

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة الاخوة منتوري

Université des frères Mentouri Constantine 1

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Département : Biochimie/ Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : *Biochimie*

Thème:

Etude des caractéristiques physico-chimiques de la protéase de Candida sp

Présenté par : *CHAOUR Housna*

Le : 21 /09 /2021

YONES Khaoula

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr NOUADRI T., MCA, Université des frères Mentouri, Constantine 1

Encadreur : Mme DAKHMOUCHE S. MCA, ENS Assia Djébar, Constantine.

Examineur : Mme BOUKHALFA H. MCB, Université des frères Mentouri, Constantine 1

Année Universitaire : 2020- 2021

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons en premier lieu, à remercier Dieu pour nous avoir guidé et donné la force, le courage et la patience durant toutes ces années d'études. Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos plus vifs remerciements à notre encadrante Dr. Dakhmouche Scheherazed, pour sa patience, pour ses précieux conseils et pour sa disponibilité durant la préparation de ce travail.

Nous n'oublions pas de remercier, Monsieur Nouadi Tahar Maitre de Conférences classe A d'avoir accepté de présider le jury d'évaluation de ce mémoire, et Madame Boukhalfa Hayet, Maitre de Conférence classe B de nous avoir fait honneur de faire partie du jury pour examiner ce travail.

Nous adressons aussi nos remerciements à tous nos enseignants et le personnel du Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire, à tous ceux qui nous ont soutenu de près ou de loin et à tous ceux qui ont participé à notre formation du primaire jusqu'à l'université.

Dédicace

Ce projet de fin d'étude est dédié à ma chère famille. À défunte mère qui m'a arrosé de tendresse depuis ma naissance et qui m'a nourrit d'espoirs jusqu'à son dernier moment. À mon père qui n'a jamais cessé de me guider vers tout ce qui est bon dans la vie, m'a appris à supporter les épreuves en m'encourageant et en me soutenant sans cesse.

C'est avec un grand plaisir que je dédie cet œuvre à mes chères grandes sœurs et frère pour leur appui moral et pour leur amour fraternelle à mon égard.

Je dédie cet accomplissement à mes proches pour leurs encouragements permanents et leurs aides précieuses dans le besoin, pour leur gentillesse et leur soutien.

Je dédie ce modeste travail à mes amis que j'ai connus depuis mon parcours scolaire jusqu'à ce jour et qui m'ont toujours motivée.

Que mes professeurs et mes camarades de la promotion de master II (2021) en biochimie trouvent tous ici l'expression de ma reconnaissance.

Je ne saurais oublier ma collègue et amie Khaoula, qui m'a accompagné durant les périples et pendant les bons et les mauvais moments de ces dernières années.

Chaour Housna

Dédicaces

**Je dédie ce modeste travail, en premier lieu à mes chers parents
pour toutes ces années de sacrifices,**

**A mon meilleur papa dans le monde *Mourad*, qui m'as toujours
fait confiance et poussée à donner le meilleur de moi-même,**

**A toi chère maman *Samia*, qui m'as appris que la persévérance
finie toujours par payer et qui as toujours cru en moi et m'as
offert la meilleure des éducations**

***DIEU* les garde en bonne santé et les protège.**

A mes frères *Abdelhakim* et *Abderrahim*

A mes sœurs *Nadine*, *Nesrine* et *Aya*

A ma tante *Dounia*

A mon oncle *Sid Ali*

**A tous les membres de la famille, pour leur amour, et l'aide tout
au long des années scolaires.**

A ma chère collègue dans ce travail *Hosna*.

Khaoula Younes

Table des Matières

Liste des Abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale.....	1

Chapitre 1: Etude bibliographique

1. Levures.....	3
1.1. Généralités.....	3
1.2. Habitat.....	4
1.3. Caractéristiques des levures.....	4
1.3.1. Caractéristiques Physiologiques.....	4
1.3.2. Morphologie.....	4
1.3.3. Conditions de croissances.....	5
1.3.3.1. Sources de carbone.....	5
1.3.3.2. Sources d'azote.....	6
1.3.3.3. Oligoéléments et vitamines.....	6
1.3.3.4. Température.....	6
1.3.3.5. pH.....	7
1.3.3.6. Respiration et fermentation.....	7
1.3.3.7. Pression osmotique et l'activité d'eau (Aw).....	8
1.4. Classification des levures.....	8
1.5. Levures en biotechnologie.....	9
2. Enzymes protéolytiques.....	12
2.1. Classification des protéases.....	12
1. Endopeptidases.....	12
2. Exopeptidases.....	12
2.1.1. Métalloprotéases.....	12
2.1.2. Protéases à cystéine.....	13
2.1.3. Protéases à threonine.....	13

2.1.4. Protéases aspartiques.....	13
2.1.5. Protéases à sérine.....	13
2.2. Sources des protéases.....	14
2.2.1. Protéases d'origine animale.....	14
2.2.2. Protéases d'origine végétale.....	15
2.2.3. Protéases d'origine microbienne.....	15
2.2.3.1. Protéases des bactéries.....	15
2.2.3.2. Protéases des moisissures.....	15
2.2.3.3. Protéases des levures.....	16
2.3. Facteurs influençant la production de protéases.....	16
2.3.1. Effet de la source de carbone.....	17
2.3.2. Effet de la source d'azote.....	17
2.3.3. Effet de la salinité (NaCl).....	18
2.3.4. Effet du pH.....	18
2.3.5. Effet de la température.....	18
2.3.6. Effet des solvants organiques.....	18
2.3.7. Effet d'ions métalliques.....	19
2.4. Mode d'action.....	19
2.5. Caractérisation de protéase.....	19
2.5.1. Poids moléculaires.....	19
2.5.2. Température et thermostabilité.....	20
2.5.2.1. Protéases thermostables.....	20
2.5.3. pH.....	21
2.5.4. Stabilité.....	21
2.6. Applications des protéases.....	21
2.6.1. Applications alimentaires.....	22
2.6.1.1. Fromageries.....	22
2.6.1.2. Boulangeries.....	22
2.6.1.3. Produits à base de soja.....	22
2.6.1.4. Synthèse de l'aspartam.....	23

2.6.2. Industrie des détergents.....	23
2.6.3. Domaine pharmaceutique et médicale.....	23
2.6.4. Tanneries.....	23
2.6.5. Traitement des eaux usées industrielles.....	24
2.6.6. Autres applications.....	24
3. Fermentation.....	24
3.1. Fermentation en milieu liquide (FML).....	24
3.2. Fermentation en milieu solide (FMS).....	25
3.2.1. Avantages de la FMS.....	25
3.2.2. Inconvénients de la FMS.....	26
3.2.3. Les paramètres de contrôle de la FMS.....	26
3.2.3.1. Humidité.....	26
3.2.3.2. Température.....	26
3.2.3.3. pH.....	27
3.2.3.4. Aération.....	27
3.2.4. Support.....	27
3.2.5. Utilisations de la FMS en biotechnologie.....	28
3.2.6. Production industrielle de la protéase.....	28
3.2.6.1. Production d'enzymes industrielles microbiennes	29
4. Déchets de tomates.....	32
4.1. Tomate.....	32
4.1.1. Généralité.....	32
4.1.2. Description botanique.....	34
4.1.3. Compositions biochimiques de la tomate.....	34
4.1.4. Production de la tomate.....	34
4.1.4.1. Production mondiale de la tomate.....	34
4.1.4.2. Tomates industrielles en Algérie.....	35
4.2. Sous-produits de la tomate transformée.....	36

4.2.1. Déchets de tomates et leur composition chimique.....	36
4.2.1.1. Pulpes de tomates.....	37
4.2.1.2. Graines de tomate.....	37
4.2.1.3. Pelures de tomates.....	37
4.2.2. Utilisations de déchets de tomate.....	38
4.2.2.1. Alimentation.....	38
4.2.2.2. Agent antioxydant.....	39
4.2.2.3. Production d'enzymes.....	39
4.2.2.4. Production d'huiles.....	40
4.2.2.5. Traitement de diarrhée.....	40
4.3. Fermentation des déchets de tomate.....	40

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Matériel biologique.....	41
1.1. Identification de la souche.....	41
1.1.1. Principe de système ID 32.....	41
1.1.2. Méthode.....	41
1.2. Repiquage des souches.....	42
1.3. Préparation de l'inoculum.....	42
1.3.1. Suspension des cellules.....	42
1.3.2. Dénombrement des cellules par la cellule de Thoma.....	42
2. Production de la protéase par Fermentation en Milieu Solide (FMS).....	42
2.1. Préparation des milieux de culture.....	42
2.2. Conduite des FMS en Erlenmeyers.....	43
3. Etude de l'activité protéolytique.....	43
3.1. Préparation des extraits enzymatiques.....	43
3.2. Méthode de dosage de l'activité protéolytique.....	43
3.2.1. Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....	43
3.2.1.1. Principe.....	43
3.2.2. Mesure de l'activité protéolytique.....	44

3.2.2.1. Principe.....	44
3.2.2.2. Mode opération.....	44
a. Courbe d'étalonnage de la tyrosine.....	44
b. Dosage de l'activité protéolytique.....	45
3.3. Sélection de la protéase.....	47
4. Etude des caractéristiques physico-chimique de la protéase.....	47
4.1. Effet du pH sur l'activité de protéase.....	47
4.2. Effet de la température sur l'activité de protéase.....	47
4.3. Etude de la thermostabilité.....	47
4.4. Effet des sels.....	47
4.5 Effet des détergents.....	48

Chapitre 3: Résultats et discussions

1. Identification de la souche.....	49
2. Sélection du milieu de culture le plus performant pour la production de la protéase.....	49
3. Etude des caractéristiques physico-chimiques de la protéase.....	54
3.1. Effet du pH sur l'activité de protéase.....	54
3.2. Effet de la température sur l'activité de protéase.....	55
3.3. Etude de la thermostabilité.....	57
3.4. Effet des sels et des détergents sur l'activité de protéase.....	58
3.4.1. Effet des sels sur l'activité de protéase.....	58
3.4.2. Effet des sels et des détergents sur l'activité de protéase.....	60
Conclusion	62
Résumés	63
Abstract.....	64
الملخص.....	65
Références bibliographiques.....	66-82

Abréviations

ADAMs: A Disintegrin And Metalloproteinase

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique Acide

FML : Fermentation en Milieu Liquide

FMS : Fermentation en Milieu Solide

MMPs : Matrix MetalloProteases

SDS: Sodium DodécylSulfate

TCA: TriChloroacetic Acide

UI : Unité Internationale

VIH-1 : Virus de l'Immunodéficience Humaine

YPGA: Yeast extract-Peptone-Glucose-Agar

Liste des figures

Figure 1	<i>Saccharomyces sp.</i>	03
Figure 2	Morphologie d'une levure	05
Figure 3	Métabolisme central de la fermentation chez les levures	08
Figure 4	Arbre phylogénétique simplifié de la famille des protéases	14
Figure 5	Etapes production d'enzymes industrielles	30
Figure 6	Diversité des formes, tailles et couleurs des fruits de tomates (Claire, 2017)	33
Figure 7	Principaux pays producteurs de tomates dans le monde (1997- 2007)	35
Figure 8	Galerie ID 32 C	41
Figure 9	Courbe d'étalonnage de la tyrosine	45
Figure 10	Lecture de la Galerie Api 32C après 48	49
Figure 11	Sélection du milieu de culture pour la production de la protéase	50
Figure 12	Effet du pH sur l'activité de protéase	55
Figure 13	Effet de température sur l'activité protéolytique	56
Figure 14	Etude de la thermostabilité de la protéase de <i>candida sp</i>	57
Figure 15	Effets des sels sur l'activité protéolytique	59
Figure 16	Effets des détergents sur l'activité protéolytique	61

Liste des tableaux

Tableau 1	Quelques exemples des applications industriels des levures	10
Tableau 2	Quelques enzymes produites par les levures	11
Tableau 3	Quelques espèces des levures productrices de la protéase	16
Tableau 4	Substrats à faible coût utilisés lors de la production de protéase par des microorganismes	32
Tableau 5	Evolution des superficies, des productions et des rendements de la tomate pour le frais (en Algérie)	36
Tableau 6	Compositions chimiques des graines des tomates	37
Tableau 7	Composition minérale de la tomate	38
Tableau 8	Préparation de la courbe d'étalonnage de la tyrosine	45
Tableau 9	Préparation de mélange réactionnel	46
Tableau 10	Dosage de l'activité	46
Tableau 11	Activité enzymatique résiduelle après traitement par les sels	59
Tableau 12	Activité enzymatique résiduelle après traitement par les détergents	60

Introduction générale

Introduction générale

Cela fait longtemps que les enzymes font partie de notre vie quotidienne et sont, par la même occasion, indispensable pour la survie de toutes les espèces vivantes. L'utilisation des enzymes connaît un succès considérable et ouvre des perspectives nouvelles. Un avantage pouvant être utilisé dans différents domaines. Du coup, 40 % des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes parmi lesquels, des souches fongiques. En effet, les moisissures sont considérées comme les microorganismes les plus importants en biotechnologie (Belmesikh *et al.*, 2013).

Les protéases sont parmi les enzymes les plus employées en industrie, leur vente comptant pour 60% de toutes les ventes d'enzymes au niveau mondial. Les protéases sont employées principalement comme additifs dans la formulation des détergents. Les protéases d'origine bactérienne sont les plus employées, en comparaison avec les protéases fongiques ou végétale. Il y a donc un grand intérêt au niveau industriel pour les protéases (Bezawada et Jyothi, 2010). En Algérie, les enzymes importantes dans l'industrie sont importées, alors qu'elles peuvent être fabriquées par les microorganismes comme les levures.

Les levures représentent certainement le groupe le plus important de micro-organismes exploités par l'homme. Depuis la plus haute antiquité, elles ont joué un rôle de premier ordre dans l'alimentation humaine : vinification, panification, brasserie, fromagerie.

Actuellement, les levures, en tant qu'usine cellulaire, sont les sources les plus exploitées dans une large gamme d'applications industrielles biotechnologiques (Dali et Hamame, 2016), en raison de leur thermorésistance avérée. De nombreux travaux leur ont été consacrés dont la production de protéases à partir des espèces *Saccharomyces* (Villena *et al.*, 2017), *Candida sp* (Jaibon *et al.*, 2016) et d'autre souches comme *Kluyveromyces* (Sugawara, 2020).

Les enzymes levuriennes possèdent une variété de fonctions biochimiques, physiologiques et régulatrices. Au fil des siècles, les protéases levuriennes ont joué un rôle clé dans l'affinage des fromages, et maintenant le secteur industriel des enzymes. Les industries sont toujours à la recherche de nouvelles souches levurienne avec les aspects souhaités afin de produire diverses enzymes industrielles. La sélection appropriée des différents micro-organismes industriels et l'optimisation des conditions de fermentation est donc nécessaire pour produire des enzymes industrielles peu coûteuses. Il a été signalé que la levure *Candida sp* est excellente pour la production de protéase.

Le prix de revient des déchets agro-alimentaires industriels en fait d'eux une source d'énergie et de substrats très bien adaptés aux fermentations à grande échelle. Les déchets alimentaires se produisent à différentes étapes de la production, la transformation, la vente au détail et la consommation (Olfa *et al.*, 2019). La quantité de déchets alimentaires a augmenté au cours

Introduction générale

des 25 dernières années en raison de la croissance démographique et économique. Il serait intéressant de revaloriser ces déchets par la production des métabolites à hautes valeur ajoutées.

La fermentation à l'état solide (SSF), une technique respectueuse de l'environnement, qui utilise des substrats solides à faible taux d'humidité, nécessite un substrat solide adapté parmi les matériaux agro-industriels (Hamrouni *et al.*, 2019). Dans ce processus, les micro-organismes se développent et produisent une grande variété de produits tels que la production enzymatique d'esters de cire, et...etc. Notant ainsi le coût de production comme le rapportent cette étude.

L'objectif de notre travail est d'étudier la production de protéase par la levure *Candida sp* cultivé par fermentation en milieu à base de déchets de tomates. Ensuite, déterminer les caractéristiques physico-chimiques de la protéase (pH, températures, thermostabilité et l'effets des sels et détergents).

Ce travail comprend une première partie relatant l'état des connaissances sur les levures, les enzymes protéolytiques, la fermentation et déchets de tomates ; La deuxième partie expérimentale renferme les techniques et les méthodes ainsi que les résultats et leur discussion.

Chapitre 1: Etude bibliographique

1. Levures

1.1. Généralités

Les levures sont les premiers microorganismes utilisés par l'homme depuis des millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et de pain fermenté (Les Sumériens et les Égyptiens utilisaient déjà la levure pour faire lever leur pain) (Urien, 2015 ; Castan, 2016). Elles sont également les premiers microorganismes à être observés au microscope par A. Van Leeuwenhoek en 1680 mais c'est avec les travaux de Pasteur (1866-1876) que leur rôle dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence.

Les levures sont des eucaryotes, faisant partie des champignons unicellulaires (Kurtzman et Fall, 2006). Généralement, les cellules de levure sont isolées mais elles peuvent former, chez certaines espèces, des associations cellulaires, ou se présenter sous forme filamenteuse à certains stades de leur vie (Houdaya, 2015). Elles se reproduisent surtout par bourgeonnement (figure 1) ou par fission binaire (Castan, 2016). Leurs cellules sont généralement ovoïdes et leur taille varie de quelques microns à 30 microns (Miller, 2010). Les levures se différencient nettement des bactéries par leur structure cellulaire eucaryote. Le cytoplasme des cellules de levure, comme chez toute cellule eucaryote, contient les organites habituels des végétaux supérieurs non photosynthétiques (Houdaya, 2015).

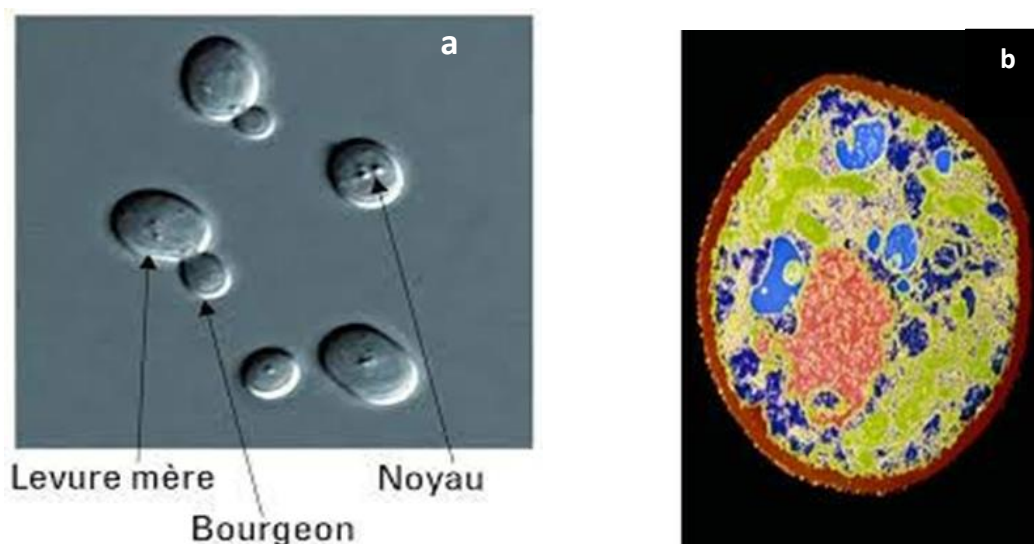


Figure 1: *Saccharomyces sp.*(Web1).

a: Bourgeonnement de levure *Saccharomyces*. b: Observation de levure de *Saccharomyces* sous microscope électronique

1.2. Habitat

Les levures sont des espèces ubiquitaires largement distribuées dans la nature et se rencontrent surtout dans les milieux riches en sucres directement assimilables (Toumi, 2018). Une large variété d'entre elles se trouve dans les eaux (au niveau des eaux douces et profondes associées au plancton), l'atmosphère (Péter *et al.*, 2017 et Belhomsa *et al.*, 2017) ; le sol (Merabti, 2017). Elles ont été également isolées à partir des fruits (Tsegaye *et al.*, 2018) comme la mangue, Tabac bœuf ... (Houdaya, 2015), du raisin (Albertin, 2020), du miel (Greppi *et al.*, 2013). Des drosophiles de savane d'Afrique intertropicale (Marie *et al.*, 1979), des fromages (Meziane et Agagna, 2019) de l'appareil digestif des mammifères et des oiseaux (Henri *et al.*, 1962, Zhaou *et al.*, 2018).

1.3. Caractéristiques des levures

1.3.1. Caractéristiques physiologiques

Le stress en biotechnologie est défini comme l'ensemble des conditions qui provoquent des changements de processus physiologiques, inhibition de croissance ou du développement. Suite à cette définition, on pourrait considérer le stress comme des variations effectuées dans le milieu de culture de la levure (température, pH, apport d'oxygène, apports nutritionnels) qui peuvent, en fonction de leur concentration, provoquer différentes «réponses dynamiques» du microorganisme à différents niveaux (macroscopique, microscopique, moléculaire), comme par exemple une modification du métabolisme cellulaire, des capacités de croissance et des fonctions physiologiques, des rendements et des productivités. Les substances inhibitrices sont parfois difficiles à éviter puisqu'elles sont souvent des substrats ou des produits de la réaction biochimique considérée (Chniti, 2017). Une concentration élevée en éthanol inhibe l'activité enzymatique (Vincent *et al.*, 2016).

1.3.2. Morphologie

La cellule de levure possède un vrai noyau et est pourvu d'inclusions cytoplasmiques : mitochondries, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, ribosomes, vacuoles, et granules de réserves (Cynthia, 2012 ; Houdaya, 2015).

La morphologie cellulaire d'une levure est donnée par la figure 2 ci-dessous.

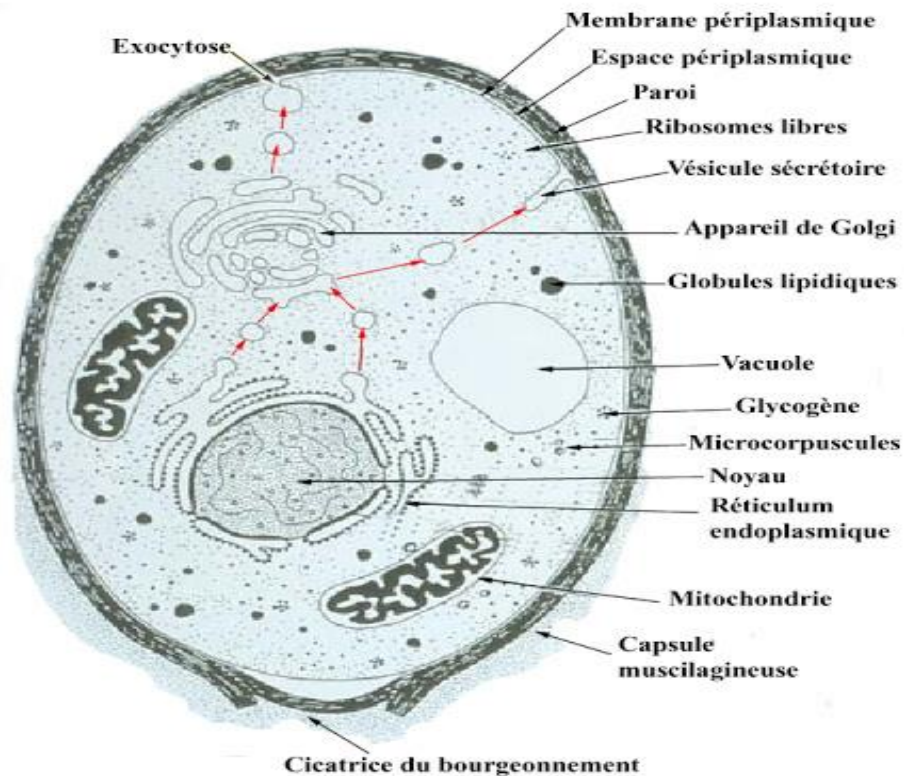


Figure 2 : Morphologie d'une levure (Web 2)

1.3.3. Conditions de croissances

1.3.3.1. Sources de carbone

Les levures ont besoin de sources carbonées et de précurseurs pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés comme les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques... (Brou, 2018 ; Soong *et al.*, 2019).

Les levures sont capables de métaboliser le glucose, le fructose, le mannose, maltose (Liang *et al.*, 2017 ; Naumova *et al.*, 2017), le glucose peut avoir un effet répressif et inhibiteur sur l'assimilation d'autres sucres par les levures. Certaines d'entre elles utilisent des saccharides, des polyols, des alcools (éthanol, méthanol, glycérol), des polysaccharides (amidon soluble, pectine), des acides organiques (l'acide lactique, l'acide citrique, tartrique, malique, succinique...) et d'autre comme : des alcanes, des acides gras et leurs esters, les triglycérides (Houdaya, 2015 ; Dakhmouche, 2016 ; Ponomarova *et al.*, 2017 ; Brou, 2018).

1.3.3.2. Sources d'azote

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes natures de sources d'azote : des sources organiques (peptone, extrait de levure, glutamine, base purines et pyrimidines...)

Chapitre 1: Etude bibliographique

influence la croissance et l'activité fermentaire des levures (Morge *et al.*, 2017) et des sources inorganiques pour la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (Gobert, 2019). Toutes les levures sont pratiquement capables d'utiliser l'azote minéral comme les sels d'ammonium utilisés dans les milieux de culture (Brou, 2018).

1.3.3.3. Oligoéléments et vitamines

Les oligoéléments ou éléments minéraux sont présents en très faibles quantités, ils sont importants pour le métabolisme des levures. Les éléments minéraux sont des constituants des métalloenzymes intervenant dans les voies métaboliques. Les éléments minéraux contiennent principalement les ions de K^+ , de Na^+ , de P^{2+} , de Mg^{2+} ... et plusieurs autres traces minérales, Al^{3+} , Ag^{2+} , Br^- , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} ... (Brou, 2018). Les ions de Ca^{2+} ont un effet significatif sur le métabolisme et la physiologie des microorganismes (Dakhmouche, 2016).

D'autres facteurs comme les vitamines comme la biotine, l'acide pantothénique, le myo-inositol, l'acide nicotinique et la thiamine sont impliquées dans la structure des coenzymes des enzymes métaboliques des levures, elles agissent donc sur la multiplication et l'activité cellulaire (Brou, 2018).

1.3.3.4. Température

Conformément aux lois thermodynamiques, la température influence les réactions biologiques. La température de culture des levures se situe entre 35 et 45°C pour leur assurer une croissance adéquate. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans leurs habitats naturels (Buzzini *et al.*, 2018). En effet, la température minimale de croissance peut se situer entre 20°C et 50°C pour les microorganismes thermophiles qui poussent à des températures comprises entre 45 et 80°C comme pour des espèces des genres levuriens de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*, 98% des levures ont une température de croissance comprise entre 20 et 45 °C (Liszkowska et Berlowska, 2021). La levure *Candida thermophila*, isolée de Thaïlande développent à plus de 50°C et certain d'autres comme : *Candida Slooffi*, *Saccharomyces telluris* et *Torulopsis bovina* (Thongekkaew et Boonchird, 2007).

Les levures thermophiles ont besoin d'une température élevée pour vivre qui peut aller jusqu'à 95°C (Vazquez *et al.*, 2019 ; Liszkowska et Berlowska, 2021). Certaines capables de se développer à des températures comprises entre 50 et 60°C sont désignées comme thermophiles modérés. D'autres levures peuvent se développer à des températures allant de 0 à 50°C, ce sont

Chapitre 1: Etude bibliographique

les levures mésophiles (Buzzini *et al.*, 2018), tandis que les levures psychrophiles ont une température maximale de croissance entre 5°C et 20°C.

1.3.3.5. pH

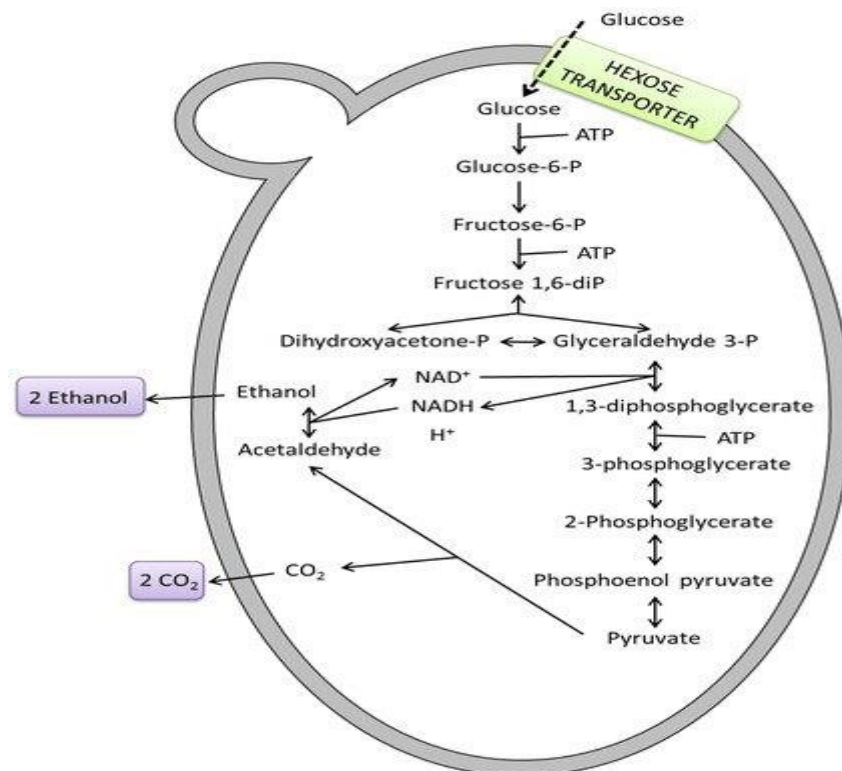
Le pH a également une influence sur le développement des levures qui ont tendance à coloniser des environnements acides et par leurs activités métaboliques (la respiration et la sécrétion d'acide organique) acidifiant encore plus le milieu. Les levures tolèrent une large gamme de pH allant de 2,4 à 8,6. Leur croissance optimale se fait à des pH allant de 4 à 6,5 (Chniti, 2017) et beaucoup d'espèces tolèrent de grandes variations de pH comme les levures du genre *Candida* qui se multiplient activement en milieu acide, de pH2 à pH6 mais peuvent survivre à pH9 (Dakhmouche, 2016). Les levures sont fortement inhibées par les acides comme l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide citrique, l'acide ascorbique et l'acide propionique (Palma *et al.*, 2018).

1.3.3.6. Respiration et fermentation

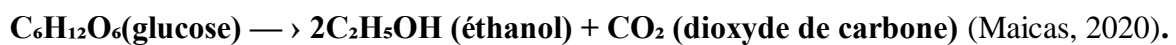
Les levures peuvent être classées selon leur mode de production énergétique, utilisant la respiration ou la fermentation. Il est important de noter que ces processus sont principalement réglés par des facteurs environnementaux (Ata *et al.*, 2018). En effet, toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène ; il n'y a pas de levures anaérobies strictes, certaines sont aérobies strictes (Moreira, 2019). D'autres sont aéro-anaérobies facultatives (respiro-fermentaire) préférant un métabolisme soit fermentaire (figure 3) même en présence d'oxygène comme *Saccharomyces cerevisiaes*, *Vanderwaltozyma polyspora*, *Torulaspota franciscaes*, *Lachancea waltii* et *Lachancea kluyveri* ; soit respiratoire en présence d'oxygène comme *Yarrowia lipolytica*, *Candida albicans*, *Eremothecium coryli*, and *Komagataella phaffii* (*syn. Pichia pastoris*) (Ata *et al.*, 2018).

Chapitre 1: Etude bibliographique

Figure 3 : Métabolisme central de la fermentation chez les levures (Maicas, 2020)



L'équation chimique schématisée pour la production d'éthanol à partir de glucose est la suivante :



1.3.3.7. Pression osmotique et l'activité d'eau (A_w)

La pression osmotique varie d'une souche à une autre. La plupart des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60 mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes, car elles sont capables de synthétiser des osmoprotecteurs (bétaine et glycérol) (Houdaya, 2015 ; Dali et Hamame, 2016).

1.4. Classification des levures

La classification de référence actuelle est celle de (Fell et Boekhout, 2011), qui classe les levures en six grands phylums (division ou embranchement) :

- **Les ascomycètes** : genre Ascosporegène et sexué, résultant de la transformation d'une cellule après la méiose.
- **Les basidiomycètes** : réalise une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.
- **Les deuteromycètes** : connu sous le nom de Fungi imperfecti (levures imparfaites), à reproduction végétative.

Chapitre 1: Etude bibliographique

- *Les zygomycètes* : ayant des zygospores (fusion de deux gamétanges), mycélium siphonné, sans cloison.
- *Les glomeromycètes* : n'ayant ni reproduction sexuée, ni mycélium siphonné, et non cloisonné.
- *Les chytridiomycètes* : ayant des zoospores (spores flagellées) à un flagelle et sans mycélium.

1.5. Levures en biotechnologie

Par leur métabolisme diversifié, les levures occupent une place essentielle dans l'industrie agro-alimentaire (Camara, 2018). Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie) (Tsegaye *et al.*, 2018) et dans la production d'enzymes. Cellulase, β -Glucosidase, protéase, lipase et amylases) (Pretscher *et al.*, 2018), du glycérol ainsi que des vitamines et des solvants (tableau 1), mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles, industriels et à la production de protéines (Houdaya, 2015 ; Ronnie, 2018). Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent aussi largement ces microorganismes, pour la production de molécules d'intérêt médical (ex : production de protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B) (Camara, 2018 ; Liskowska et Berlowska, 2021).

Chapitre 1: Etude bibliographique

Tableau 1 : Quelques exemples des applications industriels des levures

Applications industriels	Souches	Références
Fermentation alcoolique		
Vin		
Bière	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Liszkowska et Berlowka (2021) Maicas (2020)
Alcool	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	
Cidre		
Fermentations sans alcool		
Pain	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	
Café	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	
Chocolat...	<i>Pichia anomala</i>	
Pharmaceutrique		
Antibiotique	<i>Streptomyces rimosus</i>	Chniti (2015)
Probiotiques	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Var. <i>boulardii</i>	Villena <i>et al.</i> , (2017) Branduardi <i>et al.</i> , (2008)
Hormones	<i>C. albican</i>	
Anti-inflammatoires		
Hépatite B vaccin	<i>Kluyveromyces lactis</i>	
Vitamine B 12...	<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Metschnikowia gruessii</i>	
Alimentation		
Protéines		Liszkowska et Berlowka (2021)
Production de fromages...	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Meziane et Agagna (2019)
Additifs alimentaire	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	
Arômes		
Pigments...		

Les levures aussi sont impliquées dans la production des enzymes, et quelques exemples sont présentés dans le (tableau 2).

Chapitre 1: Etude bibliographique

Tableau 2 : Quelques enzymes produites par les levures

Enzymes	Souches	Références
Protéase	<i>Candida sake</i>	Maturano <i>et al.</i> , (2015)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Jaibon <i>et al.</i> , (2016)
	<i>D. vanrijiae</i> ,	Villena <i>et al.</i> , (2017)
	<i>Cryptococcus taiwanensis</i>	
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> P.	
	<i>flavescens</i> ,	
	<i>P. laurentii</i>	
	<i>R. mucilaginosa</i>	
β – Fructofuranosidase	<i>Candida guilliermondii</i>	Bousmaha <i>et al.</i> , (2007)
Lipase	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Ya-Hue Soong <i>et al.</i> , (2019)
Pullulanase	<i>Pachia patoris</i>	Akassou, (2018)
Amylopullulanase	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Dakhmouche (2016)
Pectinase	<i>Candida sake</i>	Maturano <i>et al.</i> , (2015)
	<i>Debaryomyces vanrijiae</i>	Gummadi <i>et al.</i> , (2009)
	<i>S. cerevisiae</i>	Villena <i>et al.</i> , (2017)
	<i>Candida sp</i>	
	<i>Debaryomyces sp</i>	
	<i>K. marxianus</i>	
	<i>Pichia sp</i>	
	<i>S. fragilis</i> ,	
	<i>Zygosaccharomyces sp</i>	
Cellulase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Djeddou <i>et al.</i> , (2018)
α-amylase	<i>Lipomyces kononenkoae</i>	Wanderly <i>et al.</i> , (2004)
Glucoamylase	<i>Candida guilliermondii</i>	Lagzoli, (2007)
Hémicellulase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Djeddou <i>et al.</i> , (2018)
Glucanase	<i>Hanseniaspora</i>	Chessa <i>et al.</i> , (2017)
	<i>Zygosaccharomyce</i>	
	<i>Komagataella phaffii</i>	
β - galactosidase	<i>Candida kefyr</i>	Douchet <i>et al.</i> , (2007)
	<i>Kluyveromyces sp</i>	Lyutova <i>et al.</i> , (2021)

2. Enzymes protéolytiques

Les protéases ou les protéinases font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.X). Elles catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique (Kumar *et al.*, 2008). Les enzymes protéolytiques sont présentes dans tous les organismes vivants et contribuent à la croissance et à la différenciation cellulaire. Les microorganismes se sont avérés être une source compétente et peu coûteuse d'enzymes protéases qui peuvent produire un approvisionnement continu et constant du produit souhaité. Les proteases ont une application étendue dans divers secteurs industriels (Sharma *et al.*, 2019).

2.1. Classification des protéases

Les proteases peuvent être classées selon leur sécrétion aux protéases endocellulaire et exocellulaire. Ces dernières sont les plus en portout pour l'industrie à cause de leur extraction facile. Elles sont classées selon le site de clivage :

1. Endopeptidases : (cassure du lien covalent à l'intérieur du substrat). Elles sont très peu utilisées en industrie.
2. Exopeptidases : (cassure aux extrémités NH₂ et COOH de la protéine ciblée) et sont les plus utilisées en industrie (Lopez-Otin et Bond, 2008).

Ce clivage correspond à une réaction chimique de type hydrolyse autorisant la cassure d'un lien covalent par une molécule d'eau (Rogers et Overall, 2013). Cependant, le mécanisme d'action de ces enzymes a mené à une nouvelle classification selon leur site catalytique donnant lieu à cinq familles distinctes chez les mammifères (Figure 4) (Badgujar, 2010 ; Seidah et Prat, 2012): les métalloprotéases, les protéases à cystéine, les protéases à threonine, les protéases aspartiques, et finalement les protéases à thréonine et de type serine:

2.1.1. Métalloprotéases

Se caractérisent par la présence d'un ion métallique dans le site actif, divisant cette famille en deux sous-groupes selon le site de catalyse: les MMPs (métallo protéases matricielles) composées d'un ion de zinc sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et l'inflammation (Khokha *et al.*, 2013); les ADAMs (*A Disintegrin and metalloproteinase*) interviennent auprès des protéines transmembranaires et sécrétoires et régulent la migration et l'adhésion cellulaire (Edwards *et al.*, 2008).

2.1.2. Protéases à cystéine

Les cathepsines, les caspases et la papaine jouent principalement un rôle dans l'apoptose dans le cytosol et la dégradation lysosomale. Elles sont dépendantes de la teneur en pH pour être actives (Verma *et al.*, 2016).

2.1.3. Protéases à thréonine

Ont au centre de leur triade catalytique une thréonine. Ce résidu nucléophile est essentiel pour la première étape de la catalyse puisqu'il attaque le substrat pour former un intermédiaire avant de procéder à la seconde étape, l'hydrolyse (Klein *et al.*, 2018).

2.1.4. Protéases aspartiques

La rénine et la cathepsines D et E composent la famille des protéases la moins abondante. L'activité de cette famille est favorisée par un environnement acide, mais dans certains cas comme l'aspartyl protéase du VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine), un environnement neutre est utilisé (Durand, 2019).

2.1.5. Protéases à sérine

Elle représente environ 1% de l'ensemble des protéines. Elle se divise en deux principales sous-familles : les trypsines chymotrypsines et les subtilases (Seidah et Prat, 2012). Ces deux sous-familles utilisent la même triade catalytique [une sérine (Ser), une histidine (His) et un résidu aspartique (Asp)] mais diffèrent par la configuration de la structure secondaire du module catalytique.

La sous famille des subtilases tire son nom de son homologie de séquence avec la triade catalytique de la subtilisine bactérienne de *Bacillus subtilis* (Durand, 2019). Plus de 200 subtilases sont actuellement répertoriées et divisées en six familles selon leurs homologies de séquence (les subtilisines, les thermitases, les protéinases K, les pyrolysines, les peptidases antibiotiques et les kexines) (Figure 4). Les proprotéines convertases (PCs) sont un exemple de protéases à sérine, appartenant à la sous-famille des subtilases.

Chapitre 1: Etude bibliographique

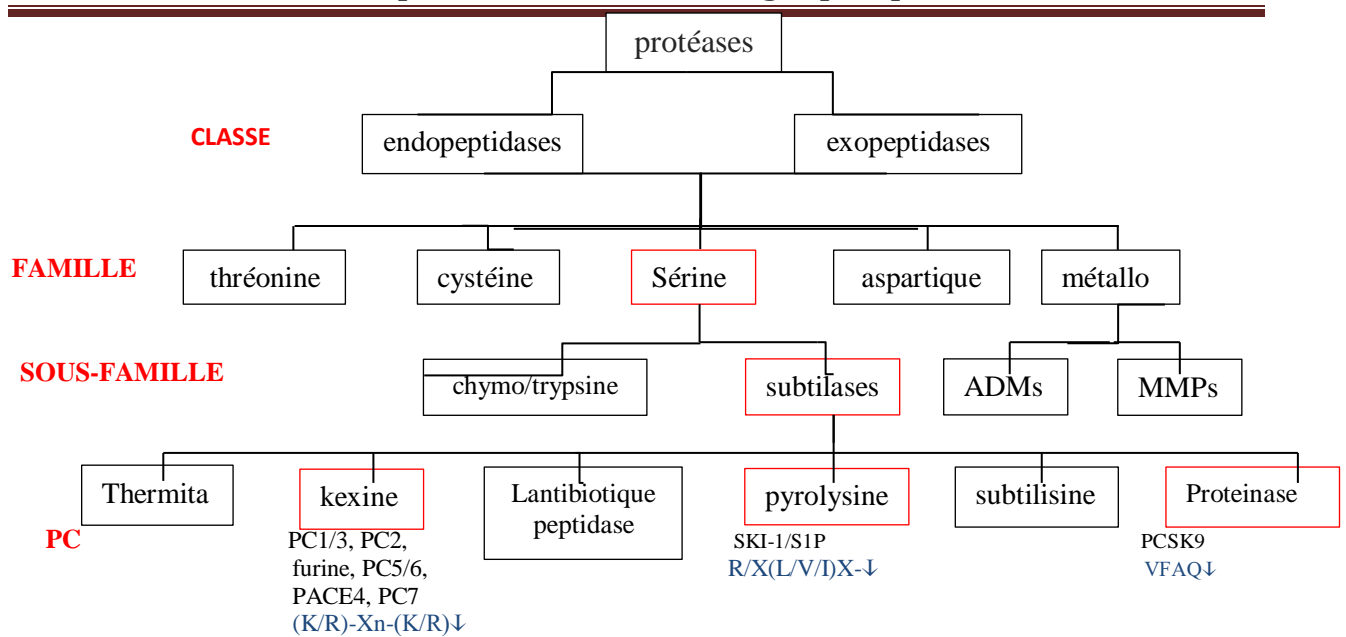


Figure 4: Arbre phylogénétique simplifié de la famille des protéases (Siezen *et al.*, 1997 et Seidah et Chrétien, 1999)

De nombreuses maladies sont associées à des altérations des protéases soit au niveau génétique (mutation ou épigénétique) ou par la dégradation du système protéolytique (inhibiteurs, substrats, facteurs de régulation). Ainsi, les protéases représentent actuellement un intérêt pharmaceutique car elles sont une cible thérapeutique avantageuse et peuvent également être utilisées comme biomarqueurs lors de diagnostics (Lopez-Otin *et al.*, 2008). Cependant cette approche peut être rapidement freinée puisqu'il est rare qu'une protéase ne cible qu'un seul substrat, il est donc difficile d'avoir une spécificité de substrat absolue, rendant l'étude des protéases complexe. Toutefois, la localisation des protéases ainsi que leurs environnements (co-facteurs, récepteurs, adaptateurs) vont faciliter cette spécificité de substrat (Durand, 2019).

2.2. Sources des protéases

La vaste distribution des protéases chez les plantes, les animaux, et les microorganismes démontre que ces enzymes sont nécessaires à la survie des organismes ; les protéases jouent des rôles physiologiques importants dans les différents processus biologiques (Raimi *et al.*, 2010). Le marché des enzymes industrielles s'est considérablement développé au cours des années 1960, lorsque les protéases alcalines ont été initialement commercialisées pour une utilisation dans les détergents (Dos Santos Aguilar et Sato, 2018).

2.2.1. Protéases d'origine animale

Une grande partie de protéases animales sont synthétisées par le pancréas sous forme d'un précurseur qui peut s'activer de façon autocatalytique, dans des conditions bien déterminés (Lakba

Chapitre 1: Etude bibliographique

et Soucha., 2015). Les protéases d'origine animale sont utilisées dans le domaine alimentaire comme la présure ou dans le domaine médical tel que la trypsine et la chymotrypsine. Ces dernières sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs (Gençkal et Tari, 2004).

2.2.2. Protéases d'origine végétale

Les protéases végétales les plus connues sont extraites du papayer (*Carica papaya*), figuier (*Ficus glabrata*), ananas (*Ananas comosus*), sarcocarpe de melon (*Cucumis melo*). Elles sont appliquées essentiellement dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (la papaine, la ficine, la bromélaïne et cucumisine) (Mahajan et Badgajar, 2010).

2.2.3. Protéases d'origine microbienne

L'incapacité des protéases végétales et animales à répondre aux exigences du monde industriel a conduit à un intérêt accru pour les protéases microbiennes (Gaur *et al.*, 2010). Ces dernières sont venues par une grande diversité de bactéries, de levures et de champignons issus de la fermentation représentent environ 40 % des ventes totales d'enzymes dans le monde en raison du fait que ces peptides sont sécrétés dans un bouillon liquide (Gimenes *et al.*, 2019). Aussi, les microorganismes industriels sont *attrayants* pour diverses raisons, y compris des taux de croissance élevés conduisant à des temps de fermentation courts, leur capacité à sécréter des protéines dans l'environnement extracellulaire (Dos Santos Aguilar et Sato, 2018).

2.2.3.1. Protéases des bactéries

Les souches bactériennes les plus importantes utilisées dans la production des protéases sont des espèces de *Bacillus sp* (Ward *et al.*, 2009). Il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés (Belmesikh, 2011). Celle-ci est très stable et résiste bien à l'action des détergents. Par ailleurs, elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa purification (Loudjani et Belmerabet, 2016). Les bactéries du lait et en particulier *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* produisent des métalloprotéases utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage des fromages ainsi que les protéases extracellulaires produites par *Streptococcus lactis*.

2.2.3.2. Protéases des moisissures

Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondial des enzymes industrielles. Ces dernières années, il y a eu des tentatives pour produire différents types de protéase à travers SmF ou SSF, en utilisant plusieurs types de substrats différents. Un grand nombre de souches

Chapitre 1: Etude bibliographique

fongiques ont été utilisées pour produire des protéases appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, entre autres (Lakba et Soucha, 2015).

2.2.3.3. Protéases des levures

Différentes levures produisent des enzymes protéolytiques (tableau 3), il s'agit essentiellement des genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. *Saccharomyces cerevisiae*, par exemple, produit trois types de protéases; une aspartyl-protéase, une sérine protéase et une métalloprotéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (Loudjani et Belmerabet, 2016).

Tableau 3 : Quelques espèces de levures productrices de la protéase

Genre	Espèce	Protéase	Référence
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	P. intracellulaires	Léger, (2020)
	<i>bayanus</i>	P. exocellulaires	Younes, (2012)
	<i>bayanus</i>	Protéase	Rafa <i>et al.</i> , (2017)
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	P. exocellulaires	Kurtzman, (2011)
	<i>buinensis</i>	Protéase	De Araújo Viana <i>et al.</i> , (2010)
<i>Metschnikowia</i>	<i>pulcherrima</i>	P. aspartique	Parapouli <i>et al.</i> , 2010
<i>Aureobasidium</i>	<i>pullulans</i>	Protéase	Chi <i>et al.</i> , (2007)

2.3. Facteurs influençant la production de protéases

La production de protéases est grandement affectée par l'environnement extérieur de la cellule, dont la nature et la concentration des sources d'azote et de carbone. Il est donc nécessaire de connaître l'effet de ces facteurs sur la production de protéases afin de bien contrôler les procédés de production et de les rendre plus performants.

Les milieux servant à la production de protéases en industrie sont généralement complexes et contiennent des concentrations élevées de sources de carbone et d'azote (Kumar et Takagi, 1999).

2.3.1. Effet de la source de carbone

Chapitre 1: Etude bibliographique

Le choix de la source de carbone a une grande importance car il influence les performances du procédé. Une grande variété de substrats peut être utilisée, dont de nombreux glucides. L'emploi du glucose a été largement étudié. Il a été établi que ce hexose, à concentration élevée, inhibe la production de protéases par un mécanisme de répression catabolique (Ferrero *et al.*, 1996 ; Kumar et Takagi, 1999 ; Gupta *et al.*, 2002 ; Puri *et al.*, 2002).

D'autres sucres simples peuvent aussi être utilisés et leurs effets sur la production de protéases sont variables. Par exemple, dans un milieu à base de soja, l'emploi de lactose ou de fructose à de faibles concentrations (3 à 4 %) permet une meilleure production de protéases que le même milieu comprenant une quantité équivalente de glucose. Par contre, une diminution dans la production de protéases est observée lorsque tous ces sucres sont présents en plus grandes concentrations (Mabrouk *et al.*, 1999).

Également, des substrats plus complexes peuvent être employés notamment l'amidon. En effet, un milieu complexe de soja et d'amidon comme source de carbone permet une meilleure production de protéases que le fructose et le lactose. L'amidon peut aussi être remplacé par le son de blé et les résultats demeurent très intéressants (Sinha et Satyanarayana, 1991). L'amidon permet une production supérieure à la pectine, au son de blé et au glucose. Par contre, dans les essais menés par Mabrouk *et al.*, (1999) sur un milieu différent à base de soja, l'amidon donne des résultats inférieurs que lorsqu'il est remplacé par le glucose (Puri *et al.*, 2002). La mélasse et la farine de maïs sont d'autres sources de carbone potentielles qui donnent aussi de faibles productions.

2.3.2. Effet de la source d'azote

Certains auteurs mentionnent que la présence d'azote inorganique est nécessaire pour la production de protéases. Ainsi, dans un milieu à base de caséine, l'ajout d'ion d'ammonium ou de nitrate en faibles concentrations stimule la production. Par contre, l'ajout d'ion d'ammonium en grande quantité a un effet répresseur (Drouin, 2005).

Généralement, de faibles productions de protéases sont obtenues avec l'emploi d'azote inorganique comme seule source d'azote. La synthèse d'enzymes est inhibée par la présence de sources d'azote organiques rapidement métabolisables comme les acides aminés et de sources d'azote inorganiques comme l'ion ammonium (Giesecke *et al.*, 1991 ; Kumar et Takagi, 1999).

Il a été mentionné qu'en présence de sources d'azotes organiques, la production de protéases est généralement plus élevée. Par exemple, le soja est une excellente source d'azote qui

Chapitre 1: Etude bibliographique

permet d'obtenir une production plus élevée de protéases (Kumar et Takagi, 1999 ; Mabrouk *et al.*, 1999 ; Drouin, 2005). Des substrats comme les peptones, la caséine, l'extrait de bœuf, les liqueurs de maïs et le son de blé peuvent aussi être utilisés, mais la production n'est pas aussi élevée que celle observée avec du soja (Mabrouk *et al.*, 1999 ; Puri *et al.*, 2002).

2.3.3. Effet de la salinité (NaCl)

Les protéines des halophiles et haloalcalophiles ont besoin de sel (NaCl / KCl) pour leur activité et leur stabilité. Toutefois, l'exigence de sel varie fortement. La plupart des protéines halophiles est active et stables jusqu'à 4 M de sel, l'optimum étant à 1–2 M et inactive et dénaturée à des concentrations inférieures à 1 M de NaCl ou de la perte de l'activité en l'absence de sel (Raval *et al.*, 2014 ; Vikram *et al.*, 2016).

2.3.4. Effet du pH

Le pH est un facteur important qui influence la croissance des microorganismes (Prescott, 1995). Il a également une forte influence sur la production de protéases. De plus, des variations importantes de pH au cours de la fermentation peuvent mener à la désactivation des protéases excrétées dans le milieu (Kumar et Takagi, 1999). 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.

2.3.5. Effet de la température

Les enzymes thermostables sont d'un intérêt particulier pour les applications industrielles en raison de leur stabilité aux températures élevées et une large gamme de pH. Les protéases thermophiles catalysent la réaction et maintiennent la stabilité à haute température. En outre, des températures plus élevées peuvent accélérer les vitesses de réaction, augmenter la solubilité des gaz et réduire l'incidence de la contamination microbienne par des germes mésophiles (Vikram *et al.*, 2016).

2.3.6. Effet des solvants organiques

Ces dernières années, une classe de microbes tolérants les solvants ont attiré l'attention. Ces organismes sont attrayants pour les applications dans la biorestauration et la biotransformation dans les milieux non aqueux et constituent, donc, une source riche d'enzymes stables aux solvants enzymes stables (Thumar et Singh, 2009). Le plus grand rôle des enzymes tolérants les solvants

Chapitre 1: Etude bibliographique

est dans le secteur pharmaceutique. Seuls les rapports limités sont disponibles dans la littérature sur les micro-organismes qui produisent des protéases stables aux solvants organiques.

2.3.7. Effet d'ions métalliques

Les ions métalliques protègent l'enzyme contre la dénaturation. Ils jouent un rôle vital dans le maintien de la conformation du site actif de l'enzyme vis à vis aux températures et des concentrations élevées des sels. Vikram *et al.*, (2016) ont révélé que, chez les bactéries halophiles, le calcium est un activateur pour la protéase et augmente sa thermostabilité.

2.4. Mode d'action

Le mode d'action des protéases diffère d'une enzyme à l'autre par la nature de leur site actif, bien qu'elles aient toutes le même principe de base. Ce processus catalytique est résumé dans trois étapes :

- Dans les deux premières étapes, l'enzyme déforme la liaison peptidique et renforce la polarité du carbonyle, qui facilite son attaque nucléophile conduisant à la formation d'une liaison covalente transitoire entre le morceau portant le carbonyle du substrat et l'enzyme avec la libération de l'autre morceau (le premier produit) proton par un proton cédé d'un résidu enzymatique
- Dans la troisième étape, une nouvelle substitution nucléophile est exercée par le OH⁻ d'une molécule d'eau et libère le deuxième produit de la réaction, où le site actif de l'enzyme se trouve régénérer par un proton (de l'H₂O) (Boureghid et Brachene, 2016).

2.5. Caractérisation de protéase

2.5.1. Poids moléculaire

Le poids moléculaire des protéases aspartiques se situe généralement entre 30 et 45 kDa (Sircar *et al.*, 2015 et Rao *et al.*, 1998). Celui des métalloprotéases est de 60 à 65 kDa, de la protéase Collagenolytique varie de 30 à 150 kDa (Kim *et al* 2002) et des proteases à sérines sont repérées entre 18 à 35 kDa. Selon Maquaire (1997), les protéases à cystéine sont un complexe d'enzymes solubles de masses moléculaires allant de 16 à 36 kDa.

La protéase *Subtilisin Carlsberg*, produite par *Bacillus licheniformis* a été découverte en 1947. La protéase constituée d'une simple chaîne de peptide avec un poids moléculaire de 27,2 kDa. Quant à la *Subtilisin Novo*, produite par *Bacillus amyloliquefaciens* son poids moléculaire est de 27,5 kDa (Drouin, 2005).

2.5.2. Température et thermostabilité

La température est l'un des paramètres les plus importants qui affectent le taux d'hydrolyse enzymatique. La thermostabilité des protéases est aussi une caractéristique importante et détermine la structure primaire de la protéine (Mahious et Rehahlia, 2020).

En général la température provoque des effets opposés sur l'activité des enzymes et la stabilité des enzymes. Plus la température monte, plus l'activité est élevée mais plus les enzymes sont instables (Illanes, 2008).

Pour les protéases alcalines bactériennes, la température optimale de la croissance de ces microorganismes et de leur production d'enzymes se situe entre 50 et 70 °C (Li *et al.*, 2013).

La température optimale de la protéase de souche levurienne *Yarrowia lipolytica* est de 37°C (Hernandez-Montañez *et al.*, 2007), et de 45°C (Jing *et al.*, 2009).

Selon Vieille et Zeikus (2001), les enzymes thermostables sont plus rigides que les enzymes non thermostables. En effet, cette caractéristique a été démontrée par des expériences de décomposition anisotropique.

2.5.2.1. Protéases thermostables

Les connaissances sur les protéases thermostables sont très peu approfondies et leurs modes de fonctionnements peu connus en comparaison des protéases conventionnelles (ex: Subtilisine Carlsberg). Ferrero et son équipe (1996), ont démontré que les protéases alcalines de *Bacillus licheniformis* MIR 29, une souche thermophile (45°C), conservent 100% de leur activité lorsqu'elles sont incubées à 60°C pendant 30 minutes. Par contre, la Subtilisine Carlsberg, qui n'est pas une protéase thermostable, possède une demi-vie de seulement 2.5 minutes à 60°C.

Les protéases thermostables trouvent facilement leur place dans le monde industriel des enzymes en raison de leur grande activité et stabilité (Demirijan *et al.*, 2001). Depuis quelques années, la découverte de nouvelles protéases thermostables s'est produite par l'isolement et le screening des microorganismes étant eux-mêmes résistants à de hautes températures. Ces microorganismes thermophiles préfèrent les températures plus élevées pour leur croissance et ont donc besoin d'enzymes thermostables pour effectuer les réactions nécessaires (Chenel *et al.*, 2011).

2.5.3. pH

Le pH est une caractéristique typique des protéases (Williams *et al.*, 2012), Les protéases ont une gamme du pH dans laquelle leur activité est optimale, en protéases acides, neutres et alcalines (Belmesikh, 2011).

Selon l'origine, la protéase des levures présente des pH variés. L'activité de protéase produite par *Candida sp* et *Yarrowia lipolytica* ont montrés que le pH optimal est de 7 (Hesham *et al.*, 2017 ; Flores *et al.*, 2016), les levures *Metschnikovia pulcherrima* et *Wickerhamomyces anomalus* produites de protéase acide (Schlander *et al.*, 2017) et d'autres levures produites de protéase alcaline comme *Aureobasidium pullulans* (Chi *et al.*, 2007).

La protéase fongique est stable dans une gamme de pH de 3 à 7,5 avec différent pH optimum, le pH de protéase chez *Aspergillus flavus* est 6,8 (Franco *et al.*, 2017), *Aspergillus niger* de pH 3 ; 4,5 ; 5 ; 6,5 et 7, ensuite *Aspergillus oryzae* a un pH de 7 (Hu *et al.*, 2020 ; Belmesikh, 2019).

Il existe des bactéries qui produisent la protéase à différent pH, les *Bacillus* et *Teredinobacter turnirae* à pH neutre de 7-7,5 (Contesini *et al.*, 2017 ; Sharma *et al.*, 2017), et d' autres bactéries comme *Stenotrophomonas sp* à pH 8 de (Sulistiani et Soeka 2017).

2.5.4. Stabilité

La stabilité des protéases augmente considérablement en cas d'addition des ions Ca^{2+} au milieu et au contraire elle diminue si des agents séquestrant sont ajoutés. Ainsi, ces protéases sont inactivées en présence d'agents chélateurs forts (ex : EDTA), qui enlèvent le Zn^{2+} , alors que l'enlèvement des ions Ca^{2+} affecte seulement leur thermo-stabilité (Wilkesman et Kurz, 2009 ; Belitz *et al.*, 2009).

2.6. Applications des protéases

La naissance de l'industrie des enzymes a coïncidé avec le début du vingtième siècle et avec l'apparition des premières enzymes microbiennes, essentiellement les amylases. Aujourd'hui, l'application de différentes enzymes a connu un grand essor dans des domaines extrêmement variés (Durand et Monson, 1982).

Les proteases font partie des enzymes industrielles : les hydrolases. Elles représentent environ 60-65% des ventes totales des enzymes en raison de leurs applications dans plusieurs

Chapitre 1: Etude bibliographique

secteurs industriels (Chellappan *et al.*, 2006 ; Barnali *et al.*, 2008 ; Mukherjee *et al.*, 2008) à savoir:

2.6.1. Applications alimentaires

Les protéases sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire (Henki, 2000) :

2.6.1.1. Fromageries

L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages. Les protéases employées sont surtout des protéases acides. La majorité des protéases employées sont produites par *Mucor sp*, *Bacillus subtilis* et *Endothica parasitica*. Elles sont utiles pour la coagulation des protéines du lait. La présure de veau a longtemps été l'enzyme utilisée pour ce processus. Cependant, elle est de moins en moins utilisée car elle provient du système digestif de très jeunes veaux. Comme il n'est pas économiquement viable de tuer les veaux aussi jeunes, elle tend à être remplacée par des protéases microbiennes. Les protéases fongiques acides, alcalines et neutres produites par *A. oryzae* ont également été utilisées en industrie laitière (Aguilar *et al.*, 2008).

2.6.1.2. Boulangeries

La farine de blé est très utilisée en boulangerie. Elle contient du gluten, une protéine insoluble, qui est responsable des propriétés de la pâte. Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten, à un degré plus ou moins important, selon les caractéristiques désirées de la pâte (Aguilar *et al.*, 2008). Le traitement de la pâte facilite sa manipulation et permet la production d'une grande variété de produits. Également, des protéases d'origine bactérienne sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte.

2.6.1.3. Produits à base de soja

Des protéases neutres et alcalines sont utilisées, depuis très longtemps, pour préparer la sauce de soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Les modifications des protéines du soja par les protéases aident à augmenter leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, le traitement de ces protéines par la protéase alcaline à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats de protéines solubles avec des propriétés nutritives très intéressantes. Ces hydrolysats sont utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et les boissons fruitées et dans les formulations d'aliments diététiques (Lakba et Soucha, 2015).

2.6.1.4. Synthèse de l'aspartam

Biens que les protéases soient des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse. Sous certaines conditions cinétiquement contrôlées, une préparation de thermolysine provenant de *Bacillus thermoprotolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartam (un édulcorant à basse calorie) à partir de l'acide L-aspartique et de la L-phénylalanine méthyle ester. Il est produit industriellement par Toya Soda (Japon) (Leisola *et al.*, 2001, Belmessikh, 2011, Zemmouri et Zemouri, 2017).

2.6.2. Industrie des détergents

Les protéases présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergents pour leur capacité à éliminer les taches protéiques vue leur avantage unique qui ne peut autrement être obtenue avec la technologie des détergents classiques. Maintenant, elles sont ajoutées comme ingrédients clés, ce qui représente environ 25% des ventes totales dans le monde entier des enzymes. Parmi les principales conditions préalables pour l'utilisation des protéases dans la production des détergents sont : l'action sur une large gamme des substrats, l'activité et la stabilité à des pH et à des températures élevées et en présence des agents oxydants additionnés (Chellappan *et al.*, 2006 ; Mukherjee *et al.*, 2008). Aujourd'hui, toutes les protéases des détergents actuellement commercialisés sont des protéases à sérines (subtilisines et/ou des protéases alcalines) produites par *Bacillus sp* (Sine, 2010 ; Singh *et al.*, 2016).

2.6.3. Domaine pharmaceutique et médicale

La grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme aide digestif chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. L'asparaginase provenant d'*E.coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie (Gupta *et al.*, 2002, Belmesikh, 2011).

2.6.4. Tanneries

Dans la tannerie, le délainage enzymatique est utilisé depuis le début du siècle dernier et plusieurs souches microbiennes et diverses méthodes ont été suggérées. Les protéases sont utilisées pour leur capacité à libérer les poils et la laine des peaux. Cette opération se fait à des pH élevés, et nécessite donc des protéases alcalines, comme celles produites par *Bacillus licheniformis*. Après l'enlèvement des poils, les peaux subissent le reverdissage, étape essentielle

Chapitre 1: Etude bibliographique

afin de rendre la peau douce et élastique. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients, dont des impacts majeurs sur la sécurité des travailleurs et sur l'environnement.

De plus, le traitement des eaux usées de ces industries cause de sérieux problèmes. Par conséquent, l'emploi d'enzymes dans les procédés est maintenant privilégié. De plus, l'amélioration des procédés, la découverte et la mise au point de nouvelles protéases plus performantes permettent l'emploi grandissant des enzymes dans cette industrie (Herida et kihal, 2011).

2.6.5. Traitement des eaux usées industrielles

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. Des essais effectués dans différentes industries alimentaires produisant des rejets riches en protéines ont donné des résultats très intéressants, qui permettent de constater le potentiel des protéases pour le traitement de ces déchets (Kumar et Takagi, 1999). Les enzymes protéolytiques de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyliquefaciens*, *Streptomyces sp* et de différentes souches d'*Aspergillus* sont actuellement utilisées dans ce domaine (Gupta *et al.*, 2002 ; Hernandez *et al.*, 2006).

2.6.6. Autres applications

La protéase neutre peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Ils sont employés aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (Loudjani et Belmerabet, 2016).

3. Fermentation

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

3.1. Fermentation en milieu liquide (FML)

La fermentation en milieu liquide peut être considérée comme une violation de l'habitat naturel des microorganismes, en particulier les champignons. Elle consiste à faire croître les microorganismes sur un substrat nutritif liquide. Ce type de fermentation a été traditionnellement

utilisé pour la production industrielle des enzymes, en raison de la facilité de contrôle des différents paramètres comme le pH, la température, l'aération, l'oxygène dissous et l'humidité (Singhania *et al.*, 2009).

3.2. Fermentation en milieu solide (FMS)

La fermentation en milieu solide est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre. De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules. Le développement des champignons filamenteux en fermentation solide se fait par extension et ramification des filaments formant le mycelium (Rahardjo *et al.*, 2006).

Les microorganismes utilisés en fermentation solide sont essentiellement les moisissures et certaines bactéries. Les champignons filamenteux sont les plus importants et les mieux adaptés pour les cultures en FMS.

La production des différents métabolites est beaucoup plus importante dans les procédés en FMS comparée à celle des cultures submergées (Thomas *et al.*, 2013). Celle des enzymes ramenés au volume des réacteurs est près de cent fois plus importante en culture solide (Duchiron et Copinet, 2011). Les premières applications non alimentaires des FMS ont porté sur la production d'enzymes, en particulier les hydrolases qui agissent sur les polymères végétaux.

3.2.1. Avantages de la FMS

La fermentation en milieu solide présente une multitude d'avantages par rapport à la fermentation en milieu liquide (Pandey et Soccol, 2000, Djama et Abdelilah, 2018) :

- Simplicité et grande reproductibilité.
- Moins d'espace de travail nécessaire.
- Moins de perte d'eau, ce qui permet d'éviter le problème des effluents liquides à traiter dans le cas de la FML.
- Matériels utilisés moins complexes d'où réduction des coûts.
- Absence d'un contrôle rigoureux des paramètres de la fermentation.
- Réduction de l'énergie requise.
- Le produit final (spores, métabolites...) est facilement récupérable et peut être utilisé directement ou après un simple séchage.
- Le volume du produit entreposé est réduit, d'où la diminution du coût de stockage.

Chapitre 1: Etude bibliographique

- Diminution des risques de contaminations microbiennes à cause de la faible humidité. Ce qui rend une éventuelle stérilisation du substrat non nécessaire.
- Simplicité des milieux de culture, en effet le substrat de fermentation est généralement très simple et le plus souvent naturel.
- Aération est plus faible qu'en milieu liquide vu qu'elle est facilitée par la porosité du matériel.
- Si on a affaire à une extraction d'enzymes, la quantité du solvant utilisé est très réduite.
- Simple technologie de production d'enzymes commerciales par FMS est, elle ne porte pas sur des micro-organismes génétiquement modifiés (Raimbault, 1980).

3.2.2. Inconvénients de la FMS

Les inconvénients évoqués par les mêmes auteurs (Pandey et Soccol, 2000, Djama et Abdelilah, 2018) sont les suivants :

- Le principal inconvénient est le risque d'une élévation excessive de la température à cause des problèmes du transfert de chaleur.
- Choix limité des microorganismes utilisables en raison du faible taux d'humidité.
- La quantité d'eau utilisée en début de fermentation doit être mesurée avec une grande précision afin d'obtenir le pourcentage d'humidité le plus favorable possible à la croissance du microorganisme ; ce taux diffère selon la souche et le substrat.
- Difficulté de régulation de certains paramètres tels que le pH.
- Transfert limité de chaleur et de masse, ce qui impose une certaine porosité du substrat.

3.2.3. Paramètres de contrôle de la FMS

La conduite de la FMS est régie par des paramètres en fonction des conditions de croissance des différents micro-organismes ainsi que l'objectif fixé préalablement (production de biomasse, d'arômes, d'enzymes...). Ces paramètres de la FMS sont essentiellement l'humidité, la température, le pH et l'aération (Durand, 1983 ; Pandey *et al.*, 2008).

3.2.3.1. Humidité

La quantité d'eau à ajouter est en fonction de la capacité de rétention d'eau du substrat solide et de la nature du microorganisme. Cette teneur en eau doit être suffisante pour le métabolisme des champignons tout en gardant la matrice solide (pas d'écoulement d'eau) et sans affecter la porosité du substrat et par conséquent réduire les échanges gazeux (Gervai et Bensoussan, 1994 ; Djama et Abdelilah, 2018).

3.2.3.2. Temperature

Le dégagement de la chaleur générée au cours des activités métaboliques des microorganismes se traduit par une augmentation de la température. Ceci pose un sérieux problème au cours de la fermentation, aussi bien à l'échelle du laboratoire qu'à l'échelle industrielle. Par

Chapitre 1: Etude bibliographique

conséquent, le maintien de la température établie en début de la fermentation (généralement température optimale de la croissance du microorganisme) est une tâche très difficile (Raimbault, 1980 ; Djama et Abdelilah, 2018). La faible conductivité thermique des matériaux, l'absence de l'agitation ainsi que la faible teneur en eau constituent les facteurs majeurs qui limitent le transfert de chaleur au cours de la FMS.

3.2.3.3. pH

L'activité métabolique des microorganismes engendre la production d'une multitude de produits dans le milieu de culture. Ceci provoque une variation du pH influençant la bonne croissance des microorganismes. Le pH initial d'une culture est ajusté à son optimum par la solution nutritive qui imprègne le support. Néanmoins, le maintien du pH au cours de la fermentation n'est pas facile à réaliser en particulier pour les FMS non agitées.

Cependant, l'utilisation des tampons permet de résoudre ce problème ; par ailleurs, Raimbault (1980) et Roussos (1985) ont démontré qu'un mélange de sulfate d'ammonium et d'urée confère au milieu un pouvoir tampon et permet donc de maintenir le pH à des valeurs favorables à la croissance des microorganismes (Djama et Abdelilah, 2018).

3.2.3.4. Aération

Selon Raimbault (1980), l'aération au cours de la FMS permet d'assurer :

Le maintien des conditions en aérobios

- L'élimination du CO₂ et de certains métabolites volatils.
- La régulation de l'humidité.
- La régulation de la température en évacuant la chaleur dégagée par les microorganismes.

Au cours des FMS, l'aération des cultures se fait par injection d'air comprimé stérile à travers les fermenteurs à aération forcée. Son débit est fonction de la nature du microorganisme mis en jeu et de la porosité du substrat.

3.2.4. Support

Le support est l'un des paramètres les plus importants en fermentation en milieu solide. Il doit être choisi avec attention en fonction de plusieurs facteurs comme la taille des particules, la porosité, la composition biochimique dans le cas d'un support organique puisque celle-ci aura une incidence sur les microorganismes et sur le profil enzymatique (substances inductrices), sa capacité de rétention d'eau et/ou sa capacité à contenir les éléments nutritifs (source de carbone, d'azote et de sels minéraux), sa disponibilité et son coût (Manpeet *et al.*, 2005, Krishna et Chundakkadu, 2005). Ils sont classés en deux catégories, les supports inertes et organiques, et se présentent sous trois formes :

Chapitre 1: Etude bibliographique

- 1) Sous la forme de matériaux organiques naturels (amylacés). Ce sont généralement des sources de polymères insolubles, complexes et hétérogènes (bagasse, pulpes de betterave, paille, bois, son de blé, manioc...). Ils servent à la fois de substrat (source de carbone) et de support.
- 2) Sous la forme de matériaux synthétiques (mousse de polyuréthane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif.
- 3) Sous la forme de matériaux minéraux (granulés d'argile, perlite, pouzzolane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif (Durand et Alani, 1998).

3.2.5. Utilisations de la FMS en biotechnologie

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

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

3.2.6. Production industrielle de la protéase

Les enzymes industrielles sont des enzymes utilisées par diverses industries à des fins commerciales. Les enzymes industrielles représentent le cœur des procédés biotechnologiques. Le marché mondial des enzymes industrielles est passé de 2,2 milliards de dollars en 2006 à 4,9 milliards de dollars en 2013 (BCC-Business Communications Company, Inc, 2008, 2013). Les applications nouvelles et émergentes ont contribué à stimuler la demande d'enzymes et l'industrie répond avec un flux continu de produits innovants (Chander et Kaur, 2015).

Le marché des enzymes industrielles est divisé en trois segments d'applications : les enzymes techniques, les enzymes alimentaires et les enzymes pour l'alimentation animale (Chander et Arora, 2014). Les protéases couvrent 60% du marché total des enzymes et comptent parmi les enzymes commerciales les plus précieuses.

Les plantes, les animaux et les microbes sont les principales sources de production de protéases :

- La majeure partie des protéases végétales, par exemple, la papaïne, la bromélaïne et la ficine qui ont des applications majeures dans les industries biotechnologiques et l'industrie alimentaire où elles sont ajoutées à différents stades de la production (Nieri *et al*, 1998).
- Les enzymes ont été extraites de sources animales depuis l'Antiquité, où le lait transporté dans l'estomac des veaux coagulait (en raison de l'activité de la présure de veau ou de la

Chapitre 1: Etude bibliographique

chymosine). La meilleure source de l'enzyme est le quatrième estomac des veaux non tissés, où elle est présente avec la pepsine, mais le rapport pepsine/présure est faible.

- Les sources préférées de protéases sont les microbes en raison de leur croissance rapide et de la facilité avec laquelle ils peuvent être génétiquement manipulés pour générer de nouvelles enzymes aux propriétés modifiées et sont actuellement utilisés par l'industrie des détergents, par ex. protéases à sérine (Harwood et Cranenburgh, 2006).

3.2.6.1. Production d'enzymes industrielles microbiennes

La production d'enzymes industrielles par des micro-organismes est une étape nécessaire dans les secteurs industriels. La production d'enzymes industrielles à partir de microorganismes implique différentes étapes (Francois, 2019) comme la montre la Figure 5.

Chapitre 1: Etude bibliographique

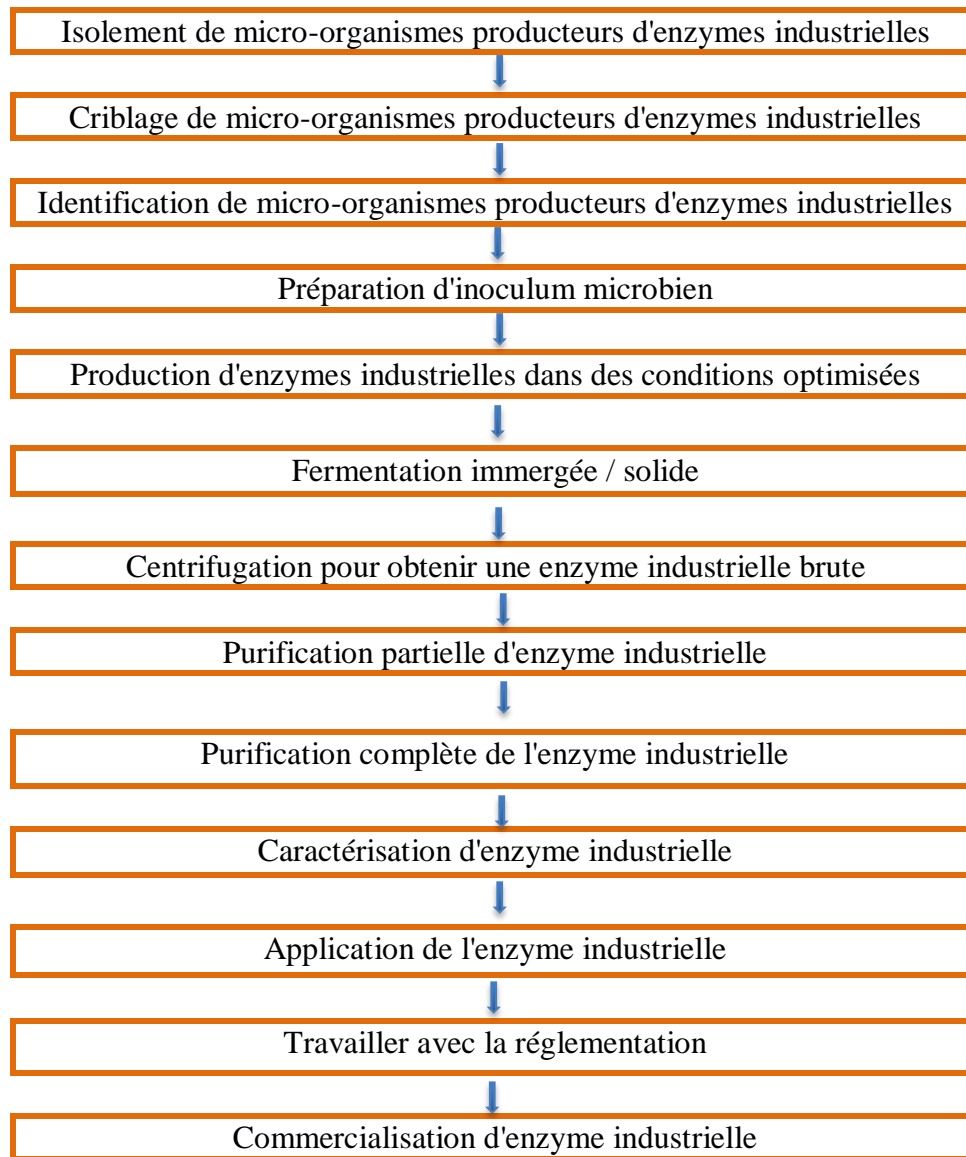


Figure 5 : Etapes de production d'enzymes industrielles (Francois, 2019)

La plupart des bactéries et des champignons utilisés pour produire des enzymes industrielles sont génétiquement modifiés pour les surproduire en quantité importante.

La fermentation à l'état solide et submergée est souvent utilisée pour produire des enzymes industrielles. Des enzymes industrielles ayant la même application peuvent être coproduites dans un même milieu de fermentation. Dans ce cas, le processus de production devient rentable et la stabilité enzymatique est assurée (Francis *et al.*, 2011).

Il n'existe pas de milieu de croissance spécifique pour la production industrielle optimale d'enzymes par des bactéries ou des champignons. Chaque espèce bactérienne ou fongique a ses propres conditions de croissance pour produire des enzymes industrielles en quantité importante. (Kumar et Takagi, 1999).

Chapitre 1: Etude bibliographique

Les industries sont toujours à la recherche de nouvelles souches microbiennes avec des caractéristiques souhaitées afin de produire diverses enzymes industrielles pour répondre à la demande actuelle en enzymes. Différentes conceptions expérimentales statistiques sont utilisées pour améliorer la production des enzymes industrielles par des micro-organismes. Comme les plans d'expériences de *Plackett-Burman* (Xiao *et al.*, 2015).

D'autre part, l'utilisation des résidus agricoles ou des sous-produits comme substrats (tableau 4) de production pour produire des enzymes industrielles par des micro-organismes rend le processus de fermentation plus rentable. Par exemple :

- ✓ Shivakumar (2012) a coproduit des quantités importantes d'amylase et de protéase par *Bacillus sp* utilisant des substrats bon marché sous fermentation à l'état solide.
- ✓ De même, les déchets agro-industriels du tourteau de moutarde étaient le substrat de choix pour la coproduction d'amylase et de protéase par *Bacillus megaterium B69* (Saxena et Singh, 2014).
- ✓ La protéase a été produite par *Aspergillus oryzae* sur milieu solide en utilisant des déchets de tomate comme substrat de fermentation (Boukhalfa, 2015).
- ✓ Utilisation de déchets de tomate comme substrat de fermentation pour la production de la protéase alcaline sur milieu solide par des moisissures (Abdou et Mebarek, 2017).

L'utilisation de sous-produits ou de résidus agricoles bons marché ne rend pas seulement la fermentation et la production rentables, mais réduit également la pollution de l'environnement qui peut être causée par l'élimination des sous-produits ou des résidus agricoles. Quelques exemples des substrats à faible coût utilisés lors de la production de protéase par des microorganismes sont récapitulés dans le tableau 4. En effet, si un substrat bon marché est choisi avec soin pour faire croître le microorganisme, un tiers du coût du processus peut être réduit (Niyonzima et More, 2015).

Chapitre 1: Etude bibliographique

Tableau 4 : Substrats à faible coût utilisés lors de la production de protéase par des microorganismes

Substrats	Microorganisme	Enzymes produites	Références
Déchets de tomates	<i>Aspergillus oryzae</i>	Protéase neutre	Belmesikh (2011)
	<i>Aureobasidium sp</i>	Protéase alcaline	Medjdoub et Chouai (2018)
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Protéase	Boukhalfa (2015)
	<i>Penicillium sp</i>	Protéase alcaline	Abdou et Mebarek (2017)
	<i>Scedosporium sp.</i>	Protéase alcaline	Abdou et Mebarek (2017)
Son de blé	<i>Aspergillus oryzae</i> (NRRL 2217)	Protéase neutre	Sumantha <i>et al.</i> , (2005)
	<i>Mucor miehei</i>	Protéases acides	Manpreet <i>et al.</i> , (2005)
	<i>Aspergillus niger</i> (LBA02)	Protéase	De Castro <i>et al.</i> , (2014)
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Protéases acides	Manpreet <i>et al.</i> , (2005)
	<i>Streptomyces sp.</i> (CN902)	Protéase alcaline	Lazim <i>et al.</i> , (2009)
Son de riz	<i>Aspergillus niger</i> (MTCC 281)	Protéase neutre	Paranthaman <i>et al.</i> , (2009)
Déchets du café	<i>Aspergillus oryzae</i> (CFR305)	Protéase alcaline	Murthy et Naidu (2010)
Déchets d'huile de noix de coco	<i>Aspergillus oryzae</i> (NRRL 2217)	Protéase neutre	Sumantha <i>et al.</i> , (2005)
Farine de déchets de poissons	<i>Streptomyces sp.</i> (CN902)	Protéase alcaline	Lazim <i>et al.</i> , (2009)

4. Déchets de tomates

4.1. Tomate

4.1.1. Généralité

La tomate (*Solanum Lycopersicum*) est originaire des vallées fertiles du Mexique. Elle a d'abord été cultivée et améliorée par les indiens du Mexique, sous le nom aztèque « tomatl », avant d'être ramenée en Europe par les conquistadores. Neuf espèces sauvages peuvent être observées en Amérique du sud, dont seulement deux comestibles, la « tomate groseille » (*Solanum pimpinellifolium*) et la « tomate cerise » (*Solanum lycopersicum var cesariforme*) qui est l'ancêtre de nos tomates actuelles (Belmassikh, 2011 ; Bénard, 2018).

En Europe les italiens ont été les premiers à la consommer dès le 16ème siècle, notamment en sauce, et c'est sous cette forme qu'elle atteint la France par la Provence au 17ème

Chapitre 1: Etude bibliographique

siècle, avant d'être popularisée à Paris lors de la révolution. La tomate a longtemps été considérée comme toxique, et on lui associait tous types de vertus maléfiques à cause de sa ressemblance avec la mandragore. Elle a donc d'abord été utilisée en tant que plante ornementale, puis en 1778, elle a rejoint le catalogue de semence potagère de Vilmorin-Andrieu (Boukhalfa, 2015).

Les variétaux débiteront au 20ème siècle, pour produire des tomates plus régulières, plus productives, et plus résistantes aux maladies. Les modes de production évoluent également, la production de tomates sous serre toute l'année, notamment aux Pays- Bas prend de l'ampleur. Aux Etats-Unis par contre, les cultures restent davantage effectuées en plein champ de façon mécanisé.

La production et la consommation mondiales de tomates sont devenues très importantes, et depuis les années 90, les consommateurs se plaignent de la standardisation de ce produit et de la perte de goût de la tomate. Les recherches actuelles s'orientent donc plus vers une caractérisation et une amélioration de la qualité organoleptique du fruit de tomate (Bénard, 2018).



Figure 6 : Diversité des formes, tailles et couleurs des fruits de tomates (Claire, 2017)

Chapitre 1: Etude bibliographique

4.1.2. Description botanique

La tomate est une plante annuelle buissonnante, poilue et aux tiges plutôt grimpantes. Elle est potagère et herbacée, sa taille varie de 40 cm à plus de 5 mètres selon les variétés et le mode de culture (Bensaid, 2020).

4.1.3. Compositions biochimiques de la tomate

La tomate est un fruit, mais elle est considérée comme un légume. Son principal atout nutritionnel est sa richesse particulière en vitamine C et lycopène, substances anti oxydantes dont les effets protecteurs sur la santé ont largement été démontrés. Elle est riche en eau (environ 95 %), et ne dépasse guère 15 calories pour 100 grammes. L'essentiel de son apport énergétique est assuré par ses glucides (3,6%) (fructose et glucose).

Les protéines et les lipides (0,30%) ne sont présents qu'en toute petite quantité. Elle constitue une bonne source de vitamine C et de vitamines du groupe B, notamment B3, B5 et B9 (acide folique ou folates) vitamine E. Elle contient également des caroténoïdes : des carotènes, précurseurs de la vitamine A (qui se transforment en vitamine A dans l'organisme), et du lycopène et phytopène (Céline *et al.*, 2010 ; Bouzid, 2013 ; Dembélé *et al.*, 2019). Ces deux substances sont dotées de propriétés anti oxydantes et sont responsables de la couleur rouge de la tomate.

Ce légume renferme de nombreux minéraux : beaucoup de potassium, du phosphore, calcium, sodium et du magnésium ainsi que des oligo-éléments : fer, zinc, cobalt, nickel, fluor, bore ..., Concentrées dans sa peau et ses graines, ses fibres sont composées de celluloses, d'hémicelluloses, et d'un peu de pectines. Les constituants protéiques sont présents en faible concentration dans la majorité des fruits et légumes. Ils sont toutefois d'une importance capitale en tant qu'enzymes impliquées dans le métabolisme des fruits au cours de leur croissance. (Boukhalfa, 2015 ; Toundou, 2019 ; Dembélé *et al.*, 2019).

4.1.4. Production de la tomate

4.1.4.1. Production mondiale de la tomate

La tomate (*Solanum lycopersicum*) est originaire de la région Andéenne, en Amérique latine originaire du Pérou, a été importée en Europe au 16^{ème} siècle. Puis s'est répandue à travers tous les continents. Elle représente l'une des importantes cultures de légumes à l'échelle mondiale donnant le légume-fruit le plus consommé après la pomme de terre. Ses fruits sont destinés à la

Chapitre 1: Etude bibliographique

consommation en frais ou à la transformation en différents produits. C'est une source de lycopène, β -carotène et vitamine C, qui sont importants pour la santé humaine et protègent du cancer et des maladies cardiovasculaires. Sa production et sa consommation augmente avec la croissance démographique (Bergougnoux, 2013).

La plus importante consommation est entre 40 et 100 kg/habitant/an dans le bassin méditerranéen et dans les pays arabes. La production mondiale de la tomate a atteint la quantité de 160 millions de tonnes en 2011 sur une surface de 4,5 millions d'hectares. La région asiatique produit plus de 57 % de la production mondiale en particulier la Chine, le plus grand producteur avec environ 49 millions de tonnes, suivie de l'Inde. Puis, viennent les USA, la Turquie, l'Egypte, l'Iran, l'Italie, le Brésil et l'Espagne (Bergougnoux, 2013).

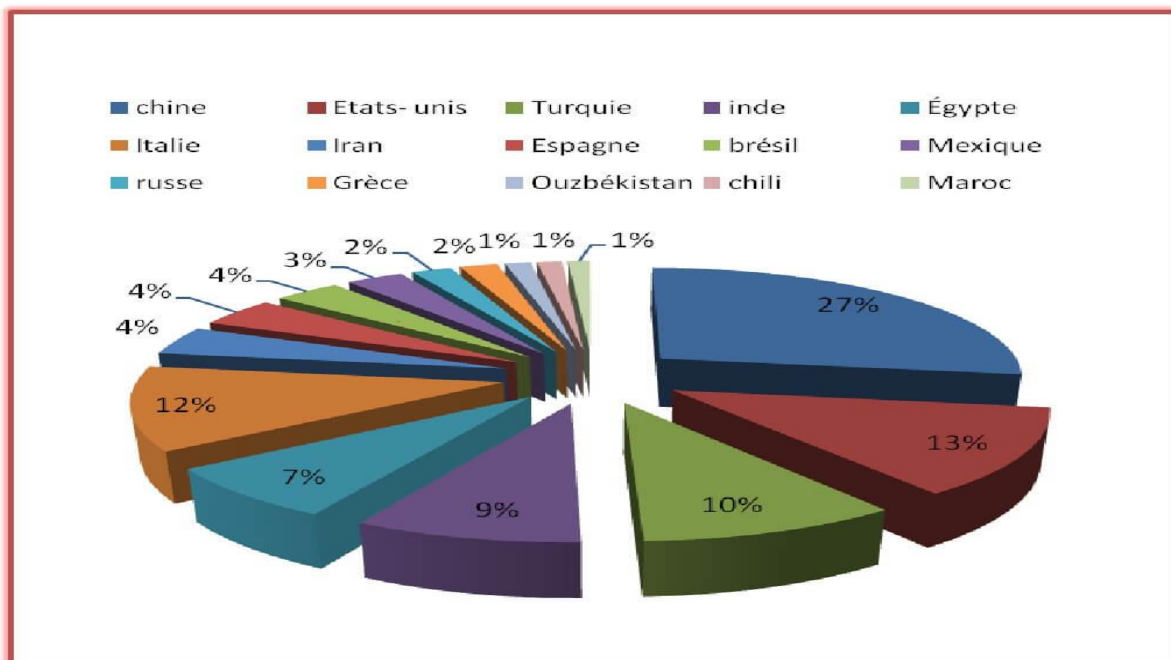


Figure 7 : Principaux pays producteurs de tomate dans le monde (1997-2007) (Heuvelink, 2009).

4.1.4.2. Tomates industrielles en Algérie

En 2005 les pays de la Méditerranée couvrent 31% de la production mondiale de tomates, soit un volume global de 39 millions de tonnes environ au 19ème rang mondial L'Algérie (avec 1% de la production mondiale) (Giove et Abis, 2007).

Les tomates destinées à l'industrie sont principalement cultivées au Nord-Est du pays : les wilayats El Tarf, Annaba, Guelma, Skikda et Jijel où elles représentent 85 % de la superficie totale consacrée à cette culture. Le reste est réparti entre la région du centre avec 7% et l'ouest 3% (Boukhalfa, 2015).

Chapitre 1: Etude bibliographique

Selon un bilan réalisé par l'Association Algérienne des conserveurs de Tomates (ACTOM), sur une superficie cultivée de 38 000 ha (32 000 ha en 2009), la production de la tomate industrielle en Algérie a presque doublé en 2010 dépassant les 6,6 million de quintaux (mq) contre 3,8 mq en 2009. Les quantités de tomate fraîche transformées ont atteint 216 860 tonnes (t).

La campagne 2014-2015 était absolument la meilleure lancée dans différentes régions du pays. On y compte entre 18 000 à 20 000 hectares cultivés, dont environ 95% à l'est. La récolte était fortement prometteuse : entre 400 000 à 500 000 tonnes de tomate fraîche, prédisent les agriculteurs (Boukhalfa, 2015).

Tableau 5: Evolution des superficies, des productions et des rendements de la tomate pour le frais (en Algérie) (Rachedi, 2004).

Période	Hectare	Tonne	Tonne/Hectare
1980-1984	16 684	167 568	10.0
1990-1991	19 170	306 644	16.0
2000	16 710	341 447	20.4
2005	21 089	513 780	24.4
2011	20 575	771 605	37.5
2012	21 542	796 963	36.9

La tomate est, depuis 2003, la principale culture industrielle en Algérie, elle occupe environ 25000 Ha. Elle connaît actuellement un renforcement de sa culture en raison du niveau important de la consommation nationale de conserves de tomate (Rachedi, 2004).

4.2. Sous -produits de la tomate transformée

4.2.1. Déchets de tomates et leur composition chimique

La transformation commerciale de la tomate et ses produits dérivés produit une grande quantité de déchets en provenance de canaux d'eau, du lavage, du tri sur table, du pulpeur-raffineur et du nettoyage du matériel (Sogi *et al.*, 2003).

Les déchets de tomates représentent, environ 10-30% du poids des fruits fraîches (King et Zeidler, 2004) ; ils se composent de 33% de graines, 27% de peaux et 40% de pulpe en plus de tomates vertes non transformées, parfois mélangés à des feuilles. En Algérie, la production

Chapitre 1: Etude bibliographique

annuelle des résidus de tomates est estimée à 1.305.000 tonnes/an (FAO, 2009). Les déchets de tomates séchés contiennent 44% de graines et le reste, 56% de peaux et de pulpe.

4.2.1.1. Pulpes de tomates

Ce résidu est peu répandu et reste disponible pendant la période estivale (d'aout à octobre). Les analyses des composés pariétaux montrent une forte teneur en cellulose brute et en lignine de 24.65% de matières sèches, par rapport à celle de la pectine 5% (Cotte, 2000). Les protéines ont une composition en acides aminés proche de celle du tourteau de soja, ceci place les pulpes de tomates parmi les aliments ayant une valeur protéique intéressante pour les ruminants. La pulpe de tomate est ainsi une source raisonnable de vitamine B1 B2 et vitamine A (Aghajanzadeh *et al.*, 2010).

4.2.1.2. Graines de tomates

La quantité de graines par rapport à la masse totale des résidus de tomates varie selon les variétés. Elle présente une particularité d'avoir un taux élevé en matière grains avec une composition en acides grains proche de celle des graines de soja ou de tournesol. Les parois des graines de tomates à maturité sont très lignifiées. Leur composition est donnée dans le tableau suivant:

Tableau 6: Composition chimiques des graines des tomates

Constituants%	Abdel Hamid , 1982	Cantarelli et al., 1993	Amalou et al., 2013
Eau	--	--	6.97
Matières sèche	--	--	93.03
Cendre	5,5	2.0 à 9.6	4.16
Fibre brut	20.1	14.8 à 41.8	24.24
Sucres totaux	3.1	2.9 à 5.4	4.25
Protéines	26.2	22.9 à 36.8	24.72
MG	30.4	14.6 à 29.6	26.2

4.2.1.3. Pelures de tomates

La peau de tomate est constituée d'un hypoderme, d'un épiderme, et d'une cuticule. Concernant les tomates, récoltées généralement à un stade de maturité assez avancé, les peaux sont donc essentiellement constituées de cellules à parois lignifiées (15 à 35% de lignine). Elles sont recouvertes d'une cuticule constituée de produit d'excrétions lipidiques désignées globalement sous le terme de cires ou de cutine. A l'instar de la lignine, les constituants de la cuticule des

Chapitre 1: Etude bibliographique

tomates sont donc susceptibles de diminuer la digestibilité des sous-produits, notamment celle de la matière organique (Cotte, 2000 ; Belmesikh, 2011).

Tableau 7: Composition minérale de la tomate (Web 3)

Minéraux et oligo-éléments	Quantités
Potassium	28 mg
Phosphore	28 mg
Calcium	13 mg
Sodium	13 mg
Magnésium	10 mg
Fer	0.51 mg
Zinc	0,07 mg
Cuivre	0,09 mg
Manganèse	0,1 mg
Sélénium	0,4 µg

4.2.2. Utilisations de déchets de tomate

Les déchets de tomates connaissent de nombreuses utilisations à savoir :

4.2.2.1. Alimentation

De part sa teneur élevée en fibres et grâce à la capacité des animaux à digérer ces fibres (Muhtaseb *et al.*, 2010), les déchets de tomates sont principalement utilisés pour nourrir le bétail, en particulier les ovins et les bovins (Celma *et al.*, 2009). Leur utilisation a également été évaluée pour l'alimentation des volailles (Mansoori *et al.*, 2008), des vaches laitières (Weiss *et al.*, 1997), des chèvres (Ventura *et al.*, 2009) et des moutons (Denek et Can, 2006).

Par ailleurs, les déchets de tomates peuvent représenter une source intéressante de fibres pour la consommation humaine (Alvarado *et al.*, 2001). De leur côté, les graines contiennent environ 40% de protéines (Rahman *et al.*, 1985). Par conséquent, les graines de tomates sont recommandées comme source de protéines dans les applications alimentaires pour l'homme (Sogi *et al.*, 2005).

Chapitre 1: Etude bibliographique

En outre, Brodowski et Geisman (1980) ont rapporté que ces déchets contiennent 13% de lysine de plus que les protéines de soja, ce qui pourrait améliorer substantiellement la qualité des protéines des aliments à basse teneur en lysine tels les produits de céréales.

4.2.2.2. Agent antioxydant

Baysal *et al.*, (2000) ont signalé qu'une grande quantité de caroténoïdes est perdue sous forme de déchets au cours de la transformation des tomates. Du fait que, 72–92% du lycopène (le pigment rouge) est associée à la fraction insoluble dans l'eau et à la peau. Ces déchets représentent donc une excellente source de caroténoïdes bon marché. Par conséquent, les extraits de peau sont particulièrement riches en lycopène qui pourrait être extraite en utilisant des solvants organiques (Kaur *et al.*, 2008).

Ces substances sont susceptibles de réduire le risque d'apparition de certains cancers ainsi que des maladies cardiovasculaires et autres maladies chroniques dont celles liées au vieillissement (Chiu *et al.*, 2007 ; Vági *et al.*, 2007 ; Choudhari et Ananthanarayan, 2007 ; Kaur *et al.*, 2008 ; Zuorro *et al.*, 2013). De plus, la qualité des huiles comestibles pourrait être améliorée les en enrichis par les caroténoïdes de peaux (Benakmoum *et al.*, 2008).

Par ailleurs, Knoblich *et al.*, (2005) ont montré le transfert de caroténoïdes vers le jaune d'œuf lorsque les poulets sont nourris de peaux et de graines de tomates. D'autre part, King et Zeidler (2004), ont révélé que les niveaux élevés de l'antioxydant α - tocophérol (vitamine E) dans les déchets de tomates ont réduit la détérioration des lipides au cours du chauffage et permet d'améliorer la durée de conservation de la viande de poulets stockés.

4.2.2.3. Production d'enzymes

Il y a des rapports dans la littérature sur l'utilisation des déchets de tomates pour la production d'enzymes. Certaines études décrivent la production d'enzymes par des souches bactériennes par des fermentations submergées ; c'est le cas de la xylanase (Katapodis *et al.*, 2006).

D'autres travaux ont permis le fractionnement des laccases et des xylanases par *Pleurotus ostreatus* et *Coriolus versicolor*. De plus, la quantité de pectine dans les déchets de tomates est suffisamment élevée pour obtenir des niveaux élevés en polygalacturonases par *Coriolus versicolor* (Boukhalfa, 2015 ; Villena *et al.*, 2017).

4.2.2.4. Production d'huiles

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

4.2.2.5. Traitement de diarrhée

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

4.3. Fermentation des déchets de tomate

Différents travaux ont été publiés sur l'utilisation des déchets de tomate en fermentation, comme la bioconversion des déchets de tomate par des cultures mixtes de *Trichoderma reesei* et *Sporotrichum sp* en FMS, la saccharification de ce substrat par des cellulases commerciales pour la production de la biomasse de la levure *Geotrichum candidum* en FMS.

Aussi, ce déchet a été utilisé comme substrat pour la production d'enzymes à savoir la protéase par le champignon *Pleurotus ostreatus* en FMS, la xylanase par *Streptomyces sp.*, la polygalacturonase, la laccase par *Coriolus versicolor.*, et pour la synthèse de l'acide γ -linoléique en culture submergée par la moisissure *Cunninghamella echinulata* (Iandolo *et al.*, 2011 ; Boukhalifa, 2015).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Identification de la souche

L'identification de la souche de la levure P3 est réalisée par les galeries API ID32C qui est un système standardisé pour l'identification des levures, contenant 32 tests d'assimilation miniaturisés.

1.1.1. Principe de système ID 32

La galerie ID 32 C se compose de 32 cupules, chacune contenant un substrat glucidique déshydraté. Un milieu semi-solide minimal est ensemencé avec une suspension de l'organisme de levure à tester. Après 24-48 heures d'incubation, la croissance dans chaque cupule est lue soit en utilisant l'ATB TM Expression TM ou la mini API ® instruments, ou visuellement. L'identification est obtenue à l'aide du logiciel d'identification.

1.1.2. Méthode

La souche levurienne utiliser dans ce travail est ensemencé dans une boîte de Pétri contenant la gélose YPGA (5g extrait de levure, 10g peptone, 20g glucose et 20g agar, après stériliser 30 min à 100°C). Ensuite, la boîte est incubée à 30 C° pendant 24h.

Pour l'identification de la souche on utilise le système ID 31 C (API C), donc après l'incubation, avec une anse de platine stérile retirer une colonie de levure et on met dans un tube contenant 2ml l'eau distillée stérile sans additifs (c'est la préparation de la suspension), puis comparer la densité de ce dernier avec un McFarland 2. Le contenu de tube est homogénéisé, 135µl de la suspension sont distribué dans chaque cupule de la galerie à l'aide d'une micropipette, après on place le couvercle et on incube dans une atmosphère humide à 30 C° pendant 24-48h.

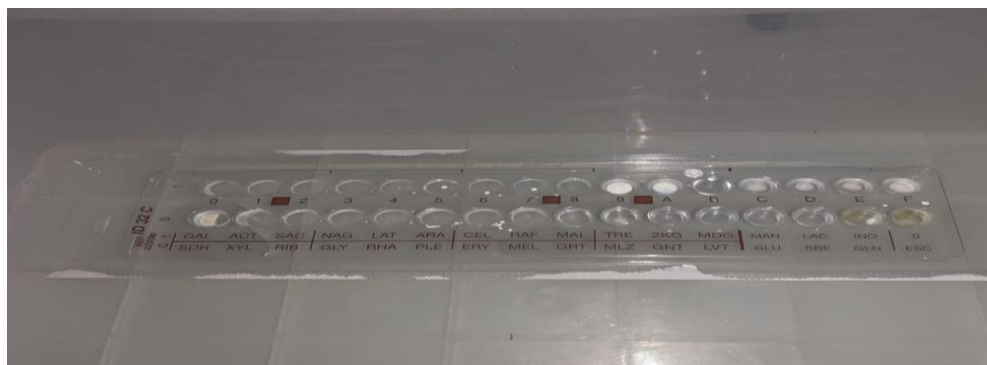


Figure 8 : Galerie ID 32 C

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Après l'incubation, on fait la lecture visuelle et on compare chaque cupule au contrôle (0). Le test est positif de trouble cupule plus boueuse. L'identification est obtenue à l'aide de la base de données (V3.0). La lecture de la galerie est réalisée après 24h puis après 48h.

1.2. Repiquage des souches

Un volume de la souche levurienne est déposé sur boîtes de Pétri contenant la gélose YPGA. Ensuite, un étalement a été effectué avec une pipette Pasteur stérile, par stries sur l'ensemble de la surface de la gélose, puis les boîtes de Pétri sont incubées pendant 48h à 40°C.

1.3. Préparation de l'inoculum

1.3.1. Suspension des cellules

L'inoculum correspond à la suspension cellulaire de la souche levurienne utilisée. Cette dernière est préparée par addition de 10 ml d'eau distillé stérile à la jeune souche cultivée deux jours (maximum) sur milieu YPGA en boîte de Pétri.

1.3.2. Dénombrement des cellules à la cellule de Thoma

Les dénombrements sont effectués par comptage direct sur cellule de Thoma (0.100mm/0.0025mm²) par observation optique au grossissement X400 à l'aide d'un microscope optique.

2. Production de la protéase par Fermentation en milieu solide (FMS)

La fermentation a été réalisée dans un milieu solide à base de déchets de tomate dans le but de doser l'activité protéolytique développée par la souche levurienne.

2.1. Préparation des milieux de culture

Les déchets de tomates utilisés sont des déchets alimentaires de cuisine. Après la collecte, ils sont séchés à l'air libre (25 – 30°C) pendant quelques jours. Après broyage et tamisage, la poudre est conservée dans des boîtes hermétiquement fermées.

Deux milieux de production ont été testés pour la production enzymatique, milieu 1 : Déchets de tomates sans enrichissement et milieu 2 : Déchets de tomate enrichis avec 1 % d'extrait de levure, d'amidon et de peptone.

Afin d'avoir un volume suffisant de l'extrait enzymatique, nous avons utilisé 16 erlens. Dans 08 erlenmeyers de 250 ml, on introduit 5g de milieu 1, et dans les 08 autres milieu 2. Les milieux sont humidifiés à 60% avec de l'eau distillée.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

L'ensemble des erlenmeyers sont bouchés par du coton cardé et couverts par le papier aluminium. Ensuite, ils sont stérilisés dans l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

2.2. Conduite des FMS en Erlenmeyers

Après refroidissement, les milieux de culture sont inoculés par 5×10^6 cellules /ml et incubés dans l'étuve à 30 C° pendant 48h.

3. Etude de l'activité protéolytique

3.1. Préparation des extraits enzymatiques

A la fin de la période d'incubation, 2,5g de substrats fermentés de chaque erlenmeyer sont mis dans des creusets en porcelaines ou dans boites de Pétri en verre (préalablement mesurés) et sont incubé dans l'étuve à 70°C jusqu'à poids sec. Par ailleurs, 25ml de Tween 80 diluée sont ajoutés au 2.5 g de substrat fermenté dans l'erlen, le tout est bien mélanger dans un mixeur électrique pendant 1 à 2 min. La solution est par la suite centrifugée à 10 000 rpm pendant 10 min à 4 °C, pour éliminer les cellules et les particules du substrat. Les surnageants correspondent aux deux extraits enzymatiques et sont conservé dans le réfrigérateur (pour une courte durée) ou dans le congélateur (pour une longue durée) pour les dosages ultérieurs.

3.2. Méthode de dosage de l'activité protéolytique

3.2.1. Dosage des protéines par la méthode de Lowry

3.2.1.1. Principe

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et ses collaborateurs (1951). Cette méthode, a pour principe de mesurer la densité optique de la coloration bleue du complexe Folin-ciocalteu (acide phosphomolybdo-tungstique), réduit en présence de protéines. La méthode permet de déterminer les concentrations en protéines comprises entre 0,05 mg/ml et 0,1 mg/ml. Un temps d'incubation d'environ 30 min est nécessaire pour le développement de la couleur bleue. L'absorbance est mesurée à des longueurs d'ondes entre 500 nm et 750 nm (750 nm est adoptée pour le dosage de faibles concentrations en protéines). La méthode de Lowry est la résultante de deux réactions :

- Réaction de Biuret qui, en présence de sulfate de cuivre et en milieu alcalin, permet le dosage des liaisons peptidiques des protéines.

- Réaction du réactif de Folin sur la tyrosine, le tryptophane et dans une moindre mesure la cystine, la cystéine et l'histidine. Elle entraîne une réduction, par perte d'un à trois atomes d'oxygène et la fixation du cuivre par chélation, facilitant ainsi le transfert d'électrons vers ce réactif.

3.2.2. Mesure de l'activité protéolytique

3.2.2.1. Principe

L'activité protéolytique est déterminée à partir de l'effet de l'enzyme sur la caséine suivant la méthode d'Anson, (1938). Elle se base sur l'estimation de la quantité des peptides simples et des acides aminés libres formés par l'hydrolyse d'une protéine (substrat) sous l'action d'une protéase ou un mélange des protéases.

La tyrosine est utilisée comme standard de dosage colorimétrique de l'activité protéolytique parce que c'est un acide aminé présent dans toutes les protéines, ce dosage est effectué à l'aide du réactif folin-ciocalteau qui réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner un complexe bleu mesurée au spectrophotomètre à 750 nm (Belmesikh, 2011).

La réaction enzymatique est stoppée par l'addition du TCA, qui fait précipiter les protéines non attaquées par la protéase.

3.2.2.2. Mode opération

Le protocole de mesure de l'activité protéolytique est réalisé comme suivant

a. Courbe d'étalonnage de la tyrosine

La gamme-étalon est à partir d'une solution mère de tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 100 µg/ml, comme l'indique le tableau suivant:

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Tableau 8 : Préparation de la courbe d'étalonnage de tyrosine

N° du tube Réactif et solution	Blanc	1	2	3	4	5
Concentrations des dilutions (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de tyrosine (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
TCA (ml)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Na ₂ CO ₃ (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Agitation et incubation pendant 10 min à température ambiante						
Réactif de folin dilué 1/4 (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agitation et incubation pendant 30 min à température ambiante						

Les lectures au spectrophotomètre à 750 nm des différentes concentrations ont permis de tracer la courbe d'étalonnage (Figure 9).

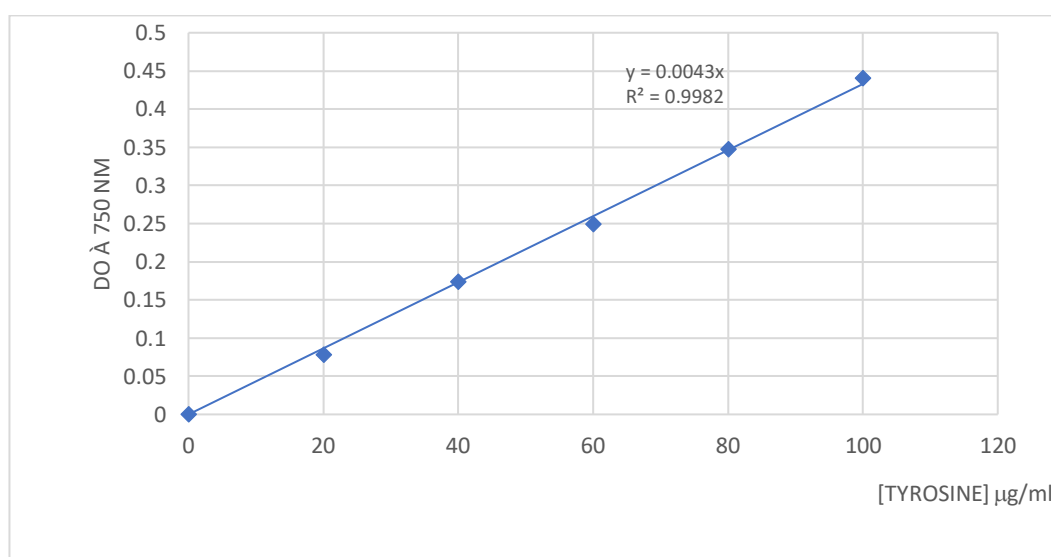


Figure 9: Courbe d'étalonnage de la tyrosine

b. Dosage de l'activité protéolytique

L'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage. La manipulation est réalisée en deux étapes:

- Réaction enzymatique : il s'agit de faire agir l'extrait enzymatique sur le substrat (la caséine à 2,5% dissoudre dans le tampon citrate de sodium).

Le mélange réactionnel est préparé comme c'est indiqué dans le tableau suivant :

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Tableau 9 : Préparation de mélange réactionnel (Beynon et Oliver, 2004 ; Wu *et al.*, 2006 ; Devi *et al.*, 2008).

N° du tube	Blanc	1	2	3
Réactif et solution				
Extrait enzymatique (ml)	-	0,5	0,5	0,5
Eau distillée (ml)	0,5	-	-	-
Volume de tampon (ml)	0,75	0,75	0,75	0,75
Solution de caséine (ml)	1,25	1,25	1,25	1,25
Après agitation, placer au bain marie 40°C pendant 30 min				
TCA à 4% (ml)	5	5	5	5
Agiter correctement et laisser reposer 10 min sur paillasse puis filtrer les solutions				

Le filtrat constitue la solution contenant le produit de la réaction (la tyrosine)

- **Dosage de l'activité :** Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'Anson, (1938) (tableau 10).

Tableau 10 : Dosage de l'activité (Sumantha *et al.*, 2006 ; Paranthaman *et al.*, 2009).

Réactifs et solution	Filtrat de Blanc	Filtrat 1	Filtrat 2	Filtrat 3
Volume de filtrat (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5
Na ₂ CO ₃ à 2% dans du NaOH 0,1N (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5
Réactif de Folin dilué 1/4 ème (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25
Agiter correctement et laisser reposer 20 min. Lire l'absorbance à 750 nm				

Chaque dosage est effectué en trois répétitions.

L'absorbance de la coloration bleue développée est lue à 750 nm (spectrophotomètre de marque JENWAY6315) ; l'activité est calculée par rapport à la courbe étalon de la tyrosine (figure 9), comme standard. Une unité (UI) de protéase est l'équivalent de 1µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml de la solution d'enzyme.

3.3. Sélection de la protéase

Dans le but de déterminer la protéase la plus produite par notre souche cultivée en milieu 1 et milieu 2, nous avons dosé l'activité protéasique à trois pH : pH acide de 5, pH neutre de 7 et pH alcalin de 9. Nous avons utilisé le tampon citrate-phosphate pour les pH 5 et 7 et le tampon glycolle-NaOH pour le pH 9.

4. Etude des caractéristiques physico-chimiques de la protéase

4.1. Effet du pH sur l'activité de protéase

L'influence du pH sur l'activité enzymatique est déterminée dans un intervalle de pH 3 à pH 9 en utilisant le tampon citrate et phosphate et le tampon glycolle et NaOH pour le pH 9 :

- Citrate (0,1 M) - phosphate (0,2 M).
- Glycolle-NaOH (0.2 M).

4.2. Effet de la température sur l'activité de protéase

L'effet de la température sur l'activité de la protéase est étudié en incubant le mélange réactionnel dans l'intervalle de 30 à 80° C (avec un pas de 5°C) pendant 30 min à pH optimal.

4.3. Etude de la thermostabilité

L'activité résiduelle de l'enzyme est estimée à 60°C (température optimale) et 90°C chaque 30 min, durant 180 minutes. La demi-vie de l'enzyme pour chaque température testée est déterminée.

4.4. Effet des sels

L'activité protéolytique est mesurée en présence des sels suivants : FeSO₄ (0.02 %), NaCl, MgSO₄, CaCl₂, MnSO₄, ZnSO₄ aux concentrations 0.25 %, 5mM, 0.02 %, 5mM et 0,02% respectivement. Les ions sont additionnés à l'extrait enzymatique. Après agitation, l'incubation du milieu réactionnel a été réalisée à 60°C pendant 30 min. Les activités résiduelles de la protéase neutre produite par SSF sont ensuite comparées avec le témoin incubé dans les mêmes conditions sans effecteurs.

4.5. Effet des détergents

L'activité protéolytique est mesurée en présence de plusieurs détergents : l'EDTA, le Tween 80, le SDS, l'urée à des concentrations de 0.058 %, 1%, 1% et 12.01 % respectivement. Les ions sont additionnés à l'extrait enzymatique. L'incubation du milieu réactionnel a été réalisée à 60°C pendant 30 min. Les activités résiduelles de l'enzyme sont déterminées et comparées avec le témoin incubé dans les mêmes conditions sans effecteurs.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Identification de la souche levurienne

La souche levurienne P3 isolée à partir de pelures de pomme de terre a été identifiée par les tests biochimiques en utilisant la galerie APi 32C. Après la lecture, le résultat est présenté dans la figure 10 ci-dessous. La levure P3 a un code de 75476710170 et selon le catalogue des galeries AP,32C, il correspond à la levure *Candida sp.*

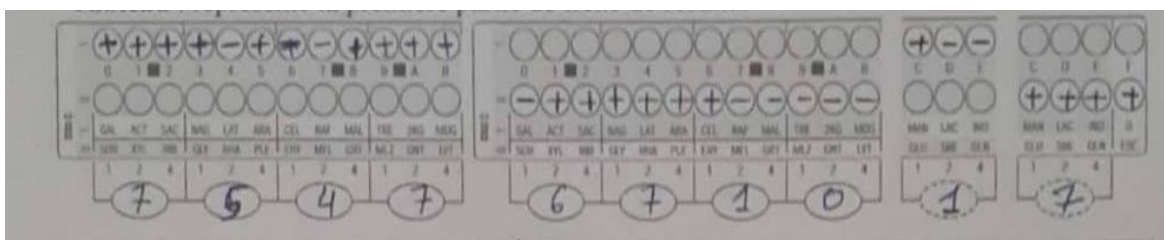


Figure 10 : Lecture de la Galerie AP, 32C après 48h

Différents travaux sur l'isolement des levures, ont utilisé les galeries AP, 32C pour l'identification des levures :

- ✓ Dakhmouche (2016) : pour l'identification des souches levuriennes isolées à partir des grains de blé des zones arides, la *Candida sp* est l'une de ces levures isolées.
- ✓ Sekkat (2008) : pour l'identification des souches levuriennes isolées à partir des patients infectés par le VIH.

Candida sp a été isolée à partir de différents biotopes comme les grains de blé (Dakhmouche, 2016), les pelures des pommes de terre (Bessalem *et al.*, 2001), les fromages (Maziane et Agagna, 2020), le sol (Youcef, 2014) et les denrées alimentaires (Rezki, 2014).

Les protéases constituent l'un des groupes les plus importants d'enzymes industrielles produit par les *Candidas sp* (Villena *et al.*, 2017), ces espèces ont la capacité à exprimer plusieurs types de protéases. Les *Candida sp* produisent des protéases extracellulaires, d'où leur intérêt croissant pour leurs applications dans les procédés industriels, principalement en raison de leurs activités (Schlander *et al.*, 2016).

2. Sélection du milieu de culture le plus performant pour la production de la protéase

La production de la protéase de *candida sp* a été étudiée par fermentation en milieu solide (FMS). Deux milieux ont été testés, le premier (milieu 1) constitué les déchets de tomates et le deuxième (milieu 2) est les déchets de tomates enrichie en extrait de levure, en amidon et en peptone. La fermentation a été conduite à différents pH à savoir pH 5, pH 7 et pH 9.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Les résultats présentés dans la figure 11 montrent que la meilleure production ($13,95.10^4$ UI/g) est obtenue par fermentation solide à pH 7 sur milieu 2 alors que le milieu constitué seulement de déchets de tomates utilisées comme support et substrat de fermentation a donné une activité protéasique de ($11,47.10^4$ UI/g).

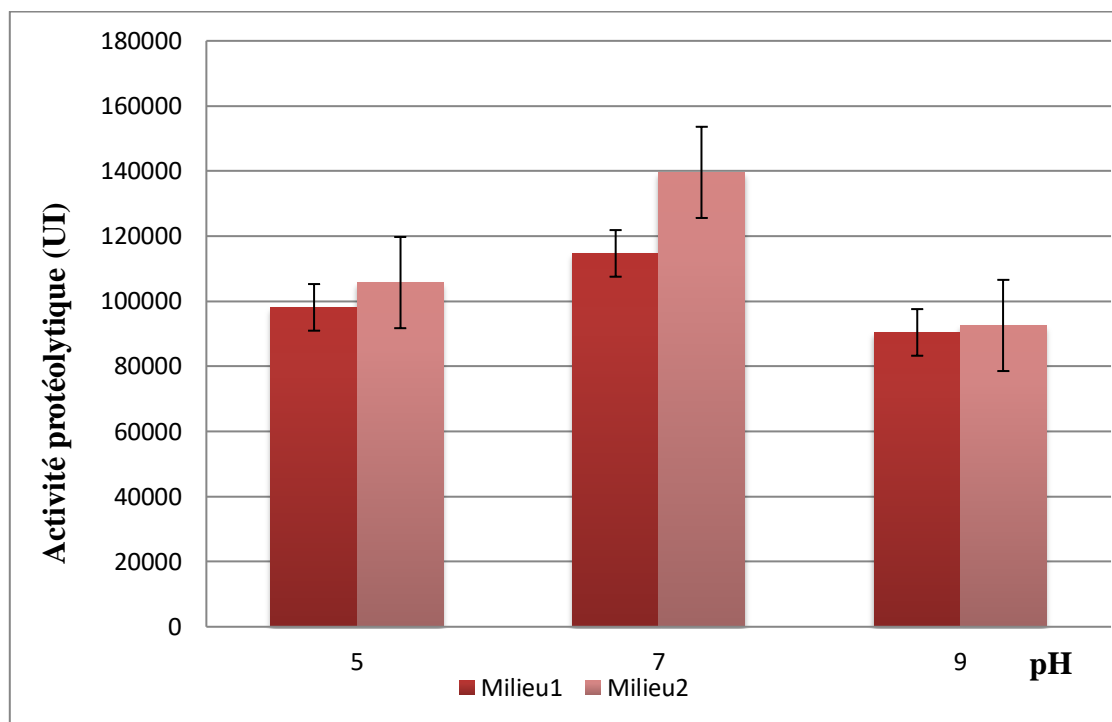


Figure 11 : Sélection du milieu de culture le plus performant pour la production de la protéase

La production proteolytique est meilleure à pH 7. Ceci peut être expliqué par le fait que le pH neutre convient mieux à l'activité de la protéase produite et nous pouvons déduire que la levure P3 (*candida sp*) est productrice de protéase neutre.

Le milieu de déchets de tomates enrichis de l'extrait de levure, de l'amidon et de la peptone est plus efficace pour la production protéasique. Ceci peut être expliqué par le fait que la source d'azote fourni par les déchets de tomates (1.2 g /100 g de fruit de tomate) et les glucides (2.80 - 4.25 %) sont insuffisantes pour la croissance de *candida sp* et par conséquent pour la production protéasiques. Ce milieu enrichi permet au *candida sp* d'utiliser l'amidon (1%) comme source complexe de carbone, la peptone (1%) comme source d'azote et l'extrait de levure (1%) comme source de nutriments et d'azote.

Il a été mentionné que la production de la protéase par *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528 dépend de la composition du milieu de culture et l'optimum est obtenu en présence du glucose et de la peptone de caséine (Lario *et al.*, 2020).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Le choix du milieu approprié de fermentation est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes. La production d'enzymes par les levures a été considérablement améliorée par l'addition de différentes sources de carbone et d'azote (Lagzouli *et al.*, 2007).

Pour l'efficacité des milieux des cultures enrichie, il a été trouvé que la production maximale de la protéase chez *A.oryzae* (García-Gomez, 2008), *Candida humicola* (Ray *et al.*, 1992), *C. Buinensis* (Araujo *et al.*, 2010) et *Yarrowia lipolytica* (Hernandez *et al.*, 2011), est obtenue dans un milieu de culture contenant de la farine de poisson et de la farine de soja.

Benkahoul *et al.*, (2017) montre que la meilleure croissance de *Aspergillus oryzae* est obtenue en présence du corn-steep liquor, du lactosérum et des sels. Alors que la meilleure activité protéolytique est observée dans l'essai contenant le corn-steep liquor, les dattes déclassées et les sels.

➤ Effet de la source azotée sur la production de la protéase

Plusieurs auteurs ont mentionné l'importance de l'extrait de levure pour la croissance des microorganismes et aussi pour la production des protéines (enzymes). L'extrait de levure est utilisé généralement comme source d'azote et comme source de vitamines.

L'extrait de levure est nécessaire pour la production de la protéase de la souche *halophile extrême S2*. Parmi les sources azotées étudiées, l'activité protéasique de la souche bactérienne *halophile extrême S2* (une archaebactérie appartenant à la famille des Halobacteriaceae) est meilleure en présence de l'extrait de levure suivie de la peptone (Zemmouri et Zemouri, 2017).

Rane *et al.*, (2017), Joshi et Shekhawat (2014) et Das et Mukherjee (2007) ont montré que l'extrait de levure est utilisé comme source d'azote par les souches de *Bacillus subtilis*. Selon Lucas *et al.*, (2020), l'extrait de levure est généralement considéré comme la principale source d'azote et également comme source de nutriments clé, dans les milieux de culture. Et selon Beata *et al.*, (2021), l'efficacité la plus élevée de la biosynthèse de la surfactine par *Bacillus subtilis* a été obtenue en utilisant de l'extrait de levure comme source d'azote.

Sayed *et al.*, (2015) ont montré que l'ajout de l'extrait de levure a considérablement amélioré les performances du MFC (*Microbial Fuel Cell*) à base de levure, ce qui peut être attribué au rôle de l'extrait de levure comme milieu de croissance ou comme médiateur.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Selby *et al.*, (1975) ont révélé que la croissance des bactéries lactiques par l'extrait des levures a été attribué à la présence de grandes quantités d'acides aminés libres et de peptides, ainsi que d'autres facteurs.

Selon Kawai et Hu, (2009) ; Li, (2007) et Chen *et al.*, (2007), l'extrait de levure est généralement utilisé comme stimulant de croissance pour les microorganismes. Shahriar *et al.*, (1988) ont montré qu'il s'est avéré essentiel pour obtenir une bonne croissance de *B. amyloliquefaciens*. Il montre, aussi, une influence maximale par l'augmentation de la production de la protéase chez *Bacillus sp* (Prakasham *et al* 2006) et chez *Streptomyces. Sp* (Mehte *et al.*, 2006).

- Effet de la source de carbone y compris l'amidon dans les milieux de cultures :

L'effet de différentes sources carbonées (saccharose, amidon, glucose, maltose, fructose et xylose) sur la production protéasique de la souche *halophile extrême S2* a été étudié et il s'est avéré que l'amidon a augmenté la production protéolytique. Alors que Kumar *et al.*, (2016) ont mentionné que l'activité protéasique produite par *Bacillus MK 22* est maximale en présence du glucose (Zemmouri et Zemouri, 2017).

Selon Beata *et al.*, (2021), l'efficacité la plus élevée de la biosynthèse de la surfactine par *Bacillus subtilis* a été obtenue en utilisant de l'amidon comme source de carbone. Singh *et al.*, (2014) et Ghribi et Ellouze (2011) et Das et Mukherjee (2007) ont trouvé que la source de carbone dans les milieux synthétiques est principalement le glucose, et l'amidon soluble, sont préférés au glycérol ou à l'hexadécane pour la production de biosurfactants lipopeptidiques par des souches de *Bacillus subtilis*.

Dix-sept souches de levures *amylolytiques* ont été isolées à partir d'un levain de panification traditionnel sur un milieu semisynthétique contenant l'amidon comme seule source de carbone (Lagzouli *et al.*, 2007).

Al-Hussuny *et al.*, (2016) a observé que l'augmentation des concentrations d'amidon améliorait la croissance de *l'amibe* et peut être due au fait que l'amidon est une bonne source de nutriments.

Selon Lopez-Flores *et al.*, (2016) l'activité protéasique maximale (105 UI/mL) a été atteinte lors de l'utilisation de la farine de soja comme source de protéines et de carbone. Le tourteau de soja est aussi un excellent substrat à faible coût pour la production de protéases par *Y.*

Chapitre 3 : Résultats et discussion

lipolytica. Et selon Sandhya *et al.*, (2005) l'utilisation de son de blé dans la production de protéases d'*A. oryzae*, a permis l'obtention de l'activité protéasique la plus élevée (31,2 U / mL).

Chellappan *et al.*, (2006) et Sumantha *et al.*, (2005) ont trouvé que l'addition de la caséine au milieu de culture ne conduit pas à une augmentation de la production de la protéase.

➤ Rôle de la peptone et d'autres sources azotées

Rane *et al.*, (2017) et Joshi et Shekhawat (2014) et Ozturk *et al.*, (1992) et Das et Mukherjee (2007) montre que la peptone est utilisée comme source d'azote pour *Bacillus subtilis*.

Selon Priatni *et al.*, (2017), la peptone a été appliquée comme source d'azote pour la croissance bactérienne. Bien que les mécanismes moléculaires des effets favorisant la croissance en présence des peptones ne soient pas entièrement compris, les effets positifs observés pourraient être due à la composition diversifiée en acides aminés des peptones (Burteau *et al.*, 2003 et Franek *et al.*, 2004).

Nurdiyana *et al.*, (2015) montre que la peptone de poisson est l'une des approches alternatives de la source d'azote nécessaire à la croissance microbienne.

Le besoin en source azotée diffère selon le microorganisme, et plusieurs travaux ont utilisé différentes sources azotées organique (simple ou complexe), et sources azotées inorganique. Et il a été trouvé que les acides aminés sont meilleurs pour augmenter la production de la protéase (Sharma, 2017).

Différentes travaux (Ghobadi *et al.*, 2010 ; Stivanid *et al.*, 2009 ; Sharma, 2017) ont reporté que la production de la protéase est améliorée par la combinaison de la peptone et de l'extrait de levure.

Parmi les sources azotées (extrait de bœuf, tryptone, peptone, glycine et caséine) utilisées pour la production de la protéase par *Pseudomonas fluores*, le maximum de production est obtenu avec la peptone. Cette dernière constitue aussi une bonne source d'azote pour la production de la protéase par *Nocardia prosine* (Ningthoujam *et al.*, 2009) et *B. licheniformis* BBRC (Ghobadi *et al.*, 2010).

Agrawal *et al.*, (2005) ont obtenu une augmentation de 12 fois de la protéase alcaline de l'*A. oryzae* NCIM 649 cultivé sur le son de blé enrichi par les protéines de soja. Vishwanatha *et al.*, (2010) ont observé une stimulation de la synthèse de la protéase acide en présence de farine de soja et de caséine à 4 % par *A. oryzae* MTCC 5341, cultivé en FMS sur son de blé.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Selon Boukhalfa (2015) l'enrichissement des déchets de tomate par la farine de soja a rendu la production plus économique comparativement à la caséine qui ne permet pas d'augmenter la production de l'enzyme d'une façon très importante.

➤ Effet du pH sur la production de la protéase

La production optimale de la protéase produite est obtenue par *Bacillus* (Contesini *et al.*, 2017), et *Aspergillus oryzae* (Hu *et al.*, 2020) à pH neutre, *Teredinobacter turnirae* à pH de 7-7,5 (Sharma *et al.*, 2017), *Stenotrophomonas sp* à pH = 8 (Soeka et Sulistiani, 2017), *Aspergillus flavus* à pH= 6,8 (Franco *et al.*, 2017).

Généralement, pour la production de la protéase alcaline, le pH optimum est entre 9 et 11 (Sharma *et al.*, 2017).

Yarrowia lipolitica et *Cryptococcus deminnaes* produisent des protéases actives à pH 2,5 et également des protéases actives à pH 7. Et il a été trouvé que le pH auquel les microorganismes ont été cultivés a influencé l'activité produite ; 43 cultures produisent des protéases actives à pH 2,5 lorsqu'ils ont été cultivés à pH 3 mais seulement 35 l'ont fait lorsqu'ils ont poussé à pH 6,5. D'autre part, quelques souches levuriennes produisaient des protéases actives à pH 2,5, lorsqu'elles sont cultivées à pH 6,5, mais pas lorsqu'elles le sont à pH 3.

Les protéases actives à pH 7 étaient plus susceptibles d'être produites lorsque les cultures sont cultivées à pH 6,5 (Ogrydiak, 1993).

3. Etude des caractéristiques physico-chimiques de la protéase

3.1. Effet du pH sur l'activité de la protéase

La figure 12 montre l'effet du pH sur l'activité protéolytique, cette étude est faite dans une gamme de pH de 3 à 9. On remarque une augmentation de l'activité protéolytique avec l'augmentation de pH jusqu'à une meilleure activité de **11,73. 10⁴ UI** à pH 7 désignant le pH optimal de la protéase étudiée. Au-delà de ce pH, une diminution de l'activité protéolytique est observée (figure 12).

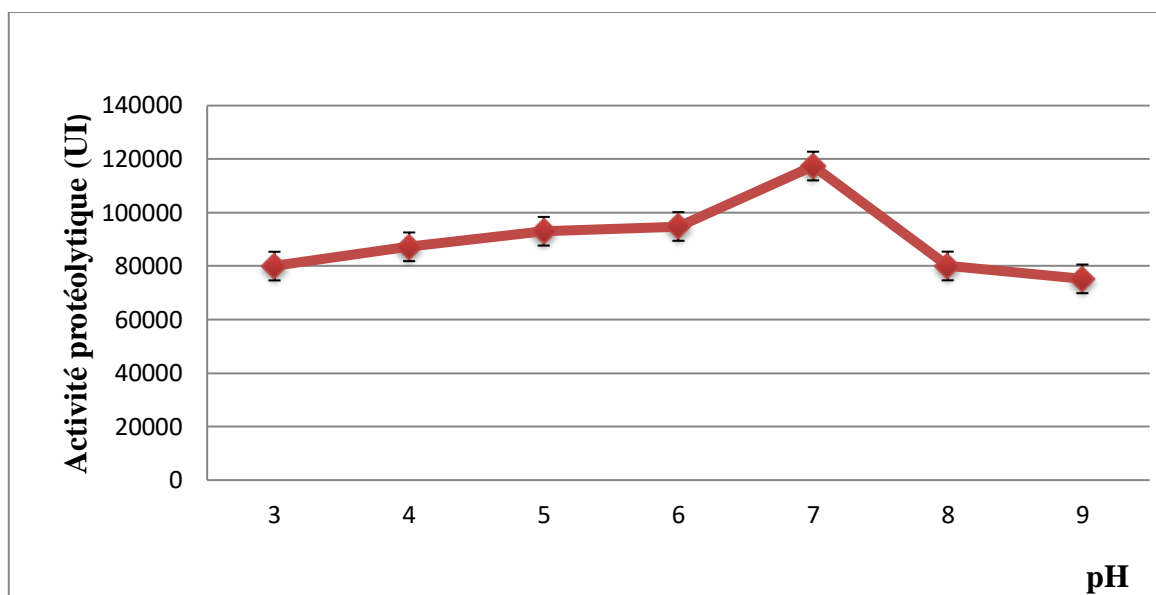


Figure 12 : Effet du pH sur l'activité de protéase

Chaque enzyme possède un pH optimal pour sa stabilité, dans notre travail la protéase de *Candida sp* donne une bonne stabilité et activité à pH neutre par rapport aux pH acide et pH alcalin. Le pH 7 est une caractéristique typique des protéases neutres (Williams *et al.*, 2012), la protéase hydrolyse bien le substrat dans les conditions favorable permettant à la protéase de catalyser la rupture des liaisons peptidiques des protéines (Silva, 2017).

L'activité de protéase produite par *Candida sp* a montré un pH optimal de 7, même résultat a été rapporté par Hesham *et al.*, (2017) pour *Candida californica*, et pour *Yarrowia lipolytica* (Flores *et al.*, 2016). Les *Candida* et quelques levures comme *Metschnikovia pulcherrima* et *Wickerhamomyces anomalus* produise de la protéase acide (Schlander *et al.*, 2017) et d'autres levures produisent de la protéase alcaline (Bessadok *et al.*, 2017).

3.2. Effet de la température sur l'activité de la protéase

L'effet de la variation de la température sur l'activité proteolytique a été étudié dans une gamme de température de 30°C à 80°C et à pH optimum de 7. Le profil de l'activité de l'enzyme en fonction de la température obtenu présente un aspect un peu large (figure 13). Nous constatons que l'activité proteolytique augmente avec la température jusqu'à 60°C où elle atteint son maximum de $15,00.10^4$ UI puis elle diminue jusqu'à $76,28.10^3$ UI à 80°C.

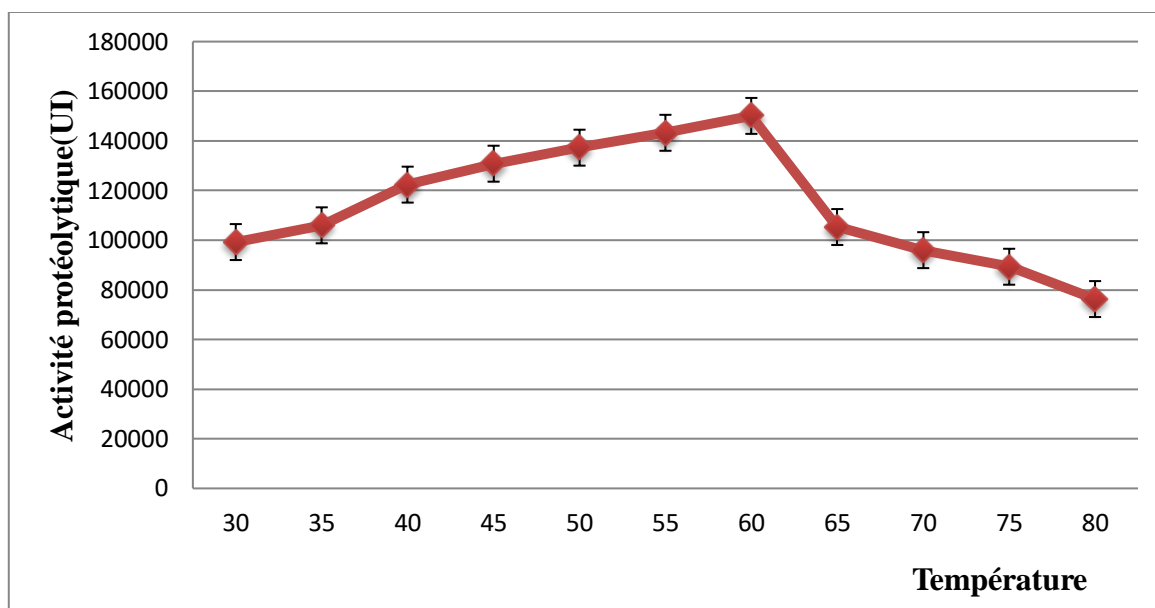


Figure 13 : Effet de température sur l'activité proteolytique.

La température est un facteur important dans la catalyse des transformations chimiques. En effet, elle augmente l'agitation des molécules et accroît la possibilité de contact entre les molécules. Dans le cas de réaction enzymatique, la température accélère la fréquence de collision entre le substrat et l'enzyme. Au-delà d'une certaine température, la protéine enzymatique va subir des modifications de sa structure tridimensionnelle, ce qui entraîne progressivement la perte de son activité (Boukhalfa, 2015).

Daniela *et al.*, (2010) ont rapporté que la production maximale de la protéase (573 U/mL) est atteinte à 35°C chez *Candida buinensis*. Par ailleurs, les surnageants cellulaires ont montré l'activité la plus élevée (534 U/mL) à 25°C et une stabilité satisfaisante dans la plage de 25 à 30°C.

La température optimale de la protéase de notre souche *candida sp* est plus élevée que celle de la protéase de *Y. lipolytica* qui est de 37°C (Hernandez-Montañez *et al.*, 2007), et de 45°C (Jing *et al.*, 2009).

Ma *et al.*, (2007) ont observé que l'activité de la protéase alcaline de la levure *Aureobasidium pullulans* était stable jusqu'à 20°C, alors qu'elle commence à perdre son activité au-dessus de 45°C jusqu'à 50°C ou elle devient totalement inactive après 30 minutes.

La protéase alcaline thermostable est produite par *Yarrowia lipolytica* à 52,7°C (Hernandez *et al.*, 2011) et à 45°C (Lopez-Flores *et al.*, 2016).

Selon Sreedevi (2017), la protéase de *Bacillus cereus UV-15* semble être stable entre 40 et 60°C qui représente la température optimale. L'activité diminue progressivement ou delà de

Chapitre 3 : Résultats et discussion

70°C. Aussi, Gomri (2019) a montré que la température optimale de la potéase 16-F39 de *Thermoactinomyces sp* est de 55°C.

La protéase produite par *Aspergillus niger* sur le milieu solide est active dans une large gamme de température avec trois pics d'activité protéolytique de 2754.66 ($\mu\text{g/h/ml}$), 2604.4($\mu\text{g/h/ml}$) et 2400.4 $\mu\text{g/h/ml}$ observées aux températures 30°C ,45°C et 70°C respectivement. Cela indique qu'il existe au moins trois formes différentes des protéases (Berbas et Meghazi 2019). Et il été trouvé par les souches *Aureobasidium sp*, *Aspergillus sp 6* et *Scedosporium sp* donnent un bon rendement protéolytique à 40°C. (Abdou et Mebarek, 2017).

3.3. Etude de la thermostabilité

L'étude de la stabilité thermique de la protéase produite par *candida sp*, est testée aux températures 60 et 100°C. Les résultats sont représentés dans la figure 14.

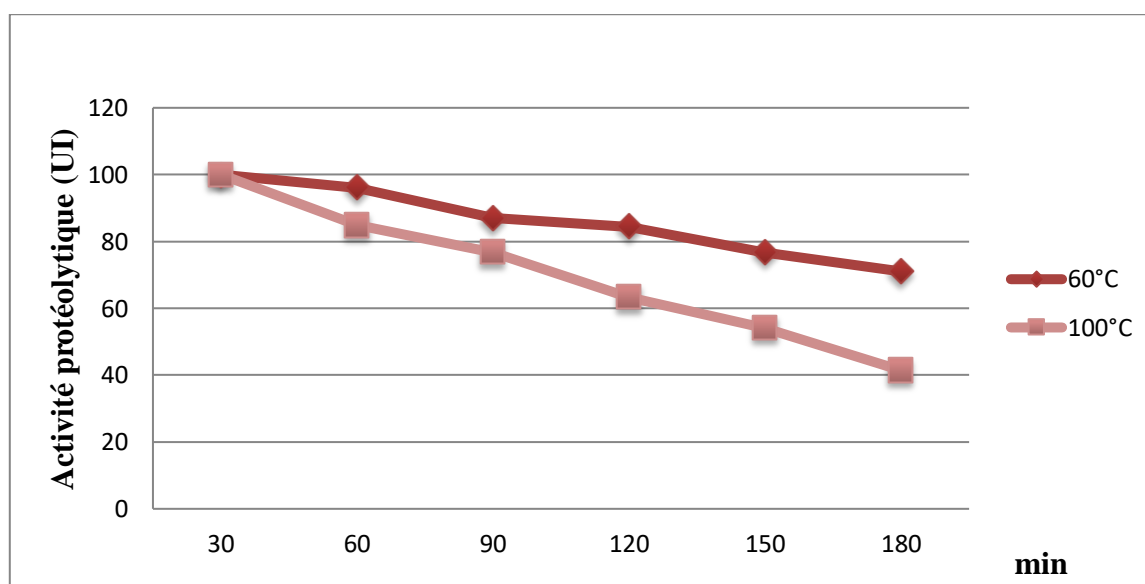


Figure 14 : Etude de la thermostabilité de la protéase de *candida sp*

Les résultats montrent qu'à 60°C, l'enzyme maintient 84.38 % de son activité initiale après 120 min d'incubation et 71.03% après 3 heures.

A 100°C, l'enzyme perd 40 % de son activité initiale après 120 min d'incubation. Sa demi-vie est de 165 min. Après 180 min elle retient 41.43% de son activité.

L'enzyme se dénature presque totalement à température plus élevées. La vitesse à laquelle une enzyme se dénature à une certaine température est un moyen très pratique pour juger de sa stabilité. La dénaturation d'une protéine est mesurée par la perte de ses propriétés biologiques (Boukhalfa, 2015). Les levures ne sont pas connues par leur résistance à la température élevée,

Chapitre 3 : Résultats et discussion

alors que certaines bactéries sont considérées comme thermorésistantes. Des études ont montré que la cohabitation des bactéries et des levures dans le même milieu peut avoir pour conséquence un transfert de gènes des bactéries vers les levures (Dakhmouche, 2016, Fossi *et al.*, 2005).

Selon Alya *et al.*, (2008) la stabilité thermique de la protéase produite par *Bacillus licheniformis* a été étudiée en incubant l'enzyme pendant 1 h à différentes températures (50, 55 et 60 °C). Le profil de stabilité thermique de la protéase a montré que l'enzyme est stable de 50 - 55 °C.

La protéase acide d'*Aspergillus niger* est très stable à 60°C, où l'enzyme garde presque 84% de son activité après 90 minutes (Dendouga, 2006).

D'après les résultats de Wang *et al.*, (2012), la protéase purifiée à partir de *Brevibacillus sp. PLI-1* a perdu 20% de son activité relative à la température optimale de 60°C au bout de 30 minutes et a conservé uniquement 25% de son activité relative après 3 heures d'incubation.

Selon Gomri (2019), l'effet sur les activités relatives des protéases 16-F39 et 32-F38 chez *Thermoactinomyces sp.*, de l'incubation aux températures optimales respectives (60 °C et 50 °C) a été étudié dans l'intervalle de 20 min à 240 min et il a été observé que la protéase 16-F39 perd 28,24% de son activité relative après 30 minutes d'incubation et garde encore 18,97% de cette activité après quatre heures.

3.4. Effet des sels et des détergents sur l'activité de protéase

3.4.1. Effet des sels sur l'activité de la protéase

D'après la figure 15, il ressort que la plupart des sels étudiés (FeSO₄, NaCl, CaCl₂, MnSO₂, ZnSO₂ et MgSO₄) semblent avoir un effet d'activateur sur la protéase de *Candida sp* (tableau 11).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 11 : Activités enzymatiques résiduelles après traitement par les sels

Sels	Activité résiduelle%
Contrôle	100
FeSO ₄	104,134
NaCl	105,8
MgSO ₄	100
CaCl	107,67
MnSO ₄	108,78
ZnSO ₄	108,78

La meilleure activité est obtenue par MnSO₄ (**155843,5UI**), ZnSO₂ (**155843,5UI**) suivie de CaCl₂ (**154243,5UI**), NaCl (**151572,6UI**) et FeSO₄ (**149177,6UI**). Tandis que la MgSO₄ n'a pas d'effet sur l'activité protéasique (figure 15 et tableau 11).

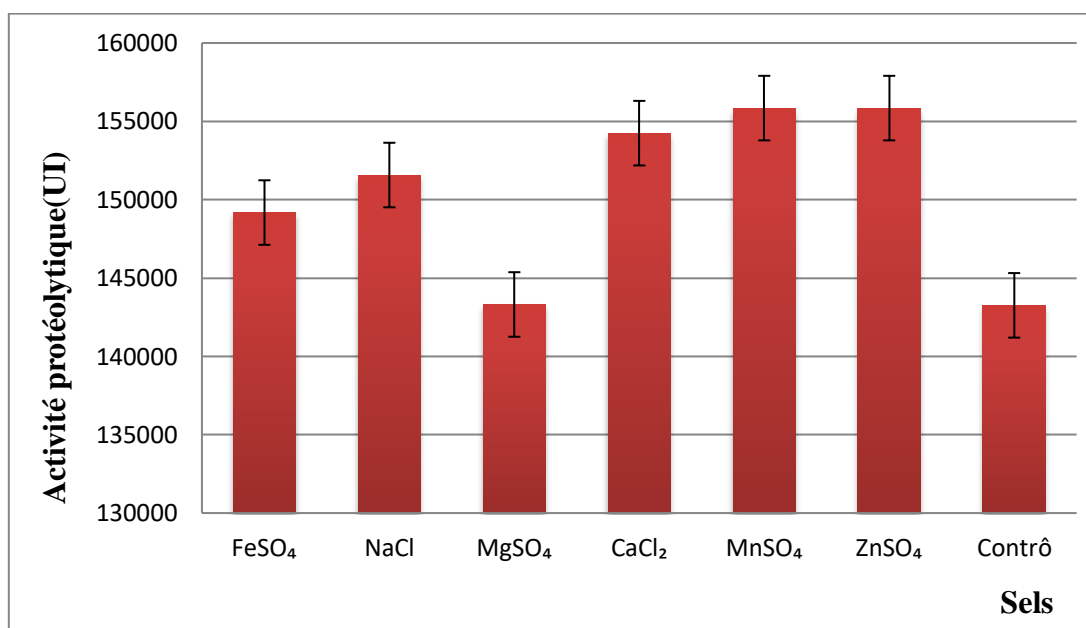


Figure 15 : Effets des sels sur l'activité protéolytique

L'addition de Na⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺ et Mg²⁺ a augmenté l'activité protéolytique de *Candida sp*. Les ions Fe²⁺ inhibent l'activité alors que le Ca²⁺ n'a aucun effet significatif sur l'activité de la protéase (Hu *et al.*, 2020). Dans d'autres études de Furhan (2020), les ions de Mn²⁺ ont inhibé l'activité de la métalloprotéase mais ont amélioré l'activité de la sérine protéase.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Nos résultats sont similaires à ceux de Sharma *et al.*, (2017) qui ont montré que le CaCl_2 augmente l'activité de la protéase de *Candida* de 105,3%.

Il a été aussi rapporté que Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} et Mg^{2+} améliorent la production de la protéase de *Kluyveromyces lactis*, alors que Fe^{2+} et Cu^{2+} inhibent la protéase serine (Sugawara, 2020). Et Amora *et al.*, (2021) ont montré que l'activité de la protéase neutre est inhibée par l'ions Hg^{2+} .

Les déchets de tomate contiennent les ions : Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ et Cl^- correspondant au milieu de culture pour la production de protéase (Boukhifa, 2015). L'utilisation du NaCl dans le milieu de culture semble avoir un effet positif significatif sur la production de la protéase neutre dans la culture solide (Belmessikh, 2011).

Les résultats peuvent s'expliquer, en partie, par le fait que les ions métalliques utilisés réagissent chimiquement et différemment avec la chaîne polypeptidique de l'enzyme, entraînant ainsi l'amélioration ou la réduction de l'activité de la protéase (Elleuch *et al.*, 2020). Les divers ions métalliques influencent l'activité des protéases. Ils sont connus comme inducteurs et stabilisateurs des protéases et les protègent des changements de conformation.

3.4.2. Effet des détergents sur l'activité de protéase

Les résultats de l'effet des détergents (SDS, EDTA, Tween 80 et Urée) sur l'activité de la protéase sont montrés dans la figure 16.

Tableau 12 : Activités enzymatiques résiduelles après traitement par les détergents

Détergents	Activité résiduelle%
Contrôle	100
Tween80	117,7
SDS	59,33
EDTA	41,88
Urée	55,4

Parmi les détergents étudiés, seul le Tween 80 a un effet activateur sur la protéase puisqu'il augmente l'activité enzymatique de **117,7%**, alors que le SDS, EDTA et l'urée ont un effet inhibiteur avec des activités résiduelles de **59,33%**, **41,88%** et **55,4%** respectivement (tableau 12).

L'inhibition de la protéase par EDTA, un agent chélateur fort de métal suggère que l'enzyme peut être une métalloenzyme.

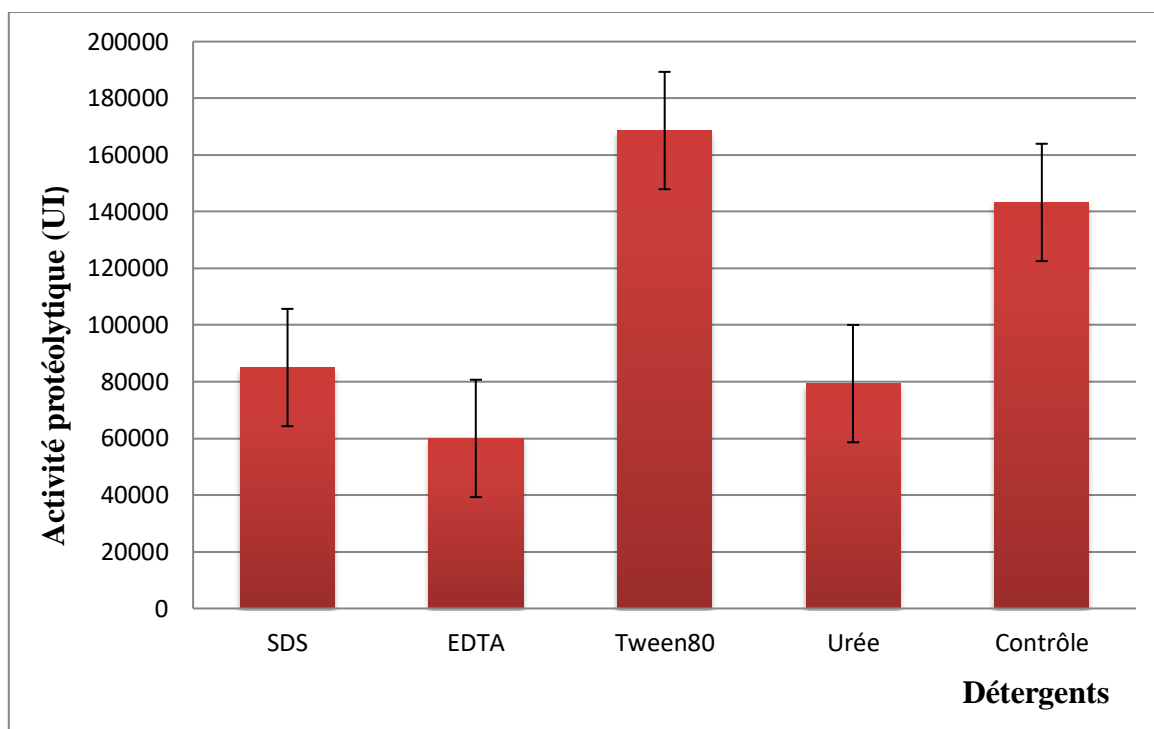


Figure 16 : Effet des détergents sur l'activité protéolytique

Selon Hu *et al* (2020), la protéase neutre de *Candida sp.* a été traitée séparément avec différents ions métalliques, inhibiteurs de protéase et tensioactifs. Le même résultat que le notre a été obtenu, l'EDTA et le SDS étaient des inhibiteurs puissants de la protéase alcaline de la levure *Candida*. L'effet de divers tensioactifs et agents oxydants à différentes concentrations sur une protéase alcaline a montré des activités relativement élevées lorsqu'elle est incubée avec le Tween-80 (Basavaraju *et al.*, 2017). L'urée diminue l'activité de la protéase alcaline et neutre (Gulmus et Gormez, 2020). En plus de l'EDTA, d'autres inhibiteurs de protéase tels que le PMSF, l'EGTA et la pepstatine A ont été observés pour la protéase de *Rhodotorula glutinis* (Furhan, 2020).

La protéase des détergents doit être compatible et stable avec tous les composés des détergents couramment utilisés tels que les tensioactifs, les agents de blanchiment, les agents oxydants et d'autres additifs qui pourraient être présents dans la formulation des détergents. Une variété d'ions métalliques et détergents ont montré l'effet variable sur l'activité de la protéase, certains d'entre eux se comportent comme des inhibiteurs tandis que d'autres agissent comme des activateurs en fonction de leur interaction avec les protéases (Basavaraju *et al.*, 2017).

Conclusion

Conclusion

L'objectif de ce travail de recherche est la production de la protéase neutre à partir de la souche levurienne *Candida sp*. Ce projet s'inscrit dans une approche qui consiste à l'exploitation des déchets de tomate et à réduire l'utilisation des produits chimiques en favorisant l'émergence d'une nouvelle industrie de produits biologiques économiquement plus abordables.

Dans la première partie, nous avons étudiés deux milieux de cultures, le premier milieu est les déchets de tomate sans enrichissement et le deuxième est constitué de déchets de tomate enrichi par 1% d'amidon, de peptone et d'extrait de levure. Les résultats révèlent que le milieu enrichi donne la meilleure activité en FMS. Notre souche produit trois types de protéase active à pH 5, 7 et 9, et d'après nos résultats, la protéase neutre est la plus dominante (**13,95 .10⁴UI**).

Dans la deuxième partie, nous avons étudié les caractéristiques physico-chimiques de la protéase neutre de *Candida sp* P3. L'effet de la température et du pH sur la production protéasique a été étudié. Et il a été trouvé que la température optimale et le pH optimum de la protéase neutre sont de 60°C et de 7 respectivement. La protéase a présenté une stabilité thermique de 71 % d'activité résiduelle à 60°C après 180 minutes. Une exposition de la protéase à des températures de 100°C pendant 3 heures lui a fait perdre 59 % de son activité initiale. Sa demi-vie est supérieure à 180 min à 60°C et 160 min à 100°C. D'après l'étude de l'effet des sels, une augmentation de l'activité protéolytique a été obtenue avec FeSO₄, NaCl, MgSO₄, CaCl₂, MnSO₂ et ZnSO₂. L'effet des détergents (Tween 80, EDTA, SDS et l'urée) a été étudié sur la protéase. Une bonne activité est donnée seulement par le Tween 80.

Ce mémoire présente la mise au point d'un procédé en FMS pour la production d'une enzyme ayant un intérêt technologique. Ces résultats mettent en relief l'intérêt de recycler les déchets de tomates industriels par FMS pour la production d'une protéase neutre levurienne à un niveau élevé et à moindre coût.

Afin d'approfondir ces recherches plusieurs perspectives peuvent être focalisées particulièrement sur:

- Détermination de la composition chimique des déchets de tomates
- Etude des autres facteurs qui affectent la production à savoir l'effet de l'humidité, effet de l'inoculum...etc.
- Optimisation et purification de l'enzyme étudiée avant sa caractérisation.
- Recherche d'autres activités enzymatiques chez *Candida sp*. telles que les cellulases, les xylanases, les pectinases et les lipases.

Résumé

Résumé

Ces dernières années, l'intérêt pour l'utilisation de levures pour la production de protéases en culture solide s'est accru. Cette étude vise à la production de protéase par la levure *Candida sp* en fermentation solide. Deux milieux ont été utilisés, les déchets de tomates et les déchets de tomates enrichis par l'extrait de levure, la peptone et l'amidon. La souche a produit 03 protéases actives à pH5, pH7 et pH9. Cependant, la production de la protéase neutre par fermentation solide sur les déchets de tomates enrichis est la plus importante (13.95×10^4 UI/g). L'étude des caractéristiques de la protéase de *Candida sp* a été aussi effectuée. Le pH optimum et la température optimale de l'enzyme sont de 7 et 60°C respectivement. Le traitement thermique de la protéase neutre a été étudié à 60 °C et à 100°C. Après 3 heures d'incubation, la protéase montre une activité résiduelle de 71% à 60°C et de 41 % à 100°C. Sa demi-vie est de 165 min à 100°C. L'effet des différents sels (FeSO_4 , NaCl , MgSO_4 , CaCl_2 , MnSO_2 , ZnSO_2) sur la protéase a montré que à part l'effet nulle de MgSO_4 sur l'activité les autres sels semblent être des activateurs de la protéase avec des taux de 104.13%, 105.8%, 107.67%, 108.78% et 108,8 %. Parmi les détergents étudiés, seul le Tween 80 a amélioré la production de la protéase neutre alors que le SDS, l'EDTA et l'urée diminuent l'activité protéasique de *Candida sp*.

Mots clés: Protéase neutre, levure, *Candida sp*, fermentation solide, déchets de tomates.

Abstract

In recent years, interest in the use of yeasts for the production of proteases in solid culture has increased. This study aims at the production of protease by the yeast *Candida sp* in solid fermentation. Two media were used, tomato waste and tomato waste enriched with yeast extract, peptone and starch. The strain produced 03 proteases active at pH5, pH7 and pH9. However, the production of neutral protease by solid fermentation on enriched tomato waste is the most important (13.95×10^4 IU / g). The study of the characteristics of the protease of *Candida sp.* was, also, carried out. The optimum pH and optimum temperature of the enzyme are 7 and 60 ° C respectively. The heat treatment of the neutral protease was studied at 60 ° C and 100 ° C. After 3 hours of incubation, the protease shows a residual activity of 71% at 60 ° C and of 41% at 100 ° C. Its half-life is 165 min at 100 ° C. The effect of different salts (FeSO₄, NaCl, MgSO₄, CaCl₂, MnSO₂, ZnSO₂) on the protease showed that apart from the zero effect of MgSO₄ on the activity the other salts seem to be protease activators with high levels of 104.13%, 105.8%, 107.67%, 108.78% and 108.8%. Among the detergents studied, only Tween 80 improved neutral protein production, while SDS, EDTA and urea decrease the proteolytic activity of *Candida sp.*

Key words: Neutral protease, yeast, *Candida sp*, SSF, tomato waste.

في السنوات الأخيرة ، ازداد الاهتمام باستخدام الخميرة لإنتاج البروتين في الثقافة الصلبة. تهدف هذه الدراسة إلى إنتاج البروتين بواسطة خميرة المبيضات في التخمر الصلب. تم استخدام وسيطين هما نفايات الطماطم ومخلفات الطماطم المخصبة بمستخلص الخميرة والبيتون والنشا. السلالة المنتجة 03 بروتياز نشطة عند pH 7 و pH 5 و pH 9. ومع ذلك ، فإن إنتاج البروتين المحايد عن طريق التخمر الصلب على نفايات الطماطم المخصبة هو الأكثر أهمية (13.95 × 104 وحدة دولية / جم). دراسة خصائص بروتياز المبيضات. نفذت أيضا. درجة الحموضة المثلى ودرجة الحرارة المثلى للإنزيم هي 7 و 60 درجة مئوية على التوالي. تمت دراسة المعالجة الحرارية للبروتين المحايد عند 60 درجة مئوية و 100 درجة مئوية. بعد 3 ساعات من الحضانة ، يُظهر البروتين نشاطاً متبقياً بنسبة 71٪ عند 60 درجة مئوية و 41٪ عند 100 درجة مئوية. يبلغ عمر النصف 165 دقيقة عند 100 درجة مئوية. أظهر تأثير الأملاح المختلفة (CaCl_2 ، MgSO_4 ، NaCl ، FeSO_4) ، ZnSO_2 ، MnSO_2) على البروتين أنه بصرف النظر عن التأثير الصفري لـ MgSO_4 على النشاط ، يبدو أن الأملاح الأخرى منشطات للبروتين بمستويات عالية من 104.13٪ ، 105.8٪ ، 107.67٪ ، 108.78٪ ، 108.8٪. من بين المنظفات التي تمت دراستها، قام توين 80 فقط بتحسين إنتاج البروتين المحايد، في حين أن SDS و EDTA واليوريا تقلل من نشاط الإنزيم البروتيني المبيضات.

الكلمات المفتاحية: البروتين المحايد ، الخميرة ، المبيضات ، التخمر الصلب ، نفايات الطماطم.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

Abdou M. et Mebarek A.I. Production de la protéase alcaline sur milieu solide par des moisissures isolées de source thermale. Utilisation de déchets de tomate comme substrat de fermentation. Mémoire de Master en Microbiologie. Université Mentouri, Constantine, Algérie. **2017**.

Aghajanzadeh G.A., Maheri S.N., Mirzaei A.A. et Baradaran H. A. Comparison of Nutritional Value of Tomato Pomace and Brewer's Grain for Ruminants Using in vitro Gas Production Technique. *Asian J Anim Vet Adv.*, **2010**, 5 : 43-51.

Agrawal D., Patidar P., Banerjee T. et Patil S. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Process Biochem.*, **2005**, 40: 1131-1136.

Aguilar C.N., Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán P.A., Rodríguez-Herrera R., Martínez-Hernandez J.L. et Contreras-Esquivel J.C. Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *Am J Biochem Biotechnol.*, **2008**, 4(4): 354-366.

Al-Hussuny., Al-Ezee. et Almojaamae. Culture d'*Entamoeba histolytica* in vitro et rôle de l'amidon sur sa croissance. *J. Diyala pour la science pure.*, **2016**, 12: 49-59.

Alya S.K., Anissa H., Nedra El Hadj A., Basma G.F., Safia K. et Moncef N. Stabilité de la protéase alcaline thermostable de *Bacillus licheniformis RPI* dans les formulations commerciales de détergent à lessive solide. *Microbiol Res.*, **2008**, 163(3): 299-306.

Anson M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J. Gen Physiol.*, **1938**, 19: 446-459.

Antoine L. Production, purification et caractérisation de la protéine Hsp 12 de *Saccharomyces cerevisiae*, une protéine impliquée dans la sucrosité du vin. Thèse de Doctorat en Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bordeaux. France, **2020**.

Araujo V.D., Albuquerque C., Névés R.P., Mota C.S., Moreira K.A., Lima-Filho J.L., Cavalcanti M.T.H., Converti A. et Portoy A.L.F. Production et stabilité de la protéase de *Candida buinensis*. *Biochimie appliquée et biotechnologie.*, **2010**, 162 : 830-842.

Ata Ö., Corinna R., Nadine E., Tatto., Minoska V., Teresa M., Stephan H., Matthias G., Steiger., Pinar Ç et Diethard M. A single Gal4-like transcription factor activates the Crabtree effect in *Komagataella phaffii*. *Cell Syst.*, **2018**, 5: 345-357.

Badgujar R.T.M.a.S.B. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *J. Pharm Res.*, **2010**, 3(9): 2048-2068.

Barnali R.B., Ajit B.K. et Manas D. Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB100 grown on fish scale. *World J. Microbiol Biotechnol.*, **2008**, 24: 449-455.

Basavaraju S., Chandrasekhar K. et Pramoda K.J. Purification, characterization and application of novel alkaline protease from new *Bacillus cereus* UV-15 mutant. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.*, **2017**, 7 : 1-12.

Références bibliographiques

BCC-Business Communications Company, Inc., In: Report BIOBIO030E. Enzym Ind App Norwalk, USA. **2008**.

Beata K.P., Grzegorz K., Joanna M.D., Dawid M. et Alicja Z. Influence de la composition du milieu et de la culture Conditions sur la biosynthèse de la surfactine par un natif Souche *Bacillus subtilis natto BS19*. Molecules., **2021**, 26: 2985.

Belhomsa A., Mohamed S., Imane K., Youssef E.M., Bouchaibsarhane., Driss B. et Khadija E. Recherche des Levures et des Moisissures dans les Eaux Conditionnées et Contrôle de la Qualité Marchande Selon Les Conditions de Stockage (Maroc). Am J Sci., **2017**, 19-25.

Belmessikh A. Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée, Université Mentouri, Constantine, Algérie. **2011**.

Belmessikh A., Benkahoul M., Boukhalifa H., et Mechakra-Maza A. Optimisation à l'aide d'un plan d'expériences de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels. Déchets sciences et techniques, **2013**, 2268-7289.

Benakmoum A., Souheila A., Ammouche A., Panagiotis K. et Dimitrios G. Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste. Food Chem., **2008**, 110(3) : 684-690.

Bénard C. Étude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Sciences agricoles. Thèse de Doctorat Sciences Agronomiques. Institut National Polytechnique de Lorraine, France., **2018**.

Benkahoul K., Belmessikh A., Boukhalifa H. et Mechakra M.A. Optimisation à l'aide d'un plan d'expériences de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels. Déchets Sciences et Techniques - N°75 – **2017**: 1-9.

Bensaid O.H. Effet de compost de déchets de palmier dattier sur le développement de la culture de tomate. Mémoire de Master en Sciences agronomiques. Système de Production Agro-écologique. Université Ahmed Draïa. Adrar. Algérie, **2020**.

Berbas A. et Meghazi N.E.M. Optimisation de la production de protéases par *Aspergillus niger* sur milieu solide: caractérisation et application. Mémoire de Master en Biochimie Appliquée. Université Mohamed Khider de Biskra. Algérie. **2019**.

Bergougnoux V. The history of tomato : From domestication to biopharming. Biotechnology Advances., **2014**, 32 : 170-189.

Bessadok M. et Sadok B. Characterization of the Crude Alkaline Extracellular Protease of *Yarrowia lipolytica* YITun15. J. fish. Sci., **2017**, 11(4) : 019-024.

Beynon R.J. et Oliver S. Avoidence of proteolysis in extracts. J. Mthods mol Boil., **2004**, 596 : 81-93.

Bezawada J. et Jyothi B. Augmentation of protease production by supplementing carbon and nitrogen sources into wastewater sludge medium. J. residuals sci. Technol., **2010**, 10 : 4061.

Boukhalifa H. Etude de la production de la protéase par *aspergillus oryzae* sur milieu solide en fermenteur fujiwara. Utilisation des déchets de tomate comme substrat de fermentation. Thèse de

Références bibliographiques

doctorat en Sciences. Spécialité : Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Mentouri, Constantine, Algérie. **2015**.

Boureghida F. et Brachene A. Etude de l'effet de la température sur la production de la protéase alcaline. Tests d'applications biotechnologiques sur l'enzyme. Mémoire de Master en Microbiologie, Université Mentouri, Constantine, Algérie. **2016**.

Bouzi A. et Slimane B. La performance économique de la filière tomate industrielle en Algérie. AJOL., **2013**, 103 : 1012-0009.

Brou M. P. R. Modélisation de cultures mixtes de levures pour leur mise en oeuvre optimale dans les bioprocédés. Thèse de Doctorat. Génie des Procédés et de l'Environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse. Université de Toulouse. France., **2018**.

Burteau C.C., Verhoeve F.R., Mols J.F., Ballez J.S., Agathos S.N. et Schneider Y.J. L'enrichissement d'un milieu de culture cellulaire sans protéine avec des peptones végétales améliore la culture et la productivité d'une lignée cellulaire CHO productrice d'interféron gamma. In vitro Cell Dev Biol Anim., **2003**, 39(7): 291-6.

Buzzini P., Benedetta T. et Andrey Y. Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around. J. Inst. Brew., **2018**, 35(8) : 487-497.

Camara J. Conservation et préservation fonctionnelle de levures d'intérêt en agro-alimentaire. Ingénierie des aliments. Thèse de Doctorat. Université Bourgogne Franche-Comté : Sciences de l'Alimentation. Biotechnologie, Microbiologie, Biochimie et Génie des procédés. France., **2018**.

Castan C. Levure de bière : un champignon aux multiples bienfaits pour la santé et la beauté. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques. France., **2016**.

Céline C. Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat. Chimie. Université d'Avignon, France., **2010**.

Celma A.R., Cuadros F. et López-Rodríguez. Characterisation of industrial tomato by-products from infrared drying process. Food Bioprod Process., **2009**, 87(4) : 282-291.

Chander M. et Arora D.S. Biodegradation of a Dye by Different White-rot Fungi on a Novel Agro Residue Based Medium. Int. J. lignocellul., **2014**, 3(1): 37-50.

Chander M. et Kaur I. An Industrial Dye Decolourisation by *Phlebia sp.* Int. J. Curr Microbiol App Sci., **2015**, 4(5): 217-226.

Chellapan S., Jasmin C., Basheer S.M., Elyas K.K., Bhat S.G. et Chandrasekaran M. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. J. Process Biochem., **2006**, 41: 956-961.

Chen J., Zhang Y., Du G.C., Hua Z.Z. et Zhu Y. Biodegradation of polyvinyl alcohol by a mixed microbial culture. Enzyme Microb Technol., **2007**, 40(7): 1686–1691.

Références bibliographiques

Chenel J.P. Production de protéase thermostables par des bactéries thermophiles en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Thèse Pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D) en Sciences de l'eau. Université du Québec. Institut national de la recherche scientifique Eau Terre Environnement. **2011**.

Chi C.M., Wang P et Li HF. Optimisation du milieu et des conditions de culture pour la production de protéases alcalines par la levure marine *Aureobasidium pullulans*. Bioresourcesloà., **2007**, 98(3) : 534-8.

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

Chniti S. Optimisation de la bioproduction d'éthanol par valorisation des refus de l'industrie de conditionnement des dattes. Thèse de Doctorat. Institut des Sciences Chimiques, Université de Rennes, France., **2017**.

Contesini F.J., Melo R.R.D. et Sato H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. Critical Reviews in Biotechnology., **2017**, 38(3): 321-334.

Cotte F. Etudr de la valeur alimentaire des pulpes de tomate chez les Rominants. Thèse de Doctorat. Université Claude-Bernard-Lyon 1. Médecine-Pharmacie. France., **2000**.

Cynthia R.G. Etude des mécanismes physiologiques et moléculaires permettant la prise en charge des substrats hydrophobes par la levure *Yarrowia lipolytica* au niveau pariétal, Thèse de doctorat en Sciences de l'alimentation. Sciences agricoles. Université de Bourgogne. Biotechnologie, Biochimie Microbienne, Microbiologie. France., **2012**.

Dakhmouche S. Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de Doctorat. Université Mentouri, Constantine, Algérie. Université de Technologie Compiègne, France. **2016**.

Dali N.S et Hamame A. Recherche de levures productrices d'enzymes glycolytiques exocellulaires thermostables : Production (sur boîte de Pétri et en batch) et Caractérisation des enzymes produites. Mémoire de Master en Biochimie / Analyse Protéomique et Santé, Université Frères Mentouri, Constantine, Algérie., **2016**.

Das K. et Mukherjee A.K. Comparaison de la production de biosurfactants lipopeptidiques par des souches de *Bacillus subtilis* dans des systèmes de fermentation à l'état solide et submergé en utilisant une source de carbone bon marché: quelques applications industrielles de biosurfactants. Process Biochem., **2007**, 2 : 1191-1199.

De Araújo Viana D., De Albuquerque Lima C., Neves R.P., Mota C.S., Moreira K.A., De Lima-Filho J.L., Cavalcanti M.T., Converti A. et Porto A.L. Production et stabilité de la protéase de *Candida buinensis*. Appl Biochem Biotechnol., **2010**, 162(3): 830-42.

De-Castro R.J.S., Nishide T.G. et Sato H.H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. J. Biocatal Agric Biotechnol., **2014**, 3(4): 236-245.

Dembélé S., N'dri E.K., Ibrahima C., Amissa A.A., Koffi Y. et Anin Atchibri Anin Louise. Valeur nutritionnelle et capacité antioxydante de quatre variétés de tomate (*Lycopersicon*

Références bibliographiques

- esculentum mill*) cultivées en Côte d'Ivoire (Nutritional value and antioxidant capacity of four tomato varieties cultivated in Cote d'Ivoire). Int. j. sci. res. innov. Technol., **2019**, 26 : 915-925.
- Demirijan D.C.**, Moris-Varas F. et Cassidy C.S. Enzymes from extremophiles. J. Curr Opin Chem Biol., **2001**, 5: 144-151.
- Dendouga W.** Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de Magister, Université Mentouri, Constantine, Algérie., **2006**.
- Devi M.K.**, Banu A.R., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V. et Planiswamy M. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. Indian J. Sci Technol., **2008**, 1(7) : 1-6.
- Djama R.** et Abdelilah W. Production de la polygalacturonase par la moisissure *Aspergillus niger* cultivée sur milieu solide (SSF). Mémoire de Master en Biochimie de la Nutrition, Université Mentouri, Constantine, Algérie., **2018**.
- Dos Santos Aguilar J.G.** et Sato H.H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. J. Res Int., **2018**, 103: 253–262.
- Drouin M.** Étude de production de protéases alcalines par *Bacillus Licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Thèse pour l'obtention du grade Philosophiae Doctor (Ph.D) en sciences de l'eau. Université du Québec. Institut National de la Recherche Scientifique Eau, Terre et Environnement., **2005**.
- Duchiron F.** et Copinet E. Fermentation en Milieu Solide (FMS). Bioprocédés et bioproductions. BIO620 v1., **2011**, 1-13.
- Durand A.** Les potentialités de la culture à l'état solide en vue de la production de micro-organismes filamenteux. Les antagonismes microbiens. 24ème colloque SFP. Edition INRA Pub. **1983**.
- Durand G.** et Monson P. Les enzymes : production et utilisations industrielles. Edition Bordas. Paris., **1982**, P. 36-153.
- Durand L.** PC7: une protéase sécrétoire énigmatique ayant une fonction de sheddase et un ciblage cellulaire unique. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D) en Biologie Moléculaire. Université de Montréal. **2019**.
- Durand.** et Alain. La fermentation en milieu solide. Biofutur [en ligne]., **1988**, 181: 41-43.
- Edwards D.R.**, Handsley M.M. et Pennington C.J. The ADAM metalloproteinases. J. Mol Aspects Med., **2008**, 29: 258-289.
- Elleuch J.**, Farah H., Kacem F., Ben Amor B., Hadrich P.M., Imen F., et Slim A. Extracellular neutral protease from *Arthrospira platensis*: Production, optimization and partial characterization. Int. J. Biol. Macromol., **2021**, 167 : 1491-1498.

Références bibliographiques

- Ferrero M.A.**, Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D. et Sineriz F. Thermostable alkaline protease of *Baeillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *J. Appl Microbiol Biotechnol.*, **1996**, 45: 327-332.
- Fossi F.T.**, Bertrand T. et Robert J. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soil. *Afr. J. Biotechnol.*, **2005**, 4: 14-18.
- Francis S.** Ire1., Bartholomew N., Okolo., Anene N., Moneke et Frederick J.C. Influence of cultivation conditions on the production of a protease from *Aspergillus carbonarius* using submerged Fermentation. *Afr. J. Food Sci.*, **2011**, 5(6): 353 – 365.
- Franco D.G.**, Spalanzani R.N., Lima E.E., Marchetti C.R., Silva P.O., Masui D.C., Giannesi G.C. et Zanoelo F.F. Biochemical properties of a serine protease from *Aspergillus flavus* and application in dehairing. *Biocatal Biotransfor.*, **2017**, 35(4): 249-259.
- Francois N.N.** Production of Microbial Industrial Enzymes. *J. Acta sci microbiol.*, **2019**, 2(12) : 75-89.
- Franek F.** Gluten d'épeautre (*Triticum aestivum* sous-espèce spelta) en tant que source de peptides favorisant la viabilité et le rendement des cultures cellulaires d'hybridomes de souris. *J. Agric Food Chem.*, **2004**, 52(13): 4097-100.
- Furhan J.** Adaptation, production et potentiel biotechnologique de protéases adaptées au froid provenant de psychrophiles et de psychrotrophes: aperçu récent. *J. de génie génétique et de Biotechnol.*, **2020**, 18 : 36.
- García-Gomez M.J.** Comparaison entre extrait commercial et extrait protéolytique fongique produit par fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat en Biotechnologie. Université autonome métropolitaine d'Iztapalapa., **2008**.
- Gaur S.**, Agrahari S. et Wadhwa N. Purification of Protease from *Pseudomonas thermaerum* GW1 Isolated from Poultry Waste Site. *J. Open Microbiol.*, **2010**, 4: 67-74.
- Gençkal H.** et Tari C. Studies on Alkaline Protease Production from *Bacillus sp.* Thèse de Magistère en Biotechnologie. Institut of Technology. Izmir-Turkey. **2004**.
- Gervais P.** et Bensoussan M. Solid-state fermentations of the genus *Aspergillus*. In: Smith. J. E., editor. *Aspergillus*. Plenum Press., **1994**, P. 101–140.
- Ghobadi N.Z.**, Yaghmaei S. et Haji Hosseini R. Production of extracellular protease and determination of optimal condition by *Bacillus licheniformis* BBRC 100053. *IJE Transactions B: Applications.*, **2010**, 22(3): 221-228.
- Ghribi D.** et Ellouze-Chaabouni S. Amélioration de la production de biosurfactants lipopeptidiques de *Bacillus subtilis* par l'optimisation de composition moyenne et contrôle adéquat de l'aération. *Biotechnol Res Int.*, **2011**, 2011:653654. doi: 10.4061/2011/653654.

Références bibliographiques

- Giesecke U.E.**, Bierbaum G., Rudde H., Spohn U. et Wandrey C. Production of alkaline protease with *Baeillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. *J. Appl Microbiol Biotechnol.*, **1991**, 35: 720-724.
- Gimenes N.C.**, Silveira E. et Tambourgi E.B. An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications. *Rév. Purif sept.*, **2019**, 00:1–21.
- Gobert A.** Etude des besoins en azote des levures *non-Saccharomyces* en vinification : impact sur les fermentations séquentielles. Sciences agricoles. Thèse de Doctorat en Biotechnologies agro-alimentaire. Université Bourgogne Franche-Comté. France., **2019**.
- Gomri M.A.** Contribution à l'étude de la diversité des bactéries thermophiles de quelques environnements chauds algériens et essai de production et de caractérisation de leurs protéases extracellulaires. Thèse de Doctorat en Sciences. Université Mentouri, Constantine, Algérie. Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (L.N.A.T.A.A). **2019**.
- Gulmus E. O.** et Gormez A. Characterization and biotechnological application of protease from thermophilic *Thermomonas haemolytica*. *Arch. Microbiol.*, **2020**, 202 : 153–159.
- Gupta R.**, Beg Q.K. et Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *J. Appl Microbiol Biotechnol.*, **2002**, 59: 15-32.
- Harwood C.R.** et Cranenburgh R. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Tre. Micro.*, **2006**. 16(2): 73-79.
- Herida F.** et kihal A. Optimisation de la production d'une enzyme proteolytique par *Lactobacillus* sp. et caractérisation de ses propriétés physicochimiques. Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée, Université Jijel, Algérie. **2011**.
- Hernandez M.R.**, Sancho S.A., Loera-Corra O., Rojo D.A., Regalado G.C., S. Huerta O et Prado-Barragan L.A. Purification et caractérisation d'une protéase alcaline thermostable produite par *Yarrowia lipolytica*. *J. mexicain de génie chimique.*, **2011**, 10(2) : 333-341.
- Hernández M.S.**, Marilú R., Nelson P.G. et Renato P.R. Amylase production by *Asprgillusnigerin* submerged cultivation on two wastes from food industries. *J. Food Eng.*, **2006**, 73: 93-100.
- Hernandez-Montañez Z.**, Araujo-Osorio J., Noriega-Reyes Y., Ch´avez-Camarillo G. et Villa-Tanaca L. Le système protéolytique intracellulaire de *Yarrowia lipolytica* et la caractérisation d'une aminopeptidase. *J. FEMS Microbiol Lett.*, **2007**, 268 : 178-186.
- Hesham A. E. L.**, Alrumman S.A., Al-Dayel M.A., et Salah H.A. Screening and genetic identification of acidic and neutral protease-producing yeasts strains by 26S rRNA gene sequencing. *Cytol. Genet.*, **2017**, 51 : 221–229.
- Heuvelink E.** et Higashide T. Physiological and morphological changes over the past 50 years in yield components in tomato. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **2009**, 134(4) : 6.
- Houdaya M.** Isolement et identification des levures de quatre fruits tropicaux : *Mangifera indica*, *Psidium cattleianum*, *Clidemia hirta* et *Psidium goyava*, récoltes dans trois régions de

Références bibliographiques

- Madagascar : *Atsinanana, Boeny et Yakinankaratra*. Mémoire de Master. Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée. Université d'Antananarivo. Madagascar., **2015**.
- Hu X.Q.**, Liu Q., Hu J.P., Zhou J.J., Zhang X., Peng S.Y., Peng L.J. et Wang X.D. Identification and characterization of probiotic yeast isolated from digestive tract of ducks. *Poult. Sc.*, **2018**, 97 : 2902-2908.
- Hu Y.**, Tong L., Zhui T., Qinghua H., Yanping L. et Jinheng F. Engineering a recombination neutral protease I from *Aspergillus oryzae* to improve enzyme activity at acidic pH. *RSC Adv.*, **2020**, 10 : 30692-30699.
- Illanes A.** Enzyme biocatalysis. Chapter 3: Homogeneous enzyme kinetics. Chile: Springer., **2008**, P. 107-153.
- Jessika** et Héliá. Microbial proteases : Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Res. Int.*, **2018**, 103(18): 253-262.
- Jing L.**, Zhenming C., Xianghong W., Ying P. et Zhe C. The selection of alkaline protease producing yeasts from marine environments and evaluation of their bioactive peptide production. *Chin. J. Oceanol Limnol.*, **2009**, 27: 753-761.
- Joshi P.A.** et Shekhawat D.B. Dépistage et isolement des bactéries productrices de biosurfactants à partir de sols contaminés par le pétrole. *EUR. J. Exp Biol.*, **2014**, 4 : 164-169.
- Katapodis P.**, Vasiliki C. et Paul C. Optimization of Xylanase Production by *Thermomyces Lanuginosus* in Tomato Seed Meal Using Response Surface Methodology. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, 22 : 501–506.
- Kaur C.** et Kapoor H.C. Chapitre : Antioxydant Activity in Tomato: A Function of Genotype. In Victor R. Preedy and Ronald R. Watson : Tomatoes and Tomato Products. Science Publishers,U.S., **2008**, P. 21.
- Kawai F.** et Hu X.P. Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *J. Appl Microbiol Biotechnol.*, **2009**, 84(2): 227–237.
- Khokha R.**, Murthy A. et Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *J. Nat Rev Immunol.*, **2013**, 13(9): 649.
- Kim S.K.**, Park P.J., Kim J.B. et Shahidi F. Purification and characterization of a collagenolytic protease from the filefish, *Novoden modestrus*. *J. Biochem Mol Biol.*, **2002**, 35(2): 165–171.
- King A.** et Zeidler J.G. Tomato pomace may be a good source of vitamine E in broiler diets. *Calif Agric. (Berkeley).*, **2004**, 58(1) : 0008-0845.
- Klein T.**, Eckhard U., Dufour A., Solis N. et Overall C.M. Proteolytic Cleavage-Mechanisms, Function, and "Omic" Approaches for a Near-Ubiquitous Posttranslational Modification. *Chem Rev.*, **2018**, 118: 1137-1168.
- Knoblich M.**, Brandi A. et David L. Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids. *J. Sci. Food Agric.*, **2005**, 85(7) : 1166-1170.
- Krishna.** et Chundakkadu. Solid-State Fermentation System-An Overview. *Crit. Rev. Biotechnol [en ligne].*, **2005**, 2(25): 1-30.

Références bibliographiques

- Kumar C.G.** et Takagi H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *J. Biotechnol Adv.*, **1999**, 17: 561-594.
- Kumar D.**, Savitri., Thakur N., Verma R. et Bhalla T.C. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.*, **2008**, 3(12): 661–672.
- Kurtzman C.P.**, Fell J.W et Boekhout T. The yeasts : a taxonomic study, Fifth Edition., **2011**, 1 : 3.
- Kurtzman C.P.**, Part Iva. Classification of the Ascomycetous Taxa Chapitre 13. Discussion of Teleomorphic and anamorphic Ascomycetous and yeasts-like-taxa. In Kurtzman C. P., Fell J.157 W. and Boekhout T (Eds). The yeasts, a taxonomic study. Fifth edition. Elsevier., **2011**, 2: 293-311.
- Lagzoul M.**, Charouf R., El-yachioui M., Ouhssine M., Berny. et Jadil M. Optimisation de la croissance et de la production de glucoamylase extracellulaire par *Candida Guilliermondii*. *J. Bull Soc Pharm Bordeaux.*, **2007**, 146: 251-270.
- Lakba H.** et Soucha H. Production des protéases par les mycètes isolés de milieux sahariens. Mémoire de Master en Microbiologie, Université Mentouri, Constantine, Algérie. **2015**.
- Lario L.D.**, Pillaca-Pullo O.S., Duraes Sette L., Converti A., Casati P., Spampinato C. et Pessoa A. Optimisation de la production de protéase et analyse de séquence de l'enzyme purifiée de la levure adaptée au froid *Rhodotorula mucilaginosa CBMAI 1528*. *Biotechnol Rep (Amst).*, **2020**, 28: 1-9.
- Lazim H.**, Mankai H., Slama N., Barkallah I. et Limam F. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces sp.* CN902. *J. Ind Microbiol Biotechnol.*, **2009**, 36 : 531-537.
- Léger A.** Production, purification et caractérisation de la protéine Hsp 12 de *Saccharomyces cerevisiae*, une protéine impliquée dans la sucrosité du vin. Thèse de Doctorat en Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bordeaux, Français. **2020**.
- Leisola M.**, Jokela J., Pastinen O. et Turunen O., 2001. Industrial use of enzymes. Laboratory Bioproc. Eng., Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds. **2001**.
- Li Y.** Principles and Technology of Fermentation Engineering, Higher Education Press, Pékin, Chine., **2007**.
- Liszkowska W.** et Berlowska J. Yeast Fermentation at Low Temperatures. Adaptation to Changing Environmental Conditions and Formation of Volatile Compounds. *Molecules.*, **2021.**, 26(4): 1035.
- Lopez-Flores A.R.**, Luna-Urban C., Buenrosto-Figueroa J.J., Hernandez-Martinez R., Huerta-Ochoa S., Escalona-Buendia H., Aguilar-Gonzalez C.N. et Prado-Barragan L.A. Effet de pH de la température et de la source de protéines et de glucides dans la production de protéase par *Yarrowia lipolytica* insolidculture. *J. mexicain de génie chimique.*, **2016**, 15(1): 57-67.

Références bibliographiques

Lopez-Otin C. et Bond J.S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol Chem.*, **2008**, 283(45): 30433-30437.

Loudjani H. et Belmerabet K. Etude des paramètres physico-chimiques de la production de protéase par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Mémoire de Master en Microbiologie, Université Mentouri, Constantine, Algérie. **2016**.

Lucas P., Eloi H., Alains S., Martin P., Lris B., Véronique M. et Vincent J. Une approche multi-omique révèle comment les peptides d'extrait de levure façonnent le métabolisme de *Streptococcus thermophiles*. *Revue ASM: Microbiologie appliquée et environnementale.*, **2020**, 86(22): 1-23.

Ma C., Ni X., Chi Z., Ma L. et Gao L. Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* for bioactive peptide production from different sources. *Marine Biotechnology.*, **2007**, 9: 343–351.

Mabrouk S.S., Hashem A.M., El-shayeb N.M.A., Ismail A.M.S. et Abdel-Fattah A.F. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis ATCC 21415*. *J. Bioresour Technol.*, **1999**, 69: 155-159.

Mahajan R.T. et Badgujar S.B. Biological aspects of proteolytic enzymes. *A Rev. J. Pharm .Res.*, **2010**, 3(9): 2048-2068

Mahious R. et Rehahlia N. Etude d'a-amylase levurienne: Production, optimisation et immobilization. Mémoire de Master en Biochimie Appliquée, Université Mentouri, Constantine, Algérie., **2020**.

Manpreet S., Sawraj S., Sachin D., Pankaj S. et Banerjee U.C. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malays. J. Microbiol [en ligne].*, **2005**, 1(2): 1-9.

Maquaire S. Etude des activités protéasiques constitutives et excrétées-sécrétées au cours du cycle de développement parasitaire de *Leishmania amazonensis*. Mémoire de stage en Etude Approfondie de Parasitologie. Université des Sciences et Techniques du Languedoc - Montpellier II. **1997**.

Maturano Y.P., Victoria M., Braulio E.Z., María C.N., María C.L.M., Eugenia T., Fabio V. et Mariana C. Yeast population dynamics during prefermentative cold soak of Cabernet Sauvignon and Malbec wines. *Int. J. Food Microbiol.*, **2015**, 199 : 23-32.

Maziane A. et Agagna S. Recherche, dénombrement et identification de la flore fongique dans le fromage traditionnelle *Bouhezza* au lait de vache. Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée. Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Larbi Ben M'hidi -Oum El -Bouaghi. Algérie., **2020**.

Medjdoub R. et Chouai O. Production de la protéase alcaline par *Aureobasidium sp.* sur milieu à base de déchets de tomate. Mémoire de Master en Microbiologie. Université Mentouri, Constantine, Algérie., **2018**.

Références bibliographiques

- Merabti R.** Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Mémoire de Magistère en Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Mentouri, Constantine, Algérie., **2017**.
- Miller R.K.**, et al. The CLIP-170 orthologue Bik1p and positioning the mitotic spindle in yeast. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **2006**, 76 : 49-87.
- Moreira J. da V.**, Modélisation de la bascule métabolique chez les cellules eucaryotes : Application à la production de citrate chez la levure *Yarrowia lipolytica*. LIX - Laboratoire d'informatique de l'École polytechnique. Thèse de doctorat en Biotechnologie. Université Paris-Saclay. France., **2019**.
- Morge C.**, Antoine G., Raphaëlle Tourdot-Maréchal., Céline Sparrow., Youzhong Liu., Beatriz Quintanilla-Casas., Stefania Vichi et Hervé Alexandre. *Non-Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences : Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Front. Microbiol.*, **2017**, 10 : 3389.
- Mukherjee A.K.**, Adhikari H. et Rai S.K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *J. Biochem Eng.*, **2008**, 39: 353-361.
- Murthy P.S.** et Naidu M.M. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World. J. Appl Sci.*, **2010**, 8(2): 199-205.
- Naumova E.S.**, Sadykova A.Z., Martynenko N.N. et Naumova G.I. Hybrid Selection of *Saccharomyces cerevisiae* Yeasts for Thermotolerance and Fermentation Activity. *Microbiology.*, **2017**, 87(2) : 215–221.
- Nieri B.**, Canino S., Versace R. et Alpi A. Purification and characterization of an endoprotease from alfalfa senescent leaves. *Phyto.*, **1998**, 49(3): 643-649.
- Ningthoujam D.S.**, Kshetri P., Sanasam S. et Nimaichand S. Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes. *J. World Appl. Sci.*, **2009**, 7(7): 907-916.
- Niyonzima F.N.** et More S.S. Coproduction of detergent compatible bacterial enzymes and stain removal evaluation. *J. Basic Microbiol.*, **2015**, 55: 1-10.
- Nurdiyana H.**, Siti Mazlina Mustapa K., Ling Tau C., Nurul Fadzni M. et Norhani J. Comparison of microbial growth on fish waste peptones from different hydrolysis methods. *Int Conf Biomed Eng Technol.*, **2015**, 81(1): 54-57.
- Ogrydziak M.** et David. Yeast Extracellular Proteases. *Crit Rev Biotechnol.*, **1993**, 13(1): 1-55.
- Olfa B.**, Sana M., Mariam K., Wissem M. et Moktar H. Optimization of Protease and Amylase Production by *Rhizopus oryzae* Cultivated on Bread Waste Using Solid-State Fermentation. *J. Chim.*, **2019**, 3: 1-9.
- Ozturk SS.**, Riley MR. et Palsson BO. Effets de l'ammoniac et du lactate sur la croissance, le métabolisme et la production d'anticorps des hybridomes. *Biotechnol Bioeng.*, **1992**, 39(4): 418-31.

Références bibliographiques

- Pandey A.** et Soccol C.R. Economic utilization of crop residues for value addition. A futuristic approach. *J. Sci. Ind. Res.*, **2000**, 59: 12-22.
- Pandey A.**, Larroche C. et Soccol C.R. General considerations about solid-state fermentation. In: Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, Edition Springer, New Delhi, India., **2008**, P. 13-25.
- Paranthman R.**, Alagusundaram k. et Indhumathi J. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *World. J. Agric Res.*, **2009**, 5(3): 308-312.
- Parapouli M.**, Hatziloukas E., Drainas C. et Perisynakis A. The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine flavour. *J. Ind Microbiol Biotechnol.*, **2010**, 37: 85- 93.
- Péter G.**, Masako T. et Neža Č. Chapitre : Yeast Habitats : Different but Global. In Pietro Buzzini, Marc-André Lachance Andrey Yurkov : *Yeasts in Natural Ecosystems : Ecology*. SpringerLink., **2017**, 39-71.
- Ponomarova O.**, Natalia G., Daniel M.M., Katharina Z., Katsiaryna B., Sergej A., Eleni K., Athanasios T., Uwe S., Markus R. et Kiran R.P. Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. *European Molecular Biology Laboratory, Cell Syst.*, **2017**, 5(4) : 442-444.
- Prakasham R.S.**, Subba Rao, Ch. et Sarma P.N. Green gram husk: an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus sp.* in solid-state fermentation. *Bioresour Technol.*, **2006**, 97:1449–1454.
- Prescotte I.**, Harley J.P. et Klein D.A. *Microbiologie*, 2e Edition DeBoeck-Wesmael, Bruxelles, Belgique., **1995**, P. 1014.
- Pretscher J.**, Tilman F., Sina B., Lucas J., Susann K., Martina S., Eckhard T. et Harald C. Yeasts from Different Habitats and Their Potential as Biocontrol Agents. *Fermentation.*, **2018**, 4(2) : 31.
- Priatni S.**, Kosasih W., Budiwati T.A., et Ratnaningrum D. Production de peptone à partir de poisson boso (*Oxyeleotris marmorata*) pour milieu de croissance bactérien. *Série de conférences IOP: Sciences de la Terre et de l'environnement.*, **2017**, 60(1): 012009.
- Puri S.**, Beg Q.K. et Gupta R. Optimisation of alkaline protease production from *Bacillus sp.* by response surface methodology. *J. Curr Microbiol.*, **2002**, 44: 286-290.
- Rafa S.**, Dorota W., Mateusz K. et Jan G. Différents modèles d'activité protéolytique extracellulaire dans les souches W303a et BY4742 de *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol de base.*, **2017**, 57(1): 34-40.
- Rahardjo Y.S.P.**, Tramper J. et Rinzema A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *J. Biotechnol Adv.*, **2006**, 24(2): 161-179.
- Raimbault M.** *Fermentation en Milieu Solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. Thèse d'Etat.* Th Sci Nat. Université Paul Sabatier, Toulouse, France. **1980**.

Références bibliographiques

- Raimi O.G.**, Kappo M.A., Fajana O., Oku S.S. et Adeniji M.A. Alkaline protease from maggots: a likely source of industrial enzyme. *J. Cell Tissue Res.*, **2010**, 10(3): 2419-2422.
- Rane A.N.**, Baikar V.V., Ravi Kumar V. et Deopurkar R.L. Déchets agro-industriels pour la production de biosurfactant par *Bacillus subtilis* ANR 88 et son application dans la synthèse de nanoparticules d'argent et d'or. *Devant. Microbiol.*, **2017**, 8 :492. doi: 10.3389/fmicb.2017.00492.
- Rao M.B.**, Tanksale A.M., Ghatge M.S. et Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **1998**, 62(3): 597–635.
- Raval V.H.**, Pillai S., Rawal C.M., et Singh S.P. Biochemical and structural characterization of a detergent stable serine alkaline protease from sea water haloalkaliphilic bacteria. *J. Process Biochem.*, **2014**, 49(6): 955-962.
- Ray M.**, Devi K., Kumar S. et Shivaji S. Protéase extracellulaire de levure antarctique *Candida humicola*. *Microbiologie environnementale appliquée.*, **1992**, 58 : 1918-1923.
- Rogers L.D.** et Overall C.M. Proteolytic post-translational modification of proteins: proteomic tools and methodology. *J. Mol Cell Proteomics.*, **2013**, 12(12): 3532-3542.
- Rossella C.**, Landolfo S., Maurizio C., Marilena B., Severino Z., Murat U., Zeynep P.C. et Ilaria M., Biotechnological exploitation of *Tetrapisispora phaffii* killer toxin: heterologous production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2017**, 101 : 2931–2942.
- Roussos S.** Croissance de *Trichoderma harzianum* par Fermentation en Milieu Solide: Physiologie, Sporulation et Production de Cellulases. Thèse de doctorat, Université de Marseille. **1985**.
- Sandhya C.**, Sumantha A., Szakacs G. et Pandey A. Évaluation comparative de la production de protéases neutres par *Aspergillus oryzae* en fermentation submergée et à l'état solide. *J. Process Biochem.*, **2005**, 40 : 2689-2694.
- Saxena R.** et Singh R. Production contemporaine d'amylase et de protéase grâce à la méthodologie de surface de réponse CCD par la souche *B69 de Bacillus megaterium* .nouvellement isolée. *Enzyme Res.*, **2014**, 2014:601046. doi: 10.1155/2014/601046
- Sayed E.**, Barakat N., Abdelkareem M., Foued H et Nakagawa N. L'extrait de levure en tant que médiateur efficace et sûr pour la pile à combustible microbienne à base de levure de Boulanger. *ACS Publications. Ind. Eng. Chem. Rés.*, **2015**, 54(12): 3116–3122.
- Schlender M.**, Ute D., Stefan T., Eckhard T. et Harald C. Purification and Properties of Yeast Proteases Secreted by *Wickerhamomyces anomalus* 227 and *Metschnikovia pulcherrima* 446 during Growth in à White Grape Juice. *Int. J. Wine Res.*, **2017**, 3(1) : 2.
- Seidah N.G.** et Chretien M. Proprotein and prohormone convertases : a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *J. Brain Res.*, **1999**, 848 : 45-62.
- Seidah N.G.** et Prat A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *J. Nat Rev Drug Discov.*, **2012**, 11(5): 367-383.

Références bibliographiques

- Sekkat M.** *Candida dubliniensis* : Evaluation d'un test au latex pour l'identification rapide et revue de la littérature. Thèses de Doctorat en pharmacie. Médecine et de Pharmacie de Rabat. Université Mohammed V. Rabat. Maroc., **2008**.
- Selby Smith J.**, Hillier A.J., Lees G.J. et Jago G.R. 1975. La nature de la stimulation de la croissance de *Streptococcus lactis* par l'extrait de levure. *J. Dairy Res.*, **1975**, 42: 123-138.
- Sergi M.** The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms.*, **2020**, 8(8) : 1142.
- Shahriar Alam.**, Juan Hong. et William A. Weigand. Effet de l'extrait de levure sur l'a-amylase Synthèse par *Bacillus amyloliquefaciens*. Département de génie chimique, Illinois Institute of Technology, Chicago., **1988**.
- Sharma K.M.**, Rajesh K., Surbhi P. et Ashwani K. Protéases alcalines microbiennes : Optimisation des paramètres de production et de leurs propriétés *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **2017**, 15 : 115-126.
- Sharma M.**, Gat Y., Arya S., Kumar V., Panghal A. et Kumar A. A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. *J. Ind Biotechnol.*, **2019**, 15(2): 69-78.
- Shivakumar S.** Co-production of alkaline protease and amy lase of *Bacillus sp.* Y in solid state cultivations. *Res. J. Biotechnol.*, **2012**, 7: 32-38.
- Siezen R.J.** et Leunissen J.A. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.*, **1997**, 6 : 501-523.
- Silva RR Da.** Bacterial and fungal proteolytic enzymes : production, catalysis and potential applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2017**, 183 : 1–19.
- Sine J-P.** *Enzymologie et applications.* Ellipses Edition marketing S.A, Paris. **2010**.
- Singh A.K.**, Rautela R. et Cameotra S.S. Activité antifongique in vitro dépendante du substrat de *Bacillus sp.* souche AR2. *Microbe. Usines cellulaires.*, **2014**, 13 : 67.
- Singh R.**, Anshumali M., Manoj K. et Praveen K.M. Microbial Proteases in Commercial Applications. *J. pharm chem biol.*, **2016**, 14(3): 365-374.
- Singhania R.R.**, Patel A.K., Soccol C.R. et Pandey A. Recent advances in solid-state fermentation. *J. Biochem. Eng.*, **2009**, 44: 13-18.
- Sinha N.** et Satyanarayana T. Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*. *Indian J. Microbiol.*, **1991**, 31(4): 425-430.
- Sircar G.**, Saha B., Mandal R.S., Pandey N., Saha S. et Gupta Bhattacharya S. Purification, clonage et caractérisation immuno-biochimique d'un allergène de protéase aspartique fongique Rhi o 1 de la moisissure aéroportée *Rhizopus oryzae*. *J. PLoS One.*, **2015**, 10(12): 1-26.
- Soeka Y.S.** et Sulistiani. Characterization of protease from *Stenotrophomonas sp.* from Mount Bromo, East Java. *Berita Biologi.*, **2017**, 16: 203-211.

Références bibliographiques

- Sogi D. S.** et Kaur J. Studies on the preparation of margarine from tomato seed oil. *J. Food Sci. Technol.*, **2003**, 40(4) : 432-435.
- Soong Y.H.**, Valerie N.L., Seongkyu Y.C.L. et Dongming X. Cellular and metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowialipolytica* for bioconversion of hydrophobic substrates into high-value products. *Eng. Life Sci.*, **2019**, 19 : 423–443.
- Sreedevi B.**, Chandrasekhar K. et Pramoda K.J. Purification, caractérisation et application d'une nouvelle protéase alcaline à partir du nouveau mutant *Bacillus cereus UV-15*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2017**, 7 : 1-12.
- Sugawara A.**, Hirofumi H. et Jun Y. Identification and characterization of proteinase B as an unstable factor for neutral lactase in the enzyme preparation from *Kluyveromyces lactis*. *J. Biosci. Bioeng.*, **2020**, 131(1) : 20-26.
- Sumantha A.**, Larroche C., et Pandey A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases : a perspective. *J. Food Technol Biotechnol.*, **2006**, 244 : 211–220.
- Sumantha A.**, Sandhya C., Szakacs G. et Pandey A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* submerged and solid-state fermentation. *J. Process Biochem.*, **2005**, 40: 2689- 2694.
- Sumantha A.**, Sandhya C., Szakacs G., Soccol C.R., et Pandey A. Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. *J. Food Technol Biotechnol.*, **2005**, 43 : 313-319.
- Thomas L.**, Larroche C. et Pandey A. Current developments in solid-state fermentation. *J. Biochem Eng.*, **2013**, 81: 146-161.
- Thumar J.T.** et Singh S.P. Organic solvent tolerance of an alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. *J. Ind Microbiol Biotechnol.*, **2009**, 36: 211–218.
- Toumi S.** Isolement et caractérisation des souches levuriennes productrices d'amylase à partir de sol saharien Algérien et cultivée sur un milieu à base de lactosérum. Thèse de Doctorat en Microbiologie Moléculaire et Protéomique. Sciences Biologiques. Université Djillali Liabes de SBA. Sidi Bel Abbas. Algérie., **2018**.
- Toundou O.** Evaluation des caractéristiques chimiques et agronomiques de cinq composts de déchets et étude de leurs effets sur les propriétés chimiques du sol, la physiologie et le rendement du maïs (*Zea mays L. Var. Ikenne*) et de la tomate (*Lycopersicon esculentum L. Var. Tropimech*) sous deux régimes hydriques au Togo. Thèse de doctorat en Biologie Végétale Appliquée. Faculté des Sciences & Techniques Groupement de Recherche Eau Sol Environnement. Université de Limoges ; Université de Lomé (Togo). France., **2017**.
- Tsegaye Z.**, Tefera G., Gizaw B. et Abatenh E. Characterization of Yeast Species Isolated from Local Fruits used for Bakery Industrial Application. *J. Appl Microbiol Res.*, **2018**, 1(1) : 2581-7566.
- Urien C.** Diversité des espèces de levures dans des levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique : une étude pilote pour analyser les pratiques boulangères et les patterns des communautés microbiennes. Thèse de Doctorat en Ecologie, Environnement UMR. Université Paris Sud - Paris XI. Paris. France., **2016**.

Références bibliographiques

- Vázquez J. A.**, Araceli M., Ana I.D., Margarita N., Andrea F.C., Ricardo I.P.M et Isabel R. A. Production of Valuable Compounds and Bioactive Metabolites from By-Products of Fish Discards Using Chemical Processing, Enzymatic Hydrolysis, and Bacterial Fermentation. *Mar. Drugs.*, **2019**, 17(3): 139.
- Vázquez I.T.**, Ricardo S.C., Marisol A. D., Verónica L.R., Ayixón S.R., Mariadel R. Sánchez C., Daniel P.C. R., Alberto B.G., et Jorge Luis F.M. Isolation and characterization of psychrophilic and psychrotolerant plant-growth promoting microorganisms from a high-altitude volcano crater in Mexico. *Microbiol Res.*, **2019**, 232: 126394.
- Verma S.**, Dixit R. et Pandey K.C. Cysteine Proteases : Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *J. Front Pharmacol.*, **2016**, 7 :107.
- Vielle C.** et Zeikus G.J. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **2001**, 65: 1- 43.
- Vikram H.R.**, Megha K., Purohit. et Satya P.S. Chapter 16: Extracellular proteases from Halophilic and Haloalkaliphilic Bacteria: Occurrence and Biochemical Properties. Dinesh K.M: Halophiles, Biodiversity and Sustainable Exploitation. Edition Springer., **2016**, P. 422-449.
- Villena M.**, Arevalo A., Briones-Perez I., Corbo M.R., Sinigaglia M., et Bevilacqua A. Biotechnological application of yeasts in food science : Starter cultures, probiotics and enzyme production. *J. Appl. Microbiol.*, **2017**, 123(6) : 1360-1372.
- Vishwanatha K.S.**, Appu Rao A.G et Singh S.A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC5341 : Optimization of process parameters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2010**, 37 : 129-138.
- Wang S.**, Lin X., Huang X., Zheng L et Zilda D.S. Screening et characterization of the alkaline protease isolated from PLI-1, a strain of *Brevibacillus sp.* collected from Indonesian hot springs. *J. Journal of ocean University of China.*, **2012**, 11(2): 213–218.
- Ward O.P.**, Rao M.B. et Kulkarni A. Proteases. In Schaechter, M. (Ed). *Encyclopedia of Microbiology*. Amsterdam: Elsevier., **2009**, 495-511.
- Warren A.** Diversité génétique et phénotypique des levures du raisin et du vin. Thèse de Doctorat en Œnologie Science de la Vie et de la Santé. Institut des sciences de la vigne et de vin. Université de Bordeaux. France., **2020**.
- Web 1** : <https://sites.crdp-aquitaine.fr/stl/files/2014/06/>, Date : 10/05/2021 ; Heur 11 :00.
- Web 2** : http://parasitoweb.free.fr/Cours_Parasito/mycologie/morphologie_levure.htm, Date : 16/05/2021 ; Heur 14 :20.
- Web 3** : <https://sante.lefigaro.fr/mieux-etre/nutrition-aliments/tomate/composition>, Date : 19 /09/2021 ; Heur 18 :30.
- Willaert R.G.** Yeast Biotechnology. Vrije Universiteit Brussel. *Fermentation.*, **2018**, 3(1) : 6.
- Wu T.Y.**, Mohammad A.W., Jahim Md. et Anuar N. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *J. Enzyme Microb Technol.*, **2006**. 39 : 1223–1229.

Références bibliographiques

Xiao A., et al. Statistical optimization for tannase production by *Aspergillus tubingensis* in solid-state fermentation using tea stalks. *Electron. J. Biotechnol.*, **2015**, 18: 143-147.

Xueliang Q., Juan Z., Jingwen Z., Zhen F., Zhengming Z., Jianghua L. et Guocheng D. Stress tolerance phenotype of industrial yeast : industrial cases, cellular changes, and improvement strategies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2019**, 103 : 6449–6462.

Younes B. Les protéases exocellulaires des levures indigènes de la baie de raisin et leur impact sur les protéines de moût. Un outil potentiel pour l'industrie et la fermentation appliqué à l'œnologie. Thèse de doctorat en Biochimie et biologie moléculaire. Université de Reims Champagne-Ardenne. **2012**.

Zemmouri S. et Zemouri N. Mise en évidence d'une protéase produite par une archée halophile extrême et essai de protéase brut comme ingrédient de détergent à lessive. Mémoire de Master en Biotechnologie microbienne, Université M'hamed Bougarra de Boumerdes, Algérie. **2017**.

Zuorro A., Roberto Lavecchia., Franco Medici et Luigi Piga. Enzyme-Assisted Production of Tomato Seed Oil Enriched with Lycopene from Tomato Pomace. *Food Bioproc Tech.*, **2013**, 6 : 3499–3509.

Soutenu le : 21 Septembre 2021

Présenté par :

CHAOUR Housna
YONES Khaoula

Encadré par :

Dr DAKHMOUCHE Scheherazed

Résumé :

Ces dernières années, l'intérêt pour l'utilisation de levures pour la production de protéases en culture solide s'est accru. Cette étude vise à la production de la protéase par la levure *Candida sp* en fermentation solide. Deux milieux ont été utilisés, les déchets de tomates et les déchets de tomates enrichis par l'extrait de levure, la peptone et l'amidon. La souche a produit 03 protéases actives à pH5, pH7 et pH9. Cependant, la production de la protéase neutre par fermentation solide sur les déchets de tomates enrichis est la plus importante (13.95×10^4 UI/g). L'étude des caractéristiques de la protéase de *Candida sp* a été aussi effectuée. Le pH optimum et la température optimale de l'enzyme sont de 7 et 60°C respectivement. Le traitement thermique de la protéase neutre a été étudié à 60 °C et à 100°C. Après 3 heures d'incubation, la protéase montre une activité résiduelle de 71% à 60°C et de 41 % à 100°C. Sa demi-vie est de 165 min à 100°C. L'effet des différents sels (FeSO_4 , NaCl, MgSO_4 , CaCl_2 , MnSO_2 , ZnSO_2) sur la protéase a montré que à part l'effet nulle de MgSO_4 sur l'activité, les autres sels semblent être des activateurs de la protéase avec des taux de 104.13%, 105.8%, 107.67%, 108.78% et 108,8 %. Parmi les détergents étudiés, seul le Tween 80 a amélioré la production de la protéase neutre alors que le SDS, l'EDTA et l'urée diminuent l'activité protéasique de *Candida sp*.

Mots clés: Protéase neutre, *Candida sp*, fermentation solide, déchets de tomates.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr NOUADRI T., MCA, Université des frères Mentouri, Constantine 1
Encadreur : Mme DAKHMOUCHE S. MCA, ENS Assia Djébar, Constantine.
Examinatrice : Mme BOUKHALFA H. MCB, Université des frères Mentouri, Constantine 1

Année Universitaire :

2020- 2021