et des polypeptides pour les transformer en fragments protéiques plus courts (polypeptides,

Peptides simples et acides aminés libres). Le TCA permet la précipitation des fractions

Insolubles. La filtration permet de récupérer les fractions solubles, dont des groupements de

tyrosine. La présence de tyrosine dans le filtrat est traduite en activité protéolytique par un

Dosage colorimétrique selon la méthode d'Anson, (1938), à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu. Celui-ci réagit avec ces groupements et avec le tryptophane pour donner par Réduction un complexe bleu.

L'activité enzymatique est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard avec des concentrations comprises entre 0 et 100 µg/ml (Voir Annexe 4).

Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1 µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par ml d'une solution d'enzyme avec comme substrat la caséine chaque dosage est effectué en double.

3.2. Dosage des protéines selon la méthode de Lowry (1951)

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et *al* (1965) dont le principe de base est Fondé sur la résultante de deux réactions. Dans le premier temps, la présence de sulfate de Cuivre en milieu alcalin entraîne la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et la liaison peptidique avec l'apparition d'une coloration violette proportionnelle à la quantité d'aminoacides présents dans le milieu (réaction de Biuret).

La deuxième réaction résulte de la réduction de la tyrosine et du tryptophane présents dans les protéines par le constituant actif du réactif de Folin-Ciocalteu l'acide phosphomolybdotungstique pour donner naissance à un complexe bleu (Voir protocole en Annexe 6).

La gamme étalon est établie à partir d'une solution de BSA avec des concentrations comprises entre 0 et 500 µg/ml (voir Annexe 6).

4. Méthode d'optimisation

L'optimisation des milieux de culture est réalisée en deux étapes : la première étape a pour but de sélectionner les paramètres (variables) ayant un effet positif sur la production de la protéase neutre en utilisant le plan de Plackett et Burman (1946). La deuxième étape permet de déterminer les optima des paramètres sélectionnés par le plan composite centré de Box et Wilson (1951).

4.1. Sélection des variables significatives par le plan d'expérience de Plackett et

Burman.

Le plan d'expérience de Plackett et Burman est constitué de matrice carrée ne contenant que des éléments égaux à +1 ou -1. Dans cette étude, la matrice employée étudie 11 facteurs pour 12 combinaisons (Tableau 8). Les facteurs de la dernière combinaison étant toujours pris au niveau (-1). Les concentrations réelles de l'ensemble des facteurs testés sont consignées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Matrice d'expérience de Plackett et Burman pour l'étude de 11 facteurs avec 12 Combinaisons.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

(+1) : niveau supérieur du facteur

(-1) : niveau inférieur du facteur

Tableau 10 : Les différents facteurs étudiés et leurs concentrations correspondantes.

Facteur	Code du facteur	Niveau (-)	Niveau (+)	Unité
Température	A	30	50	C°
Humidité	B	50	80	%
Inoculum	C	10 ⁵	10 ⁷	Cellules/ml
Erreur	D	-	-	-
Glucose	E	0	0.5	%
Corn steep	F	0	0.5	%
(NH ₄) ₂ SO ₄	G	0	0.5	%
Erreur	H	-	-	-
Nacl	I	0	0.1	g/l
Incubation	J	24	72	h
Erreur	K	-	-	-

4.2. Détermination des optima par le plan composite centré de Box et Wilson.

Le plan composite centré de Box et Wilson (1951) est adopté pour déterminer les optima des trois variables significatives permettant la production maximale de la protéase neutre par

Candida sp. Le plan est composé de trois parties distinctes générant un traitement des combinaisons (Tableau 11).

Ce plan est formé de trois parties distinctes pour générer un nombre des traitements des combinaisons égal à $2^k + 2^k + N$.

- Un plan factoriel à deux niveaux factoriels (-1, +1), habituellement fractionné à partir de k facteurs, ce qui forme un plan factoriel complet 2^k .

Ce plan comprend 2^k expériences (k est le nombre de facteur). Avec k = 2 facteurs, ce plan comporte 4 essais (Tableau 12).

- 2^k points en étoiles, avec des niveaux (- α) et (+ α). La valeur du α est fonction du nombre de facteur k ($\alpha = 1.682$).
- N = 3 répétitions du point central (niveau 0) : afin de calculer l'erreur expérimentale ce qui permet d'analyser ce plan (3 répétitions sont effectuées).

Un tel plan est représenté par l'équation polynomiale du second degré suivante :

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

\hat{Y} la réponse (activité protéolytique) ;

X_1, X_2 les formes codées des variables explicatives ;

β_0 : la constante du modèle ;

β_1, β_2 les coefficients linéaires ;

β_{11}, β_{22} les coefficients quadratiques ;

β_{12} le coefficient d'interaction.

La relation entre les valeurs codées des variables entrées et ses valeurs réelles est décrite par l'équation suivante :

$$X_i = \frac{(A_i - A_0)}{\Delta A} \quad \text{où : } X_i : \text{ valeur codée du facteur.}$$

A_i : valeur réelle de ce facteur.

A_0 : valeur réelle du même facteur au niveau central.

ΔA : pas entre le niveau central et les niveaux ± 1 .

Le plan composite centré permet d'exprimer les résultats sous forme d'un modèle quadratique nécessitant une analyse de la variance (ANOVA) qui donne la statistique de Fisher F. En général, pour que les prédictions soient significatives, la valeur de F observée doit être plus élevée que la valeur tabulée p. La validité du modèle est vérifiée en déterminant les coefficients de corrélation multiple (R^2) et R^2 ajusté. Lorsque R^2 est large, la régression a été alors expliquée pour une large proportion de variabilité totale des valeurs observées de \hat{Y} , ce qui favorise le modèle.

Tableau 11 : Structure du plan composite centré à 3 facteurs.

N° d'essais	Niveau codés		
	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1.682	0	0
10	+1.682	0	0
11	0	-1.682	0
12	0	+1.682	0
13	0	0	-1.682
14	0	0	+1.682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Tableau 12 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels utilisés dans le plan composite centré à 3 facteurs.

Facteur	Niveaux des facteurs				
	$-\alpha(1.682)$	-1	0	+1	$+\alpha(1.682)$
X1 : Humidité	63.18	70	80	90	96.82
X2 : Glucose	0.2318	0.3	0.4	0.5	0.568
X3 :Sulfate d'ammonium	0.13	0.2	0.3	0.4	0.468

- **L'analyse statistique**

Tous les tests sont effectués en double et les valeurs moyennes sont analysées et interprétées par logicielle Minitab version 19. Estimation des paramètres statistiques est réalisé par Analyse de Variance (ANOVA) (Moghri et *al.*, 2017; Moradi et *al.*, 2018).

Résultats et discussion

Cette partie présente l'ensemble des résultats obtenus sur l'étude de l'optimisation de la production des protéases par la levure. Pour cela nous avons testé les facteurs suivants : le mode de culture (solide, liquide), les différents substrats (son de blé, avoine) .Dans le but de sélectionner quel type de protéase est produit un dosage de l'activité protéolytique est déterminé à différents pH (5,7 et 9) est aussi réalisé.

Par la suite une approche statistique basée sur les plans de Plackett et Burman (1946) afin de sélectionner les facteurs influençant la production de protéase neutre la détermination des optima des facteurs à effet significatif par l'utilisation d'un autre plan statistique de Box et Wilson (1951).

1. Identification de la souche levurienne

L'identification de la levure par la galerie API 32C est réalisée après 24h d'incubation à 30°C, les résultats sont marqués sur la galerie. D'après la Figure 13 la levure sélectionnée a un code de 7557100000, le catalogue de la galerie API 32C indique que ce code correspond à la levure *candida sp.*

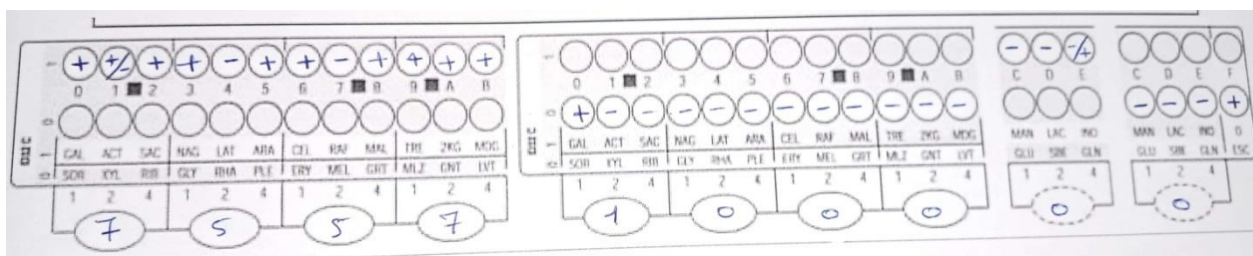


Figure 13 : Lecture de la galerie API 32 C après 24 h.

2. Etude de la production des enzymes protéolytiques sur milieu solide et liquide

2.1 Fermentation sur milieu solide (FMS)

2.1.1 Effet des différents substrats sur la production des protéases (acide, neutre et alcaline) par *candida sp*

La production des enzymes protéolytiques par FMS est testée sur différents substrats son de blé (M1), avoine (M2), et le mélange son de blé et avoine (M3). Le dosage de différentes activités protéolytiques est réalisé à différent pH (5, 7, 9).

Les résultats sont présentés dans la Figure 14, On note une production maximale en protéase neutre estimée à 23777.09 U/g obtenue sur le milieu M1. La plus faible quantité d'enzyme soit 13657.62 U/g est obtenue avec le milieu M2. Alors que pour le milieu M3 la quantité de protéase

produite par la levure *candida sp* est de 14995.19 U/g. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Talhi et *al.*, 2021 pour la production de la protéase neutre par *Mycothermus thermophilus* qui ont enregistré une activité maximale de 192.27 U/ml et de 175.45U/ml respectivement avec le son de blé et l'avoine.

De même, ces résultats sont très proches est obtenu de Chellapandian et *al.*, 2021 pour la production de la protéase alcaline par *Bacillus halodurans* , la grande quantité a été enregistrés de 397.09U/ml sur le milieu à base de son de blé .

Ce résultat est expliqué par le fait que le son de blé est caractérisé par une meilleure circulation de l'air et par un faible coût. Il représente ainsi une meilleure perspective économique dans les processus de fermentation (Mahalakshmi et Jayalakshmi, 2016).

En effet les déchets-agroalimentaires sont considérés comme des substrats bon marché pour la production des enzymes (Panesar et *al.*, 2016 ; Madeira et *al.*, 2017) . Parmi les substrats criblés, le son de blé est le plus approprié pour la production de protéase dans la FMS en raison de sa richesse en protéine et en nutriments minéraux nécessaire pour le développement des micro-organismes et la synthèse des métabolites (Meruvu et Meruvu, 2019 ; deAlbuquerque et *al.*, 2020).

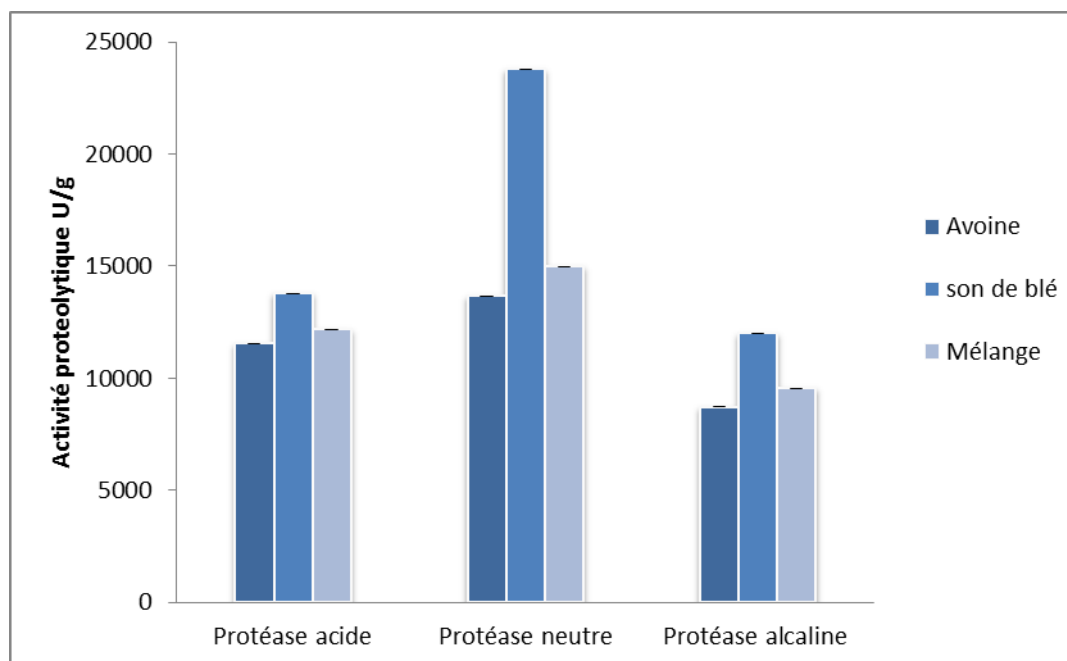


Figure 14 : Effet des différents substrats sur la production de protéase (acide, neutre et alcaline) par FMS par *candida sp*.

2.2 Fermentation sur milieu liquide (FML)

2.2.1 Effet des différents substrats sur la production des protéases (acide, neutre et alcaline) par *candida sp*

La production des enzymes protéolytiques par FML est testée sur différents substrats son de blé (M1), avoine (M2), et le mélange son de blé et avoine (M3), le dosage des différentes activités protéolytiques est réalisé à pH5, pH7 et pH9.

Les résultats illustrés dans la Figure 15, montrent que le M3 est le meilleur substrat pour la production de protéase neutre avec une activité spécifique de 17.20 U/ml. D'après les résultats de Mahadeo et *al.*, 2019 le son de blé est le plus adapté, qui donne une meilleure production de xylanase et de protéase alcaline estimé de 4,96 U/mL par FML par rapport autres substrat (les épis de maïs, le son de graines de moutarde et la bagasse de canne à sucre).

Selon Belmessikh et *al.*, 2013 l'influence du son de blé sur la production de protéase neutre était significativement dans le milieu submergé .

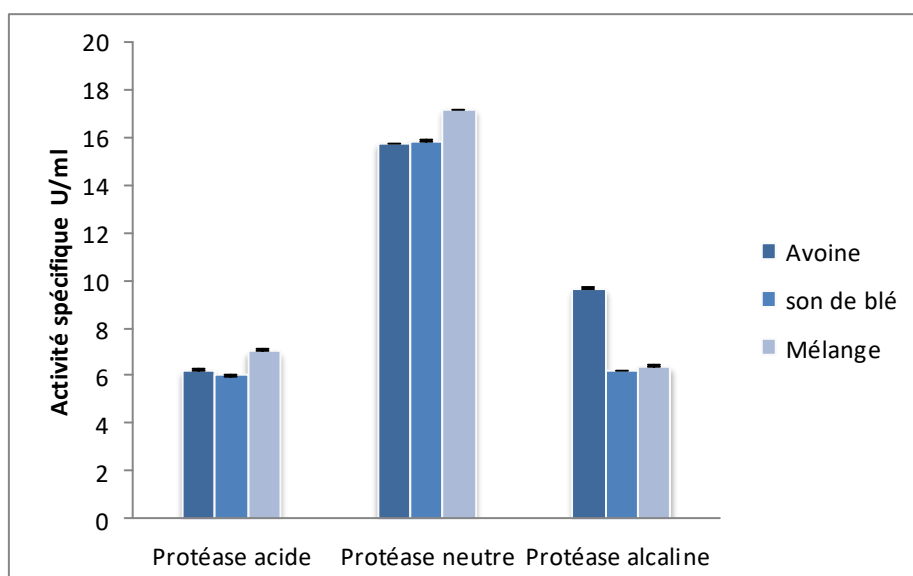


Figure 15 : Effet des différents substrats sur la production de protéase (acide, neutre et alcaline) par FML par *candida sp* .

Conclusion partielle

Cette étude comparative de production des protéases, a montré que le procédé de FMS est mieux adapté à la production des protéases de *candida sp* que le procédé de FML. D'après l'ensemble des résultats obtenus, on déduit que la meilleure production des protéases est la protéase neutre par FMS à base de son de blé.

Le procédé de FMS est entièrement adapté aux champignons filamenteux parce que leur croissance peut-être à faible humidité et préférée pour la production de protéase contrairement à la FML qui contient un risque de contamination élevé (Arora et al., 2018 ; Molaverdi et al., 2019).

Les travaux de Belmessikh et al., 2013 ont montré aussi que les activités enzymatiques de protéase neutre produites par *A. oryzae* sur déchet de tomate sont de 21309 et de 2343,5 U/g dans FMS et FML respectivement montrant que l'activité protéolytique était neuf fois plus élevée dans la FMS par rapport à la FML.

3 Optimisation des conditions de culture pour la production de protéase neutre par la planification expérimentale

3.1 Optimisation de la production des protéases neutres par le plan statistique de Plackett et Burman (1946).

L'effet des facteurs étudiés selon le plan de Plackett et Burman a permis d'évaluer l'activité spécifique sur milieu à base de son de blé. L'ensemble des résultats sont consignés dans le Tableau 13.

Tableau 13: Effet des facteurs testés sur la production de la protéase neutre
(Plan de Plackett-Burman).

Expérience	Facteurs											Activité protéolytique (U/g)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	19436.5
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	15177.8
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	13083.8
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	19311.4
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	16122.0
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	22911.6
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	13756.4
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	26685.8
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	26032.6
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	30610.0
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	18372.8
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	22564.2

D'après le Tableau 12 il ressort que l'activité spécifique la plus importante est enregistrée dans l'essai 10 (température à 30 C°, humidité de 80 % , inoculum 10^7 et incubation à 72 h).

Par contre, la plus faible activité correspondant à l'essai 3 (température à 50 C°, humidité de 50 %, inoculum 10^7 cellules/mL, Corn-steep liquor 0.5%, sulfate d'ammonium 0.5 % et incubation à 24 h).

L'effet de chaque facteur est testé par le calcul du coefficient de corrélation et le niveau de signification statistique sur chaque réponse est déterminé par le test de la probabilité (P) :

* $P < 0,05$: le résultat est significatif, donc le facteur est retenu.

* $P > 0,05$: le résultat est non significatif, donc le facteur ne présente pas un effet important sur la réponse ce qui l'exclue de l'étude.

- **Effet des facteurs testés sur la production de protéase neutre :**

L'analyse statistique (Tableau 14) de la production de la protéase neutre est expliquée de façon significative par l'humidité ($p = 0.024$), le glucose ($p = 0.012$) et le sulfate d'ammonium ($p = 0.047$). Les facteurs non significatifs mentionnés sont la température ($p = 0.286$), l'inoculum ($p = 0.518$), le corn-steep ($p = 0.097$), la NaCl ($p = 0.132$) et l'incubation ($p = 0.154$).

Tableau 14 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de protéase neutre.

Terme	Coeff	Coef ErT	Valeur de T	Valeur de P	FIV
Constante	20339	601	33.85	0.00	0
C1	-777	601	-1.29	0.286	1.00
C2	2537	601	4.22	0.024	1.00
C3	-439	601	-0.73	0.518	1.00
C5	-3309	601	-5.51	0.012	1.00
C6	-1436	601	-2.39	0.097	1.00
C7	-1960	601	-3.26	0.047	1.00
C9	1234	601	2.05	0.132	1.00
C10	1139	601	1.9	0.154	1.00

- **Expression des résultats**

Les résultats des activités protéolytiques peuvent être présentés par une équation polynomiale du premier degré :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 C_1 + \beta_2 C_2 + \beta_3 C_3 + \beta_4 C_4 + \beta_5 C_5 + \beta_6 C_6 + \beta_7 C_7$$

Equation de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique = 20339 - 777 C1 + 2537 C2 - 439 C3 - 3309 C5 - 1436 C6 - 1960 C7 + 1234 C9 + 1139 C10.

L'équation réduite

$Y = 20339 + 2537 \text{ Humidité} - 3309 \text{ Glucose} - 1960 \text{ sulfate d'ammonium}$.

L'analyse statistique indique une valeur du coefficient de détermination de $R^2 = 96.13 \%$

pour ce modèle. Cela signifie que 96.13 % de la production de la protéase neutre sont expliqués par ce modèle et que 3.87 % restent par conséquent inexpliqués.

- **Conclusion**

L'analyse statistique des résultats de ce plan et la modélisation selon une régression linéaire multiple ont permis de sélectionner un effet significatif positif ou négatif sur l'activité protéolytique à savoir glucose, humidité, sulfate d'ammonium, Corn-steep, température, inoculum, NaCl et temps d'incubation.

La production de la protéase neutre est nettement influencée par l'humidité, le glucose et le sulfate d'ammonium. Les optima de ces facteurs sélectionnés seront déterminés antérieurement par l'emploi d'une autre conception : plan composite centré de Box et Wilson (1951).

3.2 Optimisation de la production des protéases neutres selon le plan statistique de Box et Wilson (1951)

L'effet des facteurs étudiés selon le plan de Box et Wilson 1951 a permis d'évaluer l'activité spécifique sur milieu à base de son de blé. L'ensemble des résultats sont consignés dans le Tableau 15.

Tableau 15: Valeurs expérimentales (observées) de l'activité spécifique.

N° d'essai	Niveau de facteur			L'activité (U /g)
	X1	X2	X3	
1	-1	-1	-1	20595.2
2	+1	-1	-1	23601.3
3	-1	+1	-1	19780.1
4	+1	+1	-1	20410.8
5	-1	-1	+1	16616.0
6	+1	-1	+1	22478.9
7	-1	+1	+1	23495.8
8	+1	+1	+1	27852.0
9	-1.682	0	0	21719.7
10	+1.682	0	0	23566.9
11	0	-1.682	0	21210.2
12	0	+1.682	0	22977.9
13	0	0	-1.682	19838.0
14	0	0	+1.682	21171.5
15	0	0	0	19977.7
16	0	0	0	19768.5
17	0	0	0	21215.5

D'après le Tableau 15 on remarque que l'activité spécifique la plus importante est enregistrée dans l'essai n° 8 (0.5 g glucose, 90 % humidité et 0.4 g et de sulfate d'ammonium. Par contre, la

plus faible activité correspond à l'essai n° 5 qui contient de 0.3g de glucose, 70 % d'humidité, et 0.4 g sulfate d'ammonium) par erlen de 250 ml.

Les valeurs de P utilisées comme un outil pour vérifier la signification de chacun des coefficients qui à leur tour sont nécessaires pour comprendre le modèle des interactions mutuelles entre les meilleures variables. Les valeurs de P inférieures à 0,05 indiquent que les coefficients sont significatifs. La valeur du test- t est grande et plus la valeur de P tend vers 0 indique la signification du coefficient correspondant et les variables ayant des coefficients négligeables sont omis.

Le Tableau 16 montre les coefficients significatifs du polynôme de second degré de l'activité protéolytique sont déterminés par le test de Student (t) et (p) valeur.

Tableau 16 : Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de la production des protéases neutres.

Terme	Coef	Coef ErT	Valeur de T	Valeur de P	FIV
Constante	20339	601	33.85	0.00	0
C1	-777	601	-1.29	0.286	1.00
C2	2537	601	4.22	0.024	1.00
C3	-439	601	-0.73	0.518	1.00
C5	-3309	601	-5.51	0.012	1.00
C6	-1436	601	-2.39	0.097	1.00
C7	-1960	601	-3.26	0.047	1.00
C9	1234	601	2.05	0.132	1.00
C10	1139	601	1.9	0.154	1.00

La relation entre la réponse activité protéolytique et les variables expérimentales obtenues par l'application du RSM est représentée mathématiquement par l'équation de régression suivante

Activité protéolytique = $20319 + 1243 C_1 + 822 C_2 + 608 C_3 + 825 C_1 * C_1 + 632 C_2 * C_2 + 70 C_3 * C_3 - 485 C_1 * C_2 + 823 C_1 * C_3 + 2032 C_2 * C_3$.

Où C_1 , C_2 et C_3 représentent les facteurs humidité, glucose, sulfate d'ammonium.

La pertinence du modèle est évaluée via plusieurs facteurs techniques tels que le coefficient de détermination (R^2), la détermination ajustée coefficient de mination (R^2_{adj}), coefficient de détermination prédite ($R^2_{préd}$), le test F de Fisher et les valeurs P pour linéaire, quadratique et intra-effets des facteurs utilisés.

L'ANOVA est un outil statistique important, largement utilisé pour vérifier d'avantage la commodité du modèle.

Le coefficient de détermination R^2 est utilisé comme indice pour confirmer la précision et la qualité de l'ajustement du modèle, il est généralement compris entre 0 et 1. Lorsque le R^2 se rapproche étroitement de 1, le modèle prédit fortement la réponse. Plusieurs auteurs rapportent que le coefficient R^2 devrait atteindre 0,80 pour un bon ajustement du modèle (Vasseghian et Dragoi., 2018; Dragoi et Vasseghian., 2020).

L'analyse statistique indique la valeur du coefficient de détermination $R^2 = 0,9227$ ce qui implique que 92.27 % des variations de l'activité de protéase neutre, la valeur de R^2 prédit de 0,4806 (48.06%) indique un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites.

La valeur du coefficient de détermination ajusté $R^2_{Adj} = 82.32\%$ représente une correction de la valeur de R^2 qui permet de prendre en compte la taille de l'échantillon et le nombre de variables utilisées dans le modèle (Bennamoun, 2017). Le coefficient de détermination relativement élevé ajusté ($R^2_{Adj} = 0.82$) dans la présente étude explique la bonne qualité descriptive du modèle.

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
1015.57	92.27 %	82.32 %	48.06 %

Les résultats sont analysés par l'analyse de variance (ANOVA) comme étant approprié au plan expérimental utilisé (Tableau 17).

L'ANOVA, à travers le modèle de régression quadratique, a révélé que le modèle de surface de réponse du second ordre obtenu est hautement significatif. Cette analyse est également confirmée par la valeur élevée du test de Fisher. Le Tableau 17 montre que la valeur de $F = 32,04$ est supérieure à celle tabulée $F(9,6) = 7.97$ au niveau de 1%. Ceci est approuvé aussi par la très faible valeur de la probabilité ($p = 0.001$), ce que signifie que la régression est donc significative à un niveau de confiance d'environ 99 % et que le modèle choisi est adéquat pour la production de protéase neutre. De plus, la valeur p pour le manque d'ajustement (Inadéquation de l'ajustement = 0,371) n'est pas significatif ce qui permis d'affirmer que les données expérimentales obtenues sont ajustées avec précision par le modèle (Garai et Kumar, 2013).

Tableau 17 : Analyse de variance (ANOVA) pour les paramètres de la méthode de surface de réponse adaptée au modèle polynomial quadratique pour l'optimisation de l'activité protéolytique.

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Modèle	9	86119689	9568854	9.28	0.004
C1	3	35352247	11784082	11.43	0.004
C2	1	21092261	21092261	20.45	0.003
C3	1	9218139	9218139	8.94	0.020
Carré	1	504846	5041846	4.89	0.063
C1* C1	3	10425487	3475162	3.37	0.084
C2*C2	1	7669234	7669234	7.44	0.029
C2*C3	1	4498559	4498559	4.36	0.075
Erreur	1	54991	54991	0.05	0.824
Interaction à 2 facteurs	3	40341955	13447318	13.04	0.003
C1*C2	1	1883842	1883842	1.83	0.219
C1*C3	1	5416106	5416106	5.25	0.056

C2*C3	1	33042007	33042007	32.04	0.001
Erreur	7	7219665	1031381		
Inadéquation de l'ajustement	5	5996336	1199267	1.96	0.371
Erreur pure	2	1223329	611664		
Total	16	93339355			

a. Graphiques de Pareto

Le diagramme de Pareto (Figure 16) permet de représenter graphiquement les résultats de l'analyse du plan pour la production de protéase neutre et illustre l'ordre de signification des variables. Il apparaît clairement que les paramètres, humidité, glucose, sulfate d'ammonium, sont significatifs pour la production de protéase neutre, ainsi que leurs interactions mutuelles C1×C2 et C2×C3, et le terme quadratique C32 est indiqué de 2.365.

D'après la charte Pareto obtenue, on remarque que les effets de l'interaction C1×C3, et les termes quadratiques C1 et C2 ne sont pas significatifs sur la production de protéase neutre.

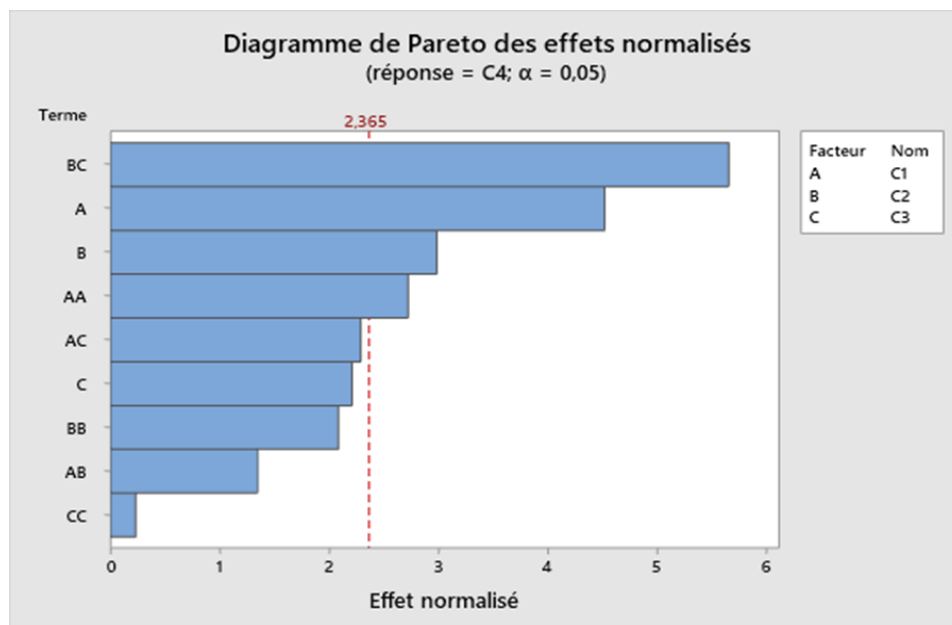


Figure 16: Charte Pareto des effets standardisés des paramètres opératoires sur l'activité protéolytique.

b. Droite de Henry

La droite de Henry est une méthode graphique pour ajuster une distribution gaussienne à celle d'une série d'observation (d'une variable numérique continue). Il est nécessaire de vérifier le modèle ajusté pour s'assurer qu'il fournit une approximation adéquate du système réel. La Figure 17 montre le diagramme de probabilité normal des résidus, qui est un outil de diagnostic important pour détecter et expliquer les écarts systématiques par rapport aux hypothèses. Les résidus ont été tracés par rapport aux valeurs normales attendues du modèle. Le tracé de probabilité normal des résidus montre les points proches d'une ligne diagonale, par conséquent les erreurs sont normalement distribuées et sont indépendantes les unes des autres, et les variances d'erreurs sont homogènes. Cela indique que le modèle était bien adapté aux résultats expérimentaux. Comme les résidus du modèle ajusté sont normalement distribués.

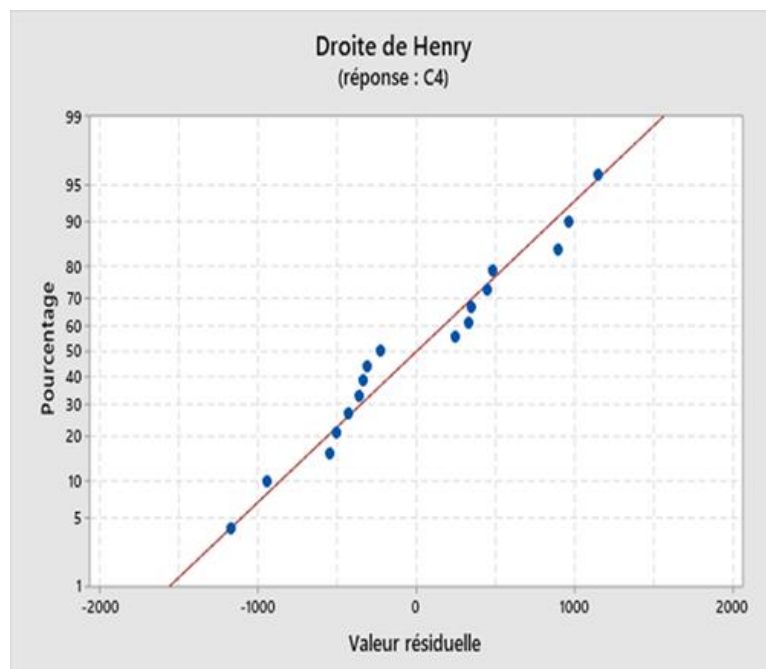


Figure 17 : Graphique de parité montrant la distribution des données expérimentales de l'activité protéolytique par rapport à la valeur prédite par le modèle.

- **Détermination des interactions entre les variables**

Les courbes de surface de réponse tridimensionnelles et les courbes de contour correspondantes obtenues par le logiciel Minitab 19 montrant les interactions entre paires de facteurs permettant de déterminer la zone des meilleurs résultats entre deux variables.

Les courbes sont tracées pour déterminer le niveau optimal de chaque variable (C1, C2, et C3).

- **Interactions entre C2 (Glucose) et C1 (Humidité)**

Les interactions entre les deux variables : C2 (Glucose) et C1 (Humidité) sont représentées par la

surface de réponse (Figure 18.1.B.1) et la courbe de contour (Figure 18.1.A.1) qui définissant l'interaction entre les deux facteurs et montre les différentes zones traduisant l'activité protéolytique de la souche étudiée.

La zone en vert foncé de la Figure (18.2.A.1) représente l'intervalle entre les concentrations en C2 (Glucose) et C1 (Humidité) où l'on retrouve la zone d'activité la plus importante (>25000UI/g), ce qui signifie une production élevée. Cet intervalle se situe à des niveaux hauts pour l'humidité et le glucose. La forme de la courbe de surface de réponse montre une interaction modérée entre ces variables testées. L'analyse statistique montre une forte interaction entre C2 et C1 ($p=0,219$) avec un effet négatif.

- **Interactions entre C3 (sulfate d'ammonium) et C1 (l'humidité)**

Les interactions entre les deux variables : C3 et C1 sont représentées par la surface de réponse (Figure 18.1.B.2) et la courbe de contour (Figure 18.1.A.2) qui définissant l'interaction entre les deux facteurs et montre les différentes zones traduisant l'activité protéolytique de la souche étudiée.

La zone en vert foncé de la Figure (18.1.A.2) représente l'intervalle des valeurs entre le sulfate d'ammonium et l'humidité où l'on retrouve la zone d'activité la plus importante (> 28000 UI/g) traduisant une production en protéase neutre élevée obtenue avec une concentration élevée en Humidité et sulfate d'ammonium. L'analyse statistique montre une faible interaction entre ($p=0.056$).

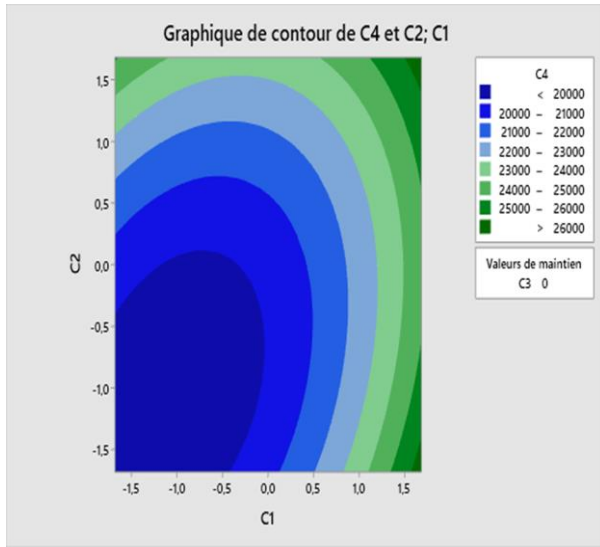
- **Interactions entre C3 (sulfate d'ammonium) et C2 (Glucose)**

Les interactions entre les deux variables : C3 et C2 sont représentées par la surface de réponse (Figure 18.1.B.3) et la courbe de contour (Figure 18.1.A.3) qui définissant l'interaction entre les deux facteurs et montre les différentes zones traduisant l'activité protéolytique de la souche étudiée.

La zone en vert foncé représente l'intervalle entre les concentrations en C3 et C2 où l'on retrouve l'activité la plus importante (> 30000 UI/g), ce qui signifie une production de protéase neutre élevée obtenue avec une concentration élevée en glucose et sulfate d'ammonium.

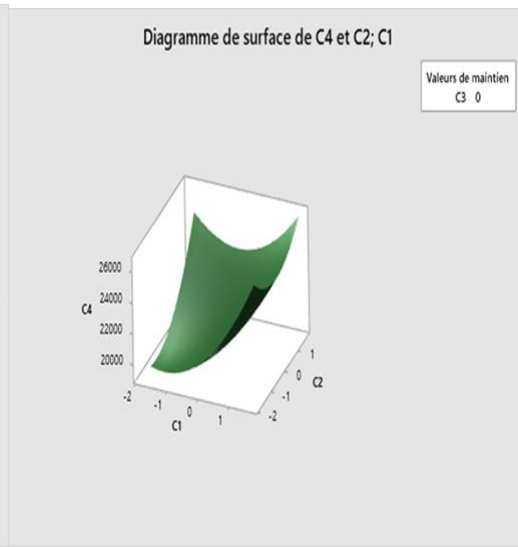
L'analyse statistique montre une forte interaction entre C3 et C2 ($p=0,001$) avec un effet négatif.

A



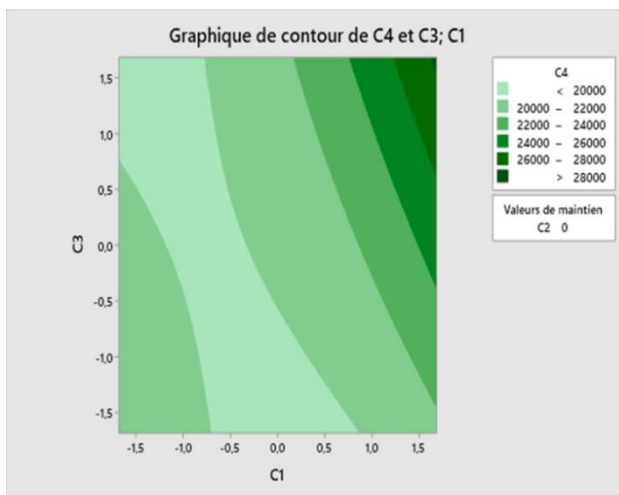
1

B

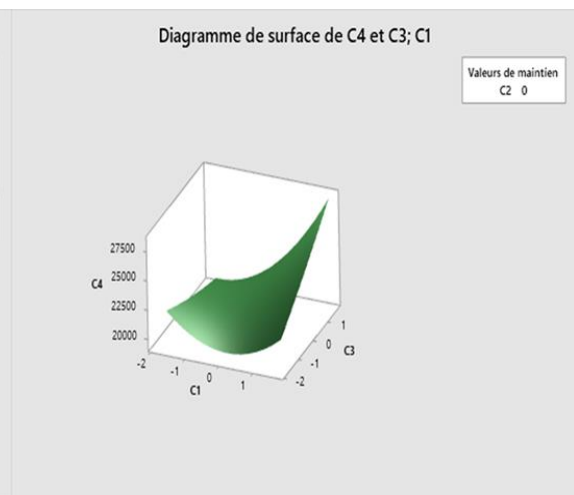


2

Activité protéolytique C2, C1

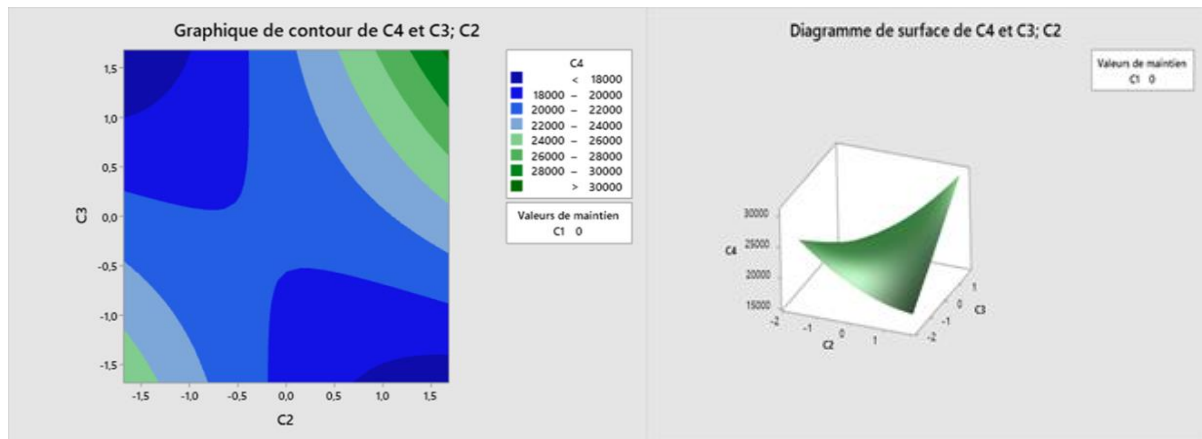


1



2

Activité protéolytique C3, C1



3

3

Activité protéolytique C3, C2

Figure 18: La courbe de contour (A) et la surface de réponse (B) .

- **Détermination des optima**

La méthodologie de surface de réponse « RSM », a permis de déterminer les valeurs optimales des trois variables retenues pour une meilleure activité protéolytique (Figure 19).

L'optimisation de la production de protéase neutre évaluant l'influence de chaque paramètre sur l'activité étudiée d'une part et les effets des interactions par paire de facteur d'autre part réalisée par la méthodologie de surface de réponse a permis d'obtenir un taux d' humidité (96.82 %), une quantité de glucose (0.568 g) et de sulfate d'ammonium (0.468 g).La valeur théorique calculée de l'activité protéolytique $3.584 \text{ E}+04 \text{ UI/g}$.

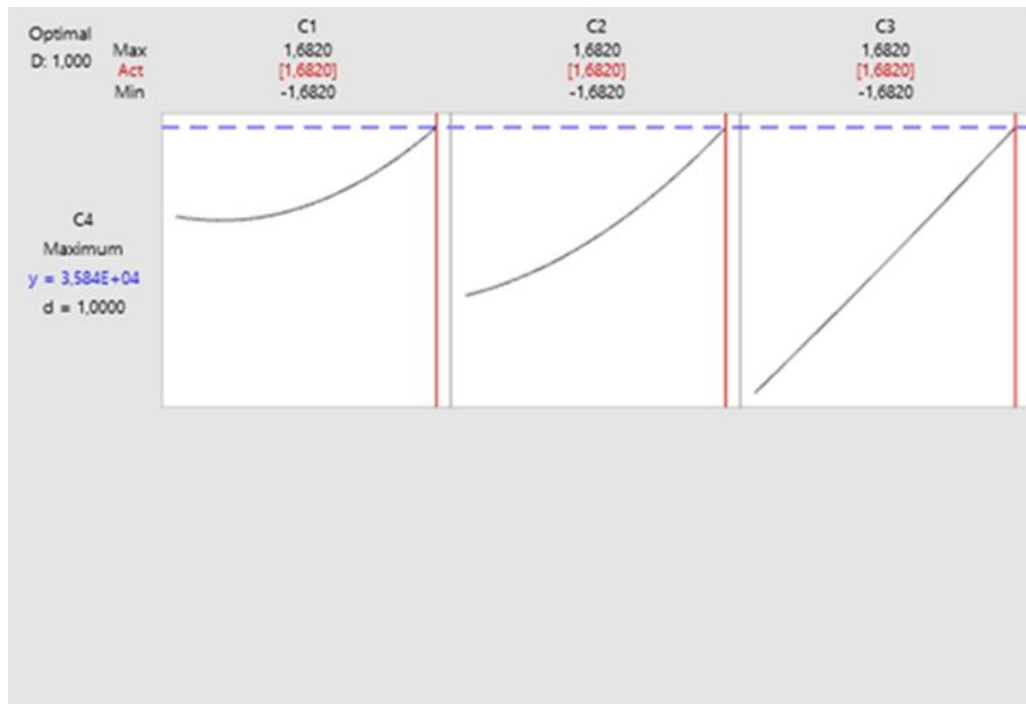


Figure 19 :Les valeurs optimales des variables de la réponse déterminées par « RSM » .

Les résultats obtenus montrent que les paramètres de culture sélectionnés en l'occurrence l'humidité, le glucose et le sulfate d'ammonium jouent un rôle important dans la production des protéases neutres par la souche *condida sp.* Plusieurs études indiquent que les conditions de croissance et la composition du milieu de culture ont une influence majeure sur la production d'enzyme (Lee, 2018). Par conséquent, Plackett-Burman et Box–willson sont appliqués avec succès dans la production de protéase optimisation à partir des sources microbiennes (Kim et al., 2016 , Fan et al., 2017).

Nos résultats montrent que l'humidité a un effet significatif ($p = 0.004$) pour l'activité protéolytique . L'humidité montre un coefficient positif sur la production de protéase neutre et sa valeur optimale est de 96.82 %.

Selon chee Kuan et al.,2021, 60% de la teneur en humidité est obtenue comme condition optimale pour la production de protéase alcaline .

La présente étude est soutenue par les travaux antérieurs d' Esakkiraj et al., 2011 qui a enregistré un rendement maximal en protéase neutre dans 75 % de l'humidité par *S. proteomaculans* . Anandan et al., 2007 et Mahanta et al., 2008 ont rapporté 65 % et 66,7 % respectivement comme niveau d'humidité optimal.

Le niveau d'humidité insuffisant conduit à la réduction des éléments nutritifs présents dans le son de blé entraînant une mauvaise croissance fongique. La production enzymatique satisfaisante

dans un taux d'humidité bénéfique pour la mise à l'échelle FMS où elle réduit le risque de contamination (Yoon et *al.*, 2014) , Cependant, il est nécessaire d'identifier l'humidité initiale dans chaque fermentation, dans laquelle il y a des variations importants dans les types et la porosité des substrats utilisés pour la FMS (Mamo et *al.* ,2020) .

Selon Devi et *al.* , 2021 le source de carbone joue un rôle majeur dans la croissance ainsi que pour la production d'enzyme . Dans cette étude, le glucose est facilement utilisable et identifié comme un source de carbone significatif en Plackette et Burman.

Notre étude a montré que la valeur de glucose est significative ($p = 0.003$) pour l'activité d'enzyme protéolytique de la souche étudiée. Le glucose montre un coefficient positif sur la production de protéase neutre a un valeur optimale de 0.568 g . Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Rohit et *al.*, 2021 qui ont trouvé que l'activité de protéase neutre maximale était de 0,0748 uM/ml avec une concentration de 1% du glucose .

Dans notre étude, l'effet de source d'azote pour la production optimale de la protéase neutre est enregistré avec le milieu enrichi en sulfate d'ammonium . De même, ces résultats sont très proches pour la production optimale de la protéase alcaline par *Bacillus halodurans* , est enregistrés dans un milieu contenant des sulfate d'ammonium (Chellapandian et *al.* ,2021) .

Par contre Nascimento et Martins (2004) est enregistré une production optimale de protéase alcaline avec les milieux enrichis en nitrate d'ammonium par rapport à d'autres sources (sulfate d'ammonium , peptone , extrait de levure , extrait de viande , caséine) .

Les résultats de Djekrif et *al.* , 2014 indiquées que le sulfate d'ammonium n'a pas de effet affecté sur la production de l'-amylase et la pullulanase .

- **Validation du modèle expérimental**

Essai en conditions optimales la culture de la levure *Candida sp* en conditions optimales (humidité 96.82 %, glucose 0.568 et le sulfate d'ammonium 0.468) a permis l'obtention d'une activité de la protéase neutre (pH 7) de 35835.3 UI.

Conclusion générale

A la lumière de nos résultats, l'identification de la levure par la galerie API 32C montre que la levure est affiliée au genre *candida sp.*

La comparaison entre le mode de culture a montré que le procédé de FMS est mieux adapté à la production des protéases de *candida sp* que le procédé de FML. D'après l'ensemble des résultats obtenus, on déduit que la levure produit une protéase neutre par FMS à base de son de blé. Ce dernier est sélectionné parmi les substrats naturels, convenables pour la croissance des levures à cause de sa richesse en matières azotées et en cellulose. Ces sources carbonées et azotées conviennent donc aussi bien à la croissance microbienne qu'à la production de métabolites. Ce qui permet une valorisation de ce sous-produit de la minoterie du blé, et servira pour la préparation des milieux de culture à moindre cout telle que l'exige la production industrielle de molécules à forte valeur ajoutée.

L'optimisation des milieux de culture par l'application d'une planification expérimentale : le premier plan pour la sélection des facteurs d'enrichissement ayant un effet significatif et le second pour la détermination des optima. Pour cela, huit facteurs sont testés : la température, l'humidité, inoculum, glucose, corn-steep liquor , sulfate d'ammonium , Nacl , incubation .

L'analyse statistique des résultats du premier plan de Plackett et Burman et la modélisation des résultats par le logiciel Minitab 19 selon une régression linéaire multiple ont permis de sélectionner l'humidité , le glucose et le sulfate d'ammonium .

L'application du deuxième plan de Box et Wilson suivi du calcul des optima des facteurs sélectionnés a permis de déterminer les optima suivants :L'humidité 96.82 % , glucose 0.568 g et le sulfate d'ammonium 0.46 .

La validation du modèle a permis d'obtenir une activité de la protéase neutre de 35835.3 UI/ml, soit 2 fois plus élevé que dans les conditions non optimisées.

Références
Bibliographiques

A

Abdul Razzaq , Sadia Shamsi , Arfan Ali , Qurban Ali , Muhammad Sajjad , Arif Malik et Muhammad Achraf (2019) .Applications de protéases microbiennes .

Abou -Taleb.A, Gehan F. Galal , 2018 , Une étude comparative entre un facteur à la fois et des exécutions minimales méthodes de résolution IV pour améliorer la production de polysaccharide par *Stenotrophomonas daejeonensis* et *Pseudomonas géniculé* Khadiga.

Adinarayana K, Ellaiah P (2002) Optimisation de la surface de réponssetion des composants critiques du milieu pour la productionde protéase alcaline par un *Bacillus* sp. *J Pharmpharm Sci* 5(3):272-278.

Ahmad R, Zuily-Fodil Y, Passaquet C et al (2013) Bactérien expression, purification et caractérisation partielle de nouveaux cystéine protéase recombinante de feuilles de maïs : post-tran-changements de description sous le stress de l'ozone. *Pak J Bot* 45:441-446.

Ahasanul Karim, Natela Gerliani, Mohammed Aïder ,*Kluyveromyces marxianus*,(2020).Une usine de cellules de levure émergente pour des applications en alimentation et biotechnologie .

Ait Kaki A., Gagaoua M., Bennamoun L., Djekrif S., Hafid K., El HadeF El-Okki M., Meraihi Z., (2017) . Optimisation Statistique De La Production α -Amylase Thermostable Par Une Souche FSIS4 De *Rhizopus Oryzae* Nouvellement Isolé En Utilisant Des Dates De Déclassement. Valorisation des déchets et de la biomasse. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9727-6>.

Aguilar-Uscanga B., François J.M. (2003). Une étude de la composition et de la structure de la paroi cellulaire de la levure en réponse aux conditions de croissance et au mode de culture. *Lett. Appl. Microbiol.*

AL Daccache M. (2019). Étude du potentiel fermentaire de la pomme libanaise et impact des procédés émergents sur la fermentation du jus en vue de l'élaboration du cidre. Thèse de doctorat L'université Saini-Joseph de Beyrouth.

Alexandre A. Osmolovskiyune, Elizaveta A. Popovaa , Valeriana G. Kreyerun ,Nina A, Baranova A , Nikolay S. (2020) . Egorov La vermiculite comme nouveau support pour la production de protéase extracellulaire par *Aspergillus* spp. sous fermentation à l'état solide.

Al-Masri mounir, (2017). Conception, synthèse et évaluation des dérivés d' amino benzosubérone comme inhibiteurs potentiels des aminopeptidases de la famille M1.

Alnandi Hanan S , (2012) . Isolement et criblage de protéases extracellulaires produites par un nouveau Bacillus sp. Journal des sciences pharmaceutiques appliquées.

Al Yasmina,(2021). Identification et Connaissance des Principales Adventices d'Algérie Méditerranéenne. <https://portal.wiktrop.org/species/show/737?pos> .

Ami D, Varia, Vireal Y, Shukla , Devavani R , Tipre (2019). Protéase alcaline , un poly-valent enzyme .

Anais M , (2021) . Avoine Bienfaits Incroyables que tout le monde devrait connaître.

Antonio de Anchieta , Camara junior , (2018) . Conservation et préservation fonctionnelle de levures d'intérêt en agro-alimentaire .

Arendt E.K, Zannone E, (2013). Céréales pour l'industrie alimentaire et des boissons.

Arora Sidharth, Rani Richa , Ghosh Sanjoy , (2018) . Bioréacteurs dans la technologie de fermentation à l'état solide: conception, applications et aspects techniques.

Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith et Struhl,(1994). Protocoles actuels en biologie moléculaire, Current Protocols.

Azzouz, Z, (2016). Production des cellulases et des xylanase fongiques par fermentation solide et liquide à base de paille et de son de blé. Mémoire de magister. Université A. Mira- Bejaia.

B

Barrett A. J, (1994). Classification des peptidases, Méthodes en enzymologie.

Barnett J. A., Payne R.W et Yarrow D , (2000). Levures : caractéristiques et identification. Cambridge University Press 3e édition .

Bhatt P , Rene E. R., Kumar A. J, Zhang Wet Chen,S. (2020c). Interaction de liaison de l'alléthrine avec l'estérase : potentiel et mécanisme de bioremédiation. Bioressource. Technologie

Behera S , Ray R , Das U. ; Panda SK ; Saranraj P, Berenjian, A,(2019) . Essentials en fermentation technologie. Matériel d'apprentissage en biosciences , Éditions Springer International .

Belmadani Amine , (2018) .Effets de la dermaseptine sur la croissance, la transformation, la formation de biofilms et l'expression de certains gènes de virulence de *C. albicans*.

Belmessikh A., Boukhalfa H., Mechakra-Maza A., Gheribi-Aoulmi Z, Amrane A , (2013). Optimisation statistique du milieu de culture pour la production de protéase neutre par *Aspergillus oryzae*

Benkahoul malika, Belmessikh Aicha, Boukhalfa Hayet, MechakrMaza Aicha (2017). Optimisation à l'aide d'un plan d'expériences de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels.

Bennamoun L, (2017). Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides Sahariens Purification et caractérisation enzymatique (El-M'gheir) productrices de polygalacturonase .

Bennamoun L, Meraihi Z, Dakhmouche S, (2004). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.10.007>.

Berman J. Krysan D.J, Drug , (2020) . Résistance et tolérance aux champignons.

Biswas P, Bharti A.K, Kadam A, Dutt D. (2019). Le son de blé comme substrat pour la production d'enzyme et son application dans le bio-désencrage du papier de déchet de bureau mixte (MOW).

C

Calik G., Pehlivan N., Ozcelik L.S, Calik P et Ozdamar T.H, (2004). Caractéristiques de la fermentation et du transfert d'oxygène dans la production de protéase à sérine alcaline par *Bacillus subtilis* recombinant dans un milieu complexe à base de mélasse. Journal de la technologie chimique et de la biotechnologie .

Calla Salcedo, Mario Omar , Moreira da Silva de Almeida, Sheylla Susan,(2021). Étude physique, chimique et biologique des extraits de feuilles de *Senna obtusifolia* : revue bibliographique.

Carrau F, Gaggero C et Aguilar PS, (2015). Diversité des levures et vigueur native pour la saveur phénotypes. Tendances en biotechnologie. <https://doi.org/10.1016/>.

Chanalia P, Gandhi D, Jodha D , (2011) .Applications des protéases microbiennes dans l'industrie pharmaceutique : un aperçu. Rev Med Microbiol 22(4):96-10133.

Chalamacharla RaghuBabu, Harsha Ketanapalli, Sheik Khasim Beebi et Viswanatha Chaitanya Kolluru, (2018). Composition du son de blé et qualité nutritionnelle: examen, progrès de la biotechnologie et de la microbiologie. DOI: 10.19080 /AIBM.2018.09.555754.

Chabriere E ,(2010). Protéases architecture et fonction des macromolécules .

Chellapandian Balachandran , Alagumalai Vishali, Natarajan Arun Nagendran , Kathirvelu Baskar d, Abeer Hachem, Elsayed Fathi Abd_Allah ,(2021). Optimisation de la production de protéase de *Bacillus halodurans* sous solide fermentation d'état à l'aide d'agro-déchets.

Chee Kuan Ooi , Nazaitulshila Rasit , Wan Rafizah Wan Abdullah, (2021) . Optimisation de la protéase d'*Aspergillus Niger* sous fermentation à l'état solide utilisant un substrat de carapace de crevette.

Cheng Zhou , (2018) . Une nouvelle protéase alcaline d'*Idiomarina alcaliphile sp* avec une application potentielle pour l'épilation enzymatique écologique dans l'industrie du cuir.

Chi Z..M , Zhang T, Cao T.S,Liu X..Y., Cui W, Zhao C.H, (2011). Biotechnologique potentiel de l'inuline pour les bioprocédés.

Chi Z., Ma C , Wang P et Li HF ,(2007). Optimisation du milieu et des conditions de culture pour la production de protéase alcaline par la levure marine *Aureobasidium pullulans* . Technologie des bioressources.

Contesini FJ, Melo RR , Sato H, (2018). Un aperçu des protéases de *Bacillus* de production à l'application critique. Rév. Biotechnol.

Costa JAV , Treichel H., Kumar V.et Pandey,(2018). A Avancées dans la fermentation à l'état solide Dans Développements actuels en biotechnologie et bio-ingénierie, Elsevier : Amsterdam, Pays-Bas .

Coda R., Rizzello C.G, Curiel J.A, Poutanen K, Katina K, (2014). Effet du bio-traitement et de la taille des particules sur les propriétés nutritionnelles des fractions de son de blé. Technologie. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.11.012>.

D

Dakhmouche S,(2016). Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zone aride. Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine.

Dakhmouche S, Gheribi-Aoulmi Z, Meraihi Z, Bennamoun L, (2006) . Application d'un design statistique à l'optimisation du milieu de culture pour la production d' α -amylase par *Aspergillus niger* ATCC16404 cultivé sur de la poudre de déchets d'orange .
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.021>.

Dalal Rupali,(2015). Dépistage et isolement des bactéries productrices de protéase à partir de sol collectés dans différentes zones de la région de Burhanpur (MP) en Inde. Journal international de microbiologie actuelle et des sciences appliquées. 4 (8): 597-606.

Deak T,(2006). Chapitre 8 : Facteurs environnementaux influençant les levures dans le manuel de la levure ,biodiversité et écophysiologie des levures,). Berlin Heidelberg,pp. 155- 174.

Demir H., Tari C. (2014). Valorisation du son de blé pour la production de polygalacturonase dans la SSF d'*Aspergillus sojae*. Cultures et produits industriels. 54: 302 –309.

Devi M.K., Banu A.R., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V., Planiswamy M.(2008). Purification, caractérisation de l'enzyme protéase alcaline à partir de l'isolat natif *Aspergillus niger* et sa compatibilité avec les détergents commerciaux. Journal indien de la science et de la technologie 1(7): 1-6.

De Albuquerque MFG, Guimaraes V.M, Rezende ST, (2020). L' utilisation d'abeille sucre tla farine et le son de blé comme source de carbone améliorent l'efficacité de la *chrysoorth ecubensis* dans la saccharification de la bagasse de canne à sucre. Recherche en bioénergie 1-14.

De Castro RJS ; Sato H,(2015). Production d'enzymes par fermentation à l'état solide : Aspects généraux et analyse de la physique Caractéristique biochimiques des substrats pour la valorisation des déchets agro-industriels. Valorisation de la biomasse des déchets , 6, 1085-1093 .

Djekrif S , Gilimann L , Cochet N , Bennamoun L, Ait kaki A, Labbani K , Noudri T et Meraihi Z , (2014). Optimisation de la production thermophile de pullulanase et d' α -amylase par amy-levure .

Direction des Services Agricoles, 2016.

Dumorné K, Córdova DC, Astorga-Eló M, Renganathan P ,(2017) .Extremozymes une source potentielle d'application industrielle. J Microbiol Biotech 27:649-659.

Plumey Laurence , article mise à jour le (31/3/2021). médecin nutritionniste, auteur du Grand Livre de l'Alimentation et fondatrice d'EPM Nutrition .

Dragoi E.N, Vasseghian Y, (2020). Modélisation du transfert de masse dans la membrane sous vide Procédé de distillation pour le traitement des eaux usées radioactives en utilisant NEURA artificielle réseaux. Toxine Rév. 1-10.

E

EdulisR , Thiruchelvi A, Venkataraghavan B , Sharmila A, (2020) . Optimisation des paramètres environnementaux par la conception Plackett-Burman et méthodologie de surface de réponse pour l'adsorption du vert de malachite sur Gracilaria .

Ezebuio Victor , Ipeghan Jonathan Otaraku, Boma Oruwari and Gideon Chijioke Okpokwasili ,(2019). Effets des sources d'azote et de carbone sur la production de biosurfactant par l'utilisation d'hydrocarbure *Stenotrophomonas sp.*

F

Fam H., Dumont M..J., Simpson BK, (2017). Extraction de gélatine de saumon (Salm osalar) la peau de poisson en utilisant un procédé assisté par la trypsine: Optimisation par Plackett-Burman un approche méthodologique de surface de réponse. J. Food Sci. Technol. 54, 4000-4008.

Farinas, (2015) . Développements dans la fermentation à l'état solide pour la production d'enzymes dégradant la biomasse pour la bioénergie secteur. Renouveler. Soutenir. Énergie Rév. 2015 , 52, 179-188.

Fonseca, GG, Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, AK,(2008). La levure *Kluyveromyces marxianus* et son potentiel biotechnologique. Appl. Microbiol. Biotechnologie. 79,339-354.

Foukis A, Stergiou P.Y, Theodorou LG, Papagianni M, Papamichael EM, (2012). Purification, caractérisation cinétique et propriétés d'un nouvel agent thermo-tolérant protéase traccellulaire de *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 avec un potentiel bio-intérêt technologique. *Bioresour. Technol.* 123, 214-220.

Forgeois P, Picot M, Bertin A, Delhaye J.M, Louchart A, Herbommez F, Poncet C , Sourdille P . (2021). *Innovations Agronomiques* Introduction de gène de résistance à la rouille couronnée dans la sélection française d'avoine (*Avena sativa* L).

Francis F, Sabu A, Madhavan Nampoothiri K, Ramachandran S, Ghosh S , Szakacs G, Pandey A., (2003) . Utilisation de la méthodologie de surface de réponse pour optimiser les paramètres de processus pour la production d' α -amylase par *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 15(2), p. 107-115. [https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(02\)00192-4](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(02)00192-4)

G

Gasmi M., Kitouni M., (2016). Optimisation de la production de chitinase par un nouvel isolat de *Streptomyces griseorubens* C9 en utilisant la méthodologie de surface de réponse. *Annale de microbiologie*, 67(2), p.175-183. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1249-8>.

Gais S. (2011). Optimisation de la production de la protéase de *Rhizopus stolonifer* sur milieu solide: purification et caractérisation. Mémoire de magister, UMBB. P. 96.

Gow N.A.R., Latge J.P, Munro C.A. (2017). La paroi cellulaire fongique : structure, biosynthèse et fonction, *Microbiol, Spectr.*

Gintjee T.J, Donnelley M.A, Thompson G.R, (2020). Antifongiques en herbe : examen des développements actuels du pipeline antifongique. *J. Champignons*, 6, 28.

Giorgio Maria Vingiani , Pasquale De Luca , Adrianna Ianora , Alan Dobson et Chiara Lauritano , (2019) . Enzymes des micro-algues avec applications biotechnologiques.

Gordana Šelo , Mirela Planinic, Marina Tišma , Srečko Tomas, Daliborka Koceva Komlenic et Ana Bucic-Kojic ,(2021). Un examen complet sur la valorisation de l'agro-alimentaire Résidus industriel par fermentation à l'état solide .

Gurumallesh P, Alagu K, Ramakrishnan B et Muthusamy S, (2019). A systemati creconsidération sur les protéases. *Int. J. Biol. Macromole.* 128, 254-267.

Giulia Coradello et Nicola Tirelli ,(2021). Cellule de levure en micro-encapsulation. Caractéristique générale et facteur de contrôle du processus d'encapsulation . Revoir.

H

Hamma S et Saoudi S,(2016). Optimisation de la production des des xylanases chez *Jonesia denitrificans* BN13 xylanases chez par la méthode des plans d'expériences. Mémoire de master. Université A. MIRA - Bejaia.

Hajji M., Rebai A, Gharsallah N, Nasri M,(2008). Optimisation de la production de protéase alcaline par *Aspergillus clavatus* ES1 dans la poudre de tubercule de *Mirabilis jalapa* à l'aide d'un plan expérimental statistique. Appl. Microbiol. Biotechnol.79: 915-923.

Haroldo C, Oliveira, Johanna Rivera et Nuria Trevijano-Contador,(2020) . La paroi cellulaire fongique :espèces,*Candida*,*Cryptocoque*,et,*Aspergillus*.<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.0299>.

Hoshida H, Kidera K, Takishita R., Fujioka N, Fukagawa,T et Akada R., (2018).Augmentation de la production d'inulinase extracellulaire par la levure *Kluyveromyces marx-ianus* à l'état catabolique du xylose. J. Biosci. Bioeng. 125 (6), 676–681.

I

Ibrahim A.S, Elbadawi Y.B, El-Toni A.M, Almaary K.S, El-Tayeb M.A, Elagib, A.A et Maany, D.A.F,(2021). Stabilisation et amélioration des propriétés de la protéase alcaline de *Salipaludibacillus agaradhaerens* par immobilisation sur des nanosphères core-shell double mésoporeuses. Int. J. Biol. Macromole.166, 557–566.

J

Jain A, Morlok CK, Henson JM ,(2013).Comparaison de la fermentation à l'état solide et à l'état immergé pour le biotraitement de Switchgrass à l'éthanol et à l'acétate par *Clostridium Phytofermentans*. Appl. Microbiol. Biotechnologie 97, 905-917.

Jermen Mamo et Fassil Assefa (2018) . Le rôle de l'enzyme protéase aspartique microbienne dans les aliments et Industries des boissons .

José Pablo, López-Gómez et Joachim Vénu,(2021),Revoir Rôle potentiel du solide séquentiel et du liquide immergé les fermentations dans une bioéconomie circulaire.

κ

Kashif Younas ,**Altaf M.A** ,**Malana M.I** et **Ghori**, (2018) . Production optimale de protéase à partir de *Bacillus subtilis* par fermentation submergée .

Khater A.Y, **Abd el-tawab** , **Abd El-Dayem** , (2019) . Identification phénotypique et génotypique de levure isolée de certain produit laitier.

Kim M., **Si J.B**, **Reddy L.V** et **Wee Y.J**(2016). Amélioration de la production d'extracellulaire enzyme protéolytique excrétée par un *Bacillus subtilis* FBL-1 nouvellement isolé par utilisation combinée de conceptions statistiques et de la méthodologie de surface de réponse. *RS CAv*. 6, 51270-51278.

Kiran A, (2016). Production de protéase fongique par *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* utilisant le son de riz comme substrat. *Journal académique de recherche agricole.*, 4(6), 333-338.

Kumar L ; **Jain SK** et **Yaday L** ,(2018) . Protéases une enzyme de dégradation bénéfique dans les applications thérapeutiques . *International*.

Kurtzman C.P, **Meyerozyma** ,**Kurtzman M.** et **Suzuki** ,**Fell J.W**, (2011). *Les Levures, Une étude taxonomique* . Elsevier, London, pp.623.

ℒ

Lachance Marc-André.(2011). *Encyclopédie de levure des sciences de la vie*.12-56.

Leveau J.Y., **Bouix M.** (1993). *Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel*. Ed. Tec et Doc Lavoisier, pp. 612.

Leite P , **Sousa D**, **Fernandes H**, **Ferreira M**, **Costa AR** , **Filipe D**, **Gonçalves M.** , **Peres H**, **Belo I** et **Salgado JM** ,(2020)0 Récent progrès dans la production d'enzyme lignocellulolytique par fermentation à l'état solide des déchets agro-industriels. *Cour. Avis. VertSoutenir. Chem.* , 27, 100407.

Li S.C, **Kane P.M**, (2009). Vacuole de type lysosome de levure : critère d'évaluation et carrefour. *BBA Mol. Rés. Cell.*,. 1793, 650–663.

Liza Begriche , (2021), impact des paramètres de fabrication sur la composition microbiologique et physico-chimique des légumes fermentés.

Liu Z, Sasaki K, Den Haan R, Inokuma K., Ogino C, Van Zyl W.H, Hasunuma T, Kondo A. (2016). Ingénierie d'un nouveau *Saccharomyces cerevisiae* cellulolytique adhérent à la cellulose pour la production de biocarburant cellulosique. *Rapports scientifiques*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep24550>.

Li AH, Yuan FX, Groenewald M, Bensch K, Yurkov AM, Li K, Han PJ, Guo LD, Aime MC, Sampaio JP, Jindamorakot S, Turchetti B, Inacio J, Fungsin B, Wang QM, Bai FY (2020) Diversité et phylogénie des levures basidiomycètes des feuilles des plantes et du sol : proposition de deux nouveaux ordres, trois nouvelles familles, huit nouveaux genres et cent sept nouvelles espèces. *Études en mycologie* .

Louwrens theron ,(2017), Une protease aspartique de la levure *metschnikowia pulcherrima* .

López-Gómez JP ; Manan MA; Webb C. (2020).Fermentation à l'état solide des déchets de l'industrie alimentaire.p. 135-161.

López-Gómez et Joachim Vénus ,(2021).FermentationRevoirRôle potentiel du solide séquentiel et du liquide immergé Les fermentations dans une bioéconomie circulaire .

López L.K.(2008). Détermination du rôle de certaines peptidases bactériennes par inférence à partir de données hétérogènes et incomplètes. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).

Luciana Daniela Larioun , Omar Santiago Pillaca-Pullo , Lara Durães Sette ,Attilio Convertie , Paula Casati , Claudia Spampinato et Adalberto Pessoa ,(2020), Optimisation de la production de protéases et analyse des séquences d'enzyme purifiée de la levure adaptée au froid *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528 .

Lücking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Ariyawansa HA, Aoki T, Cardinali G, Crous PW, Druzhinina IS, Geiser DM, Hawksworth DL (2020) .Identification sans ambiguïté des champignons : où en sommes-nous et à quel point est-il exact et précis code-barres ADN fongique *Champignon* IMA 11:1–32 .

Lweron et Divol B., (2014). « Microbial aspartic proteases : current et les applications potentielles dans l'industrie », la microbiologie appliquée et Biotechnologie , vol. 98, non. 21, pages 8853-8868.

M

Mahadeo B. Limkar, Shweta V. Pawar, VirendraK. Rathod , (2019), Optimisation statistique de la xylanase et alcaline co-production de protéase par Bacillus spp en utilisant Box-Behnken Design sous fermentation immergée utiliser le son de blé comme substrat .

Mahajan R.T., Badgujar S.B. (2010). Aspects biologiques des enzymes protéolytiques. *Journal de pharmacie Recherche* .3(9): 2048-2068 .

Mahalakshmi, N et Jayalakshmi, S. (2016). Production de amylase, cellulase et de xylanase à partir d'un nouvel isolat bactérien *Achromobacter xylosoxidans* isolé du milieu marin. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 3(1), 230–233.

Mahanta, N., Gupta, A., Khare, SK, (2008). Production de protéase et de lipase partolérant aux solvants *Pseudomonas aeruginosa* Protéase A en fermentation à l'état solide utilisant Tourteau de graines de *Jatropha curcas* comme substrat. *Bioresour. Technol.* 99 (6), 1729-1735. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.046>.

Mais E. A.(2018). Extraction et purification de la protéase de l'isolement d'*Aspergillus niger* *Pharmacie et Pharmacologique Internationale Journal*. 6 (2):96–99.

Mala, B. (1998). Aspects moléculaires et biotechnologiques des protéases microbiennes. *Revue du microbiol et de la biologie moléculaire.*, 62 (3), 597–635.

Mamo, J., Kangwa, M., Fernandez-Lahore, HM et Assefa, F. (2020). L' optimisation de medi un composition et conditions de croissance pour la production de protéase de la coagulation du lait (MCP)d'*Aspergillus oryzae* DRDFS13 sous fermentation à l'état solide. *Brazile. J. Microbiol* 1.14

María-Jesús Torija, Albert Mas, Ikin Yucel Sengun, Gemma Beltran (2021) Levure de vin : physiologie et facteurs de croissance .

Maruyama J., Juvvadi P. R.and Kitamoto K.(2005). Analyse de l'image en trois dimensions du colmatage du pore septal par le corps de Woronin lors d'un choc hypotonique Induisant l'éclatement de la pointe de l'hyphe dans le champignon filamenteux *Aspergillusoryzae*.

Masoud Moradi ,Maryam Heydari, Mohammad Darvishmotevalli, Kamaladdin Karimyan ,Vinod Kumar Gupta ,Yasser Vasseghian et Hooshmand Sharafi f , (2018),Données cinétiques et de modélisation sur l'élimination du phénol par la poudre de Scoria modifiée par du fer (FSP) à partir de solutions aqueuses les liens d'auteur ouvrent le panneau de superposition 20 , 957-968.

Mathieu Drouin (2005) .Etude de production de protéases alcalines par Bacillus us licheniformis en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat .

Meruvu, H et Meruvu, HBT, (2019). Activité anticoagulante des chitines partiellement purifiées eproduit par Citrobacter freundii str. nov. haritD11 par fermentation de blé bra ncouplé avec des écailles de poisson. SN Sciences appliquées 1, 1–9

Meziani ali ,(2014).catalogue culture, céréales, profert, p09 PRAT S., 1971 : Les céréales 2éme édition, J.B Baillièrre et fils, Paris, p9-23-315.

Molaverdi Maryam , KeikhosroKarimia, Safoora Mirmohamadsadeghia , Mats Galbec , (2019) , Production d'éthanol à titre élevé à partir de paille de riz via une saccharification et une fermentation simultanées à l'état solide par Mucor indicus à faible charge en enzymes .

Ming-Chi Li a bHung-Jen Tang c dChi-Jung Wu a eShin-Wei Wang fShu-Li Su a gWei-Lun Liu h iWen-Chien Ko a jYee-Chun Chen,(2021) .Article originale ,Les liens d'auteur ouvrent le panneau de superposition.

Moghri Mehdi, Elena Niculina Dragoi , Ali Salehabadi , Devesh Kumar Shukla et Yasser Vasseghian ,(2017).Effet de divers ingrédients de formulation sur les caractéristiques thermiques des mousses nanocomposites PVC/argile : expérimental et modélisation 17 , 119-

Moubasher Hani, Salwa S. Wahsh et Nabil Abo El Kassem. (2013). Isolement d'Aureobasidium pullulans et effet des différentes conditions pour la production de pullulanase et de pullulan Microbiologie,82 (2): 155-161.28 .

Monteiro, P. (2015). Perspective biotechnologique des protéases fongiques.Microbiologie.,46 (2), 337-346.

Moubashir Mintoo ; Amritangshu Chakravarty et Ronak Tilvawala , (2021).Stratégies de N-Terminomique pour le profilage des substrats de protéase .

Naïf Abdallah Al-Dhabi, Galal Ali Esmail, Abdul-Kareem Mohammed Ghilan et Mariadhas Valan Arasu (2019), Isolement et criblage de *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 dul'environnement de l'Arabie saoudite avec une production concomitante de lipase et protéase en fermentation liquide .

Naveed muhammad , Fareeha Nadeem , Tahir Mehmood, Muhammad Bilal ,Zahid Anwar et Fazeeha Amjad, (2020) .Protease ,Un biocatalyseur polyvalent et respectueux de l'environnement avec Applications .

Netea M. G., Brown G. D., Kullberg B. J. et Gow N. A.(2008). Un modèle intégré de reconnaissance de *Candida albicans* par le système immunitaire inné. *Nat Rev Microbiol*.

N. Jellen , EricW. Jackson , Thiam Elhadji , Lauren K. Young , Ayoub El Mouttaqi , Ilyass Al Halfa ,Imane El Fartassi ,Sakina Soukrat et Ouafae Benlhabib, (2021) . Adaptation et performance agronomique des lignées domestiquées d'avoine marocaine (*Avena magna* ssp. *domestica*) dans des conditions d'agriculture de subsistance à plusieurs endroits au Maroc Eric.

Nicolas Bernet ,SophieBozonnet ,FayzaDabouss i,Véronique deBerardinis, Jean-Loup Faulon, Diana Garcia-Bernet ,GabrielGras, JackLegrand, Françoise Ouarné,et Yonghua Li-Beisson,(2021). Une infrastructure en soutien au Développement de la biotechnologie industrielle comme Technologie clef pour l'industrie du futur et pour accompagner la bioéconomie et l'économie circulaire .

Niyonzima FN et More S ,(2015). Protéases compatibles avec les détergents : production microbienne, propriétés et coloration analyse de suppression. *Préparation Biochem Biotech* 45:233-258.

Normando Ribeiro-Filho a,b, Robert Linforth b, Chris D. Powell b, Ian D. Fisk ,(2021). Influence des éléments inorganiques essentiels sur la formation de l'arôme au cours fermentation de levure.

O

OCDE-FAO, 2019. Perspectives Agricoles de l'OCDE et de la FAO 2019-2028.

Onipe, O. O., Jideani, Afam. I. O et Beswa, D. (2015). Composition et fonctionnalité du son de blé et son application dans certains produits alimentaires à base de céréales. *Journal international des sciences et technologies alimentaires*, 50 (12), 2509–2518. DOI: 10.1111 / ijfs.12935.

P

Patel, MJ, Tipre, DR et Dave, SR (2009). Isolement et identification de la souche de *Candida digboiensis* provenant du drainage minier acide de mine de lignite, Gujarat. *Journal de microbiologie de base.* 49(6) : 564-571.

Patel, Y., Gupte, A. et Gupte, S. (2018). Production, purification partielle, caractérisation et compatibilité détergente des protéases de l'isolat du sol *Bacillus cereus* AG1. *Journal international de microbiologie actuelle et des sciences appliquées.* 7(8) : 587–600.

Pandey., Larroche C., Soccol C.R. (2008). Considérations générales sur la fermentation à l'état solide. pp.13-25.

Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (2016),. Développements actuels de la fermentation à l'état solide. Asiatech Publishers, INC. SPRINGER, New Delhi, Inde.

Pandey A. (1991). Effet de la taille des particules du substrat sur la production d'enzymes fermentation à l'état solide *Bioresour. Technologie* 37: 169-172.

Prückler, M., Lorenz, C., Endo, A., Kraler, M., Dürrschmid, K., Hendriks, K., Soares da Silva, F., Auterith, E., Kneifel, W., Michlmayr, H.,(2015). Comparaison de bactéries lactiques homo- et hétérofermentaires pour la mise en œuvre de son de blé fermenté dans le pain. *Microbiologie alimentaire.* 49, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.014> .

R

Rabah F.K.J et Dahab M.F., (2004), Caractéristiques d'élimination des nitrates des réacteurs à biofilm à lit fluidisé haute performance. 382719–2728.

Rauseo, A.M.; Coler-Reilly, A.; Larson, L.; Spec, A. (2020), Espoir à l'horizon : nouveaux traitements fongiques en cours de développement. *Forum ouvert Infect.Dis.* 7.

Rao MB, Tanksale AM et Ghatge MS ,(1998) .Molecular and aspects biotechnologiques des protéases microbiennes. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(3):597-635.

Ravi Shankar , Prabhat Kumar Upadhyay, Manish Kumar , (2021) . Enzymes protéases : faits saillants sur le potentiel des protéases en tant qu'agents thérapeutiques .

Rodriguez Couto, S.(2008) Exploitation des déchets biologiques pour la production de produits à valeur ajoutée sous fermentation à l'état solide Conditions. *Biotechnologie. J. , 3,* 859-870.

Rohit Dashpute , Jayashri Bandal , Avinash Bholay , Bharat Kunde , Sarika Kulkarni , Mukul Barwant , Département de microbiologie, KTHM College, Nashik Département de microbiologie , KTHM college et Kopargaon .(2021) . Isolement, identification, dépistage et Optimisation des paramètres de production de protéase Bactéries halophiles .

Rungaroon Waditee-Sirisattha :Tanutchai Patipong ;Hakuto Kageyama (2021).Aperçu de la phylogénie et de la réponse transcriptionnelle des protéases à sérine chez une cyanobactérie halotolérante *Halotheca* sp. PCC7418.

S

Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. (2005). Évaluation comparative de neutre production de protéases par *Aspergillus oryzae* en fermentation à l'état liquid et à l'état solide. *Traiter Biochimie*, 40: 2689-2694.

Sandhya Mishra, Ziqiu Lin, Shimei Pang, Wenping Zhang , Pankaj Bhatt et Shaohua Chen (2021). Technologies avancées récentes pour la caractérisation des micro-organismes et des communautés microbiennes dégradant les xénobiotiques, article REVIEW *Front. Bioeng. Biotechnol.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.632059> .

Sarazin, A. (2010). Les glycannes pariétaux de levures et leur implication dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte, thèse de doctorat, aspects moléculaires et cellulaires de la biologie, l'université Lille2, 181p .

Sathishkumar.R.,Ananthan.G.et,Arun.J.,(2015), Production, purification et caractérisation de protéase alcaline par *Bacillus subtilis* GA CAS8 associé aux ascidies à l'aide de déchets agricoles. *Biocatalyse et biotechnologie agricole* 4(2), p. 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.12.003>.

Sawant R, Nagendran S (2014). Protease : une enzyme aux multiples applications industrielles. *Sci* 3:568-57.

Sethia, K. (2016). Production de protéases acides thermostables chez *Aspergillus terreus*. *Journal de l'Université des sciences de Taibah.*, 10(15), P 571–583.

Shanmugavel, M., Vasantharaj, S., Saathiyavimal, S., Gnanamani, A., (2016). Application d'une protéase alcaline dans le traitement des déchets biologiques : une démarche éco-responsable. *Int. J. Biosci. Nanosci.* 3, 19-24.

Sijwali M , (2021) .Ange Nivya Protéases à cystéine .

Singh R., Anshumali M., Manoj K et Praveen K.M. (2016). Protéases microbiennes dans le commerce applications. *Journaez de Pharmacetique, Chimique et biologique* 4(3): 365-374.

Singh, R., Singh, R. et Kennedy, J., (2017). Immobilisation d'inulinase de levure sur chitosanebilles pour l'hydrolyse de l'inuline dans un système discontinu. *Int. J. Biol. Macromole.* 95, 87-93 .

Soccol, CR ; da Costa, FSE ; Letti, LAJ; Karp, SG ; Woiciechowski, AL et Souza Vandenberghe, (2017), Développements récents et les innovations dans la fermentation à l'état solide. *Biotechnologie. Rés. Innov.* 1, 52-71.

Sumantha A., Larroche C et Pandey A., (2006). Microbiologique et industrie biotechnologique de alimentation pour proteases a perspective. *Food Technol. Biotechnol.*, 244; 211–220.

S. Yegin, M. Fernandez-Lahore, A. Jose Gama Salgado, U. Guvenc, Y. Goksungur, and C. Tari, (2011). Les protéinases aspartiques de *Mucor* spp. dans la fabrication du fromage, *Microbiologie appliquée et biotechnologie* , vol. 89, no. 4, pp. 949–960.

T

Taille du marché des protéases, rapport d'analyse de l'industrie, sortie régionalelook, Potentiel de développement d'applications, Tendances des prix, Com-Part de marché et prévisions : 2020-2026.

Talhi imen , Laid Dehimat , Atef Jaouani , Radia Cherfiaa , Mohammed Berkani ,Fares Almomani , Yasser Vasseghiane , Noredine Kacem Chaouche , (2021) .Optimisation de la production de protéase thermostable sous agro-déchetsfermentation à l'état solide par un nouveau *Mycothermus thermophilus thermophile* isolé d'une source hydrothermale Hammam Debagh, Algérie.

Tišma M, Žnidaršic-Plazl P ,elo G. Tolj I, Šperanda M. Bucic-Kojic A. Planinic M. (2021) , *TrametesVersicolor* en Lignocellulose-Bioéconomie basée : état de l'art, défis et opportunités. *Bioresour. Technol.* , 124997.

Tomasz M. Karpinski , Marcin Ozarowski , Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz , Hubert Wolski et Artur Adamczak,(2021). . Examiner les préparations végétales et les composés avec des activités contre les biofilms formés par *Candida* spp.

Tolulope Oreoluwa Faniyi et Olukayode Stephen Oyatokun ,(2021). La fermentation dans la perspective de l'agriculture .

Thumm M ,(2000). Structure et fonction de la vacuole de levure et son rôle dans l'autophagie. *Microsc.*

U

Un bilan sur la production de protéase Mali B1 , Andhare p2 , Marchawala F2 , Bhattacharya I2 et Upadhyay D2 (2021) .

V

Vasseghian, Y.et Dragoi, E.-N. (2018). Modélisation et optimisation de 193 remova bleu acide lpar procédé UV et peroxydisulfate. *J. Environ. Ing.* 144, 06018003.

Velloorvalappil NJ, Robinson BS et Selvanesan P.(2013) .Polyvalence des protéases microbiennes. *Adv Enzyme Res* 1(3):1-13.

Verduzco-Oliva, R.,Gutierrez-Urbe, (2020), JA Au-delà de la production d'enzymes : la fermentation à l'état solide (FMS) comme approche alternative produire des polysaccharides antioxydants. *Durabilité* , 12, 495.

Vistwanatha K. S., Rao Appu A. G and Sigh S. A. (2010). Production et caractérisation d'une enzyme de coagulation du lait à partir d'*Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Microbiologie appliquée et biotechnologie*,85: 1849-1859.

W

Wagner, JM, Alper, HS, (2016). Biologie synthétique et génétique moléculaire dans les non-levures classiques : outils actuels et avancées futures. *Genet fongique. Biol.* 89, 126-136.

Y

Yang J.K., Shih I.L., Tzeng Y.M., Wang S.L. (2000). Production et purification de protéase à partir de *Bacillus subtilis* qui peut déprotéiniser les déchets de crustacés. *Enzymes et technologie microbienne* , 26(5-6) p. 406-413. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(99\)00164-7](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(99)00164-7).

Yoon, LW, Ang, TN, Ngoh, GC et Chua, ASM, (2014). Champignon, Fermentation à l'état solide net diverses méthodes d'amélioration de la production de cellulase. *Biomasse Bioénergie* 67 ,319-338.

Les sites web :

1-<http://ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>., 2020 . consulté 1 septembre 2021 .

2 - Allied Market Recherche, 2018, <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market;ResearchandMarket.com> . Consulté 15 septembre 2021 .

3-BCC Research, 2018, <https://www.bccresearch.com/market-recherche/biotechnologie/marchés-mondiaux-pour-enzymes-dans-les-applications-industrielles.html> . Consulté 23 août 2021 .

4- Chemical Engineering World, 31 MAI 2021, Site Web : <https://jasubhaimedia.com> . Consulté 03 juillet 2021 .

5- <https://www.capterra.fr/software/109731/minitab-statistical-software>. Consulté 02 juillet 2021

6- HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Reg.office 2021 [.techhelp@himedialabs.com](mailto:techhelp@himedialabs.com) . Consulté 17 juin 2021 .

ANNEXES

ANNEXE 1 : Composition De Milieu De Culture.**Milieu YPGA (*Yeast extract Peptone Glucose Agar*) :**

L'ajout d'hydrolysats de protéines et d'extraits cellulaires de levure permet une croissance plus rapide de sorte que pendant croissance exponentielle ou en phase logarithmique, un temps de doublement de 90 minutes est observé (Ausubel et *al.*, 1994). La peptone fournit des nutriments azotés en particulier les acides aminés et les peptides et l'extrait de levure fournit de la vitamine B complexe. Le dextrose (Glucose) est la source d'énergie facilement disponible et une bonne source de glucides pour les levures(site web n° 6)

- pour 1 litre :

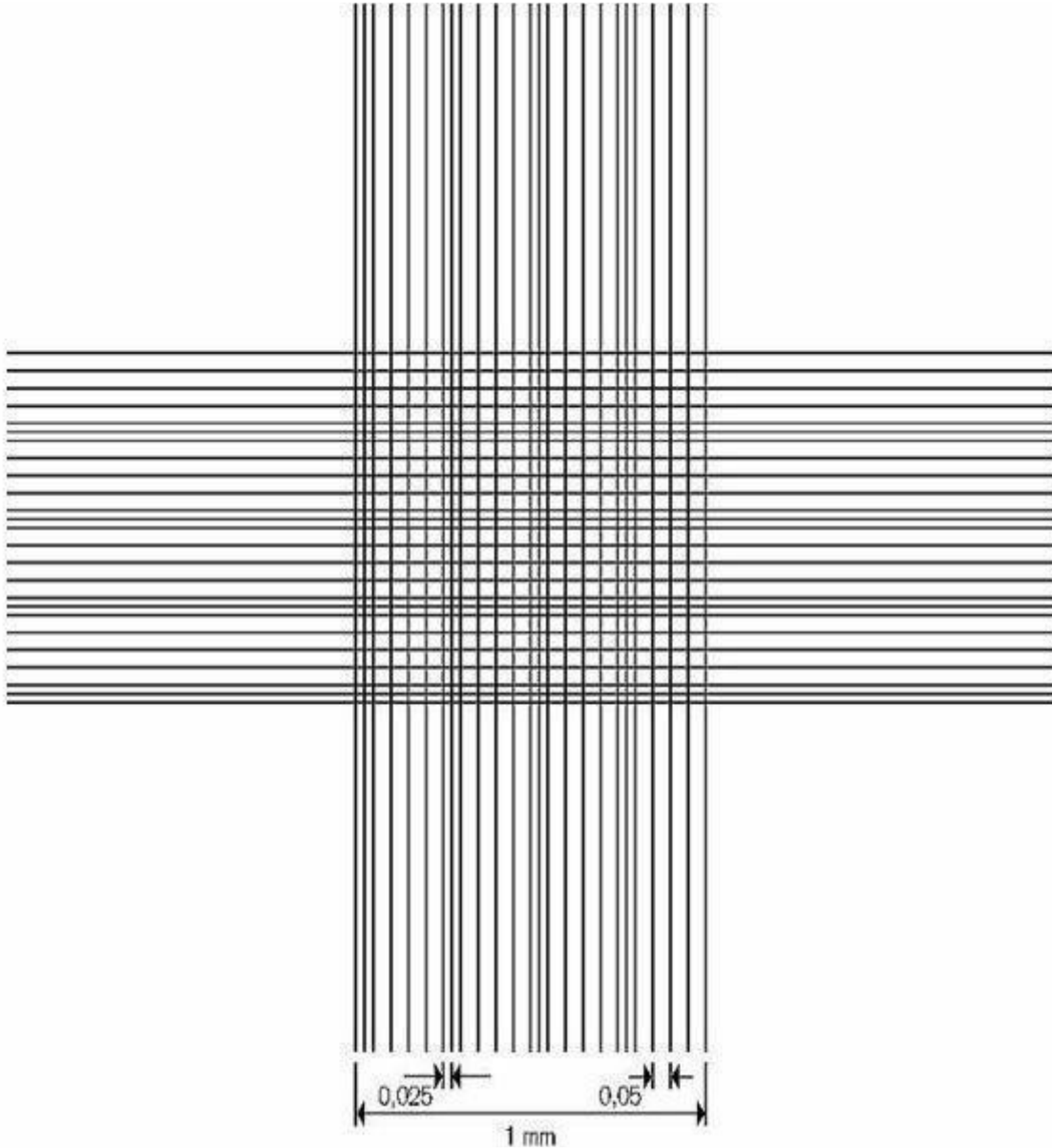
Extrait de levure	5g
Peptone.....	20g
Glucose	20g
Agar	20g
pH final.....	7

Stérilisation a l'autoclave à 120 °C pendant 20 min.

ANNEXE

Annexe 2: Le dénombrement cellulaire par comptage sur la cellule de Thomas

Concentration cellulaire = nombre des cellules \times comptées facteurs de dilution \times le facteur de conversion



Nombre des carrés \times le volume de carré

ANNEXE

ANNEXE 3 : Préparation Des Tampon

➤ pH=05 :

- Acide citrique 0.1M (C₆H₈O₇)
- phosphate disodique 0.2M (Na₂HPO₄)
- Eau distillé

➤ pH=07 :

- phosphate monosodique0.2M(NaH₂PO₄)
- phosphate disodique0.2M (Na₂HPO₄)
- Eau distillé

➤ pH=09 :

- Glycine0.2M (C₂H₅NO₂)
- NaOH.....0.2M
- Eau distillé

- Titration à l'aide d'un pH mètre (préalablement étalonné) jusqu'à pH qui nous intéresse.

ANNEXE 4 : MESURE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

1-Solutions utilisées

- Caséine 2,5 % dans Citrate de Sodium (0,02 M).

- Solution mère 100 µg /ml de Tyrosine.

- TCA 4 %.

- Na₂CO₃ 2 % dans NaOH (0,1 N).

- Folin-Ciocalteux 1/5^{ème}.

- Le dosage de l'activité protéolytique est réalisé en deux étapes :

- La 1^{ère} étape

étant la réaction enzymatique dont le mélange réactionnel est constitué de :

1ml de l'extrait brut.

1.5ml du tampon de chaque pH (05 ;07 ;09)

2.5ml de la solution de la caséine à 2.5% dissoute dans du citrate de sodium 0.02M.

Après incubation 20min au bain-marie à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 2.5 ml de TCA (4%).

- La 2^{ème} étape :

Dosage colorimétrique de l'activité enzymatique est réalisé par mélange de :

0,5 ml de Filtrat .

2,5 ml Na₂CO₃.

0,25 ml du folin ciocalteu .

Le mélange est agité et laissé stabiliser à température ambiante pendant 30 min.

ANNEXE

- Après l'incubation à température ambiante pendant 30 min la lecture de l'absorbance a lieu à

750 nm au spectrophotomètre.

2-Courbe d'étalonnage de la tyrosine:

Tableau 1 : Protocole de la courbe d'étalonnage de la tyrosine

N° de tubs	Blanc	01	02	03	04	05
Concentration de tyrosine ($\mu\text{g/ml}$)	0	20	40	60	80	100
Volume de tyrosine prélevé (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
TCA (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Na ₂ CO ₃ à 2% dans du NaOH 0,1N (ml)	2.5					
Agiter correctement puis laisser stabiliser le mélange pendant 10 min						
Réactif de Folin dilué (1/5ème) (ml)	0.25					
Mélanger après chaque addition du réactif de Folin et laisser reposer à l'ombre pendant 30 min au minimum						
Lecture de l'absorbance à 750 nm.						

ANNEXE

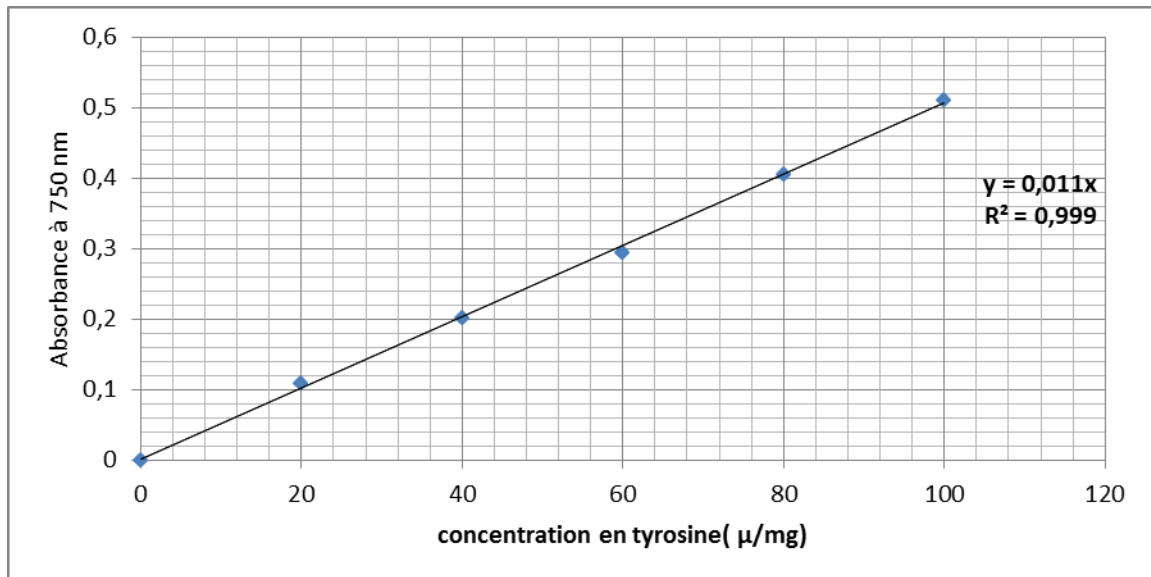


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine .

-**Activité protéolytique (µg/h/ml)** = concentration déduite de la courbe d'étalonnage x dilution x 2 (pour ramener le volume de l'échantillon à 1ml) x 2 (pour ramener le temps à 1h)

-**Activité en µ/ml** = (Activité (µ/ml) x Volume utilisé pour l'extraction) / Masse sèche.

ANNEXE 6: Dosage des protéines totales

1. Méthode de dosage des protéines selon la méthode de LOWRY (1951) .

- **Solutions nécessaires**

- Solution A : Na₂CO₃ à 2% dans du NaOH (0,1N).

- Solution B : Tartrate double de sodium et de potassium à 2% dans de l'eau distillée.

- Solution C : CuSO₄, 5H₂O à 1% dans l'eau distillée.

- Solution D : 0.5ml de solution C + 0.5 ml solution B + 50 ml solution A , ce mélange doit être préparé juste avant utilisation.

-Solution E : Réactif de folin-Ciocalteu dilué au 1/3 dans de l'eau distillée.

- **Mode opératoire**

- 0.5 ml de l'échantillon

- 2.5 ml de la solution D.

Après agitation et incubation à température ambiante pendant 10 min, 0,5ml de Folin-Ciocalteu dilué à 1/3 est ajouté.

La solution est agitée de nouveau puis incubée pendant 30 min à l'ombre à température ambiante. La lecture de l'absorbance est réalisée à 750 nm au spectrophotomètre.

2. La courbe d'étalonnage de la BSA

Solutions utilisées:

- Solution étalon : BSA (bouvine albumine sérum) dilué 0.5 % .

Tableau 2 : Préparation de la gamme d'étalonnage de la BSA (1mg/ml).

N° de tubs	Blanc	01	02	03	04	05
Solution étalon BSA dilué 0.5 % (µg/ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillée (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Solution D (ml)	5					
Agiter correctement puis laisser stabiliser le mélange pendant 10 min						
Réactif de Folin dilué (1/3 ème) (ml)	0.5					
Mélanger après chaque addition du réactif de Folin et laisser reposer à l'ombre pendant 30 min au minimum						
Lecture de l'absorbance à 750 nm.						

ANNEXE

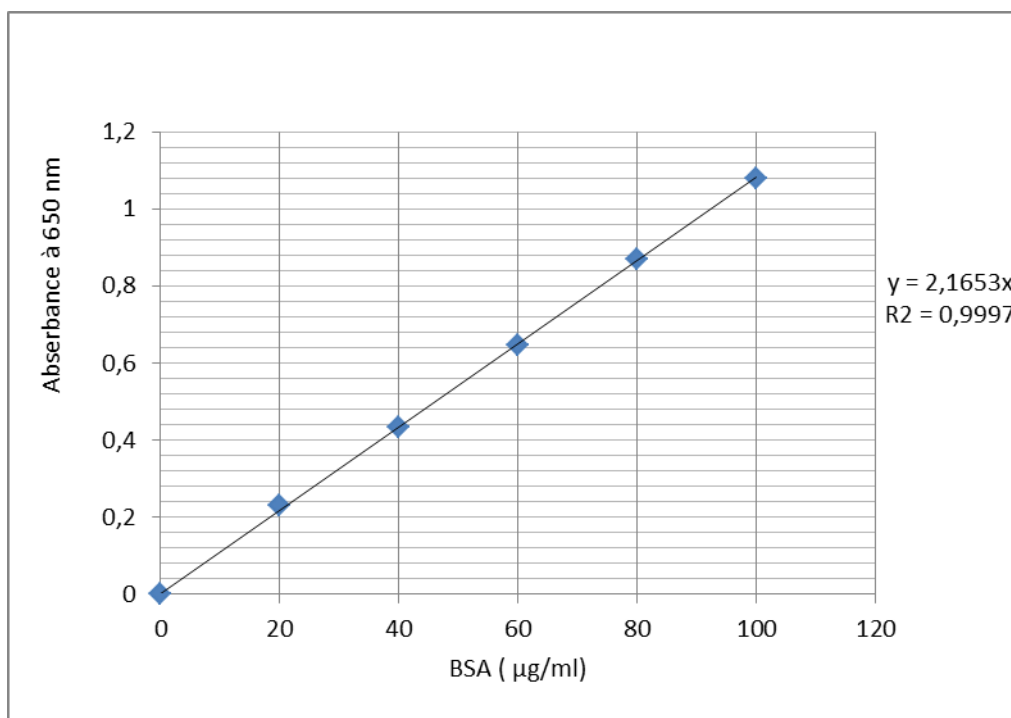


Figure 2 : Courbe d'étalon pour le dosage des protéines.

Dosage des protéines totales et de l'activité enzymatique :

Les résultats des différents dosages de l'extrait sur les différents milieux de Fermentation sont réunis dans les tableaux suivantes

Tableau 4 : L'activité enzymatique de l'extrait à l'état de fermentation solide.

Fermentation solide	Avoine			Son de blé			Mélange		
	pH=5	pH=7	pH= 9	pH = 5	pH = 7	pH=9	pH=5	pH=7	pH=9
L'activité enzymatique	16253.9	19246.32	12272.92	14991.205	25845.7	13039.975	15623.155	19246.32	12272.92
Masse des Protéine	1.4095			1.087			1.2835		
L'activité spécifique	11531.67	13657.62	8707.32	13791.35	23777.09	11996.29	12172.31	14995.19	9562.07

ANNEXE

Tableau 5 : L'activité enzymatique de l'extrait à l'état de fermentation liquide.

Fermentation liquide	Avoine			Son de blé			Mélange		
	pH = 5	pH=7	pH=9	pH=5	pH=7	pH=9	pH =5	pH=7	pH=9
L'activité enzymatique	452.925	1144.05	701.47	421.95	1113.225	435.29	488.1	1189.65	444.117
Masse des protéine	72.50			70.08			69.15		
L'activité spécifique	6.25	15.78	9.67	6.02	15.88	6.21	7.05	17.20	6.42

Etude de l'optimisation de la production de la protéase neutre par la levure *Candida sp.* Cultivée sur milieu solide.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Résumé : Ce travail est une étude comparative de la production d'une protéase par culture d'une souche levurienne *Candida sp* sur milieu solide (FMS) et milieu liquide (FML) à différents pH (acide, neutre et alcaline). Pour cela deux substrats sont testés à savoir : le son de blé et l'avoine avec un taux d'ensemencement de $4 \cdot 10^6$ cellules à 30°C. Dans un premier temps et afin de déterminer le procédé de fermentation et le substrat testé qui donne une production maximale en protéase. La méthode statistique d'un facteur à la fois (OFAT) a montré que les meilleures activités protéolytiques sont obtenues en fermentation solide à base de son de blé. Le dosage des activités protéolytiques à différents pH montre que la meilleure activité est obtenue à pH 7 (protéase neutre).

Dans un second temps, les plans statistiques de Plackett et Burman et de Box et Wilson sont respectivement utilisés pour déterminer et optimiser les facteurs influençant la production de la protéase neutre. Les milieux de cultures sont préparés par l'emploi d'un plan factoriel de Plackett-Burman à N=12 essais et N-1 facteurs : cinq facteurs réels (Température, humidité, Inoculum, Glucose, Corne steep, sulfate d'ammonium, NaCl, incubation) et deux erreurs. Les résultats obtenus montrent que les facteurs significatifs influençant la production d'enzyme par la levure *Candida Sp.* sont: l'humidité, le glucose et le sulfate d'ammonium. Les valeurs optimales des variables étudiées sont déterminées par la méthodologie de surface de réponse à savoir: L'humidité 96.82 %, glucose 0.568 g et le sulfate d'ammonium 0.46 g.

La validation du modèle a permis d'obtenir une activité de la protéase neutre de 35835.3 UI/ml, soit 2 fois plus élevé que dans les conditions non optimisées.

Ces résultats significatifs confirment l'importance de la conception statistique dans la production de protéase neutre.

Mots-clés : Protéase, FMS, FML, Son de blé, Avoine, *Candida sp*, Optimisation.

Jury d'évaluation :

Président:	Mme DAKHMOUCHE S.	M.C.A, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine 3
Encadreur:	Mme BENNAMOUN L.	M.C.B, Université Frères Mentouri, Constantine 1
Examineur:	Mme LABBANI F.Z.K.	M.C.B, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine 3

Date de soutenance : 23 / 09 / 2021