



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

N^o d'ordre :

Série :

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et biotechnologie microbienne

Thème

Essai de valorisation du marc de café dans la culture des mycètes

Présenté et soutenu par

- GHEDJATI Alla
- ZATER Moncef
- DJEDJEH Badis

Le: 28/09/2020

Présidente

M^{me} ABDELAZIZ Ouided

MCB. Université des frères Mentouri 1, Constantine

Encadreur

M^{me} AMOKRANE Sérine

Maitre de recherche B, Centre de Recherche en Biotechnologie
(CRBt), Constantine

CO-encadreur

M^{me} KEROUM Fatima

Maitre de recherche B, Centre de Recherche en Biotechnologie
(CRBt), Constantine

Examineur

Mr BOULAHROUF Khaled

MCB. Université des frères Mentouri 1, Constantine

Année universitaire

2019 - 2020

Remerciement

*Après avoir remercié **Allah**, le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force, l'intelligence et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

Nous tenons à remercier vivement nos parents pour tous leurs sacrifices qu'ils ont fait pour nous. Ainsi tous ceux qui de près ou de loin ont participé à la rédaction de ce document.

Il s'agit plus particulièrement de :

*Notre encadreur Madame **AMOKRANE Serine**, pour sa disponibilité, pour les précieuses informations qu'elle nous a prodiguées avec intérêt et compréhension, sa rigueur scientifique, son sens d'écoute et d'échange, son encouragement sa confiance en nous.*

*Je remercie sincèrement Madame **KEROUM Fatima**, Co Encadreur de ce travail pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer, nous dis merci.*

*Mme **ABDELAZIZ Ouided** qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider le jury, et d'apporter son jugement sur ce travail.*

*Mr **BOULAHROUF Khaled** d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce mémoire.*

Nous exprimons nos reconnaissances à toute personne ayant contribué à sa réalisation.

Tous ceux qui nous ont aidés par la moindre des choses de près ou de loin.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux.

A ma mère **Roukia ASSIFER** qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau.

A mon cher papa **Abderraouf** qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

A mes sœurs **Roufida ,Tesnime** et mon frère **Taha** que dieu vous garde et vous protège, que votre chemin soit plein succès.

A ma **grand-mère** et **grand-père**

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

GHEDJATI Alla

Dédicace

Je dédie ce travail a mes **chers parents** et tous qui m'ont toujours poussée et motivé dans mes etudes pendant toute ma carrière universitaire sans eux je n'aurais certainement pas fait ces etudes langues.

C'est un moment de plaisir pour dédier aussi ce travail a mes mes amis **oumeziane mounir , seghiri seif eddine ...**

Et tous mes camarades de notre promotion

" Biotechnologie microbienne " et la promotion du **" Biotechnologie fongique "**

Et finalement , sans oublier mes chers tante **Hachemi madiha** et **Hachemi zoubida** qui m'ont trop aider dans mes recherches de cette memoire du fin d'études .

ZATER Moncef

Dédicace

Je dédie mon travail à mon père –ma mère et mon frère Hassouna
Pour leur croyance en mes capacités et tous leurs sacrifices
tout au long de mes études

À l'âme de mon grand-père, dont j'ai beaucoup appris, ainsi que les
encouragements de mon cousin et de tous les membres de ma famille
À mes amis Lina et Manal, qui ont joué le rôle central dans ma réussite
au lycée, en particulier Malak, et à ce jour, merci.

À l'ami que j'ai rencontré le premier jour à l'université, Abdel-Wadoud,
et notre compagnon Rania. Nous avons partagé la vision et les objectifs,
ainsi que la conviction. Vous avez grandement influencé ma réussite
universitaire, merci.

Tous mes camarades en licence à l'université ; spécialité biotechnologie
microbienne Dida,Oumnia ,khawla , Nouha... j'ai découvert avec eux et
beaucoup appris pendant les cours et en dehors, j'ai fait exploser mes
capacités et je me suis découvert davantage.

À la chose la plus étonnante qui m'est arrivée dans mes études
universitaires, qui sont des amis de la vie, charafeddin, ma source
d'inspiration, qui m'a toujours encouragé. mouhamed amin notre grand
frère et fares le meilleur endroit pour soulager.

moncef Avec lui les jours difficiles restent un doux souvenir et toujours
abed al wadoud Mon partenaire d'idées dont j'ai beaucoup appris
À Alla et Nariman et sara , vous avez eu raison de m'aider et vous avez
participé à la réussite de mes études de master universitaire, en
particulier Alla, qui a tenu compte de ma situation lors de la préparation
de notre mémoire de fin d'études, et elle a été créditée

Pour notre professeur respecté **AMOKRENE Serine**, nous n'avons pas
eu la chance d'en savoir plus à cause de l'épidémie de Corona, mais nous
avons beaucoup appris

DJIDHEH Badis

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	01
<u>Première partie : Revue Bibliographique</u>	
<u>Chapitre I : Le marc du café, caractéristiques et valorisation</u>	
1. Définition.....	04
2. Les caractéristiques chimiques du marc de café.....	04
2.1.Les glucides.....	04
2.2.Les protéines.....	04
2.3.Les lipides.....	05
2.4.Les minéraux.....	05
2.5.Les composés secondaires.....	05
3. Les caractéristiques physiques du marc du café.....	06
4. Valorisation du marc de café.....	06
5. Le marc du café obtenu par la méthode expresso.....	07
<u>Chapitre II : Les mycètes et les espèces: <i>Fusarium oxysporum</i>, <i>Ascochyta pisi</i>, <i>Ascochyta lentis</i> et <i>Trichoderma sp.</i></u>	
1. Généralité sur les mycètes.....	09
2. <i>Fusarium oxysporum</i>	09
2.1.Définition.....	09
2.2.Classification.....	09
2.3.Mode de vie, habitat et reproduction.....	10
3. <i>Ascochyta pisi</i> et <i>Ascochyta lentis</i>	12
3.1.Définition.....	12
3.2.Classification.....	12
3.3.Mode de vie, habitat et reproduction.....	12
4. <i>Trichoderma sp.</i>	14
4.1..Définition.....	14
4.2.Classification.....	15
4.3.Mode de vie, habitat et reproduction.....	15
<u>Chapitre III : Les enzymes d'origine fongiques ; les cellulases, les α-amylases et les protéases</u>	
1. La cellulase.....	17
1.1.Structure et mode d'action.....	17
1.2.Les applications industrielles.....	18
1.3.La cellulase d'origine fongique.....	18
2. L'alpha amylase.....	20
2.1.Structure et mode action.....	20
2.2.Les applications industrielles.....	21
2.3.L'alpha amylase d'origine fongique.....	22
3. Les Protéases.....	24

3.1. Structure et mode d'action.....	24
3.2. Applications industrielles.....	24
3.3. Les protéases d'origine fongique.....	25

Deuxième partie : Matériel et Méthodes

1. Echantillonnage.....	27
2. Préparation du marc de café.....	27
3. Evaluation du potentiel chimique du marc de café.....	28
3.1. Détermination de la teneur en humidité.....	28
3.2. Détermination de la teneur en cendre et en matière organique.....	29
3.3. Détermination de la teneur en matière grasse (MG).....	30
4. Analyse phytochimique des échantillons.....	31
4.1. Préparation de l'extrait brut du marc de café par macération (solide-liquide).....	31
4.2. Détermination de taux des flavonoïdes.....	32
4.3. Détermination de taux des phénols totaux.....	33
5. Essai de production des enzymes dans un milieu ordinaire (PDA).....	34
5.1. Rappel.....	34
5.2. Revivification des mycètes.....	35
5.3. Identification micro et macroscopique des souches fongiques.....	36
5.3.1. L'aspect macroscopique.....	37
5.3.2. L'aspect microscopique.....	37
5.4. Screening des souches productrices d'enzymes.....	37
5.4.1. Détermination de l'activité amylolytique des souches fongiques.....	37
5.4.2. Détermination de l'activité cellulolytique des souches fongiques.....	38
5.4.3. Détermination de l'activité protéolytique des souches fongiques.....	39
6. Optimisation de la production des enzymes dans des milieux de fermentation liquide à base de trois substrats, effet du pH et de la température.....	41
6.1. Préparation des milieux de fermentation.....	41
6.2. Effet du pH initial.....	41
6.3. Effet de la température.....	41

Troisième partie : Résultats et Discussion

1. Evaluation du potentiel chimique du marc de café.....	43
1.1. Détermination de la teneur en humidité.....	43
1.2. Détermination de la teneur en matière minérale.....	43
1.3. Détermination de la Teneur en matière grasse (MG).....	44
1.4. Détermination du taux des flavonoïdes et des phénols totaux.....	44
2. Essai de production des trois enzymes sur Gélose PDA.....	45
2.1. Identification macroscopique et microscopique des souches.....	45
2.1.1. Identification macroscopique.....	45
2.1.2. Identification microscopique.....	46
2.2. Mise en évidence des activités enzymatiques sur gélose PDA.....	47
2.2.1. Mise en évidence de l'activité amylolytique.....	48
2.2.2. Mise en évidence de l'activité cellulolytique.....	50
2.2.3. Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	50
3. Optimisation de la production des enzymes sur milieu liquide.....	50
3.1. Sélection des souches microbiennes productrices de l'enzyme amylase.....	50

3.2. Paramètres influençant la production de l'amylase.....	51
3.2.1. Effet du pH.....	51
3.2.2. Effet de la température.....//.....	51
Conclusion générale	54
Références bibliographiques	56
Annexes	
Résumé	
Abstract	
ملخص	

Liste Des Figures

Figure 01.	Marc du café.....	04
Figure 02.	Images de microscopie électronique à balayage de marc de café	06
Figure 03.	La technique d`extraction espresso.....	08
Figure 04.	Distribution du <i>Fusarium oxysporum</i> dans le globe.....	10
Figure 05.	<i>Fusarium oxysporum</i>	11
Figure 06.	<i>Ascochyta pisi</i>	13
Figure 07.	<i>Trichoderma sp</i>	16
Figure 08.	Structure 3D de la cellulase.....	17
Figure 09.	Action de l'enzyme cellulase.....	18
Figure 10.	Modèle tridimensionnel de la structure de l' α -amylase. («Alpha Amylase»).....	21
Figure 11.	La composition et les différents liens d'une dextrine qui peuvent être hydrolysés par les diverses enzymes.....	22
Figure 12.	Préparation du café.....	27
Figure 13.	Préparation du marc de café.....	27
Figure 14.	Détermination de la matière sèche.....	28
Figure 15.	Détermination de la matière organique.....	29
Figure 16.	Détermination de la matière grasse.	30
Figure 17.	Le procédé d`extraction par macération (liquide-solide).....	31
Figure 18.	Schéma simplifié des étapes d`obtention des extraits bruts de marc du café.....	32
Figure 19.	La quantification des flavonoïdes.....	33
Figure 20.	Schéma simplifié des étapes de la technique de révifcation des mycètes.....	35
Figure 21.	Coloration par bleu de méthylène et l`observation microscopique....	37
Figure 22.	La préparation de milieu à base d`amidon.....	38
Figure 23.	la préparation de milieu à base de la cellulose.....	38
Figure 24.	La préparation de milieu à base de la gélatine.....	39
Figure 25.	La technique de screening.....	40
Figure 26.	Préparation des milieux liquide de fermentation	42
Figure 27.	Teneurs en phénols totaux (ug GAE/mg) et en flavonoïdes (ug Quercetine/ mg) du marc de café.....	45

Liste Des Tableaux

Tableau 01.	Composition chimique de marc du café.....	06
Tableau 02.	La position taxonomique de <i>Fusarium oxysporum</i>	10
Tableau 03.	La position taxonomique d' <i>Ascochyta pisi</i>	12
Tableau 04.	La position taxonomique actuelle des <i>Trichoderma sp</i>	15
Tableau 05.	Applications des cellulases dans diverses industries.....	19
Tableau 06.	Microorganismes ayant des capacités cellulolytiques.....	20
Tableau 07.	Les applications des amylases dans diverses industries.....	23
Tableau 08.	Les applications des protéases dans diverses industries.....	24
Tableau 09.	Exemples des protéases fongiques.....	26
Tableau 10.	Photographie des souches utilisées.....	36
Tableau 11.	Le taux d'humidité, les teneurs en minéraux et en matières grasses du marc du café (% MS).....	43
Tableau 12.	Caractères macroscopiques des souches sur milieu.....	46
Tableau 13.	Caractères microscopiques des souches testées.....	47
Tableau 14.	Diamètre (mm) des zones d'hydrolyse.....	48
Tableau 15.	Zones d'hydrolyses des souches testées après 7 jours incubation à 25° C.....	49
Tableau 16.	Production de l'amylase par les deux souches dans les pH 4, 5, 6, 7 et 8 à 25° C.....	52
Tableau 17.	Production d'amylase par les deux souches dans les températures 25, 30 ,35 ,40 et 45°C.....	53

Liste des abréviations

FOSC	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex
MG	Matière grasse
MM	Matière minérale
MS	Matière sèche
MO	Matière organique
Abs	Absorbance
µg	Microgramme
µl	Microlitres
PT	Phénols totaux
FT	Flavonoïdes totaux
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
°C	Degré Celsius

INTRODUCTION GENERALE



Aujourd'hui le café est devenu une richesse économique majeure et présente la première denrée agricole échangée en volume, et la deuxième matière première commercialisée dans le monde après le pétrole. Sa production mondiale annuelle est en augmentation continue, elle dépasse 8 millions de tonnes par an (Haddoudi *et al.*, 2014). Près de 50% du café produit dans le monde est destiné à la préparation du café moulu, ce qui génère par sa consommation des quantités importantes d'un résidu solide qu'on appelle **marc de café**. Ce dernier est généralement évacué vers les décharges avec des conséquences environnementales et économiques non négligeables.

Au cours des dernières décennies, la prise de conscience croissante de la nécessité de réduire les déchets en vue de protéger l'environnement a stimulé la recherche de méthodes de valorisation du marc de café en différents domaines, son usage directe en compostage, son utilisation dans la production d'énergie sous forme d'agropellets par combustion, ainsi que son utilisation comme source convertible en biodiesel et en bioéthanol ont été proposés (Campos-véga *et al.*, 2015). Des travaux ont été développés également dans le domaine de la technologie de fermentation utilisant le marc de café comme un substrat carbonique. Le marc du café a probablement favorisé la **croissance des souche fongique** en raison de sa teneur élevée en protéines et en humidité, facteurs qui affectent le développement des micro-organismes (Mussatto *et al.*, 2011).

Le présent travail présente le marc du café comme une alternative économique et écologique en vue de son utilisation comme un milieu de base pour la production des enzymes à intérêt industriel par les mycètes. Parmi les enzymes d'intérêt industriel, nous avons les cellulases où elles représentent environ 20 % du marché mondial des enzymes, et la plupart sont produites par les moisissures du genre *Trichoderma et Aspergillus*, les protéases représentant près de 60% du marché mondiale et les amylases. Ces derniers sont produits généralement par des champignons mésophiles comme *Aspergillus, Penicillium et Rhizopus* (Tiwari *et al.*, 2015).

De ce fait, l'objectif de notre travail de recherche s'insère dans cette préoccupation, il consiste à valoriser l'un des résidus de la production instantané de la boisson du café, étant le marc de café comme un substrat de fermentation pour la production de la cellulase, l'amylase

et le protéase par les moisissures : *Trichoderma sp*, *Fusarium oxysporum*, *Ascochyta lentis* et *Ascochyta pisi*.

Dans le but de déterminer l'aptitude de ces souches à fermenter le marc du café pour produire les enzymes recherchées, et pour définir les souches performantes et les conditions optimales de telle production, nous avons suivi l'échéancier suivant :

- ✓ Obtention du marc de café à partir d'un café composé de 20% Arabica et 80% Robusta auprès d'un café public en utilisant la méthode « Espresso » ;
- ✓ Caractérisation chimique du marc de café obtenu via la détermination de sa composition pariétale et cytoplasmique ;
- ✓ Revivification des souches déjà isolées, identifiées et conservées par lyophilisation, congélation et réfrigération ;
- ✓ Re-identification de souches microscopiquement et macroscopiquement ;
- ✓ Test de la production des enzymes (cellulase, amylase et protéase) sur gélose PDA ordinaire contenant les substrats inducteurs de la production des enzymes suscitées, La cellulose, l'amidon et la gélatine, respectivement ;
- ✓ Test de production des enzymes dans un milieu liquide ordinaire en présence toujours des substrats inducteurs ;
- ✓ Etude de l'effet de la température et du pH sur lesdites activités ;
- ✓ Test de production des trois enzymes dans un milieu fermentaire à base du marc de café ;
- ✓ Optimisation de la composition du milieu de fermentation en fonction de la composition chimique détaillée du marc de café ;
- ✓ Optimisation de la production de chaque enzyme en différents paramètres de température et de pH

Notre manuscrit est subdivisé en trois parties fondamentales, une partie bibliographique dont nous avons mis en lumière le marc du café, sa composition, ses caractéristiques et sa valorisation. Une présentation très abrégée des mycètes utilisées et des enzymes testées est également exposée dans deux chapitres séparés.

Deuxièmement, une partie expérimentale est déroulée comme mentionnée en ci-dessus. La troisième et dernière partie du travail apporte les différents résultats obtenus et discutés séparément.

Il paraît très intéressant à noter que pour des raisons échappant à la volonté relatives à la pandémie du coronavirus et aux exigences de confinement imposées par les hautes instances, nous n'avons pas pu accomplir plusieurs tests à l'instar de la détermination de la teneur du marc de café en protéines, en sucres, en fibres, en différents minéraux et en composants secondaires (tanins et saponines), test de production des enzymes dans un milieu fermentaire à base du marc de café, la détermination des conditions culturales optimales et finalement analyse de l'influence de différents composants primaires et secondaires sur les activités enzymatiques. Ces travaux vont être accomplis dès que le retour aux conditions de la vie quotidienne soit autorisé.

Première partie

Revue bibliographique



Chapitre I : Le marc du café, caractéristiques et valorisation

1. Définition

Le café est l'une des boissons les plus consommées au monde (Mussatto et al., 2011 b). Le marc de café est un résidu avec une granulométrie fine, une humidité élevée, une charge organique et une acidité obtenues lors du traitement du café brut poudre avec de l'eau chaude ou de la vapeur pour une préparation de café instantanée. Près de 50% de la production mondiale de café est transformée pour la réparation du café soluble. Par conséquent, le marc du café (figure 01) est généré en grandes quantités, avec une production annuelle mondiale de 6 millions de tonnes (Mussatto et al., 2011).



Figure 01: marc du café

2. Les caractéristiques chimiques du marc de café

2.1. Les glucides

Les glucides sont les principaux macronutriments trouvés dans le marc du café présentant environ 60 % du poids sec (Jiménez-Zamora et al., 2015 ; Campos-Vega et al., 2015). Il est riche en sucres polymérisés en structures cellulosiques et hémicellulosiques, qui correspondent à près de la moitié (45%, p / p). Ainsi que des glucides simples tels que 19% du glucose, 3,8% de l'arabinose, et 30,4% du galactose (Esquivel et Jiménez, 2012). Le marc de café contient également 46,8% du mannane qui lui confère une viscosité élevée (Campos-Vega et al., 2015).

2.2. Les protéines

Les protéines sont le deuxième macronutriment trouvé dans le marc du café (Ma et al., 2013). Elles varient de 13,6 à 17% (Dean R et al., 2012).

Le marc du café est une source des acides aminés essentiels et non essentiels, tels que la leucine, la phénylalanine, la valine, l'isoleucine, l'arginine, cystéine, glutamine, histidine, l'acide aspartique, la lysine, le phénylalanine, la sérine et la thréonine. Les acides aminés essentiels représentent environ 49% de la totalité des acides aminés dans le marc du café (Campos-Vega et *al.*, 2015).

2.3.Les lipides

La teneur des lipides dans le marc du café varie de 10 à 15% (tableau 01) (Jenkins et *al.*, 2014). Les études sur les différentes méthodes de préparation de la boisson du café ont montré que les lipides restent majoritairement dans le marc du café correspondant à 84,4% de triacylglycérols, 12,3% d'esters d'alcools diterpéniques, 1,9% de stérols, 1,3% de matières polaires et 0,1% d'esters de stérol(Campos-Vega et *al.*, 2015).

2.4.Les minéraux

Le marc du café ne conserve que 39% des minéraux car la plupart sont facilement extraits à l'eau chaude pendant la préparation instantanée du café (García-Gutiérrez et *al.*,2017). Il contient des minéraux tels que K, Mg, P, Ca, Na, Fe, Mn et Cu. La concentration totale de cendres dans le marc du café varie de 0,82 à 2,08% (Pitt et *al.*, 1997). Le potassium (K) et le calcium (Ca) sont les minéraux les plus abondants suivis du magnésium (Mg) (Campos-Vega et *al.*, 2015).

2.5.Les composés secondaires

Le marc de café contient également d'autres éléments d'intérêt, tels que des antioxydants. Plusieurs tanins sont présents dans le marc de café, parmi eux, la catéchine, la gallocatéchine, la gallocatéchine galate et l'acide chébulique. La catéchine est un antioxydant puissant qui possède une action complémentaire à la vitamine C (Low et *al.*,2015). Les tanins ne sont pas les seuls antioxydants présents dans le marc de café. En effet, d'autres polyphénols sont présents ainsi que de la caféine. Parmi ces polyphénols, les principaux sont les flavonoïdes, l'acide protocatéchuïque et l'acide chlorogénique. Ce sont les acides chlorogéniques qui sont retrouvés en plus grande abondance (1,31 mg/g MC), celui-ci étant plus important dans le marc de café arabica que dans le marc de café robusta (Carassou, 2015).

Tableau 01 : composition chimique de marc du café (Janissen et Huynh, 2018)

composants	Protéines (%)	Glucides (%)	Lipides (%)	Fibre total (%)	Caféine (%)
Quantité	13.6	82	6 g	60.5	0.4

3. Les caractéristiques physiques du marc du café

Le diamètre des grains de marc de café séchés varie entre 50 et 100 μm pour le marc de café commercial. Cependant, ce diamètre augmente avec le taux d'humidité (Carassou, 2015). Le marc du café possède de bonnes propriétés fonctionnelles nécessaires à la transformation et au stockage des aliments. La plus petite taille des particules et la densité de tassement élevée du marc du café sont associées à sa haute capacité de rétention d'eau et/ou d'huile, (Salazar-López et *al.*, 2020).

La torréfaction des grains de café fait en sorte que leur couleur change progressivement du gris vert au brun, au brun foncé et au noir, en fonction du degré de torréfaction. Dans les opérations de torréfaction à petite échelle, la couleur des grains est évaluée visuellement par échantillonnage périodique (Xiuju et Loonge-Tak, 2015)

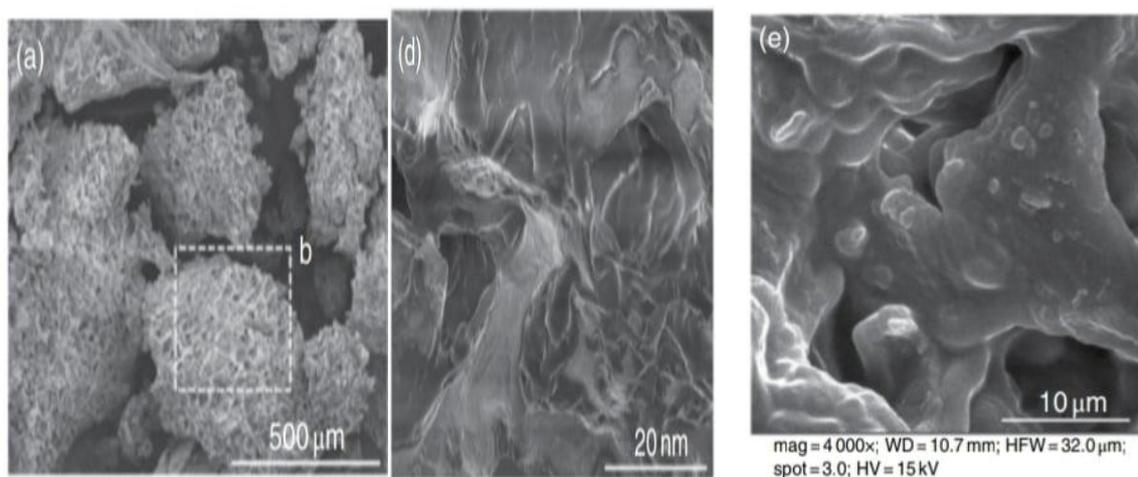


Figure 02 : images de microscopie électronique à balayage de marc de café (a - d) montrant la vue d'ensemble et la morphologie locale des grains de café ; e) marc de café séché (Salazar-López et *al.*, 2020).

4. Valorisation du marc de café

Le marc du café est utilisé comme combustible dans les chaudières industrielles de la même industrie en raison de son pouvoir calorifique élevé d'environ 5000 kcal / kg, comparable à d'autres résidus agro-industriels (Silva et *al.*, 1998). La possibilité de son

utilisation comme alimentation animale pour les ruminants, les porcs, les poulets et les lapins a déjà été vérifiée, mais la teneur élevée en lignine ($\approx 25\%$) de ce matériau a été considérée comme un facteur limitant pour son application. (Mussatto et *al.*, 2011). Le marc du café peut être utilisé comme source potentielle pour produire du biodiesel et des pastilles de carburant, entre autres produits à valeur ajoutée, comme l' H_2 et l'éthanol (Campos-véga et *al.*, 2015).

L'huile du marc de café est le composant le plus précieux du point de vue économique et facilement extractible. Elle est une source potentielle de matière première à faible coût et de bonne qualité pour la production d'esters méthyliques et d'acides gras par transestérification directe (Mussatto et *al.*, 2011). En ce sens, la faisabilité d'utiliser des procédés d'extraction par fluide supercritique pour obtenir la fraction lipidique du marc de café a également été évaluée (Mussatto et *al.*, 2011). La qualité de l'huile peut être améliorée pour une utilisation dans des applications cosmétiques et pharmaceutiques ou comme source d'autres produits de valeur tels que la caféine, les stérols, les terpènes et les tocophérols par fractionnement similaire à ceux utilisés pour l'huile de café vert (Azevedo et *al.*, 2008).

Néanmoins, peu de travaux ont été développés dans le domaine de la technologie de fermentation utilisant le marc de café comme substrat. Leifa et *al.* (2001) ont étudié la production de *Flammulina velutipes* sur le marc de café. Ils ont confirmé la possibilité d'utiliser ce résidu comme substrat sans aucune supplémentation nutritionnelle pour la culture de champignons comestibles dans des conditions de fermentation à l'état solide. Le marc a probablement favorisé la croissance de cette souche de champignon en raison de sa teneur élevée en protéines et en humidité, facteurs qui affectent le développement des micro-organismes (Mussatto et *al.*, 2011). Murthy et Naidu. (2010a) ont évalué l'efficacité de plusieurs sous-produits du café comme seule source de carbone, parmi lesquels le marc de café des variétés Arabica et Robusta pour la production de xylanase à partir de *Penicillium sp.* Malgré la faible production de xylanase, il s'est avéré être un bon substrat pour soutenir la croissance fongique.

Le marc de café peut être également utilisé comme répulsif anti-fourmis, comme exfoliant pour la peau (pour le visage et le corps) et comme un colorant naturel (Consoglobe, 2013).

5. Le marc du café obtenu par la méthode espresso

Le potentiel du marc de café espresso a été caractérisé en tant qu'une source importante de composés bioactifs par rapport à ceux d'autres méthodes de préparation du café soluble (décoction Cona, gravimétrie...etc)(Marcone, 2006). L'espresso est une infusion obtenue par

percolation d'eau chaude sous pression à travers du café moulu torréfié (Marcone, 2006). L'eau était chauffée jusqu'à son point d'ébullition dans une cuve scellée, de sorte que la vapeur en équilibre créait une pression, accélérant l'extraction des composants et des arômes (Marcone, 2006).

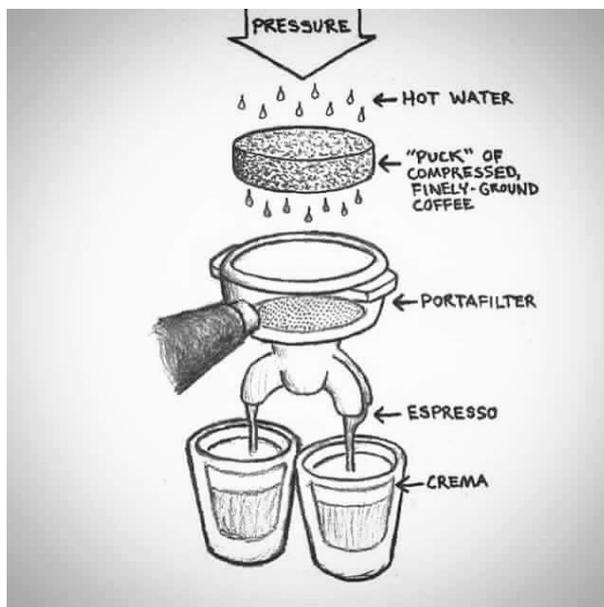


Figure 03: la technique d'extraction espresso

Chapitre II : Les mycètes et les espèces : *Fusarium oxysporum*, *Ascochyta pisi*, *Ascochyta lentis* et *Trichoderma sp.*

1. Généralité sur les mycètes

Les moisissures sont largement répandues dans la nature et sont communément observées sur le pain rassis, le fromage ou les fruits. Elles constituent avec les levures les deux groupes de champignons microscopiques ou mycètes. Ce sont des champignons pluricellulaires (filamenteux), alors que les levures sont des champignons unicellulaires (Madigan et Martinko, 2007).

2. *Fusarium oxysporum*

2.1.Définition

Fusarium oxysporum est l'un des espèces les plus importants du genre *Fusarium* à cause de ses activités phytopathogènes. C'est un agent pathogène du sol ayant une capacité enzymatique de synthétiser une grande variété de métabolites secondaires sous forme de mycotoxines (nivalenol, fusarenone X, Sambutoxine...etc.). Ces derniers étant associées à la pathogénèse fongique et à la contamination des aliments (Ma et al., 2013). Nombreuses variétés de plante sont envahies à l'instar du concombre, courgette, topinambour, piment, pomme de terre, patates douces et tomates. Dans une récente enquête menée auprès de la communauté internationale des pathologistes fongiques, en fonction de son importance scientifique et économique, *Fusarium oxysporum* a été classé cinquième dans une liste des 10 pathogènes fongique des plantes (Janissen et Huynh, 2018). *Fusarium oxysporum* est un producteur d'enzymes cellulolytiques, et peut donc être utilisé dans des procédés biotechnologiques pour obtenir ces enzymes ou pour produire du glucose. La bagasse de canne à sucre était efficace pour induire *Fusarium oxysporum* à produire les enzymes cellulases. Le plus haut niveau de production d'enzyme a été observé à 55 jours de fermentation à une température constante de 28 °C à pH 5,96

2.2.Classification

Le système SACCARADO de classification des champignons imparfaits "fungi imperfecti" (henni, 1998) classe *Fusarium oxysporum* comme suit (tableau 02) :

Tableau 02 : la position taxonomique de *Fusarium oxysporum*

Embranchement	Thallophyte
Classe	Deutéromycètes
Ordre	Monodiales
Famille	Tuberculariacées
Genre	<i>Fusarium</i>
Espèce	<i>Oxysporum</i>

2.3.Mode de vie, habitat et reproduction

Les membres du FO SC (*Fusarium oxysporum* souches complexes) sont omniprésents dans le sol et ont été trouvés dans divers écosystèmes, y compris les prairies, les forêts et les déserts (allant des tropiques à l'Arctique) (figure 04). Bien qu'ils soient communément appelés phytopathogènes, ils peuvent survivre sous forme de saprophytes ou d'endophytes colonisant les plantes asymptomatiques, et la plupart des isolats sont présumés non pathogènes (Seogchan Kang et al., 2014)

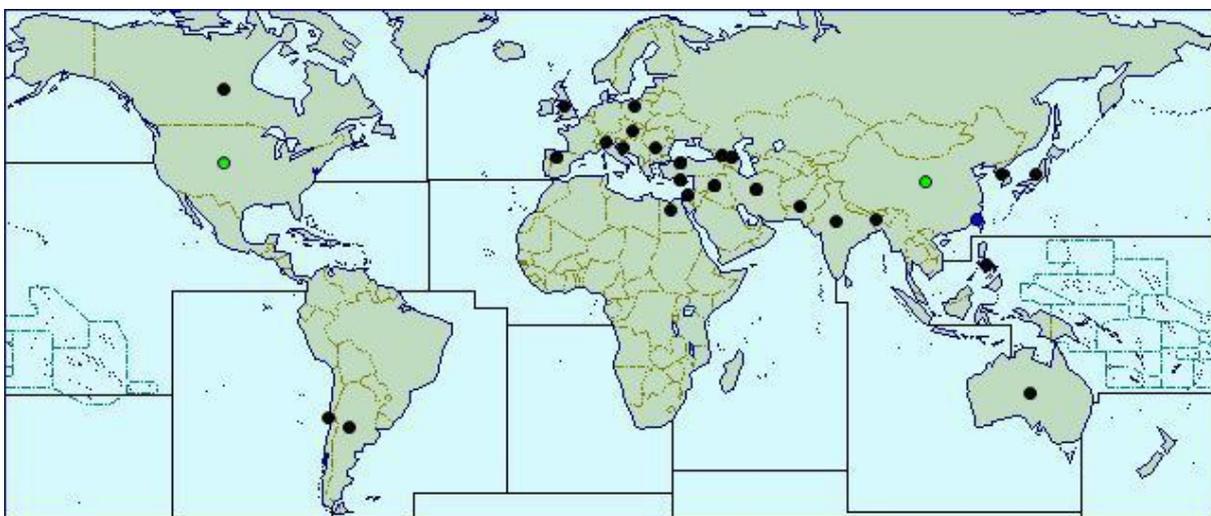


Figure 04 : distribution du *Fusarium oxysporum* dans le globe
(cabi.org)

F. oxysporum a un cycle de vie complexe qui pourrait être divisé en deux phases, une vie parasitaire sur son hôte spécifique et une croissance saprophyte sur les tissus morts. La phase saprophyte commence lorsque les tissus infectés de la plante commence à mourir (Seogchan Kang et al., 2014). Sa température de croissance oscille entre 25 et 30 °C. Sa reproduction est

généralement considéré comme asexué. Pour cela, trois types de spores asexuées sont produits : les microconidies, les macroconidies et les chlamydozspores (figure 05).

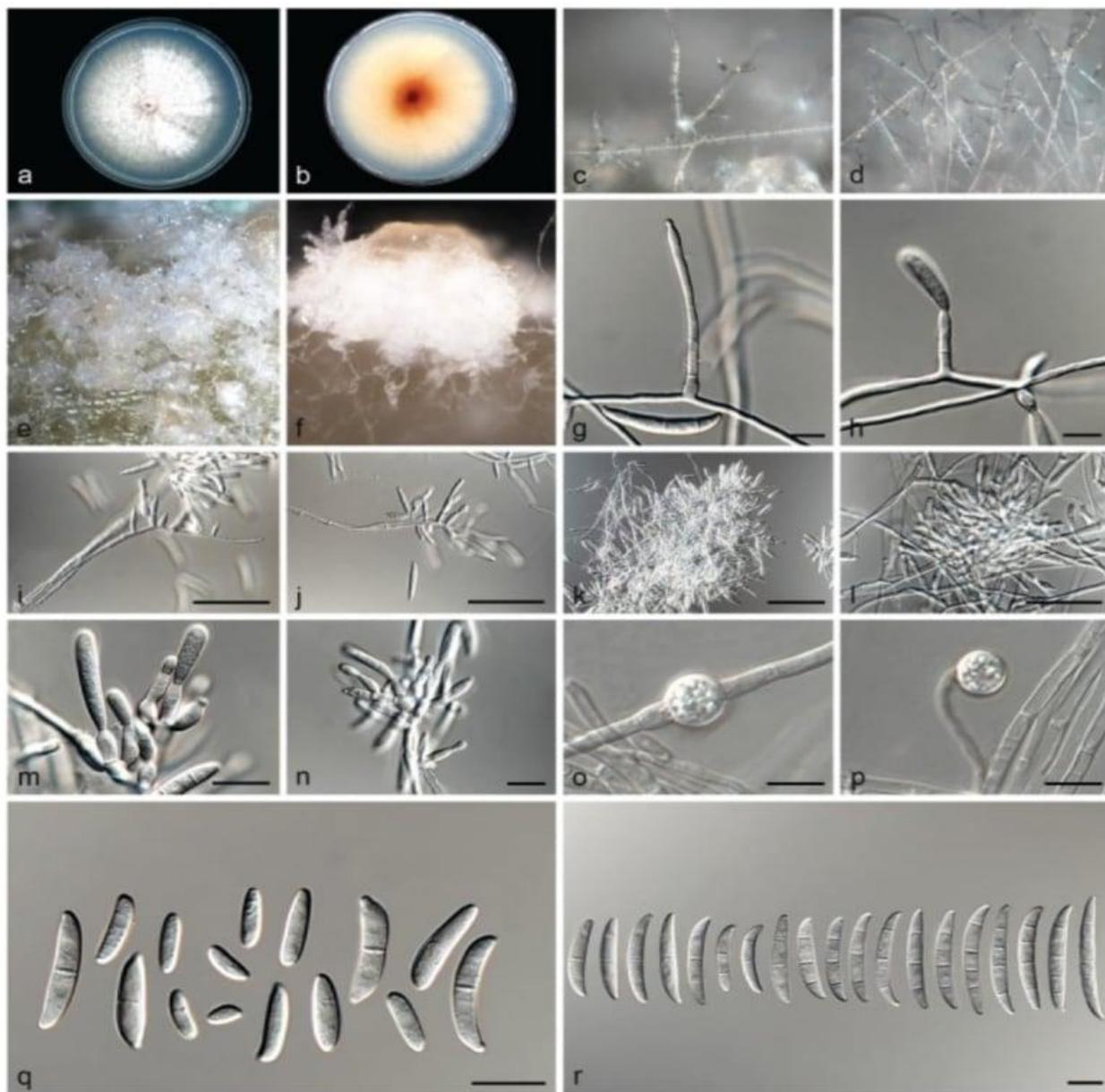


Figure 05 : *Fusarium oxysporum*

a-b : colonie sur PDA ; a : surface de la colonie sur PDA après 7 j à 24 ° C sous lumière blanche continue; b : revers de la colonie sur PDA; c-d : conidiophores à la surface de la feuille d'œillet ; e-f : sporodochies sur les feuilles d'œillet ; g-j : conidiophores et phialides sur mycélium aérien; k-n : sporodochies et conidiophores sporodochiaux; o-p: chlamydozspores; q : conidies aériennes (microconidies);r : conidies sporodochiales (macroconidies).

Barres d'échelle: g-h, m-r = 10 µm; i-l = 50 µm. 26) , (salazar-lópez et *al.*, 2020)

3. *Ascochyta pisi* et *Ascochyta lentis*

3.1. Définition

Ascochyta est un genre de champignons ascomycètes, contenant plusieurs espèces pathogènes pour les plantes, en particulier les cultures céréalières. *Ascochyta pisi* est un phytopathogène fongique qui provoque la brûlure ascochytique sur le pois, provoquant des lésions des tiges, des feuilles et des gousses. Ces mêmes symptômes peuvent également être causés par les pinodes d'*Ascochyta*, et les deux champignons ne sont pas faciles à distinguer.

L'ascochitine, un méthide o-quinone, a été découverte pour la première fois dans des extraits de culture d'*A. Pisi*. Récemment, de l'ascochitine a été trouvée dans des extraits de culture de nombreuses espèces *Ascochyta* et *Ascochyta* infectant la vesce sauvage, y compris *A. viciae-villosae*. Ce qui suggère que la production d'ascochitine est ancestrale aux espèces *Ascochyta* associées aux légumineuses.

Ascochyta lentis est décrit pour la première fois infectant le pois de graminées en Italie. Ce champignon provoque des lésions nécrotiques sur les feuilles et les tiges ces plant (Infantino et al., 2016).

3.2. Classification

La classification d'*Ascochyta pisi* est comme suit (tableau 03) :

Tableau 03 : la position taxonomique d'*Ascochyta pisi* et d'*Ascochyta lentis*

Embranchement	Ascomycota
Classe	Dothidéomycètes
Ordre	Pléosporales
Famille	Didymellacées
Genre	<i>Ascochyta</i>
Espèce 01	<i>A. pisi</i>
Espèce 02	<i>A. lentis</i>

3.3. Mode de vie, habitat et reproduction

Ascochyta pisi survit difficilement dans le sol ou sur les résidus de culture, en raison de sa faible activité saprophyte et de la rareté des chlamydospores. L'infection primaire est purement transmise par les semences. Les conidies et autres structures fongiques sont

transmises sur la face externe de la semence, provoquant l'infection primaire. Les conidies germent et infectent par l'intermédiaire des stomates ou directement par la cuticule. Des pycnides se forment sur les lésions, produisant des masses rouge-orangé de conidies à deux cellules. L'infection secondaire s'effectue par dispersion de ces conidies (figure 06).

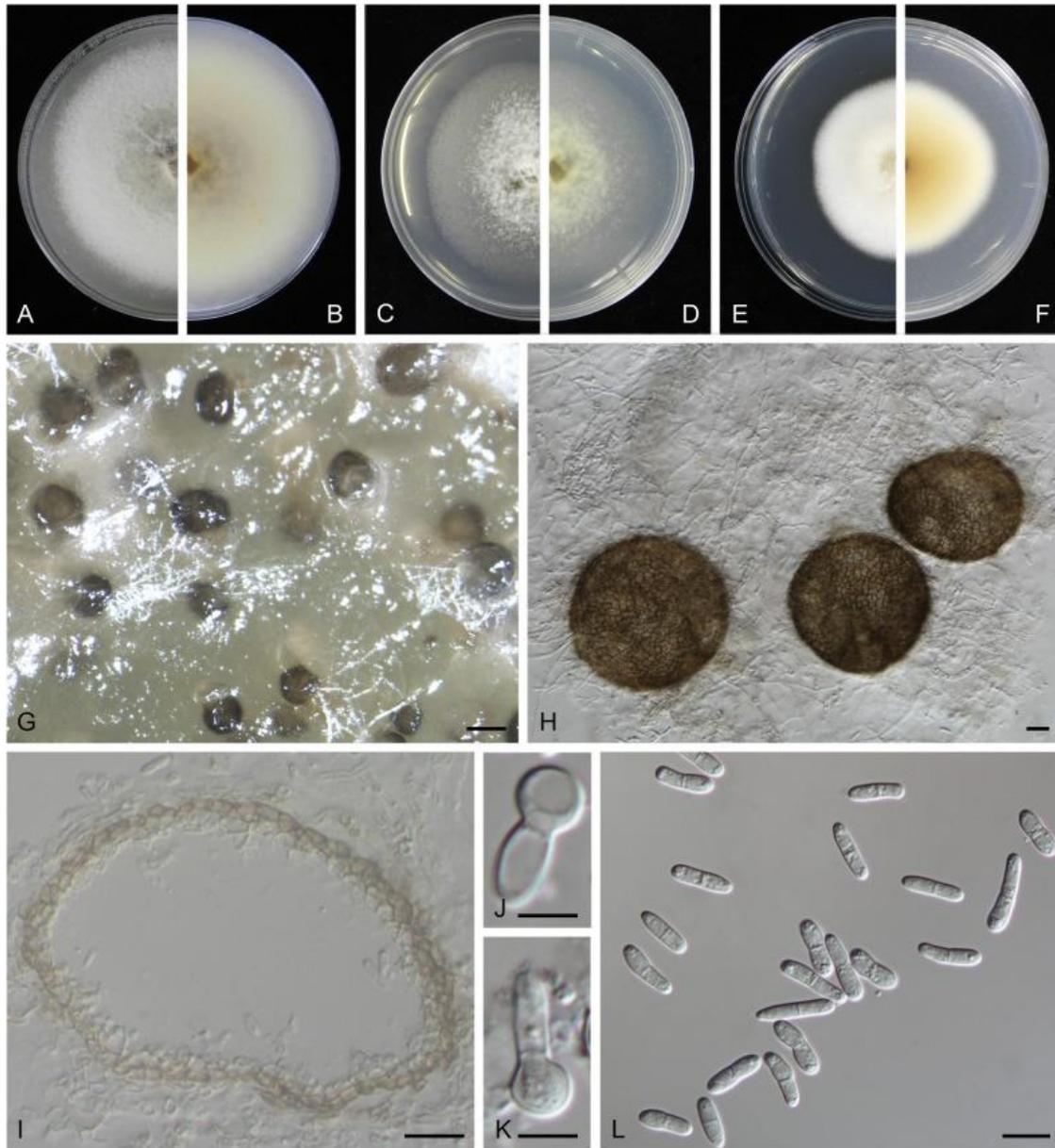


Figure 06 : *Ascochyta pisi* (CBS 122785).

A–B: colonie sur OA (front et reverse). C–D: colonie sur MEA (front et reverse). E–F: colonie sur (front et reverse). G : Pycnides se formant sur OA. H: Pycnides. I : Section de pycnidium. J–K : Cellules conidiogènes. L : Conidie. Barres d'échelle: G= 200 μm ; H–I= 20 μm ; J–K = 5 μm ; L= 10 μm .

Les champignons du genre *Ascochyta* se développent mieux à des températures inférieures à 20 °C. L'eau est nécessaire à la dispersion des spores. *Ascochyta blight*, causée par *Ascochyta lentis*, est une maladie grave des lentilles et peut limiter la production de lentilles en Australie. L'agent pathogène nécessite des conditions de croissance fraîches et humides, il est répandu dans la plupart des régions de culture de lentilles du monde. Il est présent dans divers pays ; en Australie, en Asie, en Europe, en Afrique du nord Ainsi l'Amérique du sud (Avila et al. 2004).

Sa reproduction asexuée se caractérise par la formation des pycnides qui sont sphériques à sub-globuleuses et sous épidermiques. Elles apparaissent sous formes de points noirs visibles à l'œil nu et mesurent 200 à 250 µm de diamètre. Les pycnidiospores sont généralement unicellulaires, occasionnellement bicellulaires, cylindriques, droites ou légèrement arrondies à une ou deux extrémités. Elles sont hyalines et mesurent 8,2 à 10 µm sur 4 à 5 µm (Khune et Kapoor, 1980). La reproduction sexuée, en contrepartie, est caractérisée par la formation des périthèces qui sont de couleurs brunes foncées à noires. Les asques sont plus ou moins courbés, pédicellés. Les Ascospores au nombre de 8 par asque, sont bicellulaires (Agrios, 1988).

4. *Trichoderma* sp.

4.1.Définition

Les *Trichoderma* sp. sont des champignons libres hautement interactifs dans les environnements racinaires, terrestres et foliaires. L'abondance des *Trichoderma* sp. dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. *Trichoderma* sp. se sont avérés être des producteurs très efficaces d'enzymes extracellulaires. La capacité des champignons *Trichoderma* à produire des enzymes lytiques est utilisée dans les industries de l'alimentation animale, de la vinification et de la brasserie. Les hémicellulases et les pectinases produites par ce genre sont utilisées dans l'hydrolyse partielle des parois cellulaires végétales des aliments, améliorant la digestibilité de l'aliment et augmentant la valeur nutritive de l'aliment. Elles peuvent également être utilisées comme additifs alimentaires (Bani et Mustapha, 2011).

Les champignons *Trichoderma* sont des micro-organismes les plus fréquemment testés et appliqués dans la protection biologique des plantes. L'utilisation de champignons *Trichoderma* peut entraîner une limitation considérable de l'utilisation des fongicides chimiques en agriculture (Blaszczyk et al., 2014).

Les méthodes conventionnelles d'identification de *Trichoderma sp.* utilisent une approche morphologique incluant l'arrangement des conidiospores, des phialides et des conidies, tandis que les caractéristiques culturelles comprennent la croissance linéaire, la couleur des colonies, le modèle de croissance et la pigmentation des hyphes (Harman et *al.*, 2004).

Les espèces de *Trichoderma* sont une source possible d'agents antimicrobiens importants contre les Gram négatif, Gram positif, les champignons et les levures. *Trichoderma sp.* produit au moins trois classes de composés qui déclenchent des réponses de défense des plantes: des peptides, des protéines et des composés de faible poids moléculaire (Harman et *al.*, 2004). Plus de 180 métabolites secondaires ont été caractérisés à ce jour.

4.2. Classification

Selon Bissett (2004), la position taxonomique actuelle de *Trichoderma sp.* se présente comme suit (tableau 04) :

Tableau 04: la position taxonomique actuelle de *Trichoderma sp.*

Embranchement	Amastigomycota et/ou Eumycètes
Sous embranchement	Ascomycotina
Classe	Sordariomycètes
Ordre	Hypocréales
Famille	Hypocraceae
Genre	<i>Trichoderma</i>

4.3. Mode de vie, habitat et reproduction.

Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin (Esposito et Silva, 1998). Les *Trichoderma sp.* terrestres se développent quasiment dans tous les sols (forestiers ou cultivés) et sur les végétaux en décomposition. Ils contaminent fréquemment le compost de la culture industrielle des champignons comestibles, mais sont rarement parasites de plantes vivantes (Esposito et Silva, 1998). Ils ont également été isolés de sources inhabituelles telles que les bivalves marins, les crustacés et les termites (Blaszczyk et *al.*, 2014).

Pour la majorité des champignons de ce genre, les spores asexuées sont les moyens de reproduction. Vu au microscope, les hyphes, les conidiospores et les conidies peuvent être

observés (Blaszczyk et *al.*, 2014) (Figure 07). Les conidiospores situés à l'extrémité des hyphes hyalins sont responsables de la production de conidies (spores vertes) qui germent ensuite et se développent pour former de nouveaux champignons au fur et à mesure que le cycle se poursuit (figure 07).

Certaines espèces se sont avérées capables de se reproduire sexuellement (Blaszczyk et *al.*, 2014). Ils se reproduisent par les chlamydospores et les ascospores et prolifèrent mieux à des températures mésophiles (25–35 ° C) et dans une large gamme de pH.

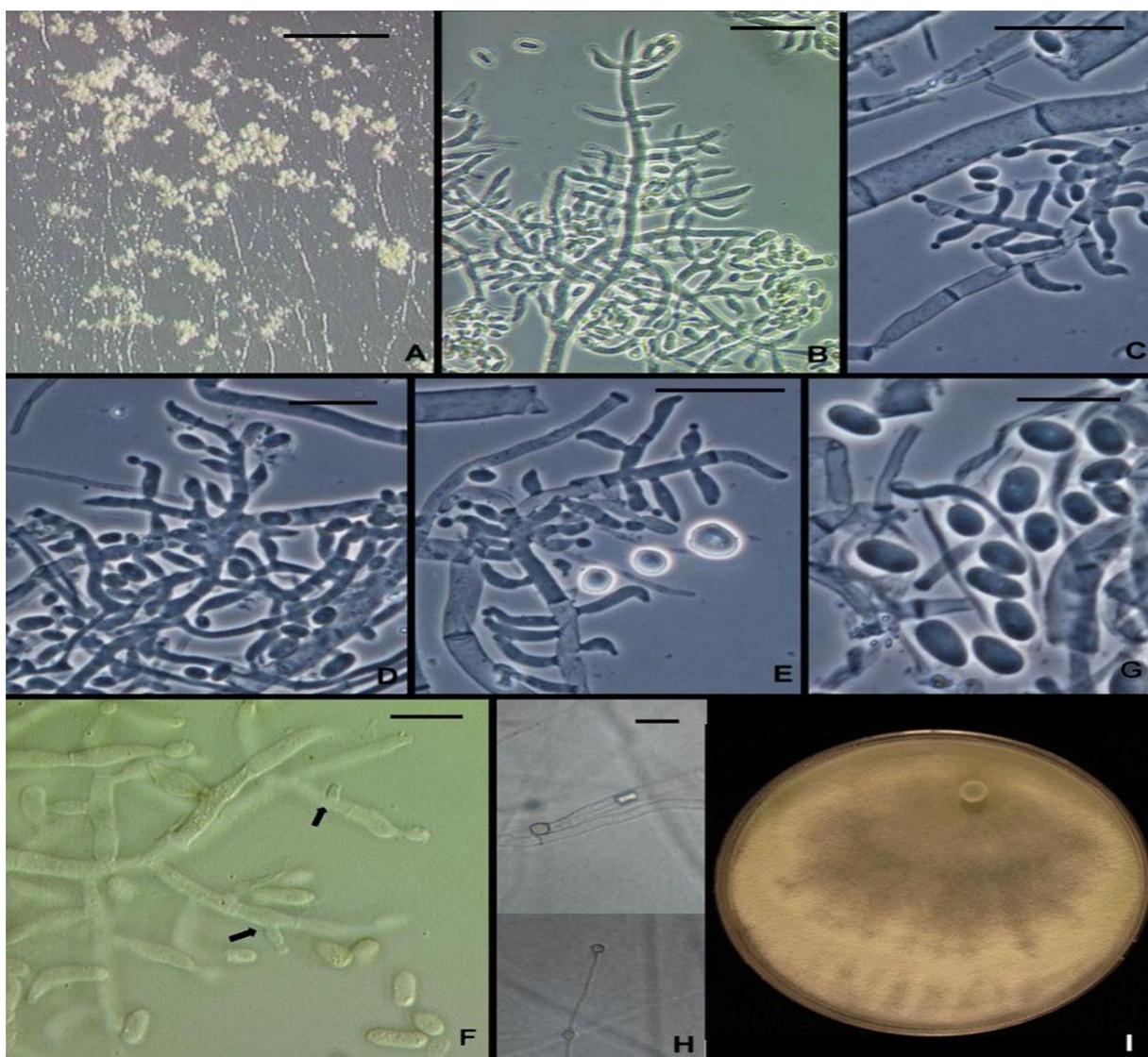


Figure 07 : *Trichoderma* sp. (CBS 243.63.)

a) Pustules de CMD. b-e, f) Conidiophores et phialides. f, g) Conidies, phialides intercalaires indiqués par des flèches. h)Chlamydospores. i) Colonie 1 semaine sur PDA sous lumière blanche, (Blaszczyk et *al.*, 2014).

Chapitre III : Les enzymes d'origine fongiques ; les cellulases, les amylases et les protéases

1. La cellulase

1.1. Structure et mode d'action

Les cellulases sont des enzymes inductibles synthétisées par une grande diversité de microorganismes comprenant à la fois des champignons et des bactéries lors de leur croissance sur des matériaux cellulotiques (figure 08). Ces microorganismes peuvent être aérobies, anaérobies, mésophiles ou thermophiles. Ils sont parmi les enzymes les plus utilisées au niveau industriel en raison du large éventail d'activités dans lesquelles elles peuvent être utilisées (Saldaña-Mendoza *et al.*, 2020).

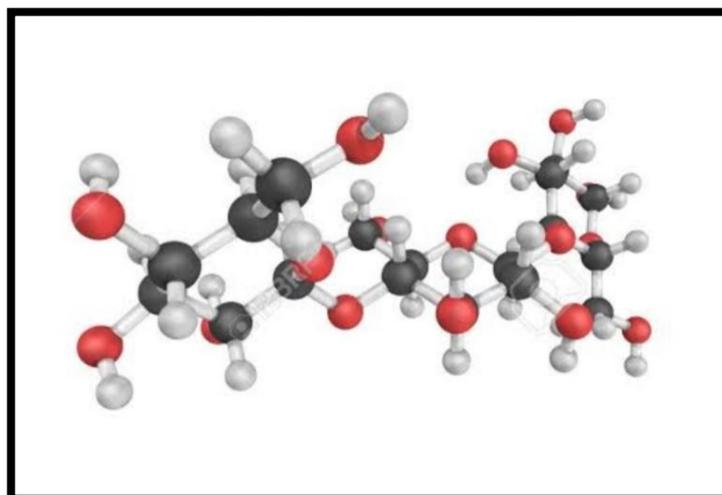


Figure 08 : structure 3D de la cellulase

Ces enzymes sont couramment produites au niveau industriel à l'aide de champignons filamenteux, car elles produisent les pools d'enzymes les plus complexes, et ont une capacité de sécrétion élevée. Ces enzymes sont cataloguées en fonction du site d'action dans lequel elles agissent pour dégrader la cellulose. Les endocellulases fragmentent la partie interne de la chaîne bio-polymère de manière aléatoire, tandis que les exocellulases dégradent les fragments produits par les extrémités, générant des dimères de cellobiose, qui sont finalement dégradés en monomères de glucose par l'action de β -glucosidases (figure 09) (Saldaña-Mendoza *et al.*, 2020) (Figure 09). Bien que le mécanisme de dégradation de la cellulose par

les bactéries aérobies soit similaire à celui des champignons aérobies, il est clair que les bactéries anaérobies opèrent sur un système différent (Kuhad *et al.*, 2011).

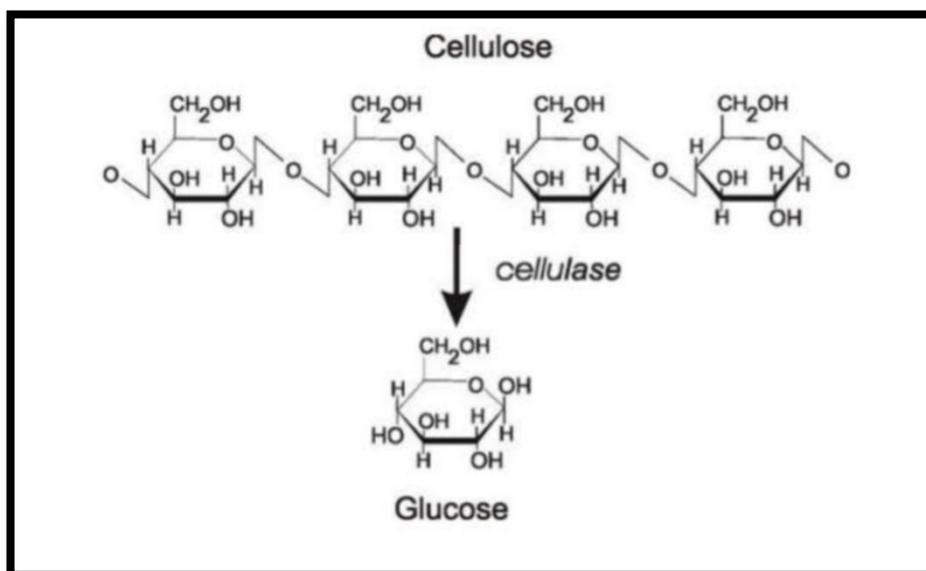


Figure 09 : action de l'enzyme cellulase

1.2. Les applications industrielles

Les cellulases microbiennes ont montré leur application potentielle dans diverses industries en raison du large éventail d'activités dans lesquelles elles peuvent être utilisées, y compris la production d'aliments pour le bétail, dans l'industrie du papier, la production de détergents, la production d'énergie renouvelable, entre autres (Saldaña-Mendoza *et al.*, 2020) (Tableau 05).

1.3. La cellulase d'origine fongique

Essentiellement, la biodégradation de la matière lignocellulosique est réalisée par des champignons (*Aspergillus*, *Schizophyllum*, *Penicillium* et *Trichoderma*) (Eloutassi *et al.*, 2014). D'autres bactéries sont impliquées (*Ruminococcus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermonospora*,...) (Tableau 06). La préparation des enzymes a été obtenue à partir du surnageant du milieu de culture de la souche *Trichoderma reesei* cultivée sur la cellulose comme source de carbone et d'énergie (Warzywoda *et al.*, 2011) (Tableau 06).

Tableau 05 : applications des cellulases dans diverses industries (kuhad et *al.*, 2011)

Industrie	Applications
Agriculture	Contrôle des pathogènes et des maladies des plantes; génération de protoplastes végétaux et fongiques; amélioration de la germination des graines et amélioration du système racinaire; amélioration de la croissance et de la floraison des plantes; amélioration de la qualité du sol; dépendance réduite aux engrais minéraux
Bioconversion	Conversion de matières cellulosiques en éthanol, autres solvants, acides organiques et protéines unicellulaires et lipides; production d'aliments pour animaux riches en énergie; amélioration de la qualité nutritionnelle des aliments pour animaux; amélioration des performances des ruminants; meilleure digestion et absorption des aliments; préservation de fourrage de haute qualité
Détergents	Détergents à base de cellulase; action de nettoyage supérieure sans endommager les fibres; amélioration de la luminosité des couleurs et élimination de la saleté; enlever les protubérances rugueuses des tissus de coton; antiredéposition des particules d'encre
Fermentation	Maltage et brassage améliorés; amélioration du pressurage et de l'extraction de la couleur des raisins; arôme amélioré des vins; amélioration de la fermentation primaire et de la qualité de la bière; viscosité et filtrabilité améliorées du moût; amélioration de la clarification du moût dans la production de vin; amélioration du taux de filtration et de la stabilité du vin
Aliments	Libération des antioxydants du marc de fruits et légumes; amélioration des rendements dans l'extraction de l'amidon et des protéines; amélioration de la macération, du pressage et de l'extraction de la couleur des fruits et légumes; clarification des jus de fruits; amélioration de la texture et de la qualité des produits de boulangerie; purées de fruits à viscosité améliorée; amélioration de la texture, de la saveur, de l'arôme et des propriétés volatiles des fruits et légumes; amertume contrôlée des agrumes
Pâte et papier	Co-additif dans le blanchiment de la pâte; pâte biomécanique; drainage amélioré; désencrage enzymatique; besoin d'énergie réduit; besoin de chlore réduit; amélioration de la brillance des fibres, des propriétés de résistance, de la saleté et de la propreté de la pâte; meilleur drainage dans les papeteries; production de carton biodégradable, de serviettes en papier et de papier hygiénique
Textile	Biodégradation de jeans; biopolissage de fibres textiles; amélioration de la qualité des tissus; amélioration de la propriété d'absorbance des fibres; adoucissement des vêtements; meilleure stabilité des tissus cellulosiques; élimination de l'excès de colorant des tissus; restauration de la luminosité des couleurs
Autres	Extraction améliorée des caroténoïdes; amélioration de l'oxydation et de la stabilité de la couleur des caroténoïdes; amélioration de l'extraction de l'huile d'olive; amélioration de la qualité de l'huile d'olive; réduction du risque de déchets de biomasse; production de cellulosomes design

Tableau 06 : microorganismes ayant des capacités cellulolytiques (Kuhad et al.,2011)

Champignons	Champignons de pourriture molle		<i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. nidulans</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>A. terreus</i> ; <i>Fusarium solani</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>Humicola insolens</i> ; <i>H. grisea</i> ; <i>Melanocarpus albomyces</i> ; <i>Penicillium brasilianum</i> ; <i>P. occitanis</i> ; <i>P. decumbans</i> ; <i>Trichoderma reesei</i> ; <i>T. longibrachiatum</i> ; <i>T. harzianum</i> ; <i>Chaetomium celluliticum</i> ; <i>C. thermophilum</i> ; <i>Neurospora crassa</i> ; <i>P. fumigosum</i> ; <i>Thermoascus aurantiacus</i> ; <i>Mucor circinelloides</i> ; <i>P. janthinellum</i> ; <i>Paecilomyces inflatus</i> ; <i>P. echinulatum</i> ; <i>Trichoderma atroviride</i>
	Champignons de pourriture brune	la	<i>Coniophora puteana</i> ; <i>Lanzites trabeum</i> ; <i>Poria placenta</i> ; <i>Tyromyces palustris</i> ; <i>Fomitopsis sp.</i>
	Champignons de pourriture blanche	la	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ; <i>Sporotrichum thermophile</i> ; <i>Trametes versicolor</i> ; <i>Agaricus arvensis</i> ; <i>Pleurotus ostreatus</i> ; <i>Phlebia gigantea</i>
Les bactéries	Bactéries aérobies		<i>Acinetobacter junii</i> ; <i>A. amitatus</i> ; <i>Acidothermus cellulolyticus</i> ; <i>Anoxybacillus sp.</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>B. pumilus</i> ; <i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>B. licheniformis</i> ; <i>B. circulan</i> ; <i>B. flexus</i> ; <i>Bacteriodes sp.</i> ; <i>Cellulomonas bioazotea</i> ; <i>Cellvibrio gilvus</i> ; <i>Eubacterium cellulosolvens</i> ; <i>Geobacillus sp.</i> ; <i>Microbispora bispora</i> ; <i>Paenibacillus curdlanolyticus</i> ; <i>Pseudomonas cellulosa</i> ; <i>Salinivibrio sp.</i> ; <i>Rhodothermus marinus</i>
	Bactéries anaérobies		<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Clostridium thermocellum</i> ; <i>C. cellulolyticum</i> ; <i>C. acetobutylium</i> ; <i>C. papyrosolvens</i> ; <i>Fibrobacter succinogenes</i> ; <i>Ruminococcus albus</i>
Actinomycètes			<i>Cellulomonas fimi</i> ; <i>C. bioazotea</i> ; <i>C. uda</i> ; <i>Streptomyces drozdowiczii</i> ; <i>S. lividans</i> ; <i>Thermomonospora fusca</i> ; <i>T. curvata</i>

2. L'alpha amylase

2.1. Structure et mode action

Les enzymes dégradant l'amidon se trouvent dans les nombreuses familles de glycoside hydrolase 13 (familles de protéines GH-13) (Tiwari et al.,2015). Les structures

tridimensionnelles (figure 10) des α -amylases ont révélé des enzymes monomères contenant du calcium, avec une seule chaîne polypeptidique repliée en trois domaines (A-C). Le domaine le plus conservé dans les enzymes de la famille des α -amylases, le domaine A, consiste en un pli hautement symétrique de huit brins β parallèles disposés dans un tonneau entouré de huit hélices α . famille impliquée dans la catalyse et la liaison au substrat sont localisées dans des boucles aux extrémités C des brins β dans ce domaine (Tiwari et *al.*, 2015). Les α -amylases de différents organismes partagent une identité de séquence d'acides aminés d'environ 30%.

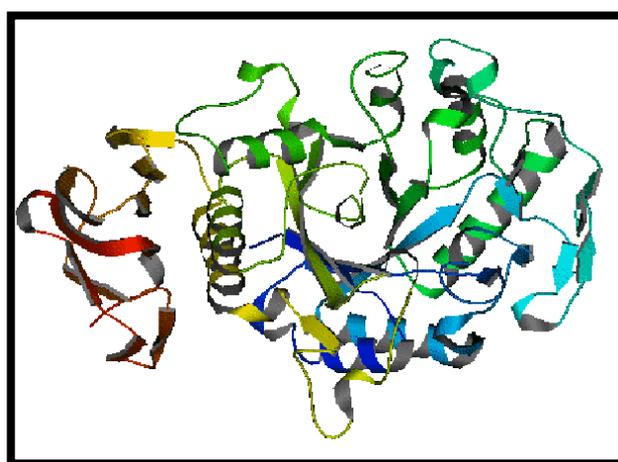


Figure 10: modèle tridimensionnel de la structure de l' α -amylase.

Elles sont capables de cliver les liaisons glycosidiques α , 1-4 présentes dans la partie interne (endo-) de la chaîne amylose ou amylopectine. Les produits finaux de l'action de l' α -amylase sont des oligosaccharides de longueur variable et des dextrines qui constituent des oligosaccharides ramifiés. En physiologie humaine, les amylases salivaires et pancréatiques sont des α -amylases et se retrouvent également dans les plantes (de manière adéquate), les champignons (ascomycètes et basidiomycètes) et les bactéries (*Bacillus*) (Tiwari et *al.*, 2015).

2.2. Les applications industrielles

Outre l'utilisation dans l'hydrolyse de l'amidon, l' α -amylase présente également un certain nombre d'applications industrielles récapitulées dans le tableau 07.

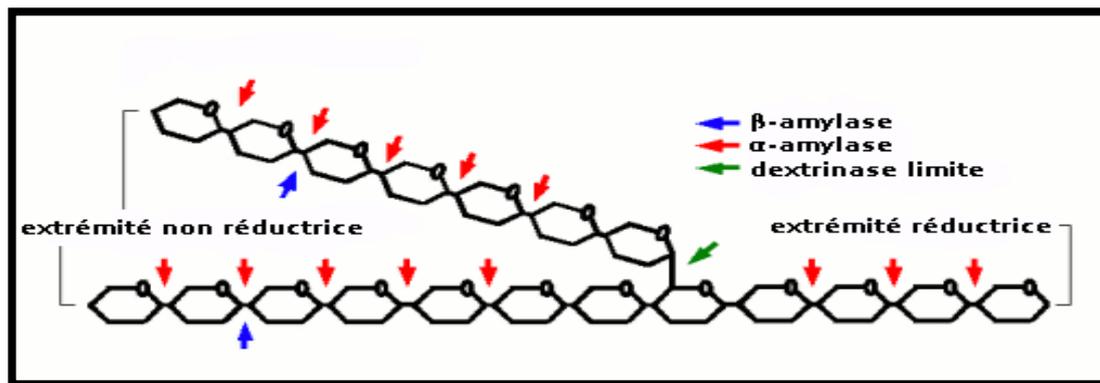


Figure 11 : La composition et les différents liens d'une dextrine qui peuvent être hydrolysés par les diverses enzymes

2.3.L'alpha amylase d'origine fongique

Il est intéressant de noter que la première enzyme produite industriellement était une amylase d'une source fongique en 1894, qui était utilisée comme aide pharmaceutique pour le traitement des troubles digestifs (Pandey et *al.*, 2000). Les champignons appartenant au genre *Aspergillus* ont été le plus couramment utilisés pour la production d' α -amylase. Avec le développement du génie génétique, la plupart des rapports sur les champignons produisant de l' α -amylase ont été limités à quelques espèces de champignons mésophiles, et des tentatives ont été faites pour spécifier les conditions de culture et pour sélectionner des souches supérieures du champignon à produire à l'échelle commerciale. Les sources fongiques sont confinées aux isolats terrestres, principalement à *Aspergillus* et *Penicillium*. Les champignons filamenteux, tels que *Aspergillus oryzae* et *Aspergillus niger* produisent des quantités considérables d'enzymes qui sont largement utilisées dans l'industrie.

Tableau 07 : les applications des amylases dans diverses industries (kuhad et *al.*, 2011)

Industrie	Applications
Industrie du pain	Pendant des décennies, les alpha-amylases fongiques ont été utilisées dans la panification. Les quantités, le goût, l'arôme et la porosité du pain sont améliorés en utilisant l'enzyme dans la farine. L'amidon est le principal composant de la farine de blé. Les amylases peuvent dégrader l'amidon et produire de petites dextrines sur lesquelles la levure agit. Les alpha-amylases dégradent l'amidon endommagé de la farine de blé en petites dextrines, ce qui permet à la levure de travailler en continu pendant la fermentation de la pâte, la levée et le début de la cuisson. Le résultat est une amélioration du volume du pain et de la texture de la mie (Tiwari et <i>al.</i> , 2015).
Industrie textile	Les industries textiles utilisent largement des alpha-amylases pour hydrolyser et solubiliser l'amidon, qui est ensuite lavé du tissu pour augmenter la rigidité des produits finis. Les tissus sont encollés avec de l'amidon. L'alpha-amylase est utilisée comme agent de désencollage pour éliminer l'amidon du tissu gris avant son traitement ultérieur dans le blanchiment et la teinture (Tiwari et <i>al.</i> , 2015).
Industrie du sucre	De nombreuses industries utilisaient des alpha-amylases pour la production de glucose. L'enzyme a hydrolysé l'amidon et l'a converti en glucose. Ils hydrolysent la liaison glucosidique α -(1,4) dans le polymère d'amidon de manière aléatoire pour donner du glucose et du maltose (Akiba et <i>al.</i> , 1998).
Industrie de l'alcool	En présence d'amylases, l'amidon est d'abord converti en sucres fermentescibles. Les amidons tels que les céréales, les pommes de terre, etc. sont utilisés comme matière première qui aide à fabriquer de l'alcool éthylique.. L'utilisation d'enzymes microbiennes remplace en partie le malt dans l'industrie brassicole, ce qui rend le processus plus important économiquement. L'alpha amylase peut également réaliser les réactions d'alcoololyse en utilisant le méthanol comme substrat (Santamaria et <i>al.</i> , 1999).
Industrie du papier	L'alpha-amylase hydrolyse l'amidon brut qui est utilisé pour l'encollage et le couchage du papier au lieu d'amidons chimiquement modifiés coûteux. Ainsi, l'amidon est largement utilisé pour certaines publications de presse au format papier (Tiwari et <i>al.</i> , 2015).
Industrie des détergents	Dans les industries des détergents, l'enzyme alpha amylase joue un rôle essentiel. Il est largement utilisé pour améliorer la détergence de la composition d'agent de blanchiment et le blanchiment sans assombrissement de la couleur (hi et <i>al.</i> , 2009). L'ajout d'enzyme stabilise l'agent de blanchiment et préserve l'efficacité de l'agent de blanchiment dans la composition de la barre de détergent à lessive (Atsushi et <i>al.</i> , 1998).
Produits de construction	L'amidon modifié est utilisé dans la fabrication de plaques de plâtre pour la construction de cloisons sèches. L'enzyme a modifié l'amidon pour une utilisation industrielle. De nombreux amidons ou peu de matière sont présents dans l'aliment. Ainsi, la valeur nutritionnelle de l'aliment peut être améliorée par l'ajout d'alpha amylase (Tiwari et <i>al.</i> , 2015).

3. Les Protéases

3.1. Structure et mode d'action

Les protéases sont variées et ont des rôles biologiques bien différents. Leurs structures sont est très variées. Toutefois, elles possèdent toutes, comme les enzymes en général, un site actif qui assure l'activité d'hydrolyse des liaisons peptidiques, et un site de reconnaissance du substrat pour n'agir que sur la protéine cible. Elle permet de séparer deux acides aminés en cassant les liaisons peptidiques entre un atome de carbone et un atome d'azote au sein des protéines. Les protéases possèdent une activité d'hydrolase, car elles utilisent une molécule d'eau pour effectuer cette cassure. Un atome d'oxygène et d'hydrogène de la molécule d'eau complète le groupement carboxyle d'un côté, et l'atome d'hydrogène restant est donné au groupement amine.

On distingue les exopeptidases, qui permettent la libération du premier ou du dernier acide aminé de la protéine ; et les endoprotéases qui clivent des liaisons peptidiques au milieu des protéines. Des protéases sont retrouvées dans les sucs digestifs (comme la trypsine ou la chymotrypsine) mais interviennent également dans des processus cellulaires pour assurer la maturation des protéines par exemple.

3.2. Application industriels

Outre l'utilisation dans l'hydrolyse des protéines, les protéases sont également utilisées dans un certain nombre d'industries comme mentionnée dans le tableau (Tableau 08).

Tableau 08 : les applications des protéases dans diverses industries

Industrie	Applications
Produits lessiviels	Les protéases ont évidemment un rôle à jouer dans le lavage des textiles, elles sont surtout intéressantes car elles ont une action progressive sur les protéines, sans aller jusqu'à la destruction des acides aminés ; il semble plus important pour nettoyer du linge taché de faire disparaître d'abord toute couleur étrangère (anthocyanes des fruits, carotènes du jaune d'œuf, chlorophylle des végétaux, hémoglobine du sang), ce qu'on peut obtenir par oxydation ménagée, en évitant la production d'autres couleurs apparues par les produits de la décomposition (Dupaigne, 1973).

Fromagerie	L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages. La présure a été l'enzyme utilisée à cette fin depuis longtemps. Cependant, les fluctuations du prix de caillette et leur pénurie épisodique fait qu'elle est de moins en moins utilisée et tend à être remplacée par des protéases microbiennes. Les protéases utilisées à cette fin sont produites par des microorganismes GRAS tels que <i>Mucor miehei</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Endothia parasitica</i> . Les protéases fongiques acides, alcalines et neutres produites par <i>A. oryzae</i> ont également été utilisées en industrie laitière (Aguilar et al., 2008).
Boulangerie	Les endoprotéases et les exoprotéinases d' <i>A. oryzae</i> sont utilisées pour modifier le gluten de blé par une protéolyse limitée selon les caractéristiques désirées de la pâte ; un tel traitement enzymatique permet de réduire le temps de pétrissage (Aguilar et al., 2008). Des protéases bactériennes sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (Rao et al., 1998).
Préparation de produits à base de soja	Les protéases neutres ou alcalines d'origine fongiques sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce de soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Le traitement de ces protéines par la protéase alcaline "alcalase" à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats solubles utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans la formulation des aliments diététiques (Rao et al., 1998). Kojizyme™ est un complexe d'exopeptidases et d'endopeptidases dérivées d' <i>A. oryzae</i> utilisé dans la fermentation du sauce du soja.
Tannerie	Les protéases sont utilisées en tannerie depuis le début du siècle dernier pour leurs capacités à libérer les poils et la laine (Laxman et al., 2005). Les trois traitements de la peau à tanner (le reverdissage, le délainage et le confitage) sont susceptibles de solutions enzymatiques de protéases produites par <i>B. licheniformis</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>B. amyloliquefasciens</i> . Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients (Rao et al., 1998).
Autres	La protéase neutre de <i>B. subtilis</i> peut être utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale. Une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir les films photographiques par hydrolyse de la gélatine (Sumantha et al., 2006).

3.3. Les protéases d'origine fongique

Les Protéases sont produites par une grande variété de microorganismes dont les actinomycètes, les moisissures et de levures. Une large variété de protéases sont élaborées par les moisissures (Wu et al., 2006 ; Tableau 09). Les enzymes d'origine fongiques sont des enzymes extracellulaires, ce qui permet une séparation du mycélium du milieu de fermentation par une simple filtration (Devi et al., 2008). En outre, ces moisissures sont des

souches **GRAS** (*Generally Regarded As Safe*) et peuvent se développer sur des substrats moins chers (Devi et al., 2008).

Tableau 09 : Exemples des protéases fongiques

Sources	Espèces	Références
Moisissures	<i>Aspergillus oryzae</i>	García-Gómez et al., 2009
	<i>Mucor circinelloides</i>	Sathya et al., 2009
	<i>Conidiobolus coronatus</i>	Bessadok et al., 2015
	<i>Penicillium sp.</i>	Bessadok et al., 2015
	<i>Aspergillus terreus</i>	Wu et al., 2006
	<i>Bauveria felina</i>	Bessadok et al., 2015
	<i>Aspergillus clavatus ES1</i>	Bessadok et al., 2015
levures	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Chi et al., 2007
	<i>Candida lipolytica</i>	Bessadok et al., 2015

Deuxième partie

Matériel et méthodes



1. Echantillonnage

2 kg du café sont obtenus auprès d'un représentant du distributeur « Bouanaba » sis à Ali Mendjli, nouvelle ville. Ils sont présentés comme un mélange du café Arabica (20%) et du Robusta (80%) étant les deux variétés du café les plus couramment consommés en Algérie et dans le monde. Tous les travaux sont réalisés au niveau des laboratoires du centre de recherche en biotechnologie de Constantine.

2. Préparation du marc de café

La quantité du café ainsi obtenue est directement placée dans un broyeur de laboratoire, puis transférée directement à un café public (Khroube) pour la récupération du marc de café à l'aide d'une machine expresso (figure 12).



Figure 12: préparation du marc de café (1)
-A : Café moulu -B : machine expresso -C : marc du café

Pour éviter la dégradation microbienne au cours du stockage, le marc de café est étuvé à 42° C jusqu'à stabilisation du poids. Une fois séché, le marc est placé dans un récipient opaque et stocké dans l'obscurité à température ambiante (figure 13).

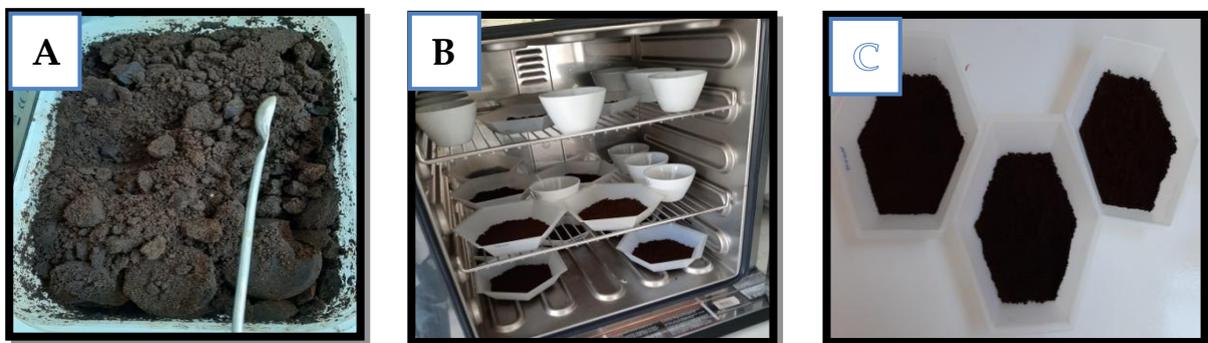


Figure 13 : préparation du marc de café (suite)
-A: Café moulu - B : Echantillons dans l'étuve - C : Marc du café récupéré

3. Evaluation du potentiel chimique du marc de café

3.1. Détermination de la teneur en humidité

➤ Principe

La détermination de la matière sèche est basée sur la dessiccation d'un échantillon quelconque dans une étuve à température bien définie pendant un moment adéquat jusqu'à stabilisation du poids.

➤ Mode opératoire

3g du marc de café humide sont pesés dans des creusets tarés, ils sont par la suite placés dans une étuve maintenue à 45°C pendant 48 heures jusqu'au poids constant. Les creusets sont mis dans un dessiccateur pendant 1 heure pour absorber l'humidité résiduelle restante (figure 14). La matière sèche (MS) est calculée selon l'expression suivante :

$$MS\% = \frac{PD - CT}{PS - CT} \times 100$$

PS: poids de l'échantillon avant séchage (g).

PD: poids de l'échantillon après dessiccation (g).

TC: poids de creuset vide taré (g).

Le taux d'humidité est calculé à partir de la formule suivante:

$$\%humidite = 100 - \%MS$$



Figure 14 : détermination de la matière sèche.

-A: Etuve ventilée - B: Echantillons dans l'étuve -C : un dessiccateur

3.2. Détermination de la teneur en cendre et en matière organique

➤ Principe

Après séchage à l'étuve, on procède à une calcination au four à moufle à 550 °C. Les cendres brutes sont obtenues après destruction de la matière organique par incinération. La matière minérale se trouve sous forme de cendres blanches.

➤ Mode opératoire

3g de l'échantillon préalablement séché sont pesés dans un creuset en porcelaine préalablement taré, il est placé dans un four à moufle porté à 550°C pendant 12 heures. En refroidissant dans un dessiccateur (figure 15), l'ensemble des cendres obtenu est pesé et le pourcentage de la matière minérale est calculé comme suit :

$$MM\% = \frac{PI - CT}{PD - CT} \times 100$$

PI: poids de creuset après incinération

PD: poids de creuset après dessiccation

CT: poids de creuset vide

La différence entre la matière sèche et la masse des cendres (matières minérales) correspond à la masse de matière organique. Le taux de matière organique dans un échantillon peut donc être donné par la différence :

$$\% MO = 100 - \% MM$$



Figure 15: détermination de la matière organique.

-A: l'échantillon - B, C: Four à moufle -D: Echantillon incinéré

3.3. Détermination de la teneur en matière grasse (MG)

➤ Principe

La détermination quantitative de la teneur en matières grasses d'un échantillon s'effectue généralement par extraction avec un solvant lipophile. Le système de **SOXHLET** utilisé dans notre étude est constitué d'un ballon monocolé, d'un réfrigérant et d'un extracteur. Ce dernier présente un système de tube permettant la vidange du réservoir dont le volume varie d'un modèle à l'autre. La méthode Soxhlet est une méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides et séchés.

➤ Mode opératoire

1 g d'échantillon est pesé dans une cartouche de cellulose. Après introduction de 25 ml d'hexane dans chaque creusé, ils sont placés dans l'appareil. L'échantillon est extrait en semi-continu par l'hexane en ébullition qui retombe goutte-à-goutte dans la chambre d'extraction et qui dissout graduellement la matière grasse. Une fois l'hexane éliminé par un évaporateur, les cartouches sont séchées à l'étuve à 105°C pendant 24 h et les creusés sont pesés (figure 16). L'expression des résultats se fait comme suit:

$$\%MG = \frac{PE - PV}{ME \times MS (\%)} * 100$$

PE : poids du creuset avec l'extrait étheré.

PV : poids du creuset vide.

ME : masse de la prise d'essai

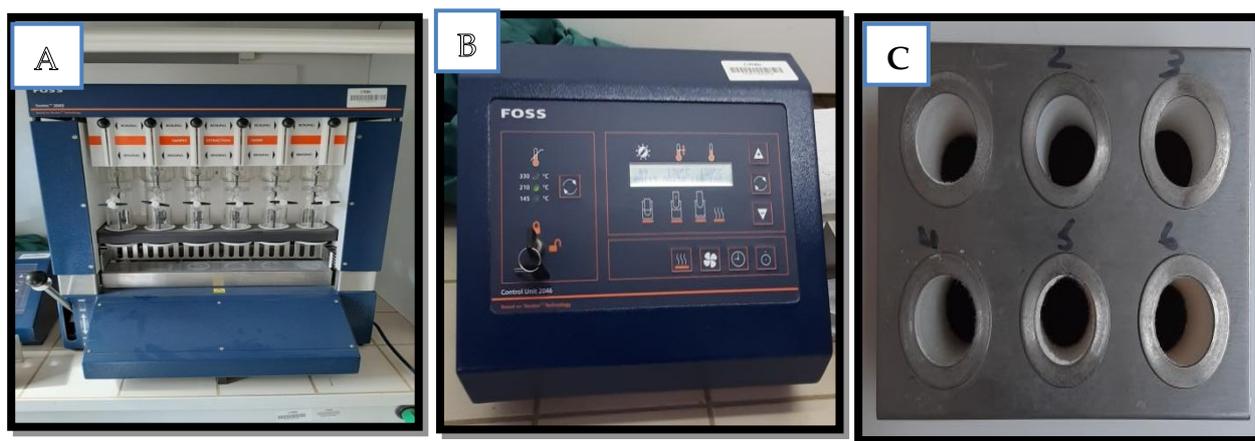


Figure 16 : détermination de la matière grasse.

-A, B: Appareil de SOXHLET -C : Creusets secs.

4. Analyses phytochimiques du marc de café

L'extrait brut du marc de café est préparé puis analysé en termes de son contenu en quelques composants phytochimiques, à l'instar des phénols totaux et des flavonoïdes.

4.1. Préparation de l'extrait brut du marc de café par macération (solide-liquide)

➤ principe

La macération est, en effet une extraction "à froid". Elle se fait en plongeant directement les substances solides dans un liquide. Ces dernières sont en général laissées en suspension pendant un certain temps qui peut aller de quelques heures à quelques jours. A la fin du processus, il est nécessaire de retirer les résidus solides par filtration.

➤ Mode opératoire

L'extraction par macération est réalisée en couvrant une quantité de 5 g d'échantillon sec avec une solution hydro-éthanolique (50%/50% v / v) pendant 72 h avec renouvellement du solvant chaque 24h (Figure 17, 18). (Acevedo et *al.*, 2013). Après récupération du filtrat, le solvant est par la suite éliminé par un évaporateur rotatif à 40° C.

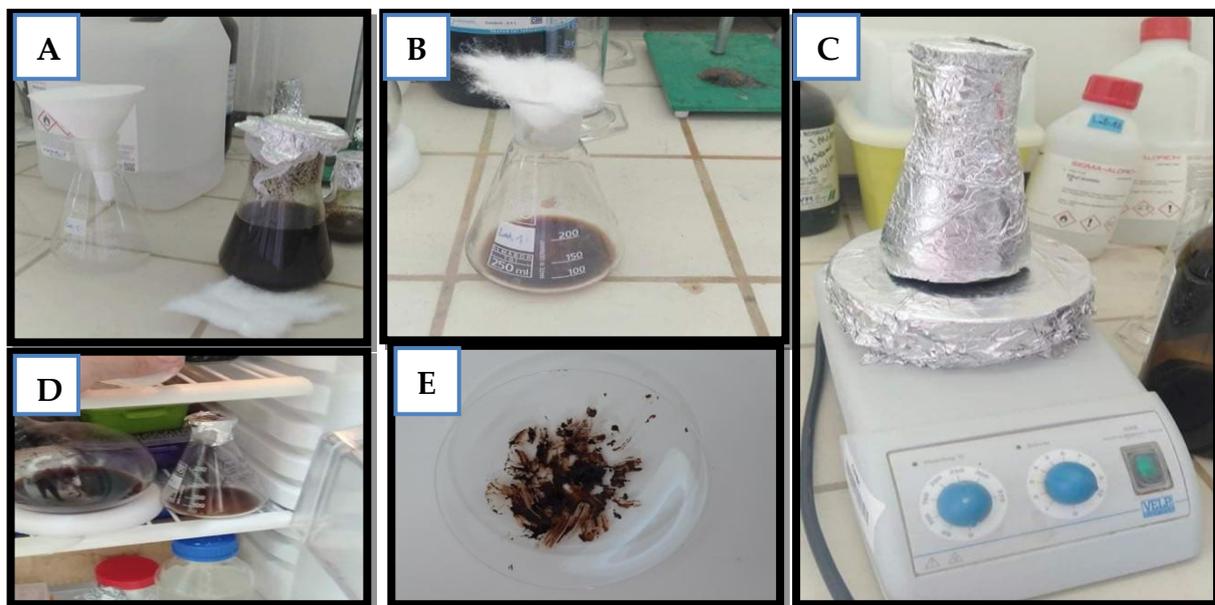
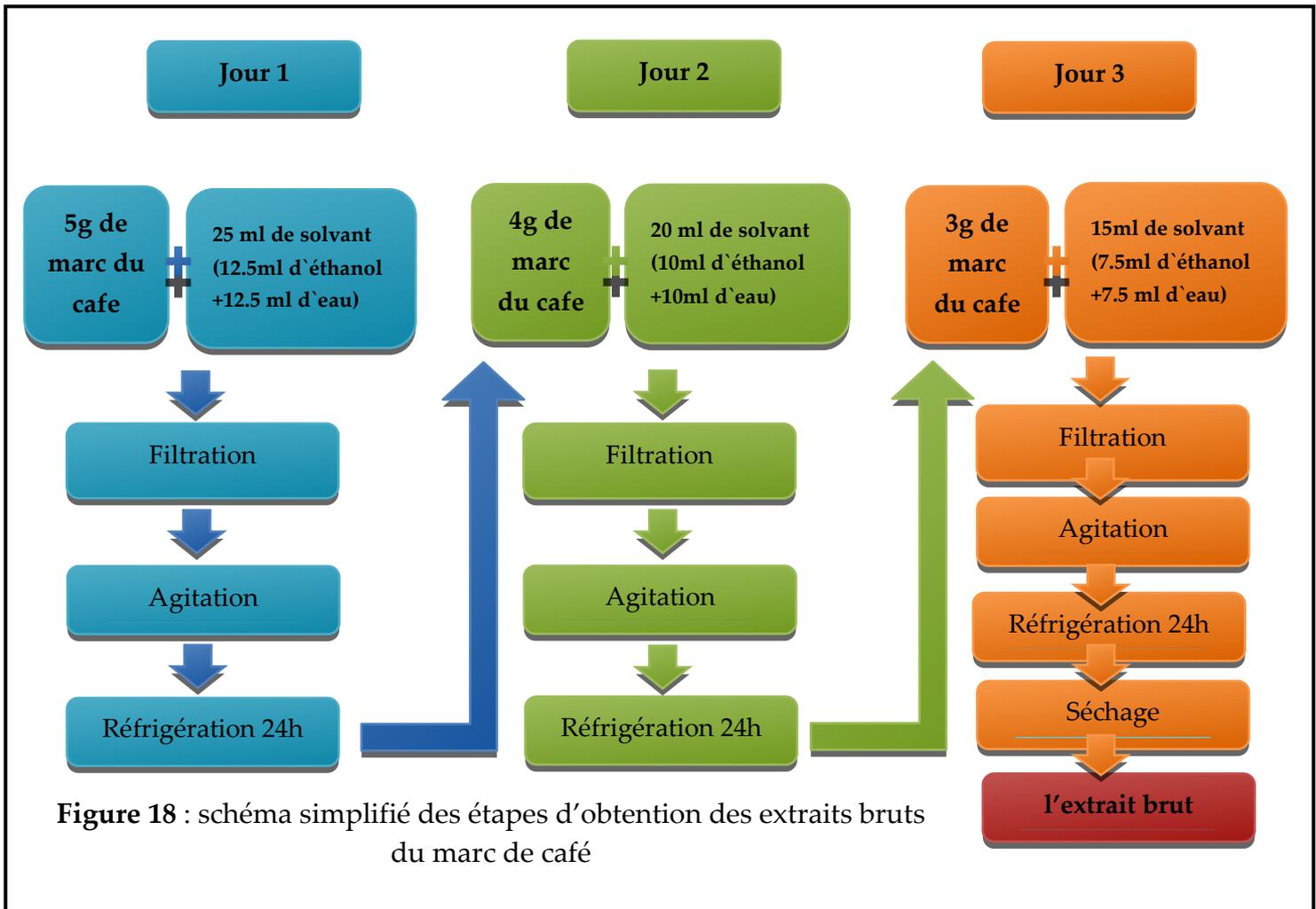


Figure 17 : le procédé d'extraction par macération (solide-liquide).

- A : Solution hydro-éthanolique des extraits combinés
- B : filtration
- C : Agitation
- D : Réfrigération
- E : l'extrait brut de marc du café



4.2.Détermination de taux des flavonoïdes

➤ Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Zhishen et *al.*, (1999) avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose absorbant le visible à 510 nm.

➤ Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes de l'extrait de marc du café a été calculée par la méthode décrite par topçu et *al.*, (2007). Elle consiste à mélanger 50 µl de extrait de marc du café avec 130 µl de méthanol et 10 µl d'acétate potassium et 10 µl d'aluminium nitrate dans une microplaque de 96 puits. Après 40 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 415 nm via un lecteur de microplaques (Figure 18).La teneur en flavonoïdes totaux est

calculée en termes d'équivalent de quercétine par référence au courbe d'étalonnage déjà établie (Annexe 02).

4.3.Détermination de taux des phénols totaux

➤ Principe

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits est effectué par spectrophotométrie selon la méthode du réactif de Folin – Ciocalto (FCR).Ce dosage est constitué par un mélange d'acide phototungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit lors de l'oxydation des polyphénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

➤ Mode opératoire

La teneur en phénols totaux de l'extrait du marc de café est déterminée par la méthode décrite par Singleton et Rossi, (1965). Elle consiste à ajouter 20 μ l d'extrait de marc du café avec 100 μ l du FCR dilue (1 :10). Après 5 mn d'agitation, 75 μ l de carbonate de sodium (7.5%) sont ajoutés. En Parallèle, un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilise (méthanol). Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 765 nm est mesurée via un lecteur microplaques. Les résultats sont exprimés en terme d'équivalents acide gallique à l'aide d'un courbe d' étalonnage (Annexe 02)

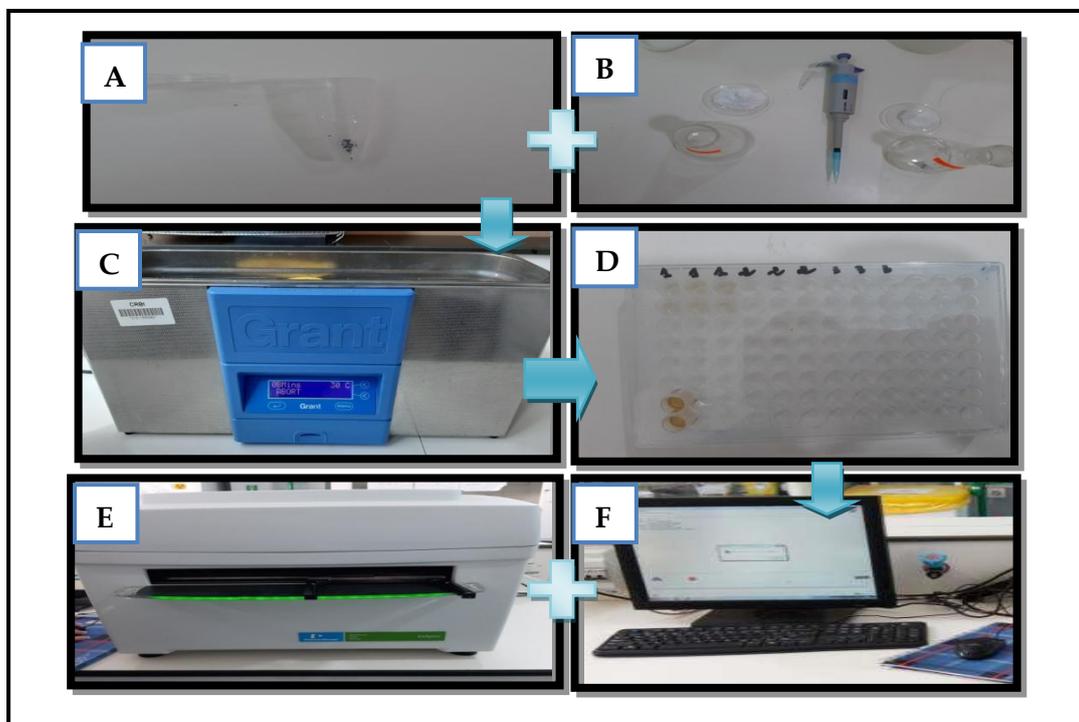


Figure 19: la quantification des flavonoïdes
-A : extrait brut -B : le matériel utilisé -C : ultrasons -D : microplaque
-E, F :un lecteur de microplaques

5. Essai de production des enzymes dans un milieu ordinaire (PDA)

5.1. Rappel

En fait, quatre souches fongiques ont été ciblées dans notre étude, en l'occurrence *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma sp.*, *Ascochyta lentis* et *Ascoenita pisi*. Elles ont été préalablement isolées à partir de différents denrées alimentaires au niveau du laboratoire de mycologie du centre de recherche en biotechnologie de Constantine. Chaque souche est conservée en différents modes, congélation, lyophilisation et réfrigération afin de les préserver le tout long possible. Dans l'optique de la valorisation du marc de café déjà préparé et caractérisé, nous nous sommes intéressés à savoir l'aptitude des mycètes à utiliser le marc du café comme un substrat ou comme une seule source de carbone dans un milieu de fermentation. Parallèlement, nous nous sommes intéressés à savoir l'aptitude de ces mêmes souches à produire en présence de tel résidus, des enzymes d'intérêt industriel, à l'instar des cellulases, des protéases et amylases.

A priori, l'aptitude de ces trois souches à produire telles enzymes est préalablement prouvée dans des milieux de cultures ordinaires à base des substrats inducteurs (Cellulase, amidon et gélatine), puis des essais de production dans un milieu fermentaire à base du marc de café en présence des mêmes substrats sont prévus. Malencontreusement, ces derniers essais n'ont pas été accomplis pour des raisons échappant à la volonté, relatifs à la pandémie du coronavirus (Covid 19). La même circonstance nous a entravée d'accomplir la détermination de quelques composants chimiques du marc comme le taux des sucres, des protéines et des fibres, l'analyse des minéraux, ainsi que son contenu en tanins et en saponines. La caractérisation chimique et phytochimique du marc de café présente un double avantage pour la culture des mycètes ; en premier lieu, en sachant sa composition primaire, nous pouvant ajuster la carence du milieu de fermentation en un / plusieurs éléments, si nécessaire. En deuxième lieu et à travers des tests de corrélation statistiques, sa composition phytochimique permet de savoir l'influence des composés secondaires sur le processus de production des enzymes *in vitro*, sont-ils néfastes ou bénéfiques?

Seuls les travaux rapportés dans cette partie sont accomplis, le restant sera accompli dès que les conditions le permettent.

5.2.Revivification des mycètes

Les échantillons à l'état physiologique congelé et réfrigérés ont placés sous hotte stérile à température ambiante jusqu'au revenue à leur état frais. Par la suite, un morceau de la culture (milieu + colonie) est repiqué sur un milieu PDA fraîchement préparé et stérilisé (Annexe 01). Cependant, la souche lyophilisée est réactivée en préparant une suspension sporale (morceaux de la culture + tube 9 ml d'eau stérile), l'agitée pendant 1 min ,puis 5 gouttes de cette dernière sont étalées sur un milieu PDA .Les boites sont incubées à 25° C pendant 7 jours. Deux répétitions sont effectuées pour chaque souche (Figure 20).

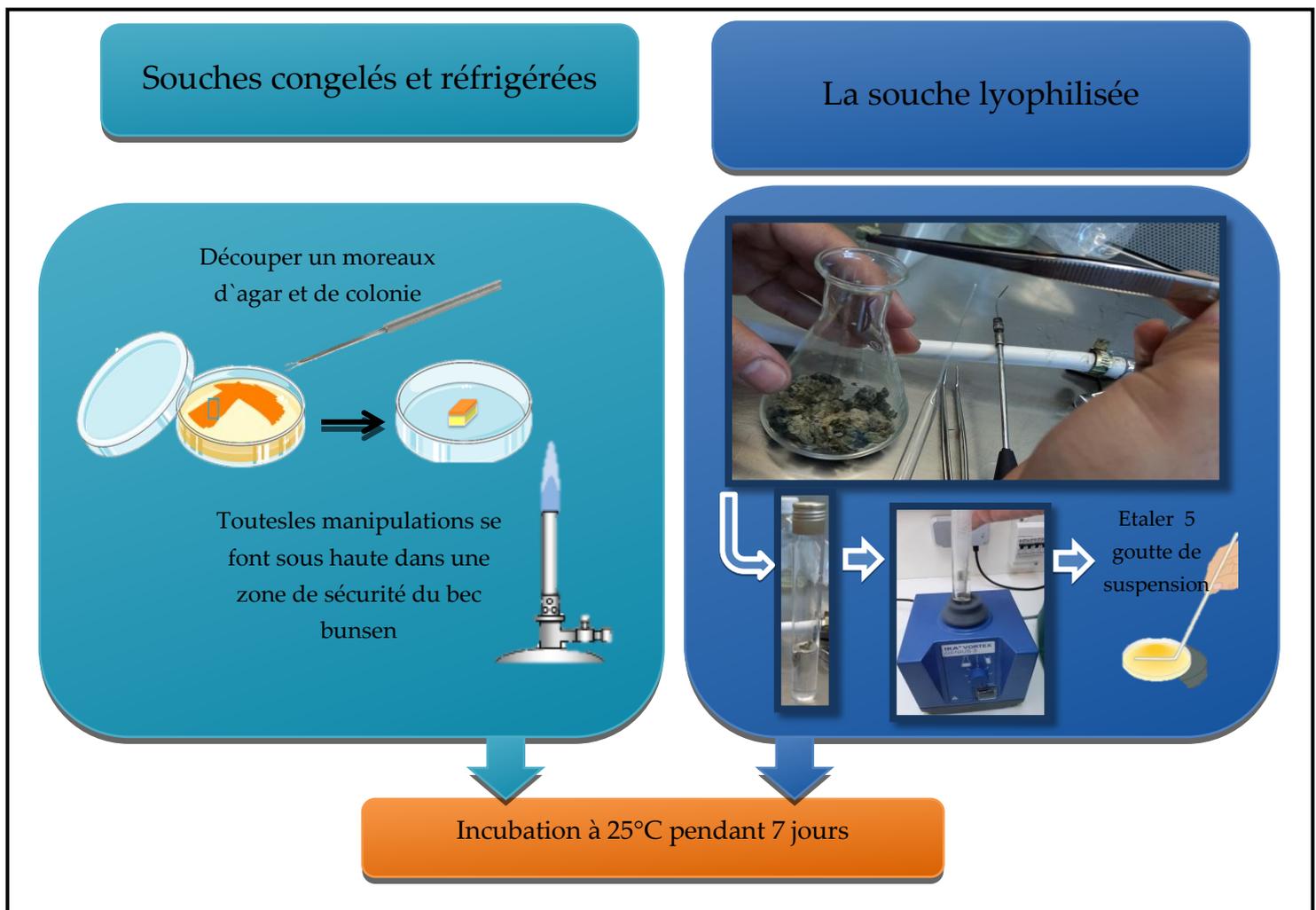
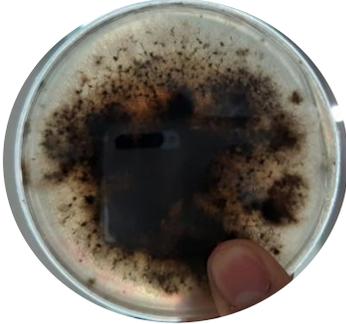
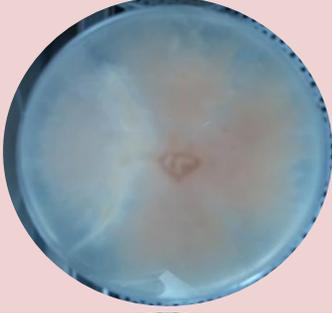


Figure 20: schéma simplifié des étapes de la technique de revivification des mycètes

Tableau 10 : photographies des souches utilisées

Code de la souche	Recto	Verso
<i>Ascochyta lentis</i>		
<i>Fusarium oxysporum</i>		
<i>Ascochyta pisi</i>		
<i>Trichoderma sp.</i>		

5.3. Identification micro et macroscopique des souches fongiques

L'identification d'une souche de moisissure est essentiellement morphologique et basée sur une observation macroscopique et une étude microscopique (Botton et al., 1990).

5.3.1. L'aspect macroscopique

La forme, la taille et la pigmentation des colonies ont été déterminées après croissance sur milieu PDA solide après une incubation de 7 jours à 25° C.

5.3.2. L'aspect microscopique

L'examen microscopique se fait sur un petit fragment de colonie placé entre lame et lamelle avec une goutte de bleu méthylène. Ce bleu est une solution alternative pour colorer les éléments fongiques comme les parois peu visibles de spores incolores en bleu (Lachapelle, 2004). L'identification se base sur la structure du mycélium (siphonné, cloisonné, épais, coloré...), les éléments de la reproduction asexuée (spores : forme, cloisons, couleur, taille...) et sexuée, et sur les formes de résistance (chlamydo-spores solitaires, en paires ou en chaînes). L'observation microscopique est réalisée au grossissement $\times 40$ (figure 21).

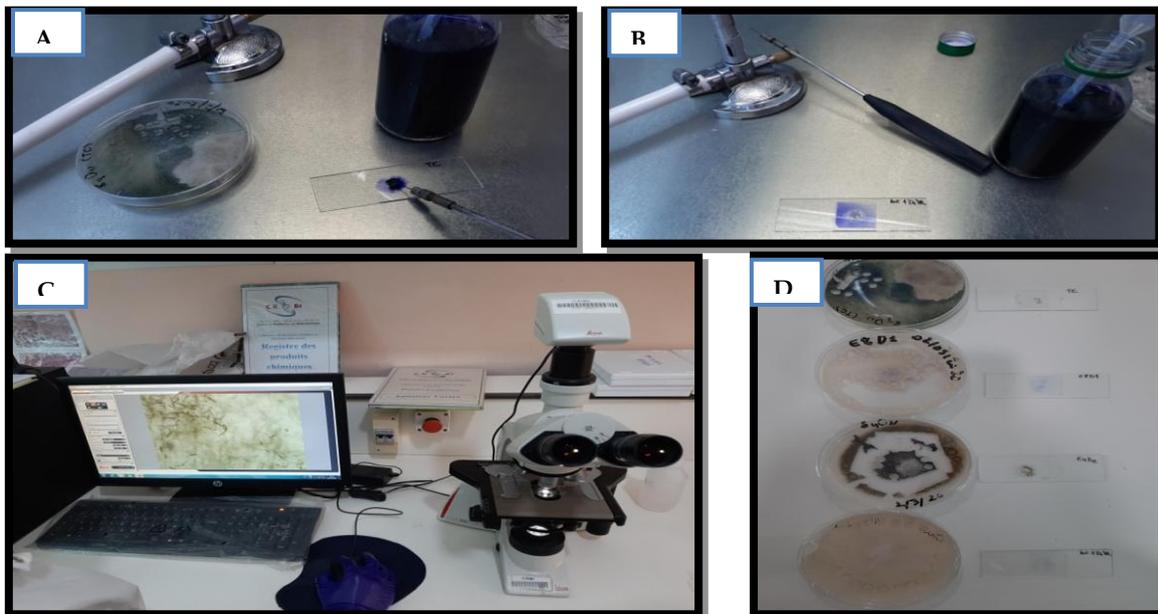


Figure 21: coloration par bleu de méthylène et l'observation microscopique
-A, B : coloration de bleu de -C : microscope
-D : les lames préparés

5.4. Screening des souches productrices d'enzymes

5.4.1. Détermination de l'activité amylolytique des souches fongiques

La détection de l'aptitude des quatre souches à produire l'alpha amylase est effectué sur un milieu spécifique à base d'amidon (Annexe 01). L'ensemencement est réalisé par disque de la culture jeune au centre de la gélose (deux répétitions pour chaque souche). Les boîtes sont

ensuite incubées à 25° C pendant 5 jours .Après croissance, les boîtes sont colorées avec le lugole, Après 5 min de réaction, Les souches à halo clair sur le pourtour sont considérées comme productrices d'amylases. Le diamètre des zones d'hydrolyse, est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante (Figure 22 et 25).



Figure 22 : la préparation de milieu à base d'amidon

-A : amidon -B : PH-mètre -C : milieu à base d'amidon -D : autoclave

5.4.2. Détermination de l'activité cellulolytique des souches fongiques

La mise en évidence de l'activité cellulolytiques des souches testées est effectuée sur un milieu spécifique contenant la cellulose (Annexe 01 ; Figure 23). L'ensemencement est réalisé par disque de la culture jeune de chaque souche au centre de la gélose (Figure 25). L'incubation est faite à 25 °C pendant 5 jours (deux répétitions pour chaque souche) .Après croissance, les boîtes sont colorées avec le lugole qui se fixe sur les polymères de cellulose. Le lugole permet la mise en évidence de l'activité cellulolytiques par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de cellulase (Korish, 2003). Les diamètres des zones d'hydrolyse pour chaque souche sont mesurés, ce qui permet de sélectionner la meilleure souche cellulolytique.

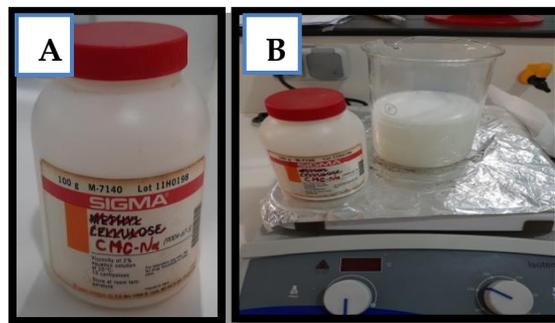


Figure 23: la préparation de milieu de base de la cellulose

-A : cellulose -B : agitateur magnétique

5.4.3. Détermination de l'activité protéolytique des souches fongiques

La détection est effectuée sur le milieu spécifique (Annexe 01). L'ensemencement est réalisé par disque de la culture au centre de la gélose. Les boîtes sont ensuite incubées à 25° C pendant 5 jours .Après croissance, les boîtes sont colorées avec le lugole, Après 5 min de réaction, les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices de protéase. Le diamètre des zones d'hydrolyse, est pris en considération pour la sélection de la souche productrice de protéase la plus performante (figure 24 et 25).



Figure 24 : la préparation de milieu à base de la gélatine

-A : gélatine -B : pH-mètre+ agitateur -C : milieu spécifique



Figure 25: la technique de screening

-A: boîtes de pétri coulées -B : les disques de culture -C : la hotte -D : les souches

6. Optimisation de la production des enzymes dans des milieux de fermentation liquide à base de trois substrats, effet du pH et de la température

Il est à noter à priori, que pour la production des enzymes *in vitro*, le choix d'un milieu de fermentation approprié est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes. Seules *Trichoderma sp.* et *Fusarium oxysporum* sont testées dans cette section.

6.1.Préparation des milieux de fermentation

L'étude de croissance de *Trichoderma sp.* et *Fusarium oxysporum* est réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de extrait pure de pomme de terre avec 10 g d'**amidon** comme seule source de carbone (annexe 01). Dans une zone stérile, on coupant 3-5 fragment des souches déjà testées productrices de l'enzyme sur milieu solide, et les plaçons dans les erlenmeyers contenant le milieu de base du substrat d'amidon, l'incubation est réalisé 7 jours à différentes température et à différents valeurs de pH (deux répétitions pour chaque souche) sous agitation continue.

6.2.Effet du pH initial

L'effet du pH initial sur la production de l'alpha amylase pour les deux souches est testé à des pH initiaux de 4, 5, 6,7 et 8. L'ajustement du pH initial est réalisé par une solution de HCL pour les pH inférieurs à 5, et de NaOH 1N pour les pH supérieurs. Les pH initial et final sont mesure par in PH-mètre type isotemp@.

6.3.Effet de la température

Les cultures des 2 souches sur milieu liquide à base d'amidon sont réalisées à 25, 30 ,35 ,40 et 45 °C, l'incubation est effectuée pendant 7 jours à PH 5 sous agitation.

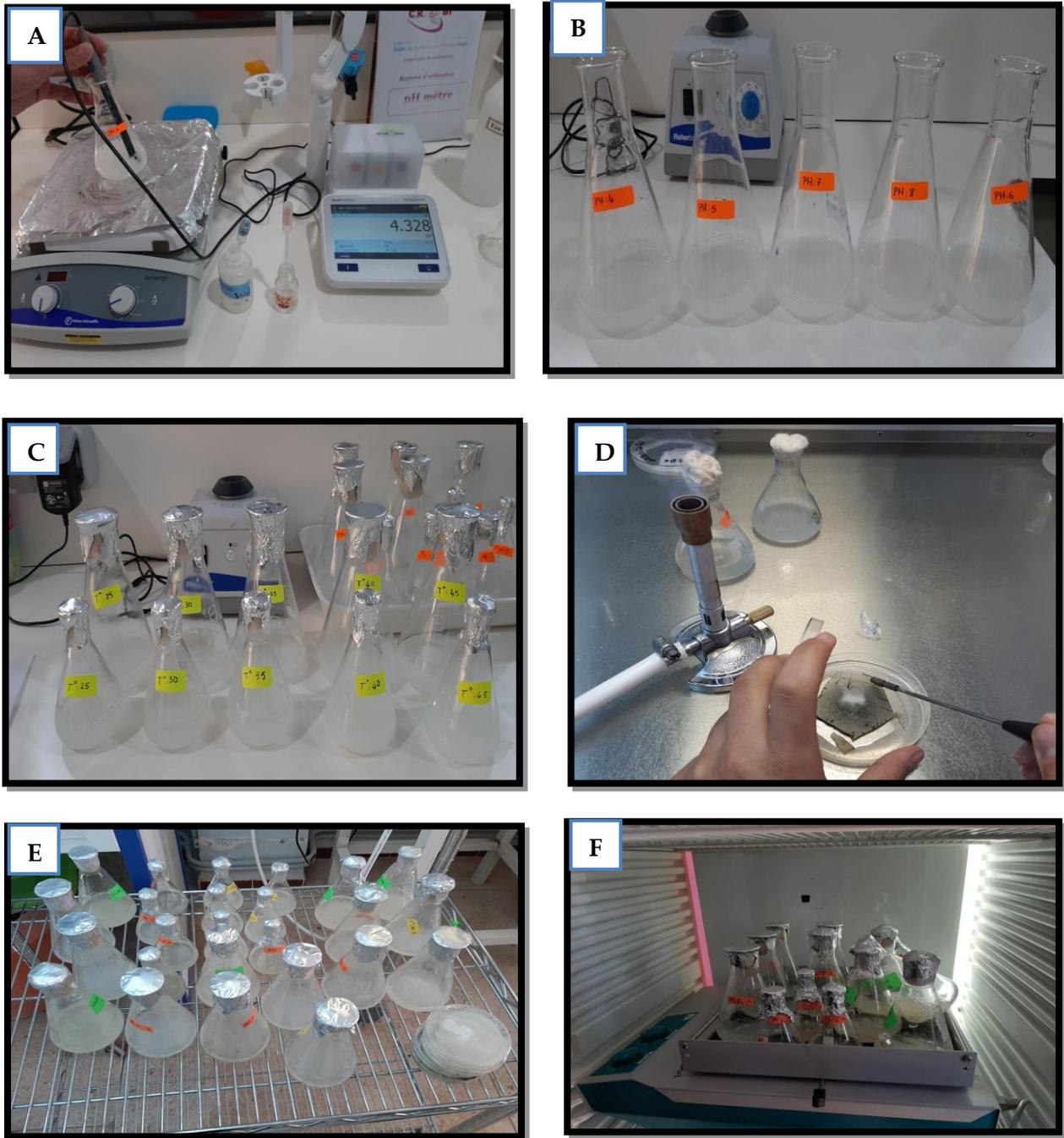
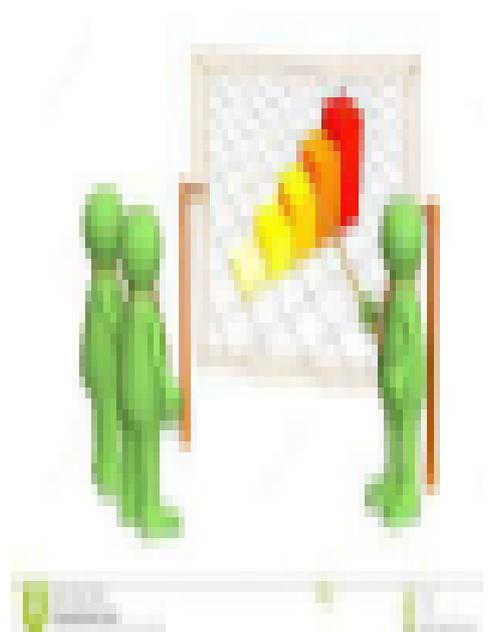


Figure 26: préparation des milieux liquide de fermentation
-A : PH-mètre -B : les milieux de culture de différents PH -C : le milieu de culture de différents T°C -D : les fragments des souches
-E : les milieux de culture -F : incubation sous agitation

Troisième partie

Résultat et discussion



1. Evaluation du potentiel chimique du marc de café

Le contenu du marc de café en humidité, en minéraux et en matière grasse est exposé dans le tableau 11.

1.1.Détermination de la teneur en humidité

La teneur en humidité du marc de café utilisée dans cette étude était de 63,90%, elle est comparable aux valeurs du marc de café (53,0% -69,8%) précédemment rapportées par Cruz et *al.* (2012) et par Nalan et *al.* (2014), soient 53% et 69,8%, respectivement. Le marc de café présente une capacité de rétention d'eau plus élevée que d'autres matériaux, tels que la paille de riz, de blé et l'Okara, ce qui pourrait également être lié à la présence de plus de fibres dans le marc que dans ces matériaux (Ballesteros et *al.*, 2014). Il est essentiel à noter que le taux d'humidité du marc de café est très favorable pour la culture des mycètes. Selon Mansour-Benamar et *al.*(2008), un taux de 70% est favorable pour la croissance mycélienne des souches, car l'humidité a une grande influence non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation, mais plus particulièrement sur la germination des spores.

Tableau 11: le taux d'humidité, les teneurs en minéraux et en matières grasses du marc du café (% MS).

	Hum	MM	MG
Marc du café	63,90	1,45 ± 0,49	6.49 ±0,12
- Hum : humidité, MM : matière minéral, MG : matière grasse -Les résultats sont exprimés comme la moyenne de trois répétitions ± écart type.			

1.2.Détermination de la teneur en matière minéral

La teneur en matière minéral notée dans notre étude était 1.45% MS, c'était dans la gamme (0.8 –3.5% MS) rapporté par Cruz et *al.*, 2012. Mussatto et *al.*, 2011 ont trouvé une teneur en cendres plus faible que la nôtre, suggérant que les conditions de brassage utilisées dans l'extraction industrielle du café entraînent une plus grande perte des minéraux. La plupart des minéraux sont facilement extraits avec l'eau chaude pendant la préparation du café instantané. La teneur en cendres enregistrée dans notre étude semble être déficiente pour une bonne croissance des champignons. Une supplémentation du milieu fermentation en solutions minérales est fortement recommandée. Benkahoul et *al.* (2017) ont rapporté un taux minimal de 3,4 % en matière minérale dans un milieu de base dans la culture des moisissures, et donc

la production d'enzymes. Pour cela, une supplémentation du milieu de fermentation en sels minéraux est importante pour la fermentation et la production des enzymes.

Les échantillons étudiés renferment un taux en matière organique de l'ordre de 98,55% MS. Notre résultat est cohérent avec celui de Ballesteros *et al.*(2014) ayant rapporté que le taux matière organique dans le marc du café est d'environ 98.7 ± 0.10 . En raison de sa teneur élevée en MO, le marc de café la présence une très bonne source de carbone pour la culture des mycètes.

1.3.Détermination de la Teneur en matière grasse (MG)

La teneur en matière grasse du marc du café est estimée à 6,49% MS, elle est inférieure à celle rapportée par Ballesteros *et al.*(2014) (2,29% MS). Néanmoins, cette même valeur est supérieure à l'intervalle noté par Jenkins *et al.* (2014) estimé de 10 à 15% MS. Cependant, la teneur en MG a été déterminée à 16,3% dans l'étude de Caetano *et al.* (2013).

Les lipides sont un constituant mineur de la boisson car ils sont mal extraits par l'eau chaude. Ces différences peuvent également être dues aux conditions utilisées pour la préparation du café instantané et à la variété des grains de café utilisés (Mussatto *et al.*, 2011a).

1.4.Détermination du taux des flavonoïdes et des phénols totaux

L'extrait brut du marc de café a été analysé quantitativement par spectrophotométrie UV-visible pour déterminer son contenu en phénols totaux et en flavonoïdes. Les résultats exprimés en termes d'équivalent d'acide gallique/ de quercétine sont exposés dans la figure 27. L'extrait du marc renferme 51,46 ug EAG par milligramme. A titre de comparaison, cette valeur est largement supérieure à celle notée par Panusa *et al.* (2013) variant de 19.3 à 25.5 ug EAG/mg et à celle de Mussatto *et al.*(2011) ayant noté 16 ug d'EAG/mg.

L'extrait du marc renferme également une teneur en flavonoïdes égal à 19,03 ug quercétine/mg d'extrait. Une valeur supérieure au notre est enregistrée par Phung *et al.* (2017) pour l'extrait Hydrométhanolique (1 : 20, v/v) du marc de café, estimée à 31.15 μg de quercétine/mg d'extrait. L'effet de tels composés secondaire sur la culture des mycètes et, par conséquence la production des enzymes est d'importance majeure. Une corrélation entre ces deux paramètres devra être accomplies.

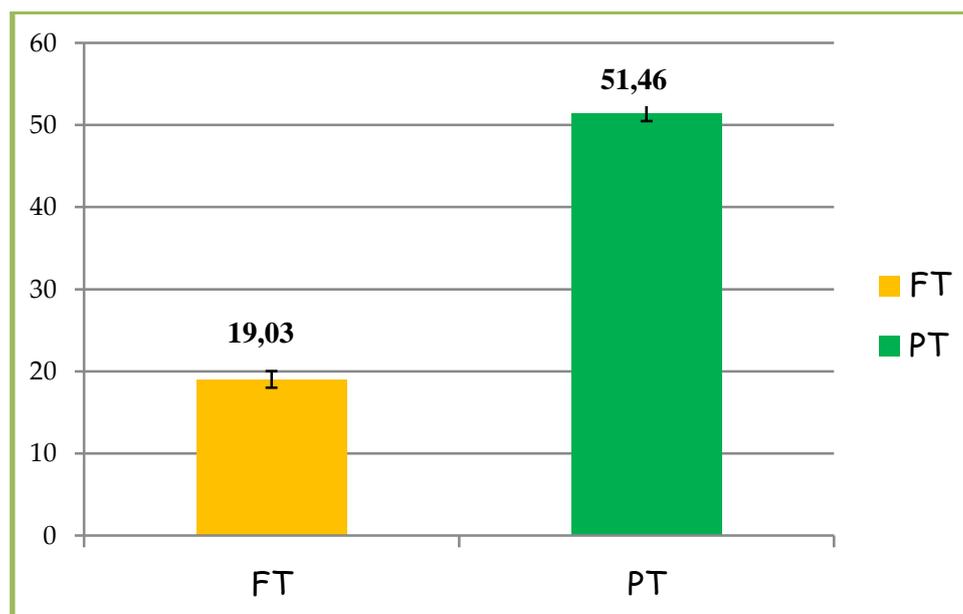


Figure 27 : teneurs en phénols totaux (ug GAE/mg) et en flavonoïdes (ug Quercetine/mg) du marc de café

2. Essai de production des trois enzymes sur Gélose PDA

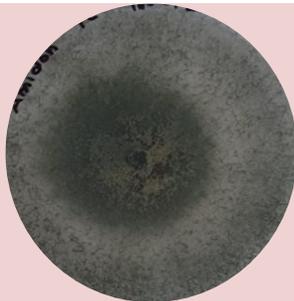
2.1. Identification macroscopique et microscopique des souches

Les souches fongique testées pour la production des enzymes recherchées est soumise à une identification macroscopique (caractères culturaux) et microscopique (caractères morphologiques).

2.1.1. Identification macroscopique

Ce type d'étude est primordial pour l'identification des moisissures (aspect de la colonie, couleur, revers et la vitesse de croissance,...). Dans ce cas, les souches: *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma sp*, *Ascochyta lentis* et *Ascochyta pisi* sont revivifiées par incubation à 25° C pendant une semaine sur milieu PDA . L'étude macroscopique repose sur l'observation à l'œil nu. Le tableau 12 récapitule l'aspect macroscopique des isolats purifiés: surface et consistance des colonies, couleur du revers de la colonie ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

Tableau 12 : caractères macroscopiques des souches sur milieu PDA

Les souches	Caractères macroscopiques	
<i>Fusarium oxysporum</i>		<ul style="list-style-type: none"> -Couleur du mycélium et du contour : blanche -Texture : colonie aplatie. -Couleur du revers : revers incolore
<i>Trichoderma sp</i>		<ul style="list-style-type: none"> -Couleur du mycélium et du contour : - colonie verdâtre. pulvérulent -Couleur du revers : - revers incolore
<i>Ascochyta lentis</i>		<ul style="list-style-type: none"> -Couleur du mycélium et du contour : brun - Texture : poudreuse à duveteuse - Couleur du revers : brun pâle
<i>Ascochyta pisi</i>		<ul style="list-style-type: none"> -Couleur du mycélium et du contour : Blanche et brun au centre - Texture : poudreuse à duveteuse - Couleur du revers : brun pâle

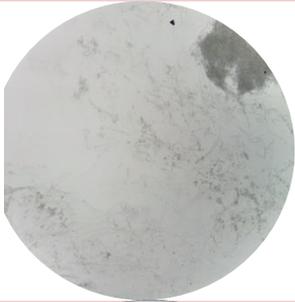
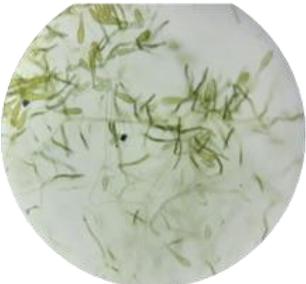
2.1.2. Identification microscopique

L'identification microscopique repose sur des critères morphologiques et sur l'ontogénie des spores (aspect, couleur et structure des conidiospores), l'examen microscopique des souches : *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma sp*, *Ascochyta lentis* et *Ascochyta pisi* est réalisée au grossissement G×40. La technique de coloration par bleu de méthylène (Harley et

Prescott, 2002) a permis d'observer les structures caractéristiques des isolats sélectionnés (conidiospores, conidies, mycélium etc...). Les résultats obtenus sont dans le tableau 13.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux décrits dans la bibliographie (Blaszczyk *et al.*, 2014 ; Pandey *et al.*, 1987 ; Seogchan Kang *et al.*, 2014).

Tableau 13 : caractères microscopiques des souches testées

Les souches	Caractères microscopiques
<i>Fusarium oxysporum</i>	 <ul style="list-style-type: none"> - Filament septé, - Macroconidies fusiformes - Microconidies ovoïdes - Absence de chlamydozspores
<i>Trichoderma sp</i>	 <ul style="list-style-type: none"> - Mycélium composé d'hyphes jaunes, - Phialides : forme de flasques - Conidies : Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale - Ramification : septés, ramifiés à parois lisses.
<i>Ascochyta lentis</i>	 <ul style="list-style-type: none"> - Mycélium cloisonné - Présence des pycnides, Pycnidiospores bicellulaires - Pycnidiospores ovales à allongée
<i>Ascoenita pisi</i>	 <ul style="list-style-type: none"> - Présence des pycnides, Pycnidiospores bicellulaires - Ramification : Mycélium cloisonné

2.2.Mise en évidence des activités enzymatiques sur gélose PDA

Le choix des milieux de culture est déterminant dans la mise en évidence des activités enzymatiques recherchées et surtout dans le choix de la substance employée comme substrat

inducteur pour la production des enzymes. Pour cela, on a utilisé les milieux gélosés à base d'amidon, de cellulose et de gélatine comme milieux sélectifs pour la détection des activités amylolytique, cellulolytique et protéolytique respectivement chez les souches testées.

Les résultats obtenus après l'ensemencement des milieux gélosés contenant des substrats spécifiques donnent des zones d'hydrolyse claires prouvant la production des enzymes hydrolases recherchées par tous les souches testées (Tableau 15). Les zones d'hydrolyse présentent des diamètres différents suivant la capacité de chaque souche à dégrader le substrat disponible (tableau 14).

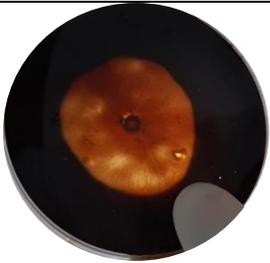
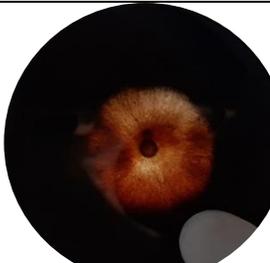
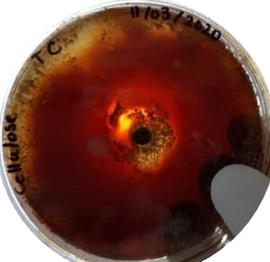
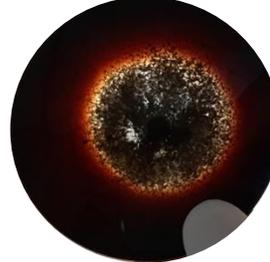
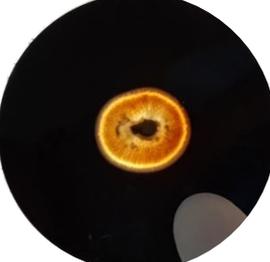
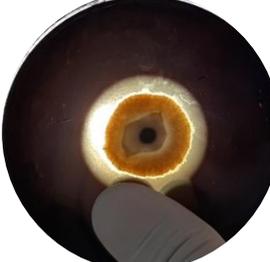
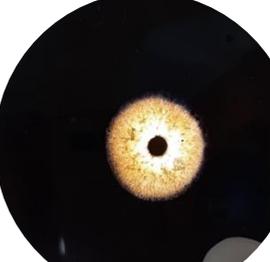
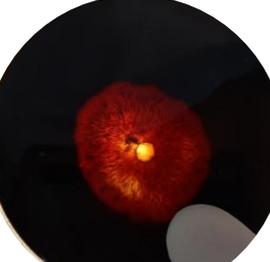
D'une manière générale, toutes les souches testées ont montré clairement leur capacité à hydrolyser (dégrader) les substrats utilisés à savoir, l'amidon, la cellulose et la gélatine.

Tableau 14 : diamètres (mm) des zones d'hydrolyse			
Tableau : Diamètres (mm) de zones d'hydrolyses de souches testées			
Activité enzymatique	Amylolytique	Protéolytique	Cellulolytique
<i>Fusarium oxysporum</i>	4	4.5	4.7
<i>Trichoderma sp.</i>	4.6	7.5	2
<i>Ascochyta lentis</i>	3	4	3
<i>Ascochyta pisi</i>	3.7	3.9	4.2

2.2.1 Mise en évidence de l'activité amylolytique

Parmi les souches testées, la souche la plus performante quant à son activité amylolytique sera sélectionnée. Cette activité est détectée par le lugole qui colore spécifiquement l'amidon non dégradé en bleu-violet (Maldonado et al., 2007). En effet, les souches à halo clair sur le pourtour sont considérées comme productrices d' α -amylases. Cependant, le diamètre des zones d'hydrolyse est le facteur principal pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante.

Tableau 15: zones d'hydrolyses des souches testées après 7 jours incubation à 25°

Milieux	PDA à base de cellulose	PDA à base de gélatine	PDA à base d'amidon
Activités enzymatique	Cellulolytique	Protéolytique	Amylolytique
<i>F. oxysporum</i>			
<i>Trichoderma sp.</i>			
<i>A. lentis</i>			
<i>A. pisi</i>			

Parmi les souches testées, *Trichoderma sp.* se distingue par l'activité amylolytique la plus élevée comparativement aux autres souches. Cette activité demeure, cependant moyenne traduite par une zone d'hydrolyse de diamètre estimé à 4.6 mm. *A. lentis* est la souche amylolytique la plus faible (3 mm). Néanmoins, *A. pisi* et *F. oxysporum* présentent une

activité amylolytique intermédiaire avec des diamètres d'hydrolyse estimés à 3,7 et 4 mm, respectivement.

2.2.2. Mise en évidence de l'activité cellulolytique

Après la coloration, l'observation d'une zone claire apparente autour des colonies des souches testées indique l'hydrolyse du substrat testé (la cellulose). Le diamètre de ces zones est lié à la quantité des enzymes extracellulaires libérées par les souches testées.

F.oxysporum. présente l'activité cellulolytique la plus élevée avec un diamètre d'hydrolyse mesuré à 4.7 mm, par contre, la souche *Trichoderma sp.* donne une zone d'hydrolyse de diamètre faible mesuré à 2 mm. Notre résultats et contradictoire avec celui de Harman, (2006) stipulé que le genre *Trichoderma* est connu parmi les souches fongiques les plus cellulolytiques.

2.2.3. Mise en évidence de l'activité protéolytique

La production de l'enzyme protéase est révélé par l'inondation les boîtes de Pétri avec la solution de lugol, l'activité protéolytique se distingue par la formation de halo clair autour des colonies qui traduit une dégradation des protéines du milieu et donc une présence d'enzymes protéolytiques (Juszczuk et *al.*, 2005)

Nous observons des zones d'hydrolyse de différents diamètres (tableau 09). *Trichoderma. sp.* présente une activité importante avec un diamètre mesuré à 7.5 mm suivi par *F.oxysporum* ayant donné un diamètre égal à 4.5 mm. Alors que, les deux *Ascochyta* présentent une activité protéolytique moyenne, dont le diamètre est mesuré à 4 et 3.9 mm, respectivement. Les souches *Trichoderma .sp.* se sont avérés produire une large gamme d'autres enzymes extracellulaires et certaines d'entre elles étaient impliquées dans la lutte biologique contre les maladies des plantes (Harman, 2006)

3. Optimisation de la production des enzymes sur milieu liquide

3.1. Sélection des souches microbiennes productrices de l'enzyme amylase

Les microorganismes qui sont capables de produire des enzymes de dégradation de certains composés sont généralement localisés où ces substances sont abondantes. Les méthodes d'isolement sont des méthodes classiques avec des milieux sélectifs contenant le substrat stimulant la production de l'enzyme spécifique. Dans notre étude, l'amidon est utilisé comme la seule source de carbone dans le milieu fermentaire pour isoler les souches productrice de

l'amylase. Le métabolisme fermentaire est réalisé en absence d'oxygène et sous agitation, le rendement de conversion de biomasse est séparé par filtration. Seule *Trichoderma sp.* et *F. oxysporum* sont testées dans cette section en raison du manque des Erlens.

3.2. Paramètres influençant la production de l'amylase

3.2.1. Effet du pH

La croissance des souches augmente en fonction du pH 5 à 7. La croissance est maximale avec un pH égal à 7 pour *Trichoderma sp.*, un pH de 5-6 pour *F. oxysporum*, une diminution progressive au-delà de cette valeur est enregistrée. En contrepartie, le maximum d'activité enzymatique est obtenu au pH initial 5,5 pour *Trichoderma sp.* et pH 7 pour *F. oxysporum*. Donc les deux souches sont des neutrophiles se développant dans des milieux fermentaires dont le pH est compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7 (tableau 16).

3.2.2. Effet de la température

La croissance des deux souches est devenue maximale à la température initial 25° C atteignant par ainsi une croissance et un rendement élevée. Elle diminue rapidement par ainsi. L'activité enzymatique présente un profil parallèle à la croissance. Le maximum de production d'amylase est obtenu à 25° C (tableau 17). Donc *Trichoderma sp.* et *F. oxysporum* sont des mésophiles. La plupart des champignons, surtout les moisissures sont mésophiles qu'ils se développent autour de 20- 25° C. Les résultats obtenus sont similaires à ceux décrits par Escoula et al. (1973) stipulant que la température idéale pour le développement des moisissures se situe entre 24 et 30° C .

Tableau 16: production de l'amylase par les deux souches dans les pH 4, 5, 6, 7 et 8 à 25° C

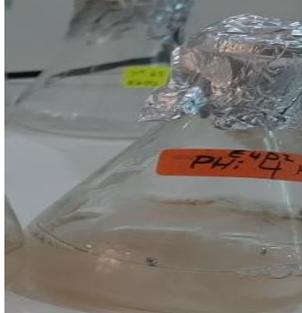
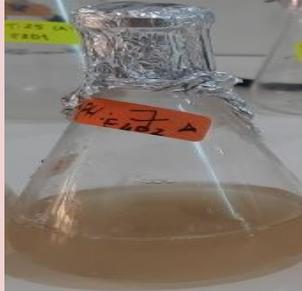
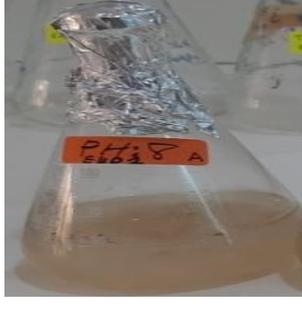
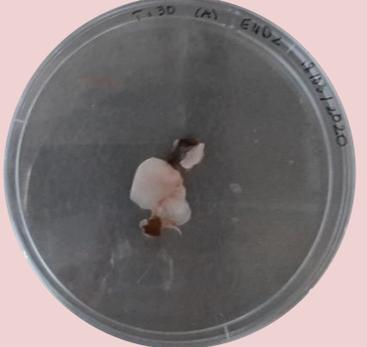
pH	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
4	-	
5		
6		
7		
8		

Tableau 17 : production d'amylase par les deux souches dans les températures 25, 30 ,35 ,40 et 45°C

Températures	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
25° C		
30° C		
35° C		

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de valorisation des résidus des ressources végétales naturelles générés par le secteur agro-alimentaire, nous avons sélectionné le marc du café, ce royal résidu qui s'appelle « **or noir** » ou « **or brun** » majoritairement rejeté à l'état dans l'environnement en dépit de ses faveurs et fameuses utilisations en industrie, en pharmacie, en agriculture et en cosmétique. A travers cette première initiative qui n'a jamais été entrepris en Algérie, nous essayons de mettre en évidence la production des enzymes, à savoir l'amylase, la cellulase et la protéase chez par quatres souches ; *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma sp*, *Ascochyta lentis* et *Ascochyta pisi* dans un milieu de fermentation à base du marc de café. Cette optique présente une importance environnementale et économique d'importance majeure.

L'utilisation de ce résidu comme un substrat de base en fermentation nécessite, en premier lieu déterminer son contenu en différents éléments nutritifs primaires, tels que les protéines, les sucres, les minéraux et les lipides, ainsi que son contenu en composants secondaires tels que les polyphénols, les tanins et les saponines. Une fiche d'analyse de ce résidu facilite la mise en place d'un milieu fermentaire équilibré pour la croissance et le développement des mycètes. Dans notre étude, seuls trois paramètres ont été déterminés, le taux d'humidité enregistré est entièrement favorable pour la croissance des mycètes, tandis une carence en minéraux est soulevé. A cet égard, une supplémentation du milieu en minéraux est très importante. D'autres analyses sont indispensables pour justifier l'utilisation du marc.

Dans une deuxième phase, les souches sélectionnées sont revivifiées sur un milieu ordinaire PDA, puis re-identifiées macroscopiquement et microscopiquement par le bleu de méthylène. Les aptitudes enzymatiques de ces mêmes souches ont été testées, en premier lieu dans une gélose ordinaire contenant la cellulose, l'amidon et la gélatine comme des substrats inducteurs de la production de la cellulase, l'amylase et la protéase, respectivement. Une production variable est enregistrée traduite par la mesure des zones d'hydrolyse en mm. Les résultats révèlent que la souche *Trichoderma sp* est la plus performante quant à la production des enzymes amylase et protéase par rapport aux autres souches, *Fusarium oxysporum* est performante dans la production d'enzymes cellulase par rapport aux autres souches. .

La production de l'amylase dans un milieu fermentaire liquide par *F. oxysporum* et *Trichoderma sp*. révèle que ces deux souches neutrophile et mésophile se développent dans une gamme de ph allant de 5,5 jusqu'à 7 à une température de 25° C.

Cette étude basée sur la mise en évidence et la production des enzymes hydrolases des souches fongiques a donné des résultats très encourageants qui devront être complétés selon l'échéancier tracé afin de présenter un travail cohérent et complémentaire justifié, en quelque sorte, l'utilisation du marc de café dans un milieu de base de production des enzymes à intérêt industriel.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

1. A. Singh, R. C. Kuhad, and O. P. Ward, "Industrial application of microbial cellulases," in *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*, R. C. Kuhad and A. Singh, Eds., pp. 345–358, I.K. International Publishing House, New Delhi, India, 2007.
2. Acevedo, F., Rubilar, M., Scheuermann, E., Cancino, B., Uquiche, E., Garcés, M., et Shene, C. (2013, March). Bioactive compounds of spent coffee grounds, a coffee industrial residue. *Agricultural. Agroindustrial Waste Management* (pp. 12-15).
3. Akgün, N. A., Bulut, H., Kikic, I., & Solinas, D. (2014). Extraction behavior of lipids obtained from spent coffee grounds using supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering & Technology*, 37(11), 1975-1981.
4. Akgün, N. A., Bulut, H., Kikic, I., & Solinas, D. (2014). Extraction behavior of lipids obtained from spent coffee grounds using supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering & Technology*, 37(11), 1975-1981.
5. Akiba, T; Kawak, YS & Kudo, T. 1998. Purification and characterization of alpha-amylase from hyper-thermophilic *Thermococcus profundus*, which hydrolyzes both, α -1-4 and α -1-6 glucosidic linkage. *J. Ferment. Bioeng.* 86:363-367
6. Andre K. Gonsalves, Educational Specialist ,Stephen A. Ferreira, Extension Plant Pathologist ,Department of Plant Pathology, CTAHR ,University of Hawaii at Manoa 1993 *Fusarium oxysporum*
7. Atsushi, J & Eiichi, H. 1998. Carbohydrates containing laundry composition with Improved detergency. *J. Kokai Tokkyo Koho.* 10:96-104.
8. Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food and bioprocess technology*, 7(12), 3493-3503
9. BANI, Mustapha. Prospection, isolement et caractérisation phénotypique d'isolats de *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl f. sp. *albedinis* (Killian & Maire). 2011. PhD Thesis.
10. Bhandarkar, N. S., Mouatt, P., Goncalves, P., Thomas, T., Brown, L., & Panchal, S. K. (2020). Modulation of gut microbiota by spent coffee grounds attenuates diet-induced metabolic syndrome in rats. *The FASEB Journal*.
11. Blaszczyk, L. M. S. K. S., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J., & Jedryczka, M. (2014). *Trichoderma* spp.—application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of plant protection research*, 54(4).
12. Booth C. (1971). *The genus Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureaux. England

13. Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., (1990). Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris
14. Burhan, A; Nisa, U; Gokhan, C; Omer, C; Ashabil, A & Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. *Process. Biochem.* 38:1397–1403
15. Campos-vega, R., Loarca-Pina, G., Vergara-castaneda , H., Ooah, B.D., (2015) Spent coffee grounds : A review on current research and future prospects, trends in food science & technology , doi :10.1016/j.tifs.2015.02.012.
16. Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., Vergara-Castañeda, H.A. et al. (2015). Spent coffee grounds: a review on current research and future prospects. *Trends in Food Science and Technology* 45 (1): 24–36.
17. Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D. et al. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International* 77 (2): 156–161.
18. Carassou, F. (2015). une récupération spécifique du marc de café aurait-elle une plus-value pour la communauté? cas de l'île de montréal. Université de Sherbrooke. O
19. Cervera Mata, A., Martín García, J. M., Delgado Calvo-Flores, R., Párraga Martínez, J. F., Sánchez Marañón, M., & Delgado Calvo-Flores, G. (2019). Short-term effects of spent coffee grounds on the physical properties of two Mediterranean agricultural soils.
20. Consoglobe , 2013 , 7 astuces pour réutiliser le marc de café
21. Crueger, W & Crueger, A. 2003. Stabilization of enzyme and cells. In: *Biotechnology, A text book of industrial microbiology II* nd Ed. Panima Publishing corp, New Delhi., :212-217
22. Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P.; Morais & Casal, S. (2012). Espresso coffee residues: a valuable source of unextracted compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(32), 7777-7784.
23. Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., ...& Casal, S. (2012). Espresso coffee residues: a valuable source of unextracted compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(32), 7777-7784.

24. Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD (2012) The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13:414–43
25. Di Pietro A., Madrid M. P., Caracuel Z., Delgado-Jarana J., Roncero M. I. G. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol. Plant Pathol.* 4:315–325 .
26. Doss, A& Anand, SP. 2012. Purification and characterization of extracellular amylolytic enzyme from *Aspergillus* species. *Afr. J. Biotechnol.* 11(83): 14941-14945.
27. Esposito, E., & Silva, M. D. (1998). Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Critical reviews in microbiology*, 24(2), 89-98.
28. Esquivel, P. and Jiménez, V. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* 46 (2): 488–495
29. García-Gutiérrez, N., Maldonado-Celis, M.E., Rojas-López, M. et al. (2017). The fermented non-digestible fraction of spent coffee grounds induces apoptosis in human colon cancer cells (SW480). *Journal of Functional Foods* 30: 237–246.
30. Hamilton, LM; Kelly, CT & Fogarty, WM. 1998. Raw starch degradation by the non-raw starch-absorbing bacterial alpha amylase of *Bacillus* sp. *IMD.* 434. *Carbohydrates resources.* 314: 251-257.
31. Harman, G. E. (2001). *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. *Deuteromycetes, Moniliales* (asexual classification system). *Biological Control: A guide to natural enemies in North America.* Cornell University. Disponible en: <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol>.
32. Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.
33. Harman, G.E. (2006). "Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp". *Phytopathology.* 96 (2): 190–194
34. hi, Z; Liu, G; Wang, F; Ju, L & Zhang, T. 2009. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv.* 27:423-431.
35. Houfani, A. A., Větrovský, T., Navarrete, O. U., Štursová, M., Tláškal, V., Beiko, R. G., ...& Jorquera, M. A. (2019). Cellulase– Hemicellulase Activities and Bacterial Community Composition of Different Soils from Algerian Ecosystems. *Microbial ecology*, 77(3), 713-725

36. Infantino, A., Zaccardelli, M., Costa, C., Ozkilinc, H., Habibi, A., & Peever, T. (2016). A new disease of grasspea (*Lathyrus sativus*) caused by *Ascochyta lentis* var. *lathyri*. *Journal of Plant Pathology*, 541-548.
37. Janissen, B. and Huynh, T. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: a review. *Resources, Conservation and Recycling* 128: 110–117.
38. Jeleń, H., Błaszczak, L., Chełkowski, J., Rogowicz, K., & Strakowska, J. (2014). Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycological Progress*, 13(3), 589-600.
39. Jenkins, R.W., Stageman, N.E., Fortune, C.M. et al. (2014). Effect of the type of bean, processing, and geographical location on the biodiesel produced from waste coffee grounds. *Energy and Fuels* 28 (2): 1166–1174.
40. Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S., and Rufián-Henares, J.A. (2015). Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant
41. Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S., and Rufián-Henares, J.A. (2015). Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT Food Science and Technology* 61 (1): 12–18.
42. Kondamudi, N., Mohapatra, S. K., & Misra, M. (2008). Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(24), 11757-11760.
43. Korish M. (2003). Production, purification, properties and application of the cellulose From a wild type strain of a yeast isolate. Faculty of biology, Johannes gutenberg-University, mainz, germany.
44. Kovalcik, A., Obruca, S., and Marova, I. (2018). Valorization of spent coffeegrunds: a review. *Food and Bioproducts Processing* 110: 104–119.
45. Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011.
46. Kumar, U., Kumar, B., Bhandari, A., Kumar, Y. (2010). Phytochemical investigation and comparison of antimicrobial screening of clove and cardamom. *International journal of pharmaceutical science and research*. (1).138-147
47. L. M. J. de Carvalho, I. M. de Castro, and C. A. B. da Silva, “A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merrill) by micro- and ultra-filtration,” *Journal of Food Engineering*, vol. 87, no. 4, pp. 447–454, 2008.

48. Leifa, F., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2001). Production of *Flammulina velutipes* on coffee husk and coffee spent-ground. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44, 205–212.
49. M. K. Bhat, “Cellulases and related enzymes in biotechnology,” *Biotechnology Advances*, vol. 18, no. 5, pp. 355–383, 2000
50. M. Karmakar and R. R. Ray, “Current trends in research and application of microbial cellulases,” *Research Journal of Microbiology*, vol. 6, no. 1, pp. 41–53, 2011
51. M. Warzywoda, D. Ballerini et F. Monot, ‘Procédé de Production d’Enzymes Cellulolytiques et Hémicellulolytiques Utilisant les Résidus de Distillation de Fermentation Ethanolique d’Hydrolysats Enzymatiques de Matériaux (Ligno-) cellulosiques’, *Fascicule de Brevet Européen* 2011, 44, 5
52. Ma, L., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., Donnell, K. O., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Kazan, K. *Fusarium Pathogenomics*. *Annu. Rev. Microbiol.* (2013). 67, 399– 416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>.
53. Marcone, M. (2006). *Espresso Coffee—The Science of Quality*, Andrea Illy, Rinantonio Viani (Eds.), Elsevier Academic Press (2005), ISBN: 0-12-370371-9.
54. Mohamed amine BEDRANE. Le genre *Trichoderma* <https://agronomie.info/fr/le-genre-trichoderma/>
55. Murthy, P.S. & Naidu, M.M. (2010a). Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. Utilizing coffee by-products. *Food Bioprocess Technology*, doi:10.1007/s11947-010-0331-7.
56. Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P. A., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A. (2011b). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 368–374.
57. Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Carneiro, L. M., & Teixeira, J. A. (2012). Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy*, 92, 763–768.
58. Mussatto, S. I., Machado, E. M., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 661.
59. N. Eloutassi , B. Louaste , L. Boudine et A. Remmal . (2014). Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération . 17 N°4 :600 – 609].

60. Ogunmolu, F. E., Kaur, I., Pasari, N., Gupta, M., & Yazdani, S. S. (2018). Quantitative multiplexed profiling of *Penicillium funiculosum* secretome grown on polymeric cellulase inducers and glucose. *Journal of proteomics*, 179, 150-160.
61. ONOFRE, Sideney Becker, et al. Production of cellulases by the endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. *J. Microbiol. Res*, 2013, 3.4: 131-134.
62. Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Mayayo, E., & Di Pietro, A. (2004). *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infection and immunity*, 72(3), 1760-1766.
63. Pandey, A; Nigam, P; Soccol, CR; Soccol, VT; Singh, D & Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*. 31(2):135-152.
64. Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, 31(2), 135-152.
65. Pitt J. I., Hocking A. D. (1997). *Fungi and food spoilage* (2e ed.). Blackie Academic & Professional, London.
<http://www.univbrest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Les+fiches+pratiques/fusaoxys>
66. Prakash, O& Jaiswal, N. 2009. Alpha-Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*. 160(8):2401-2414
67. Prescott, Harly. (2002). *Laboratory Exercises in Microbiology* Fifth Edition.
68. R. Chander Kuhad, G. Mehta, R. Gupta, and K. K. Sharma, "Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*," *Biomass and Bioenergy*, vol. 34, no. 8, pp. 1189–1194, 2010
69. Rinantonio Viani , Andrea Illy 2005 *Espresso Coffee: The Science of Quality* chapter 2 ,17
70. SALAZAR-LÓPEZ, Norma Julieta, et al. Health Benefits of Spent Coffee Grounds. *Food Wastes and By-products: Nutraceutical and Health Potential*, 2020, 327-351.
71. Saldaña-Mendoza, S. A., Ascacio-Valdés, J. A., Palacios-Ponce, A. S., Contreras-Esquível, J. C., Rodríguez-Herrera, R., Ruiz, H. A., ... & Aguilar, C. N. (2020) Use of wastes from the tea and coffee industries for the production of cellulases using fungi isolated from the Western Ghats of India. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 1-9.]

72. Sampaio, A., Dragone, G., Vilanova, M., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground. *LWT – Food Science and Technology*, 54(2), 557–563.
73. Samuels, G. J., Ismaiel, A., Mulaw, T. B., Szakacs, G., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., & Jaklitsch, W. M. (2012). The Longibrachiatum clade of Trichoderma: a revision with new species. *Fungal diversity*, 55(1), 77-108.
74. Santamaria, RIG; Delrio, G Saab; Rodriguez, ME; Soberan, X & Lpezmumguia, A.1999. Alcoholysis reactions from starch with alpha amylases. *FEBS Lett.* 45: 346 - 350
75. Scully, D. S., Jaiswal, A. K., & Abu-Ghannam, N. (2016). An investigation into spent coffee waste as a renewable source of bioactive compounds and industrially important sugars. *Bioengineering*, 3(4), 33.
76. Sendzikiene, E., Makareviciene, V., Janulis, P., & Kitrys, S. (2004). Kinetics of free fatty acids esterification with methanol in the production of biodiesel fuel. *European journal of lipid science and technology*, 106(12), 831-836.
77. Seogchan Kang, Jill Demers, Maria del Mar Jimenez-Gasco, and Martijn Rep(2014) Chapter Fusarium oxysporum from book Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens (pp.99-119)
78. SEPULVEDA-RIVERA, Jessica, et al. Biological activity of lipids extracted from two isolates of Fusarium oxysporum (environmental and clinical) in Galleria mellonella. *American Journal of Chemistry and Application*, 2020, 7.1: 1-7.
79. Shah, M. M., & Afiya, H. (2019). Introductory Chapter: Identification and Isolation of Trichoderma spp.-Their Significance in Agriculture, Human Health, Industrial and Environmental Application. In *Trichoderma-The Most Widely Used Fungicide*. IntechOpen.
80. Silva, M. A., Nebra, S. A., Machado Silva, M. J., & Sanchez, C. G.(1998). The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. *Biomass and Bioenergy*, 14, 457–467
81. Singleton, A. H., Oukaci, R., & Goodwin, J. G. (1999). U.S. Patent No. 5,939,350. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
82. T. R. Dhiman, M. S. Zaman, R. R. Gimenez, J. L. Walters, and R. Treacher, “Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding,” *Animal Feed Science and Technology*, vol. 101, no. 1–4, pp. 115–125, 2002

Références Bibliographiques

83. Tiwari, S. P., Srivastava, R., Singh, C. S., Shukla, K., Singh, R. K., Singh, P., ...& Sharma, R. (2015). Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *J Global Biosci*, 4, 1886-1901.
84. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.
85. Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555-559.7
86. Madigan M.T., Martinko J.M., 2007. *Biologie des microorganismes*. 11^{ème} édition. Pearson Education. Broek. France. pp. 478; 479.

Annexes

Annexe 1 : Préparation des milieux de culture

➤ L'extrait de pomme de terre

-500g de pomme de terre

-3 litres d'eau distillé

➤ Gélose à base d'amidon

-10 g d'amidon

-500 ml d'extrait de pomme de terre

-10 g agar

➤ Gélose à base de cellulose

-10 g de cellulose

-500 ml d'extrait de pomme de terre

-10 g agar

➤ Gélose à base de gélatine

-10 g de gélatine

-500 ml d'extrait de pomme de terre

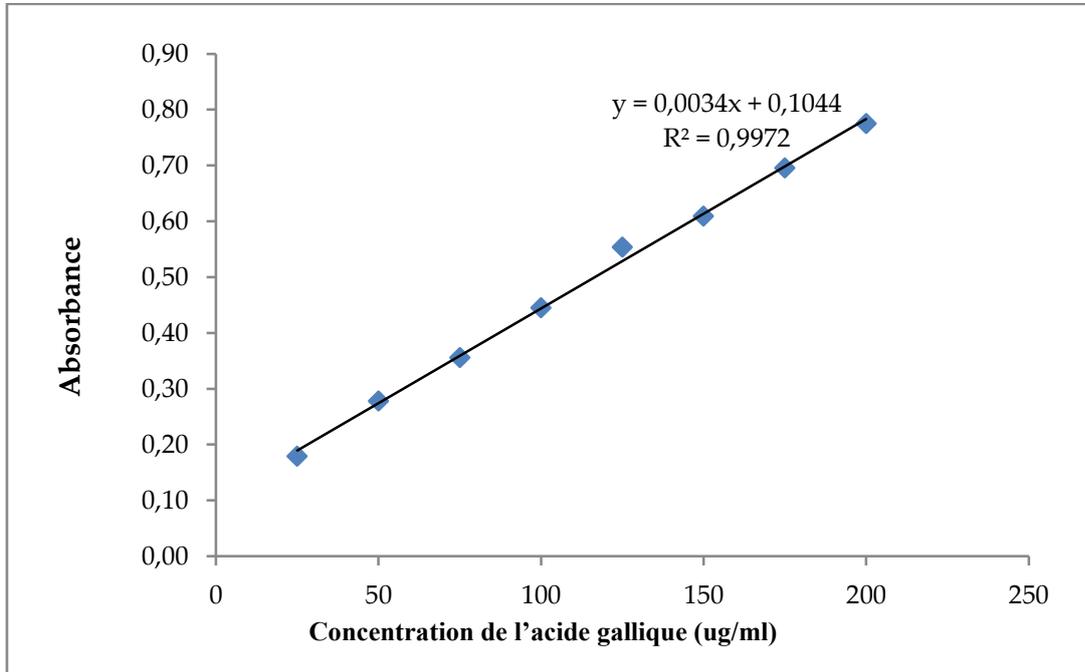
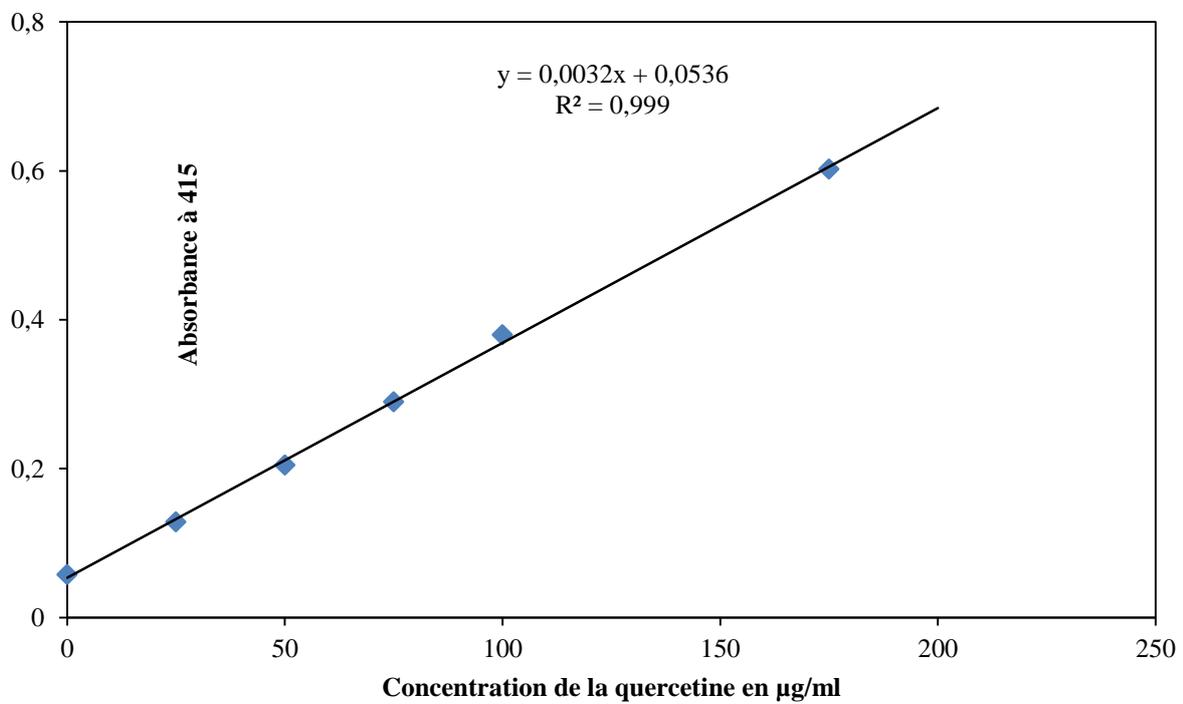
-10 g agar

➤ Milieu liquide à base d'amidon

-10 g de d'amidon

-50 ml d'extrait de pomme de terre pure

Tous les milieux sont autoclavés à $120 \pm 1^\circ \text{C}$ pendant 20 min

Annexe 02 ; Courbes d'étalonnage**Courbe d'étalonnage des phénols totaux****Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux**

Résumés

Résumés

Ce travail s'intéresse à la valorisation d'un résidu agroalimentaire étant le marc du café, comme un substrat de base pour la production des enzymes à intérêt industriel à l'instar des cellulases, des amylases et des protéases. La mise en évidence de la production de telles enzymes est testée chez les souches fongiques : *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma sp.*, *Ascochyta lentis* et *Ascochyta pisi*. A cet égard, une première partie est portée sur l'analyse de la composition chimique du marc du café. La deuxième partie est portée sur la sélection de la meilleure souche performante vis-à-vis les différentes activités enzymatiques sur un gélose PDA. *Trichoderma sp.* est retenue comme la souche la plus performante quant à l'activité amylolytique et cellulolytique. Un pH entre 5 et 7, et une température de 25° C sont considérés optimaux pour la production de l'amylase sur un milieu liquide à base d'amidon.

Mots clés : Marc du café, valorisation, Amylase, cellulase, Protéase, fermentation

Abstract

This work is interested in the valorisation of an agro-food residue which spend coffee grounds, as a basic substrate for the production of enzymes of industrial interest such as cellulases, amylases and proteases. The demonstration of the production of such enzymes is tested in fungal strains: *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma sp.* *Ascochyta lentis* and *Ascochyta pisi*. In this regard, a first part focuses on the analysis of the chemical composition of spend coffee grounds. The second part focuses on the selection of the best performing strain with respect to the different enzymatic activities on a PDA agar. *Trichoderma sp.* is selected as the best performing strain in terms of amylolytic and cellulolytic activity. A pH between 5 and 7, and a temperature of 25 °C are considered optimal for the production of amylase in liquid media based on starch.

Key-words: Spend Coffee grounds, valorisation , Amylase, cellulose , Protease, fermentation

تلخيص

يهتم هذا العمل بإعادة استعمال مخلفات الأغذية الزراعية التي هي تفل القهوة ، كركيزة أساسية لإنتاج الإنزيمات ذات الأهمية الصناعية مثل السليلولاز والأميلاز والبروتياز. يتم اختبار إنتاج هذه الإنزيمات في سلالات فطرية: *Fusarium* ، *Ascochyta lentis* ، *Trichoderma sp* ، و *Ascochyta pisi*. في هذا الصدد ، يركز الجزء الأول على تحليل التركيب الكيميائي لتفل القهوة . يركز الجزء الثاني على اختيار السلالة الأفضل أداءً فيما يتعلق بالأنشطة الأنزيمية المختلفة على agar PDA. تم اختيار *Trichoderma sp* كأفضل سلالة أداءً من حيث النشاط الأنزيمي الأميلازي و السليلوزي . تعتبر درجة الحموضة بين 5 و 7 ودرجة الحرارة 25 درجة مئوية هي الأمثل لإنتاج الأميلاز في وسط مائي يحتوي على النشاء

الكلمات المفتاحية: تفل القهوة ، تدوير ، الأميلاز ، السليلاز ، البروتياز ، تخمر

Université Des Frères Mentouri Constantine
Faculté des sciences Exactes et sciences de la Nature et de la vie

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : mycologie et biotechnologie microbienne

Nom : GUIDJATI, ZATAR , DJEDJEH

Date de soutenance : 28/09/2020

Prénom : Alla, Moncef, Badis

Intitulé

Valorisation du marc de café dans la culture des mycètes

Résumé

Ce travail s'intéresse à la valorisation d'un résidu agroalimentaire étant le marc du café, comme un substrat de base pour la production des enzymes à intérêt industriel à l'instar des cellulases, des amylases et des protéases. La mise en évidence de la production de telles enzymes est testée chez les souches fongiques : *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma sp.*, *Ascochyta lentis* et *Ascochyta pisi*. A cet égard, une première partie est portée sur l'analyse de la composition chimique du marc du café. La deuxième partie est portée sur la sélection de la meilleure souche performante vis-à-vis les différentes activités enzymatiques sur un gélose PDA. *Trichoderma sp.* est retenue comme la souche la plus performante quant à l'activité amylolytique et cellulolytique. Un pH entre 5 et 7, et une température de 25° C sont considérés optimaux pour la production de l'amylase sur un milieu liquide à base d'amidon.

Mots clés : Marc du café, valorisation, Amylase, cellulase, Protéase, fermentation

Laboratoires de recherche :

*Laboratoire de mycologie, CRBt ;

*Laboratoire d'analyse et contrôle qualité, CRBt ;

*Laboratoire de Biochimie, CRBt.