

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche



Scientifique

Université des Frères Mentouri

Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biochimie

Mémoire présenté en vue d'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Optimisation de la production de la protéase de *Candida sp.* Cultivé en FMS

- *Soutenu le* : 23-09-2021
- *Présenté par* : ABDELMOUMENE Rania
AMEUR Fatima Zahra

- **Jury d'évaluation :**

Présidente de jury : Bennamoun L.

M.C.B, Université Frères Mentouri 1.

Encadreur : Dakhmouche S.

M.C.A, ENS Assia Djebar, Constantine.

Examinatrice : Labbani F. Z.K.

M.C.B, ENS Assia Djebar, Constantine.

Année universitaire : 2020/2021



Remerciements

Avant toute chose

Nous remercions DIEU

Le tout puissant, l'omniscient et le miséricordieux
De nous avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.

Nous rendons un vibrant hommage aux jurys de ce mémoire qui
ont accepté de juger ce travail.

Avant d'entamer ce présent rapport

Nous profitons de cette occasion pour remercier tout d'abord notre formatrice Mme **DAKHMUCHE. S** qui n'a pas cessé de nous encourager pendant la durée de formation ainsi pour sa générosité en matière de formation et d'encadrement.

Egalement ; nous remercions Mme **BENNAMOUNE. L** pour ses précieux conseils, sa bienveillance et son soutien tout au long de la réalisation de notre mémoire.

Un merci particulier à l'examinatrice de ce mémoire Mme **LABBANI.F.Z.K** pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.

Enfin nous tenons à remercier tout le personnel du département de biochimie pour leurs sympathies et leurs gentilleses.



Dédicace

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents :

*Mon père DJAMEL et ma mère RAKIA que je chéris tant,
et à qui le mérite revient pour tout l'amour et l'aide qu'ils
m'ont apporté.*

À mon frère ZINE EDINNE ; je t'aime Énormément

*A mes sœurs : NOUSSEIBA, IKRAM, MALAK je bien
souhaite d'être un bon exemple pour vous*

A Mon oncle AMEUR NOUREDINNE qui m'a bien aider

A mon grand-père SADEK

*Je remercie énormément mon amie, ma sœur et ma
jumelle : RAOINAK*

*A mon amie RANIA, ma binôme, merci beaucoup pour le
soutien moral que tu m'as apporté pendant
le temps de travail, je t'aime ma chérie.*

*A toutes mes amies sans exceptionnelle surtout KENZA et
LINA.*

Fatima Zahra



Dédicace

Louange à Allah le miséricordieux

A mes très chers parents SOUAD et MUSTAPHA

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

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

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

Mes sœurs bien-aimées :

*MOUNI tu me fais toujours sentir que tu es derrière moi et
que tu crois en moi*

Et ZEINEB merci pour ton soutien et encouragements.

*Un grand remerciement à ma chère tante SAMEH que
j'aime trop.*

A tous ceux qui m'ont enseignés un jour.

Je remercie tout particulièrement

*FATIMA, ma partenaire de mémoire, ma binôme, mon
amie... sans elle, je ne serais pas en mesure de créer cette
thèse.*

Je dédie ce travail à vous tous.

RANIA

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale	

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Levures	1
1. Généralités sur les levures	1
2. Taxonomie du modèle biologique	1
3. Caractérisations des levures	2
3.1. Caractéristiques constantes	2
3.2. Caractéristiques variables	3
3.3. Caractéristiques génétiques	3
3.4. Caractéristiques biologiques	3
4. Utilisations industrielles des levures	5
Chapitre 2 : Etude de protéases	7
1. Généralités sur les enzymes	7
2. Protéases	8
2.1. Classification de protéases	9
2.1.1. Exopeptidases	10
2.1.1.1. Aminopeptidases	10
2.1.1.2. Carboxypeptidases	10
2.1.2. Endopeptidases	10
2.1.2.1. Serine protéases	10
2.1.2.2. Cysteine/ thiol protéases	11
2.1.2.3. Métalloprotéases	11
2.1.2.4. Aspartique protéases	11
2.2. Sources de protéases	12

2.2.1.	Sources d'origine animale	12
2.2.2.	Sources d'origine végétale	12
2.2.3.	Sources d'origine microbienne	13
2.2.3.1.	Protéases des bactéries	13
2.2.3.2.	Protéases des champignons	13
2.3.	Utilisation de protéases dans l'industrie.....	14
2.3.1.	Industrie des détergents	14
2.3.2.	Industrie du cuir	15
2.3.3.	Industrie alimentaire	15
2.3.4.	Industrie laitière	16
2.3.5.	Industrie de la boulangerie.....	16
2.3.6.	Fabrication de sauce de soja	16
2.3.7.	Attendrissement de la viande	17
2.3.8.	Industrie brassicole	17
2.3.9.	Industrie pharmaceutique	17
Chapitre 3 : Production de protéase		19
1.	Déchets agroalimentaires utilisés	19
1.1.	Pain	19
1.2.	Tomate	20
1.2.1.	Généralités	20
1.2.2.	Production de tomate en Algérie	22
1.2.3.	Déchets de tomate	22
1.2.4.	Utilisation de déchets de tomates	23
2.	Fermentation	24
2.1.	Fermentation liquide (FML)	24
2.2.	Fermentation solide (FMS)	24
2.2.1.	Avantages et inconvénients	24
2.2.2.	Milieu de culture	25
2.2.2.1.	Glucose	26
2.2.2.2.	Azote	26
2.2.2.3.	Minéraux ; oligéléments et vitamines	26
2.2.3.	Température et pH	27
3.	Optimisation de production des protéases ;.....	27
3.1.	Optimisation par génie génétique	28

3.2.	Optimisation du milieu de fermentation par approche statistique	28
3.2.1.	One Factore At-a- Time (OFAT)	28
3.2.2.	Plan de Box et wilson	28
3.2.3.	Plan de Box et Behnken	28
3.2.4.	Plan de Plackett et Burman	29

Matériel et méthode

1.	Matériel biologique	32
1.1.	Isolement de la souche	32
1.2.	Identification de la souche	32
1.3.	Préparation de l'inoculum	32
1.3.1.	Préparation de la suspension cellulaire	32
1.3.2.	Dénombrement des cellules	33
2.	Méthode de fermentation	33
2.1.	Milieux de culture	33
2.1.1.	Fermentation solide	33
2.1.2.	Fermentation liquide	34
2.2.	Ensemencement des milieux	35
2.2.1.	Milieu liquide	35
2.2.2.	Milieu solide	35
2.3.	Extraction enzymatique	36
2.3.1.	Milieu solide	36
2.3.2.	Milieu liquide.....	36
3.	Méthode analytique	36
3.1.	Détermination de la matière sèche	36
3.2.	Effet du pH sur la production de protéase	37
3.3.	Dosage des protéines (Lowry 1951)	37
3.4.	Dosage de l'activité protéolytique	37
4.	Optimisation protéolytique	37
4.1.	Plan d'expérience de Blackett et Bruman	38
4.2.	Plan composite centré de Box et Wilson.....	38

Résultats et discussion

1. Identification de la souche	40
2. Production de protéase	40
2.1. Fermentation liquide.....	41
2.2. Fermentation solide	42
2.3. Effet de pH.....	42
2.4. Effet de substrat	43
2.5. Conclusion partielle	44
3. Optimisation des conditions de culture pour la production de protéase par les méthodes statistiques.....	44
3.1. Plan statistique Plackeet et Burman.....	44
3.1.1. Analyse des résultats.....	46
3.1.1.1. Effet de de température	47
3.1.1.2. Effet d’humidité.....	48
3.1.1.3. Effet de l’inoculum.....	48
3.1.1.4. Effet de glucose.....	48
3.1.1.5. Effet de corn steep liquore.....	48
3.1.1.6. Effet des sels (Sulfate d’ammonium et NaCl).....	49
3.1.1.7. Effet de temps d’incubation.....	49
3.1.2. Graphique de pareto.....	49
3.1.3. Conclusion paratielle.....	50
3.2. Optimisation de productin de protéase selon le plan de composite centré.....	51
3.2.1. Détermination des interactions entre les variables	54
3.2.2. Graphique de pareto.....	57
Conclusion générale	65
Références bibliographiques.....	67
Annexes.....	76
Résumés.....	83

Liste des figures

Figure 01: Schéma général d'une cellule de levure	3
Figure 02 : Reproduction sexuée d'une levure.....	4
Figure 03 : Observation microscopique de cellules en bourgeonnement.....	4
Figure 04: Reproduction asexuée d'une levure.....	5
Figure 05: Structure de protéase.....	9
Figure 06 : Classification des protéases	29
Figure 07: Plan de Plackett-Burman pour 12 expériences et 11 facteurs.....	30
Figure 08: Milieu de culture de FMS.....	33
Figure 9 : Préparation de milieu de culture de FML.....	34
Figure 10 : Milieu de culture de FML.....	34
Figure 11: Ensemencement des milieux de production	35
Figure 12 : incubateur à agitateur.....	36
Figure 13 : Extraction de l'enzyme.....	36
Figure 14: Détermination de la matière sèche	36
Figure 15 : Galerie API 32 C.....	40
Figure 16 : Production protéolytique sur milieu liquide.....	40
Figure 17 : Production protéolytique sur milieu solide.....	41
Figure 18 : Représentation de Pareto des effets des différents facteurs sur la production de protéase.....	45
Figure 19 : Courbes de contour (1) et la surface de réponse (2).....	56
Figure 20: Représentation de Pareto des effets des facteurs sur la production de protéase...57	
Figure 21 : Valeurs optimales des variables et de la réponse déterminées par « RSM » pour une meilleure activité protéolytique.....	59

Figure 22 : Comptage cellulaire.....	70
Figure 23 : Quadrillage de cellule de thomas.....	70
Figure 24 : Courbe étalon pour le dosage des protéines.....	73
Figure 25: Courbe d'étalonnage de la tyrosine.....	75

Liste des tableaux

Tableau 01 : Enzymes industrielles produites par <i>Candida</i>	02
Tableau 02 : Enzymes industrielles produites par les levures (Dakhmouche., 2016).....	08
Tableau 03 : Composition biochimique du pain blanc classique retrouvé sur le marché.....	20
Tableau 04 : Composition chimique des résidus de tomate	24
Tableau 05 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs étudiés dans la matrice de Plackett et Burman.	
Tableau 06 : Matrice de Plakett et Burman pour l'étude de 11 facteurs avec 12 expériences.	
Tableau 07 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan centré de Box et Wilson.	
Tableau 08 : Matrice expérimentale du plan composite pour l'étude de trois facteurs.....	42
Tableau 09 : Activités enzymatiques selon le plan de Plackett et Burman.....	49
Tableau 10 : Analyse statistique des résultats du plan de Plackett-Burman pour la production de protéase.....	50
Tableau 11 : Activités enzymatiques selon le plan de Box et wilson.....	56
Tableau 12 : Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité protéolytique.....	57
Tableau 13 : ANOVA pour l'activité protéolytique.....	59

Liste des abréviations

FMS : Fermentation solide

FML : Fermentation liquide

ATP : Adénosine triphosphate

POU : Protéines d'organismes unicellulaire

SCP : Single celle protéine (protéine unicellulaire)

YPG : Yeast extract-Peptide-Gelose-Agar

Rpm : Rotation par minute

C° : Degré celsius

min : Minute

h : Heure

ml : Millilitre

µl : Microlitre

MS : Matière sèche

CCD : Central Composite Design

PBD : Plackett-Burman Design

pH : potentiel d'hydrogène

P : Probabilité

UI: Unité internationale

ANOVA : Analyse of Variances

The image shows a collection of laboratory glassware on a reflective surface. On the left is a large round-bottom flask containing a clear liquid. In the center is a graduated cylinder with markings at 20, 30, and 40. To the right of the graduated cylinder is a small beaker with markings at 10 and 30. Further right is an Erlenmeyer flask with a white stopper. On the far right, another Erlenmeyer flask is partially visible, containing a clear liquid. The background is a soft, out-of-focus gradient of light blue and purple. The text 'Introduction générale' is overlaid in the center in a black, cursive font.

*Introduction
générale*

Introduction générale

Les enzymes protéolytiques constituent l'un des groupes les plus importants des enzymes industrielles et représentent environ 60% du total marché industriel. Elles sont appliquées dans plusieurs domaines industriels tels que : l'industrie des détergents, du cuir, des aliments et les industries pharmaceutiques. Le marché mondial des enzymes devrait enregistrer un taux de croissance annuel d'environ 7,8% au cours de la période de prévision 2015-2021 (**Sharma et al., 2017**).

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

Certaines caractéristiques rendent la fermentation à l'état solide plus attrayant que la fermentation en immersion : la simplicité, le faible coût, des rendements et des concentrations des enzymes élevées. L'utilisation des résidus agroindustriels disponibles est bon marché. C'est ainsi que plusieurs déchets et sous-produits agroindustriels sont appliqués pour la production des protéases. Cependant, la composition des déchets de tomates indique la présence d'une source très significative de lycopène, de lipides, d'acide ascorbique, de fibres et de protéines (**Al-Muhtaseb et al., 2010**). Aussi les restes du pain contiennent une quantité importante d'amidon qui est facilement hydrolysé en sucres monomères à l'aide d'enzymes et aussi des protéines. Cela permet l'exploitation de ces déchets dans plusieurs domaines, en particulier, l'alimentation animale et la production d'enzymes et de vitamines

Actuellement, les levures, en tant qu'usine cellulaire, sont les sources les plus exploitées dans une large gamme d'applications industrielles biotechnologiques (**Dammak et al., 2016**), en raison de leur thermorésistance avérée et leur caractère non pathogènes (GRAS) (**Sindhu et al., 2009**). De nombreux travaux leur ont été consacrés dont la production de maltase thermostable à partir des espèces *Saccharomycopsis fibuligera* (**Hostinova et al., 2005**) et *Saccharomyces cerevisiae* (**Zhang et al., 2015**) et de l' α -amylase thermostable (**Carvalho et al., 2008**) à partir de *Candida utilis*, *Aureobasidium pullulans* (**Ouédraogo et al., 2012**), *Wickerhamia sp.* (**Hernandez-Montanez et al., 2012**),

Talaromyces pinophilus (Liang *et al.*, 2015) et *Clavispora lusitaniae* (Djekrif, 2016). Dans notre cas, nous allons étudier la production de la protéase par le *Candida sp.*

Dans l'industrie, il ne s'agit pas seulement de sélectionner une souche hautement productrice et de minimiser le coût du processus mais il est aussi nécessaire de déterminer les conditions de culture optimale. Le milieu doit contenir tous les éléments nécessaires à la croissance du microorganisme et à la production des métabolites à savoir les enzymes. Dans ce contexte, différents plans statistiques sont utilisés pour l'amélioration des protéases notamment, les plans de Plackett et Burman pour la sélection des facteurs influençant la production enzymatique et les plans de Box et Wilson (1951) pour l'étude des interactions des facteurs et aussi la détermination de leurs optima.

L'objectif principal de notre travail est :

- Production de la protéase par la levure *Candida sp* P₃ par fermentation en milieu solide (FMS) en utilisant des déchets et des sous-produits comme les restes du pain et les déchets de tomates car riches en glucides et en protéines ce qui permettra une bonne croissance de la levure et donc une bonne production d'enzymes.
- Optimisation de la production de la protéase par l'application des plans statistiques de Plackett et Burman et de Box et Wilson (1951).

Dans cette intention, notre manuscrit comporte deux parties dont la première est une synthèse bibliographique contenant trois chapitres, le premier renferme l'étude des levures protéolytiques, le deuxième porte sur l'étude des protéases et le troisième comprend la production protéasique.

La deuxième partie rapporte la méthodologie adoptée lors de la présente étude, et expose nos résultats obtenus avec discussion. Finalement, on termine par une conclusion générale avec des perspectives.



*Synthèse
bibliographique*

Chapitre 1 : Etude des levures protéolytiques

1. Généralité sur les levures

Une levure est un micro-organisme eucaryote unicellulaire qui appartient au domaine des champignons. La levure définit une catégorie de champignons ascomycètes unicellulaires (Mycéliums et pseudo mycéliums). Et de ce fait, les levures apte à provoquer la fermentation des matières organiques animales ou végétales, elles sont employées pour la fabrication du vin, de la bière, des spiritueux, des alcools industriels, du pain et d'antibiotiques. La forme de levure varie selon l'espèce (sphérique, ovoïde, en bouteille, triangulaire ou apiculée, c'est-à-dire renflée à chaque bout comme un citron) mais généralement ovales, d'environ 6 à 10 microns et jusqu'à 50 microns. Elle se multiplie par bourgeonnement ou par fission (scissiparité). Elle est capable d'accomplir une sporulation soit dans un but de dormance en milieu défavorable, soit dans un but de dispersion (**Web 1**).

Plus de 200 des *Candida sp* ont été décrits, dont la plupart existent sous forme d'organismes saprophytes. *Candida albicans* est l'espèce pathogène la plus connue comme *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* et *C. kefyr*. La taxonomie du genre *Candida* augmente au fil du temps pour être une reclassification de certaines *Candida spp*, par exemple, *Torulopsis glabrata* a été correctement nommé *C. glabrata*, et la découverte de nouvelles espèces telles que *C. metapsilosis*, *C. dubliniensis* La véritable enquête sur les espèces de *Candida* est plus importante, elle a essentiellement une importance pronostique et thérapeutique, fournissant un médicament antifongique immédiat et approprié (**Web 1**).

Les *candida sp* sont les levures impliquées dans la production des nombreuses enzymes comme alpha amylase, lactase, cellulase, lipase et la protéase ils sont utilisés dans les fermentations alimentaires et la fabrication de produits tels que : l'industries alimentaires pour la production de sirop de fructose, dans les industries du diagnostic pour la mesure des fructanes et des inulines (**Acourene et al., 2012**), fromagerie, laiterie (**Toumi., 2018**) (Tableau 01) .

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 01 : Enzymes industrielles produites par *Candida*.

Levure	Enzyme produit	Utilisation	Références
- <i>Candida kefyr</i> . - <i>Candida</i> . <i>Guilliermondii</i> .	Inulinases	Utilisée dans les industries alimentaires pour la production de sirop de fructose et dans les industries du diagnostic pour la mesure des fructanes et des inulines	(Dakhmouche., 2016). (Acourene <i>et al.</i> , 2012). (Gao <i>et al.</i> , 2007).
- <i>Candida boidinii</i> .	Phénylalanine déshydrogénase	Utilisation pharmaceutique	(Dakhmouche., 2016).
- <i>Candida antarctica</i> . - <i>Candida edax</i> .	α -amylase, glucoamylase	Industries alimentaires Panification, Sirops de glucose.	(Kavanagh, 2005). (Ettalibi <i>et al.</i> , 1988). (Moranelli <i>et al.</i> , 1987).
- <i>Candida utilis</i> , - <i>Candida guilliermondi</i> . - <i>Candida famata</i> .	α -amylase	Saccharification de l' amidon Boulangerie, conserve de fruits, textiles, papeterie	(Ouédraogo <i>et al.</i> , 2012).
- <i>Candida lipolytica</i> . - <i>Candida rigosa</i> .	lipase	Fromagerie, laiterie.	(Toumi., 2018). (Dakhmouche., 2016).
- <i>Candida pseudotropicalis</i> .	lactase	Hydrolyse du lactosérum acide	(Toumi., 2018). (Neelakantan <i>et al.</i> , 1999).
- <i>candida sp.</i>	Cellulase	Utilisation thérapeutique pour faciliter la digestion. Utilisation dans la papeterie dans la fabrication des pâtes à papiers.	(Bensmira., 2008).
- <i>Candida lipolytica</i> .	protéase	Sauce de soja, Fromagerie, Panification, Tannerie.	(Neelakantan <i>et al.</i> , 1999). (Thammarongtham <i>et al.</i> , 2001). (Murphy <i>et al.</i> , 2005).

2. Taxonomie du modèle biologique : *Candida sp*

Le *candida albicans* par exemple est un microorganisme qui fait partie de la famille des champignons, habituellement inoffensif et présent depuis toujours sur nos muqueuses, notre peau, ou bien encore dans notre intestin. Lors d'un déséquilibre immunitaire ou hormonal, il prolifère et devient pathogène en libérant des toxines.

Règne : Champignon.

Phylum : Ascomycota.

Subphylum : Ascomycotina

Classe : Saccharomycetes.

Ordre : Saccharomycetales.

Famille : Saccharomycetaceae.

Genre : *Candida*.

3. Caractéristiques des levures

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes, ainsi elles possèdent les caractéristiques structurelles propres à ce type cellulaire et d'autres plus spécifiques aux levures elles-mêmes :

3.1. Caractéristiques constantes

Une paroi cellulaire entourant la membrane plasmique et protégeant la levure des agressions physico-chimiques du milieu extérieur. Elle est constituée d'une couche externe de mannoprotéines, associés à des glucanes et une couche interne de glucanes associés à une petite quantité de chitine.

Un noyau contenant l'information génétique du génome chromosomique de la levure et des mitochondries qui jouent un rôle important dans la respiration aérobie de la levure et la production d'ATP.

Une membrane cytoplasmique composée principalement de phospholipides double couche (partie hydrophile à l'extérieur et partie lipophile à l'intérieur). Elle contient aussi de nombreux complexes protéiques intrinsèques et extrinsèques dont les rôles sont variés. . Les polysaccharides sont des composés fondamentaux dans les parois cellulaires de *Candida spp*, les parois cellulaires de *Candida spp*. Sont composées de mannanes, de glucanes et d'une petite quantité de chitine.

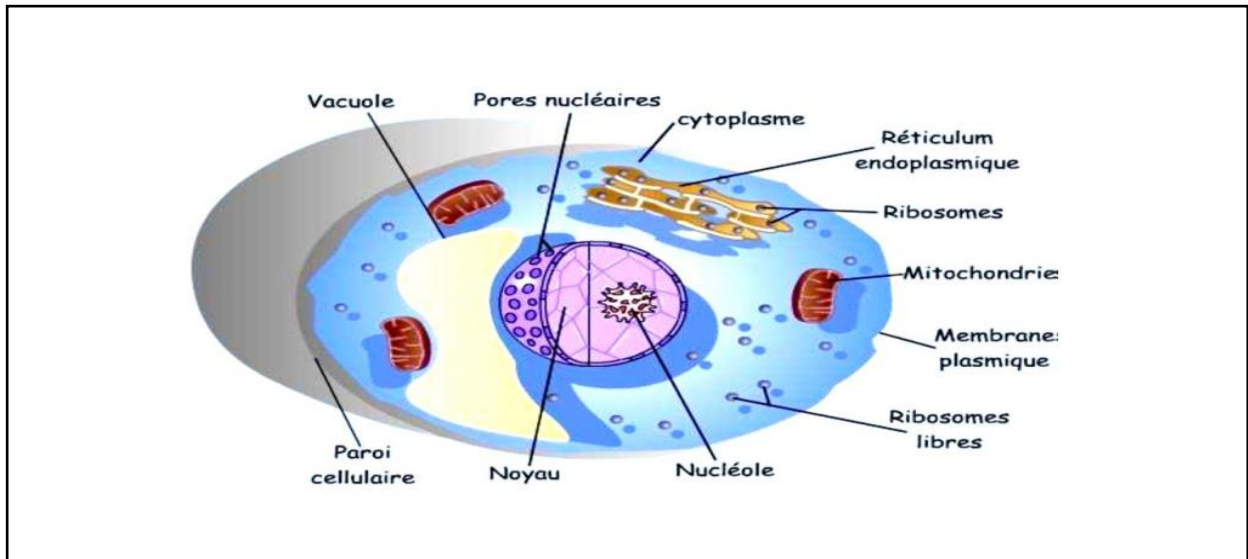


Figure 01 : Schéma général d'une cellule de levure.

3.2. Caractéristiques variables

Une ou plusieurs vacuoles, organites à l'aspect homogène, qui servent d'espaces de stockage pour diverses substances.

3.3. Caractéristiques génétiques

Les levures possèdent un noyau avec des chromosomes linéaires. Chez les *Saccharomyces*, les chromosomes sont au nombre de 16 simples ou 16 paires selon la forme haploïde ou diploïde de la cellule. Il existe des gènes de structure à information continue comme chez les bactéries, et des gènes à information discontinue (introns et exons) comme chez les organismes supérieurs. Par ailleurs, les gènes de régulation sont spécifiques des levures. Il existe une grande diversité au sein du genre *Candida*. On distingue des espèces haploïdes, comme *Candida glabrata* et des espèces diploïdes, comme *Candida albicans* et *Candida parapsilosis*. Leur nombre de chromosomes est variable : 13 pour *Candida glabrata* et 8 pour *Candida albicans*. Le génome du *candida sp* est entièrement séquencé. Il est organisé en 13 chromosomes nucléaires comportant 5283 gènes totalisant 12,3 millions de paires de bases et comportant chacun un centromère.

3.4. Caractéristiques biologiques

Les levures sont capables de se multiplier selon deux modes différents : le mode sexué et le mode asexué.

- Les ascomycètes qui se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose. Les basidiomycètes qui réalisent une

reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside. Les deutéromycètes regroupent l'ensemble des levures ne présentant pas de mode connu de reproduction sexuée.

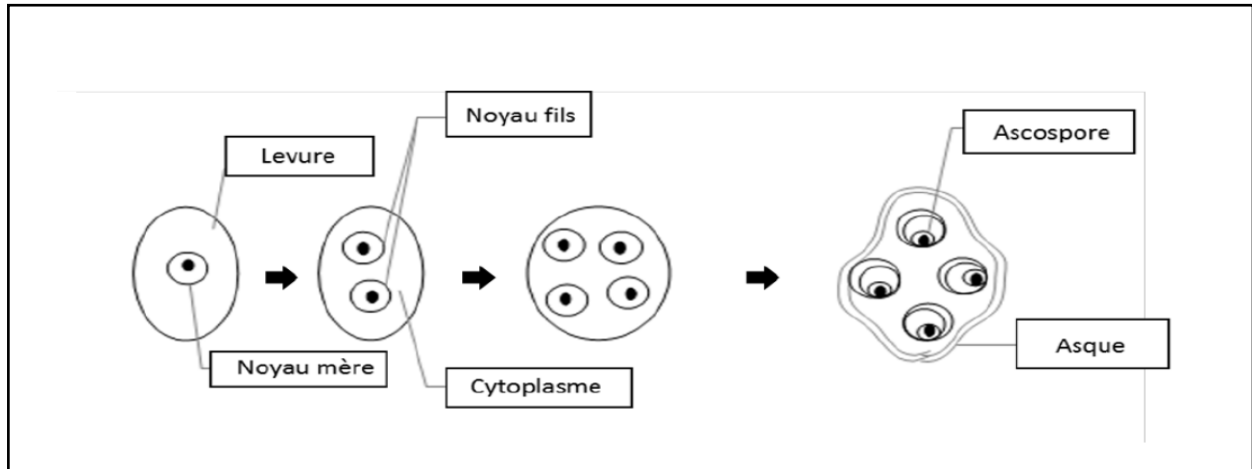


Figure 02 : Reproduction sexuée d'une levure.

- Pour la plupart des levures, la multiplication asexuée (mitotique) est la forme majeure de multiplication. Il existe 2 types de division mitotique, chez les levures : par bourgeonnement (cas des *Saccharomyces*), ou par scission (cas des *Schizosaccharomyces*). Une petite hernie apparaît en un point de la surface d'une cellule mère, grossit et s'étrangle ; le bourgeon ou la cellule fille peut alors se détacher, grossir encore, bourgeonner à son tour. L'état unicellulaire est facile à réaliser en milieu liquide agité, mais en milieu solide le bourgeonnement donne naissance à des thalles buissonnants, formés de cellules levuriennes bout à bout qui, par accumulation, forment des colonies visibles à l'œil (Web 1).

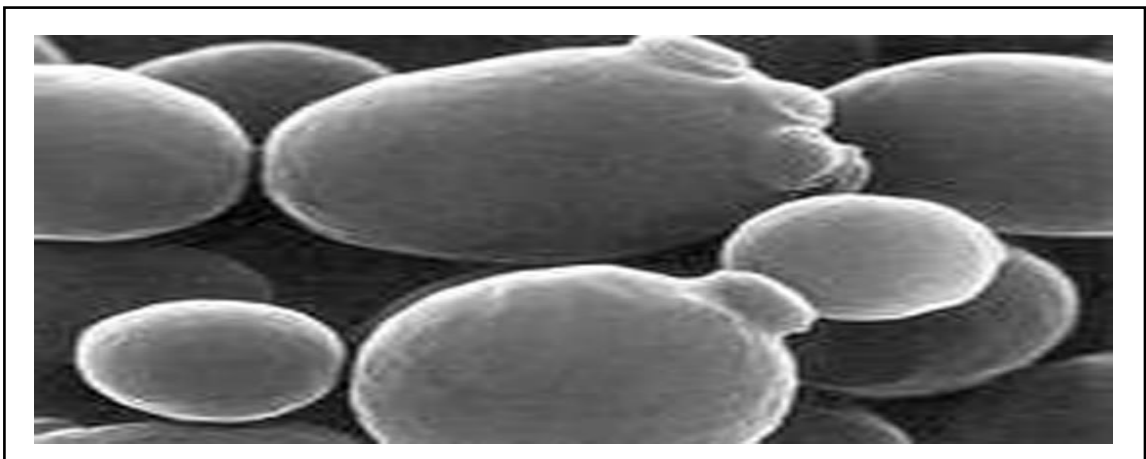


Figure 03 : Observation microscopique de cellules en bourgeonnement.

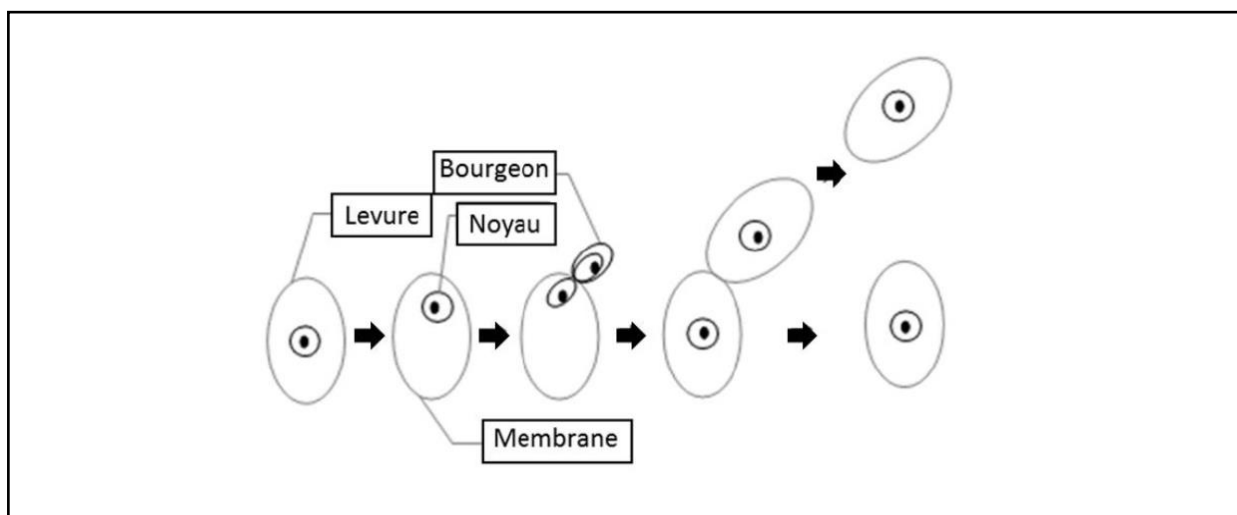


Figure 04 : Reproduction asexuée d'une levure.

Les espèces de *Candida* ont non seulement développé des modes distincts de reproduction sexuée, mais utilisent souvent des processus sexuels pour d'autres fonctions associées à leurs divers modes de vie. Dans plusieurs cas, il existe maintenant des observations directes liant les mécanismes liés à l'accouplement à la pathogénèse, en particulier en ce qui concerne leurs rôles dans la filamentation, l'adhésion et la formation de biofilm. Compte tenu de l'importance de ces mécanismes d'infection, l'utilisation pléiotrope des processus sexuels est également susceptible d'être découverte lors de l'analyse de la fonction des gènes « spécifiques à l'accouplement » dans d'autres organismes microbiens.

La colonisation de *Candida sp* apparaissent de couleur crème jaunâtre, grandissent et se développent généralement en trois jours. Le textile de la colonie peut être doux, brillant et frisé, contrôlé par un micro-organisme.

4. Utilisation industrielle des levures

Par rapport aux bactéries, les levures présentent des éléments favorables quant à leur utilisation en biotechnologie. Elles offrent donc une meilleure résistance que les bactéries à ces conditions de stress, en particulier la possibilité à des pH acides (Labrecque, 2003).

Leur utilisation dans l'alimentation a fait de sorte que les levures soient globalement plus connues pour leur efficacité en fermentation industrielle que d'autres micro-organismes. Elles ne sont pas attaquées par des virus (phages), elles sont facilement récupérables grâce à leur grosseur. La stabilité génétique des levures permet aussi une très bonne du procédé et la connaissance de leur physiologie cellulaire facilite leur utilisation (Labrecque, 2003).

Les seuls éléments défavorables, quant à leur utilisation, dans le domaine de la dépollution sont leur croissance relativement lente (120 minutes) par rapport aux bactéries (20 minutes) et le choix limité d'espèces, nous constatons que les nombreux avantages des levures l'emportent sur leurs quelques inconvénients (**Labrecque, 2003**).

Les bonnes connaissances de la biologie moléculaire des levures et la mise au point de techniques de génie génétique, permettant de programmer les levures de façon qu'elles expriment des protéines humaines et animales recombinantes ; constituent une grande réussite des biotechnologies surtout d'intérêt médical (par les productions d'enzymes, d'hormones peptidiques, de facteurs de croissance, d'hémoglobine, de ferritine, l'érythropoïétine, etc.)

Les levures constituent donc une source précieuse de protéines car elles sont le siège d'une biosynthèse protéique très active. Elles sont utilisées à la production de protéines d'organismes unicellulaires (POU) ou "single cell protéins" (SCP), qui sont souvent incorporées à l'alimentation animale et humaine. Cette production peut s'effectuer sur des substrats considérés comme des déchets tels que le lactosérum et les résidus de pâte à papier (**Pol, 1996**).

Les levures constituent une des importantes sources d'enzymes produites commercialement en raison de leurs capacités polyvalentes et de la frugalité de leurs exigences permettant d'obtenir une biomasse importante à bas prix (**Pol, 1996**). En effet, l'invertase ou saccharase sécrétée par diverses levures est utilisée industriellement pour produire du glucose et du fructose à partir de mélasses de betterave ou de cannes à sucre (**Simon & Meunier, 1970**) (Tableau 02).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 02 : Enzymes industrielles produites par les levures (Dakhmouche., 2016).

Enzyme	Levure	Industrie
Chymosin	<i>Klyveromyces sp.</i> <i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	Préparation des aliments
Galactosidase	<i>Saccharomyces sp.</i>	Applications alimentaires
Glutaminase	<i>Zygosaccharomyces rouxii.</i>	Thérapeutique analyse
Inulinases	<i>Cndida sp.</i> <i>Klyveromyces marxianus.</i>	Applications alimentaires
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	Applications alimentaires
Lactase	<i>Candida pseudotropicalis.</i> <i>Klyveromyces sp.</i>	Préparation des aliments
Lipase	<i>Candida rigosa.</i> <i>Pseudozyma antarctica.</i> <i>Trichosporon fermentum.</i> <i>Yarrowia lipolytica.</i>	Préparations des aliments Aromes Dégraissage Biorestauration Thérapeutique détergents
Phenylalanine Ammonialyase	<i>Rhodotorula sp.</i> <i>Rhodosporidium sp.</i>	Pharmaceutique
Phenylalanine Déshydrogénase	<i>Candida boidinii</i>	Pharmaceutique

Chapitre 2 : Etude de protéases

1. Généralités sur les enzymes

De nos jours, les demandes d'enzymes en tant que biocatalyseurs dans divers secteurs augmentent rapidement, en raison de plusieurs avantages tels que l'efficacité (travailler à une concentration plus faible), la sélectivité (positionnelle, chirale et fonctionnelle), les conditions de réaction douces (pH et température plus bas), la modification (peut être modifié pour améliorer l'activité et la stabilité) et la nature respectueuse de l'environnement. Les industries qui consomment la plus grande quantité d'enzymes comprennent les industries de transformation des aliments, les industries des boissons, du textile, du cuir, des biocarburants, des détergents et du papier. Selon **Jemli *et al.*, (2016)**, les hydrolases sont les enzymes industrielles les plus utilisées à ce jour. Parmi ces enzymes (amylase, cellulase, phytase, lipase, chitinase), les protéases reçoivent une attention particulière en raison de leur application potentielle dans diverses industries, notamment les secteurs biotechnologique et médical (**Souza *et al.*, 2015**). Un groupe diversifié de plantes, d'animaux et de microbiotes serait une bonne source d'enzymes. Difficile, les industries s'intéressent aux enzymes obtenues à partir de bactéries et de champignons en raison de leur coût de production faible, de leur nature extracellulaire, de leur disponibilité et de leur stabilité (**Banerjee *et al.*, 2016**). **Subba Rao *et al.*, (2009)** ont déclaré que la valeur approximative des enzymes industrielles était de 220 milliards de dollars en 2009. Les enzymes industrielles produites en vrac nécessitent généralement peu de traitement en aval et sont donc des préparations relativement brutes. L'utilisation commerciale de ces enzymes ne nécessite pas de purification, mais celles utilisées dans les secteurs pharmaceutiques et cliniques nécessitent une pureté élevée.

2. Protéase

Les protéases (EC 3.4) sont capables de catalyser des réactions hydrolytiques qui dégradent les molécules de protéines en peptides, et éventuellement en acides aminés libres; en plus d'effectuer des réactions protéolytiques, les protéases régulent également diverses cascades enzymatiques dans le cadre de cycles métaboliques (par exemple, dégradation des graisses et des glucides) via une attaque sur les zymogènes proenzyme, qui libèrent finalement d'autres enzymes actives à partir de séquences peptidiques plus longues, mais inactives. Les protéases constituent un groupe d'enzymes assez vaste et complexe, qui diffèrent les unes des autres en termes de spécificité de substrat, de nature du site actif et de mécanisme catalytique suivi, ainsi que d'optimums de pH et de température et de stabilité thermique. La spécificité des protéases, en particulier, est régie par le type de résidu(s) d'acides aminés dans leur site catalytique (**Ramos *et al.*, 2017**).

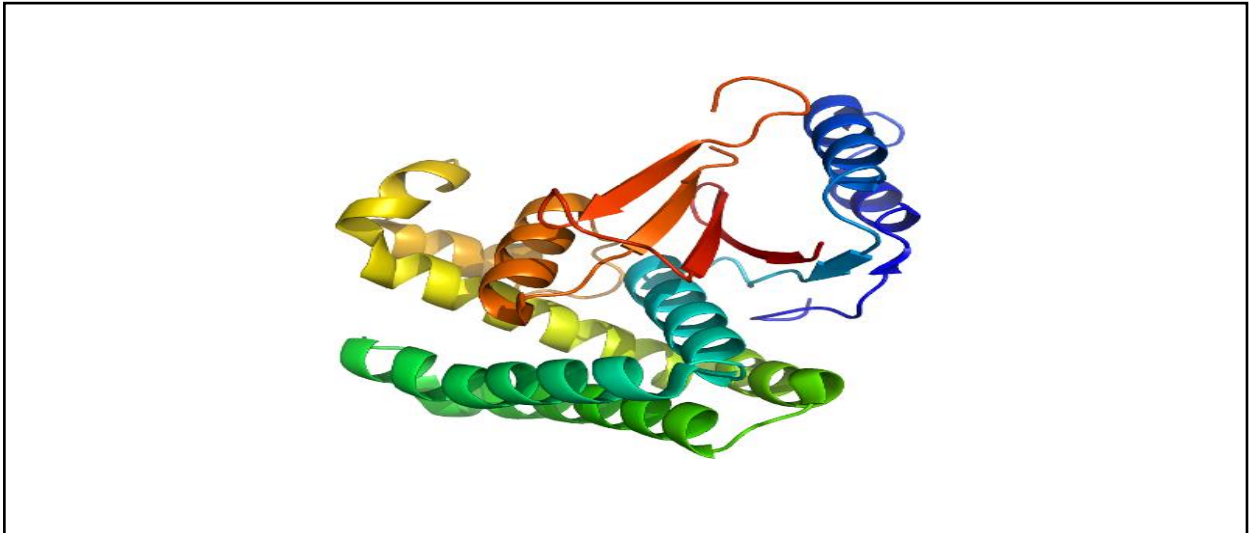


Figure 05 : Structure de protéase (Web 8).

2.1. Classification des protéases

La diversité et la spécificité de ces enzymes indigènes doivent leur large caractérisation. Sur la base du site actif des protéases, elles sont classées en exopeptidases et endopeptidases.

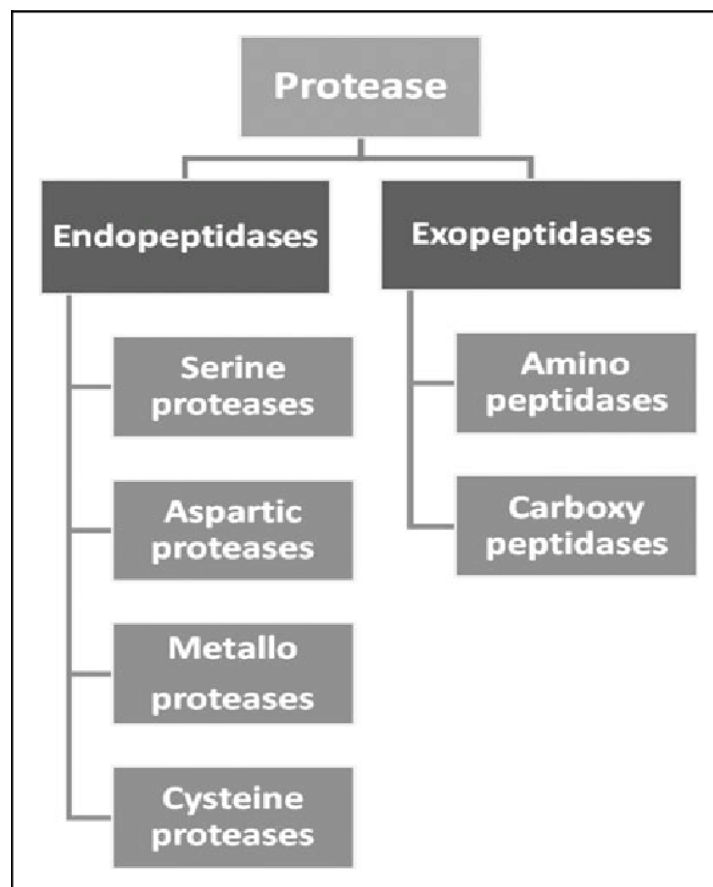


Figure 06 : Classification de protéases.

2.1.1. Exopeptidases

Les exopeptidases catalysent la scission de liaisons peptidiques protéiques distinctives adjacentes aux terminaisons carboxyle ou amino incorporées dans le substrat (**Sani et al., 2017**). Selon leur précision concernant le site d'action soit C ou N terminal, elles sont en outre caractérisées comme deux classes principales de carboxypeptidases ou d'aminopeptidases (**Sawant et al., 2014**).

2.1.1.1. Aminopeptidases

Les aminopeptidases sont biaisées vers l'extrémité N-terminale libre de la chaîne polypeptidique, libérant un résidu tripeptide, dipeptide et un seul acide aminé. Après la reconnaissance, ils s'efforcent d'éliminer la méthionine N terminale qui pourrait être présente dans des protéines, qui sont hétérologues dans leur expression mais pas présentes dans de nombreuses protéines naturelles (matures). Les aminopeptidases sont présentes dans un large éventail de souches microbiennes, notamment des champignons et des bactéries. Dans l'ensemble, les aminopeptidases se comportent comme des enzymes intracellulaires, cependant, un rapport a souligné que les aminopeptidases provenant d'*Aspergillus oryzae* sont des enzymes extracellulaires (**Rao et al., 1998**).

2.1.1.2. Carboxypeptidases

Les carboxypeptidases présentent leurs activités catalytiques à une extrémité C-terminale libre du polymère d'acides aminés avec une libération de dipeptide et d'acides aminés simples. Elles ne sont pas principalement traitées comme des endopeptidases car elles laissent l'acide aminé au niveau d'une protéine cible. Au contraire, ils peuvent être travaillés pour l'élimination des balises ajoutées à l'extrémité C-terminale de la protéine cible. Parmi les métallocarboxyprotéases, la carboxypeptidase de type A élimine principalement la ramification ou la chaîne latérale aromatique comprenant l'enzyme. Alors que le type B est mis en action pour les acides aminés basiques (**Malib et al., 2021**).

2.1.2. Endopeptidases

Les endopeptidases clivent la liaison peptidique à un site distant du substrat (**Sawant et al., 2014**). Influencées par la présence d'un groupe fonctionnel particulier présent sur le site actif, les endopeptidases sont en outre cataloguées comme sérine, aspartique, cystéine et métalloprotéases (**Siroya et al., 2020**), qui sont résumées comme suit :

2.1.2.1.Serine Protéases

Les protéases à sérine jouissent d'une grande diversité dans la nature, se produisant non seulement dans l'ensemble du règne des organismes cellulaires, mais également présentes dans de nombreux génomes viraux. Parmi les enzymes protéolytiques connues, un tiers d'entre elles sont des protéases à sérine. Il s'agit généralement d'endopeptidases dans lesquelles le clivage de la liaison a lieu dans la partie centrale de la chaîne. Certaines d'entre elles sont des exopeptidases, qui détachent les acides aminés de la terminaison de la séquence polypeptidique (**Thakur N *et al.*, 2018**). Leur nom provient du résidu Ser, qui est nucléophile et réside sur le site actif de l'enzyme. Un intermédiaire acyl-enzyme est formé par l'attaque du résidu sérine à l'extrémité carbonyle de la liaison peptidique substrat à venir. Son activité nucléophile est due à la complexe triade des résidus «Asp», «His» et «Ser».

2.1.2.2.Cystéine/Thiol Protéases

Le site actif de cette classe de protéases est constitué de résidus cystéine. Ils ont une origine naturelle à la fois dans les organismes procaryotes et eucaryotes. Le pH optimal pour leur activité protéolytique varie de 6 à 8 et la température optimale est de 50 à 70 °C. Le cyanure d'hydrogène décrit le rôle conséquent dans l'activation de cette enzyme, en raison de la régénération du groupe SH. Les protéases peuvent être inhibées par des agents oxydants et présentent une sensibilité aux agents sulfhydryle, par ex. p-CMB, cependant, ils restent inchangés par les agents chélateurs de métaux (**Malib *et al.*, 2021**).

2.1.2.3.Métalloprotéases

Les métalloprotéases sont principalement des endopeptidases contenant du zinc. D'innombrables ions métalliques, par exemple le cobalt, le calcium et le zinc sont impliqués dans leur réactivation, présents dans les champignons. La plupart des métalloprotéases fongiques et bactériennes possèdent des enzymes contenant du zinc. Le zinc est requis pour leur activité enzymatique et le calcium est essentiel pour la stabilité de la structure des protéines. Ces enzymes ont un pH optimal allant de 5 à 9, et sont sensibles aux agents chélateurs de métaux tels que l'EDTA mais sont insensibles aux inhibiteurs de la cystéine ou au sulfhydryle (**Theron LW *et al.*, 2014**).

2.1.2.4.Aspartique Protéases

Une classe comparativement nominale d'endopeptidases est celle des protéases aspartiques. Structurellement, ces protéases sont bilobées ayant un site catalytique central, qui est composé d'une paire d'aspartates. Ces protéases fonctionnent sur un pH acide et ont montré leur apparition

chez les animaux, les plantes et les micro-organismes. Une gamme de microbes les sécrète sous forme de sécrétions de virulence qui peuvent également être mutualistes pour briser les protéines produisant l'azote dans l'urée et ainsi illustrer la dualité de leur nature. Les protéases aspartiques sont principalement inclinées vers les acides aminés hydrophobes adjacents à la liaison dipeptides. Les deux premières endoprotéases emploient des résidus résidant dans le site actif ayant un attribut nucléophile pour la protéolyse. Alors que les deux derniers exploitent les résidus qui sont importants pour activer les molécules d'eau pour qu'elles subissent les attaques nucléophiles. Certaines protéases diverses ne se trouvent pas dans la classification mentionnée ci-dessus, par exemple, les protéases dépendantes de l'ATP, qui nécessitent de l'ATP pour leur activation (**Souza et al., 2017**).

2.2.Sources de protéases

Les protéases se trouvent presque dans toutes les sources biologiques y compris les plantes, les animaux et les micro-organismes. Elles sont nécessaires à l'accomplissement de diverses fonctions physiologiques.

2.2.1. Source d'origine animale

Les protéases d'origine animale les plus connues sont la trypsine pancréatique, la chymotrypsine, la pepsine et les rénines. Ceux-ci sont fabriqués en grandes quantités dans leur forme la plus pure. La trypsine est un enzyme digestive se trouve dans l'intestin et responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires (**Sharma et al., 2015**).

La chymotrypsine se trouve dans les glandes apocrines du pancréas (animaux). Cette enzyme purifiée est une enzyme coûteuse et utilisée dans les applications analytiques et diagnostiques (**Sharma et al., 2015**).

La présure est une protéase de type pepsine (présure, chymosine) formée dans l'estomac de tous les mammifères allaitants en tant que précurseur inactif : la pro-rennine. Par l'action de la pepsine ou de l'autocatalyse, est converti en renine active. Elle est couramment utilisée dans l'industrie laitière pour créer un caillé savoureux et sain (**Sharma et al., 2015**).

2.2.2. Source d'origine végétale

L'utilisation des plantes comme source de protéases (comprennent : la papaine, la bromélaïne, les kératinases et la ficin) est influencée par la disponibilité des terres pour la culture et l'adéquation des conditions climatiques.

La papaïne est une protéase végétale conventionnelle utilisée depuis longtemps. Elle est fabriquée à partir du latex des fruits de la papaya carica, qui sont originaires de l'Afrique de l'Ouest et du Centre subtropicale, ainsi que l'Inde (**Fekadu et Alemu, 2015**).

La bromélaïne est une protéase végétale obtenue à partir de la feuille, jus, tige et pelure d'ananas. Elle peut contrôler efficacement la croissance des cellules tumorales.

Pour la kératinase, c'est une protéase à large spécificité capable de dégrader les protéines hydrosolubles et insolubles. Elle est capable d'hydrolyser efficacement la kératine en peptides plus petits et en acides aminés, surpassant la plupart des protéases qui ne dégradent pas la kératine. La kératine se trouve généralement dans la fourrure, les plumes, la corne, les sabots et les écailles de poisson. Elle contient une grande quantité de liaisons disulfure réticulées et d'acides aminés hydrophobes formant une structure très serrée, et est très résistante à la protéolyse (**Fekadu et Alemu, 2015**).

2.2.3. Sources d'origine microbienne

Les protéases disponibles aujourd'hui, sur le marché sont obtenues à partir de micro-organismes. Ceci est dû à plusieurs raisons tels qu'un taux de production élevé, l'exigence limitée d'espace de culture, grande diversité biochimique, génétiquement facile pour la manipulation, et des caractéristiques attrayantes qui les rendent approprié pour les applications biotechnologiques.

Les protéases sont isolées de différents microbes comme les champignons, les bactéries et les levures. Celle d'origine microbienne représente environ 40 % de l'ensemble des ventes mondiales d'enzymes (**Kumar Ray, 2017**).

2.2.3.1. Protéase des bactéries

Les protéases bactériennes, qui sont de nature alcaline, ont une importance économique dans différentes industries telles que le cuir, l'industrie alimentaire, de la lessive, de la soie et des détergents en raison de leur activités catalytiques élevées et leur grande capacités de production.

Les protéases bactériennes (alcalines) se distinguent par leur activité plus élevée à un pH (alcalin) de 8 à 12 avec une gamme de températures entre 50 et 70 °C. Parmi les bactéries productrices de protéase alcaline se trouve : *Bacillus subtilis*, *Bacillus alkaloophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus lentus* et *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans* et *Bacillus safensis* (**Sanna et al., 2001**).

2.2.3.2. Protéases des champignons

Les protéases fongiques sont utilisées, en raison, de leur large gamme de spécificité de substrat, stabilité sous les conditions défavorables, la grande diversité et la séparation du mycélium par le processus de simple filtration.

Les protéases produites à partir de sources fongiques ont des avantages supérieurs par rapport aux protéases produites à partir de sources bactériennes et elles sont généralement reconnues comme génétiquement considérées comme des souches sûres (GRAS) (Novelli *et al.*, 2016).

Les champignons producteurs de protéases sont *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus sojae* et *sydomi*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Cephalosporium*, *Fusarium sp*, *Rhizopus* et *Penicillium italicum* (Sharma, 2019).

2.2.3.3. Protéase des levures

Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces* et *Saccharomyces* ; ce dernier peut produire trois types de protéases ; une aspartylprotéase, une sérine protéase et une métalloprotéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (Loudjani et Belmerabet, 2016).

2.3. Utilisation des protéases dans l'industrie

Aujourd'hui, les enzymes sont largement utilisées dans de nombreuses industries biotechnologiques. L'utilisation d'enzymes a créé des opportunités pour le développement d'une chimie industrielle verte, moderne et durable en raison de sa spécificité exceptionnelle, de ses conditions de réaction douces, de son économie, de sa simplicité et de son processus d'économie d'énergie (Banerjee *et al.*, 2017).

Le marché mondial des enzymes devrait atteindre 6700 millions dollars en 2028 à partir de 4012,57 millions dollars en 2020. Environ 75 % du marché industriel des enzymes était occupé par des enzymes hydrolytiques, par exemple la lipase, la protéase et l'amylase. Il a été rapporté que 75 % des enzymes produites industriellement sont utilisées par les principales industries, notamment les détergents (37 %), les textiles (12 %), l'amidon (11 %), la boulangerie (8 %) et l'alimentation animale (6 %) (Banerjee *et al.*, 2017).

2.3.1. Industrie des détergents

Les enzymes sont l'ingrédient le plus important des détergents en poudre et liquides, de l'élimination des taches de lessive, des détergents pour lave-vaisselle automatiques, des produits de nettoyage médicaux. Les protéases sont l'un des ingrédients les plus primordial de toutes sortes de détergents allant du lavage ménager aux réactifs utilisés pour nettoyer les lentilles de. Les enzymes améliorent l'efficacité des détergents pour l'élimination des protéines des vêtements souillés de sueur, d'herbe, de lait, d'œuf, de sang, etc. (**Patel et al., 2018**). Elles sont utilisées pour améliorer la capacité de nettoyage des détergents traditionnels (**Sharma et al., 2017 ; Kumar et al., 2014**) ces enzymes ont une importance industrielle et économique (**Kazan et al., 2005**). Dans l'industrie de la blanchisserie couvrent des parts de marché et représentent environ 25 % des ventes mondiales totales d'enzymes (**Singh et Kumar, 2017**). Des protéases parfois avec des amylases et des lipases sont utilisées pour la formulation de détergent. Il a été rapporté que les protéases en combinaison avec la lipase, l'amylase et la cellulase très efficace de performance des protéases (**Singh et Kumar, 2017**). Pour éliminer les taches des vêtements, les protéases agissent de manière compétente en tant que ciseaux (**Shankar et Laxman, 2015**). En comparaison avec les détergents enzymatiques, les détergents non enzymatiques ne sont pas capables d'éliminer les protéines des vêtements en tant que taches organiques, qui adhèrent fortement aux fibres textiles et deviennent permanentes en raison de l'oxydation et de la dénaturation causées lors des opérations de blanchiment et de séchage. La protéase détergente idéale doit contenir une large activité spécifique au substrat pour l'élimination de différentes taches dues au sang, à la nourriture et à d'autres sécrétions corporelles. La compatibilité avec d'autres composants des détergents comme les agents chélatants et oxydants, l'activité et la stabilité aux pH et aux température élevés sont les caractéristiques impératives des protéases destinées à être appliquées dans les détergents (**Tekin et al., 2012**).

2.3.2. Industrie du cuir

L'utilisation de protéases, comme alternative aux produits chimiques dangereux tels que le sulfure de sodium, s'est avérée efficace pour améliorer la qualité du cuir et réduire la pollution de l'environnement. Les tanneries sont responsables de la pollution de l'environnement. Par conséquent, l'utilisation d'enzymes d'hydrolyse de type protéase dans le traitement du cuir est un processus respectueux de l'environnement qui est moins nocif que d'autres processus (**Kumar et al., 2018 ; Singh et Kumar, 2017**). Le traitement du cuir comprend plusieurs étapes, elles sont le durcissement, le trempage, le chaulage, l'épilage, le battage, le décapage, le dégraissage et le tannage. Les déchets produits, y compris les effluents, au cours de ces processus provoquent une

pollution de l'environnement et des dangers pour l'écosystème. *Novo Nordisk* fabrique trois protéases différentes, à savoir. Aquaderm TM, NUE et Pyrase à utiliser respectivement pour le trempage, l'épilation et le battage (**Patel et al., 2009**). Les mutagènes de *Bacillus licheniformis* N-2 utilisant l'irradiation UV et d'autres mutagènes chimiques produisent une protéase alcaline, qui a une application importante dans le traitement du cuir (**Muhammad et al., 2010**). *Bacillus cereus* 1173900 produit une protéase alcaline par fermentation solide à partir de déchets de l'industrie du cuir (**Ravindran et al., 2011**).

2.3.3. Industrie alimentaire

Dans l'industrie alimentaire, les protéases sont impliquées dans divers processus tels que la cuisson, la fabrication de fromage, l'attendrissement de la viande, la préparation d'hydrolysats de soja (**Srilakshmi et al., 2014**). Les protéases deviennent maintenant un composant important dans notre alimentation et aident à améliorer la valeur nutritionnelle, la digestibilité, la saveur et minimisent les composés allergènes. Les protéases sont utilisées dans la production de sauce de soja, ce qui augmente le rendement en bonne quantité et la valeur nutritionnelle.

2.3.4. Industrie laitière

La principale application des protéases dans l'industrie laitière est la fabrication de fromage. La raréfaction de la présure de veau, enzyme utilisée pour la coagulation du lait lors de la fabrication du fromage, a créé une demande pour un substitut d'origine microbienne. Pendant la phase de maturation du fromage, la protéase est également importante. **Richards et al., (2014)** ont testé une gamme de protéases pour leur capacité à accélérer le processus d'affinage du fromage et ont démontré que les protéases acides et alcalines produisaient des saveurs désagréables.

Dans la fabrication du fromage, la fonction principale des protéases est d'hydrolyser la liaison peptidique spécifique pour générer de la para- κ -caséine et des macro-peptides. La chymosine est préférée en raison de sa haute spécificité pour la caséine, qui est responsable de ses excellentes performances dans la fabrication du fromage. Les protéases produites par les microbes GRAS (considérés génétiquement comme sûrs) tels que *Mucor michei*, *Bacillus subtilis* et *Endothia parasitica* sont utilisées dans la fabrication du fromage. Chymosine d'*Aspergillus niger* var. *awamori* est produite à des niveaux commerciaux (**Richards et al., 2014**).

2.3.5. Industrie de la boulangerie

La farine de blé est un composant majeur des processus de cuisson. Il contient une protéine insoluble appelée gluten, qui détermine les propriétés de la pâte de boulangerie. Les endoprotéinases et les exoprotéinases d'*Aspergillus oryzae* ont été utilisées pour modifier le gluten de blé par protéolyse limitée. Le traitement enzymatique de la pâte facilite sa manipulation et son usinage et permet la fabrication d'une plus large gamme de produits. L'ajout de protéases réduit le temps de mélange et entraîne une augmentation des volumes de pain. Celles d'origine bactériennes sont utilisées pour améliorer l'extensibilité et la résistance de la pâte (**Richards et al., 2014**).

2.3.6. Fabrication de sauce de soja

Le soja est une riche source de nourriture, en raison de sa teneur élevée en protéines de bonne qualité. Les protéases ont été utilisées depuis l'Antiquité pour préparer la sauce de soja et d'autres produits à base de soja. Les protéases alcalines et neutres d'origine fongique jouent un rôle important dans le traitement de la sauce soja. La modification protéolytique des protéines de soja contribue à améliorer leurs propriétés fonctionnelles. Le traitement des protéines de soja avec de l'alcalase à pH 8 donne des hydrolysats solubles avec une solubilité élevée, un bon rendement en protéines et une faible amertume. L'hydrolysate est utilisé dans les boissons gazeuses enrichies en protéines et dans la formulation d'aliments diététiques (**Richards et al., 2014**).

2.3.7. Attendrissement de la viande

Les buffles sont abattus principalement pour leur viande. Les sous-produits des animaux abattus sont également de bonne valeur. Les tripes de bison font partie des abats comestibles les plus importants. L'exploitation commerciale des tripes pour le développement de la fabrication de produits transformés est très limitée en raison de ses propriétés fonctionnelles médiocres et de sa ténacité inhérente due à sa teneur élevée en collagène. Afin d'améliorer la tendreté de la viande, un certain nombre de méthodes ont été essayées. L'attendrissement peut être obtenu en utilisant des enzymes chimiques ou protéolytiques. Enzyme protéolytique, la papaïne est utilisée pour attendrir les coupes de viande dures. La papaïne est très puissante pour hydrolyser les protéines fibreuses et le tissu conjonctif. En général, la pénétration uniforme de l'enzyme attendrissante a toujours posé problème pendant le traitement d'attendrissement (**Richards et al., 2014**).

2.3.8. Industrie brassicole

Les protéases sont également utilisées dans l'industrie brassicole pour éliminer le flou dans l'industrie brassicole (**Nelson et Youno, 1987**). En raison de la présence de certaines protéines

dans la bière, elle semble peu trouble à température de congélation et affecte également la durée de conservation d'une bière. Ainsi, l'élimination de ces protéines de la bière l'aide à paraître plus claire (**Paranthaman et al., 2009**). Les boissons maximales sont faites avec le processus de fermentation par l'utilisation de diverses enzymes. Les protéases comme celle sont ajoutées pendant le processus de fermentation pour solubiliser les protéines des adjuvants d'orge (**Nelson et Youno, 1987**) et pour prévenir la formation de précipités lorsqu'ils sont conservés à basse température.

2.3.9. Industrie pharmaceutique

La grande diversité et la spécificité des protéases sont utilisées avec un grand avantage dans le développement d'agents thérapeutiques efficaces. Les protéases *d'Aspergillus oryzae* (Luizym et Nortase) ont été utilisées comme aide digestive pour certains syndromes de déficit en enzymes lytiques. La collagénase clostridiale ou subtilisine est utilisée en association avec des antibiotiques à large spectre dans le traitement des brûlures et des plaies. Une asparginase isolée d'*E. coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine de la circulation sanguine dans les différentes formes de leucémie lymphoïde. Outre leurs applications industrielles et médicinales, les protéases jouent un rôle important dans la recherche fondamentale. Leur clivage sélectif des liaisons peptidiques est utilisé dans l'élucidation des relations structure-fonction, dans la synthèse de peptides et dans le séquençage de protéines, biopolissage des tissus de laine, et dans la synthèse des protéines (**Richards et al., 2014**).

Chapitre 3 : production de protéase

Le développement de la production industrielle a contribué largement à l'augmentation de la pollution de l'eau, de l'air et du sol par l'agglomération de déchets tels que les déchets de Tomate, restes de pain, son de blé, pelures de banane...etc. Ces déchets ont été longtemps considérés comme des résidus sans valeur des activités de production et de consommation industrielles, mais il est connu aujourd'hui que leur traitement constitue l'enjeu écologique de ce siècle et la mise en place d'une véritable filière économique du traitement des déchets s'impose.

La production d'enzymes industrielle exige des milieux de préparation qui coûte beaucoup, afin de réduire le cout du processus, il serait intéressant d'utiliser les déchets agroalimentaires comme substrat de fermentation. Ceci permettre d'une part de diminuer la pollution de l'environnement et d'autre part de produire des métabolites de haute valeur apoulé destinées à l'étudié.

1. Substrats agroalimentaires utilisés

1.1.Pain

Tous les jours, de très grandes quantités de pain rassis jetées anarchiquement sur les voies publiques et dans les ordures, sont ramassées, en dépit des campagnes de sensibilisation que mènent les différents acteurs dans l'environnement, la société civile et autres (**Web 2**).

Rappelant que les mesures de tri visent à éviter le jet de tonnes de pain dans les ordures, les responsables ont appelé les citoyens à s'abstenir de tout achat excessif, notamment le pain qui finit le plus souvent dans les ordures (**Web 2**).

Une petite partie de reste de pain est réutilisée pour l'alimentation animale et majorité finit dans des décharges qui émettent des gaz à effet de serre, sans parler de l'empreinte carbone associée à sa production en premier lieu (**Southey 2020**).

Maintenant, les scientifiques ont développé un moyen de réutiliser le pain perdu. Qui, selon eux, peut être utilisé comme milieu pour cultiver des bactéries, des levures et d'autres micro-organismes pour les aliments fermentés car riche en nutriments nécessaire à la croissance microbienne et à la production des métabolites.

Le pain possède les caractéristiques d'un substrat idéal pour les fermentations. Il contient une quantité importante d'amidon et de protéines qui est facilement hydrolysé en sucres monomères à l'aide d'enzymes (**Demirci et al., 2016**).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Selon le taux de blutage on dispose des différentes farines : la farine blanche correspondant essentiellement l'amande farineuse interne du grain ; les farines brises dans lesquelles on trouvera en plus de l'amande farineuse les couches sous-corticales du grain (assise protéiques, scutellum, fractions du germe) ; la farine complète renfermant la totalité des constituants du grain, après nettoyage.

Le point commun à toutes ces farines est de contenir environ 2/3 de glucides, essentiellement sous forme d'amidon (amylose et amylopectine) accompagné d'un petit pourcentage de sucres (2 à 3 %). Tous les autres composants varient selon l'intensité de blutage (**Web 3**).

Dans les farines blanches (boulangerie et pâtisserie), les protéines sont représentées par le gluten contenu dans l'amande farineuse du grain ; Il est très déséquilibré sur le plan nutritionnel en raison d'un déficit primaire en lysine (- 70% par rapport aux protéines de l'œuf) et de déficits secondaires en thréonine, méthionine et valine (**Web 3**).

Tableau 03 : Teneur en nutriments du pain blanc classique retrouvé sur le marché (**Web 3**).

Pour 100 g	Pain blanc
Calorie	265
Glucides	54 g
Fibres	4.2 g
Matières grasses	0.33 g
Protéines	9.4 g
Acide folique	22.4 µg
Potassium	178 mg
Fer	1.3 mg
phosphore	140 mg
Magnésium	33 mg
Zinc	1.2 mg
Sodium	491 mg
Thiamine	0.132 mg

1.2. Tomate

1.2.1. Généralités

La tomate (*solanum lycopersicum*) appartient à la famille des Solanaceae, à laquelle appartiennent également le piment, le jaxatu, le poivron, l'aubergine et la pomme de terre (**Larid 2012**).

La forme ancestrale de la tomate est originaire d'Amérique du Sud, dans la région Pérou-Équateur, puis fut propagée vers le nord sous forme de mauvaise herbe jusqu'à ce qu'elle atteigne le Mexique où elle fut domestiquée (**Jenkins, 1948**). Elle fut découverte au XVe siècle puis introduite en France un siècle plus tard (**Interfel, 2020**). De là, sa culture s'est propagée en Asie du sud et de l'est, en Afrique et au Moyen orient.

Contrairement aux idées reçues, la tomate est un fruit, même si elle se consomme comme un légume. Elle est disponible toute l'année, mais la pleine saison se déroule de mai à septembre (**Interfel, 2020**). La tomate est une plante qui peut atteindre une hauteur de plus de deux mètres.

La consommation des fruits de la tomate contribue à un régime sain et équilibré. Elle contient 90 % d'eau et seulement 15 calories pour 100 g. Elle est donc la collation idéale à tout moment. Elle est aussi une importante source de vitamines : A, B3, B6, E, K et C d'oligo-éléments (cuivre, manganèse, potassium), d'antioxydants (surtout le lycopène), de fibres, d'acides aminés essentiels, en sucres ainsi qu'en fibres alimentaires. Les tomates se consomment fraîches en salade ou cuites dans des sauces, des soupes ou des plats de viande ou de poisson. Il est possible de les transformer en purée, en jus et en ketchup. Les fruits séchés et les fruits mis en conserve sont des produits transformés qui ont également une importance économique (**Matkawala et al., 2019**).

Lors de son développement, les pigments responsables de sa couleur sont majoritairement les chlorophylles a et b. À maturité, les niveaux de chlorophylles diminuent fortement tandis que la proportion relative de violaxanthine, lutéine, β -carotène, lycopène, anthéroxanthine et zéaxanthine est jusqu'à 9 fois plus élevée (**Carrari, 2006**).

Les principaux contributeurs à la saveur de tomate mûre sont des composés volatils de la famille des alcools et des terpènes dont : le cis-3-hexanal, le cis-3-hexanol, l'hexanal, le 3-méthylbutanal, le sulcatone, le 1-pentan-3-one, le trans-2-hexanal, le salicylate de méthyle, le 2-isobutylthiazole et le β -ionone (**Carrari, 2006**).

Une étude de cohorte de suivi sur 6 ans a permis de montrer que la consommation de tomate était associée à un risque moindre de cancer de la prostate grâce à une présence importante de

lycopène entre 7,8 et 18,1 mg pour 100 g (Willett, 1995). Une méta-analyse a confirmé qu'une consommation plus élevée de caroténoïdes, dont le β -carotène, l' α -carotène, le lycopène, la β -cryptoxanthine, la lutéine et la zéaxanthine, réduisait le risque de cancer de l'œsophage.

Parmi 72 études identifiées, 57 ont rapporté des associations inverses entre la consommation de tomates ou le taux de lycopène sanguin et le risque de cancer, dont 35 de ces associations inverses étaient statistiquement significatives (Giovannucci, 1999). Un effet bénéfique a particulièrement été observé pour le cancer des poumons, de l'estomac, du pancréas, du côlon, du rectum, du sein et du col de l'utérus (Giovannucci, 1999).

1.2.2. Production de la tomate en Algérie

La consommation des légumes frais a beaucoup augmenté en Algérie à la suite de l'essor démographique et à la relative amélioration du niveau de vie. La tomate est le second produit maraicher suite à la place qu'elle occupe dans les habitudes alimentaires des algériens (Tableau 02) (Bacci, 2008).

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

La production réalisée par la filière tomate industrielle durant la saison agricole 2019-2020 s'élève à plus de 3, 520 millions de quintaux avec un rendement estimé à 865 quintaux par hectare, selon les chiffres de la direction des services agricoles (DSA) de la wilaya de Guelma (Web 4).

Les principales zones de la tomate industrielle en Algérie sont essentiellement (Web 4):

Zone Est : elle représente 84% des superficies et regroupe les wilayas de Skikda, El-Taraf, Annaba, Guelma et Jijel, Cette zone est caractérisée par une bonne pluviométrie et possède des sols à forte capacité de rétention d'eau. La culture de tomate se pratique en sec et semi-irrigue, avec une production d'environ 90% de la production nationale.

Zone Centre : représente 12% des superficies et regroupe les wilayas de Blida, d'Alger, Boumerdes, Bejaia, Chleff, Tipaza et Ain Defla.

Zone Ouest : Cette zone regroupe les wilayas de Mostaganem, Relizane, Mascara, Sidi-Bel-Abbès et Tlemcen. Elle représente 2,7% des superficies de la culture de tomate.

Zone Sud : est représentées par les wilayas d'Adrar et Biskra.

1.2.3. Déchets de tomates

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

Les déchets de tomates représentent, environ 10-30% du poids des fruits **fraîches** (**King et Zeidler, 2004**), ils se composent de 33% de graines, 27% de peaux et 40% de pulpe en plus de tomates vertes non transformées, parfois mélangés à des feuilles. Les déchets de tomates séchés contiennent 44% de graines et le reste, 56% de peaux et de pulpe (**Sogi and Bawa, 1998**).

Les déchets de tomates peuvent être séchés facilement à l'air libre sous soleil (**Katapodis et al., 2006**). Toutefois, pour des applications alimentaires, ils doivent être séchés immédiatement pour réduire l'humidité avant la contamination microbienne afin d'améliorer leur durée de vie, leur apparence, encapsuler la saveur originale et de maintenir sa valeur nutritionnelle (**Al-Muhtaseb et al. 2010**).

1.2.4. Utilisations de déchets de tomates

La réintégration de ces sous-produits agricoles dans les aliments peut contribuer à donner une valeur ajoutée à ces « déchets ». Les composés biologiquement actifs de ces sous-produits permettraient d'avoir un double impact sur les nouveaux aliments ainsi élaborés. En effet, ces produits naturels contribueront à apporter une meilleure qualité des aliments sur les plans technologiques et particulièrement sur le plan nutritionnel (**FAO, 2010**).

Concernant les tomates récoltées généralement à un stade de maturité assez avancé, les peaux constituent la part la plus importante des coproduits livrés par les conserveries, elle présente des particularités structurales et biochimiques qui peuvent influencer sa valeur alimentaire (**Aissa, 2006**). Elles sont donc essentiellement constituées de cellules à parois lignifiées (15 à 35% de lignine). Elles sont recouvertes d'une cuticule constituée de produit d'excrétions lipidiques désignées globalement sous le terme de cires ou de cutine (**Jarrige, 1981**).

Tableau 04 : Composition chimique des résidus de tomate (Résultats obtenus à partir de l'analyse de 15 échantillons, d'après la méthode de calcul) (INRA ,1988).

Résidus de tomate	Valeur moyenne	Valeur extrême
Matières minérales (%MS)	5	3 – 5 – 6
Matière sèche	27	20 – 35
Matières azotées totales (%MS)	22	18 – 26
Cellulose brute (%MS)	34	27 – 41
Matières grasses (%MS)	15	12 – 19
Calcium (g/Kg MS)	3	1.8 - 4.2
Phosphore (g/Kg MS)	3	3.1 – 4
Potassium (g/Kg MS)	-	7 – 10
Magnésium (g/Kg MS)	-	2.1 - 2.2
Manganèse (g/Kg MS)	-	Faible
Cuivre (mg/Kg MS)	-	15 - 20
Zinc (mg/Kg MS)	-	Faible
Soufre (mg/Kg MS)	-	1.7 - 1.9

2. Fermentation

2.1.Fermentation liquide (FML)

La fermentation liquide peut être considérée comme une violation de l'habitat naturel des microorganismes, en particulier les champignons. Elle consiste à faire croître les microorganismes sur un substrat nutritif liquide (Suresh *et al.*, 2011). Ce type de fermentation a été traditionnellement utilisé pour la production industrielle des enzymes, en raison de la facilité de contrôle des différents paramètres comme le pH, la température, l'aération, l'oxygène dissous et l'humidité (Singhania *et al.*, 2009).

2.2.Fermentation solide (FMS)

La fermentation à l'état solide un processus de fermentation impliquant une matrice solide avec une quantité très faible ou sans eau, cependant, il doit y avoir une quantité suffisante de l'humidité dans le substrat pour soutenir le métabolisme et la croissance des micro-organismes.

La matrice solide mentionnée pourrait être le support et aussi la source des nutriments ou de carbone utilisés par les microorganismes pour soutenir le développement, la croissance et les

activités métaboliques. Les micro-organismes excrètent les enzymes nécessaires au cours de la FMS pour la dégradation du substrat. La nature du substrat solide et des micro-organismes est le paramètre important qui influence le rendement de production et affecte le processus FMS (Nunes *et al.*, 2021).

2.2.1. Avantages et inconvénients de la fermentation solide

Différentes souches microbiennes ont été décrites comme produisant des protéases par FML ou FMS utilisant différentes matières premières. Ces protéases sont généralement produites par FML en raison d'avantages apparents dans la normalisation, le contrôle et la reproductibilité dans la production d'enzymes, malgré le coût élevé de certains composants du support (Xiao *et al.*, 2009).

Cependant, d'un point de vue industriel, on estime qu'environ 30% à 40% du coût de production d'enzymes est liés aux composants du milieu de culture. Pour cette raison, FMS a stimulé un intérêt économique notable, en particulier dans les pays qui ont une abondance de biomasse et les résidus agro-industriels, qui peuvent être utilisés comme matières premières bon marché (Thomas *et al.*, 2013)

Au cours des dernières années, de nombreux résidus agro-industriels riches en protéines ont été étudiés pour la production de protéases. Il est donc important de connaître les avantages et les inconvénients de la fermentation sur milieu solide par rapport à la fermentation liquide. Parmi ces avantages on note (Web 5) :

- Le support est simple, facilement disponible et peu coûteux.
- Les substrats nécessitent moins de prétraitement que les milieux liquides.
- Les contaminations sont limitées car la teneur en humidité est faible.
- L'aération forcée est souvent plus facile.
- Équipement de fermentation simple.
- Productivité volumétrique élevée.

La fermentation solide présente également de nombreux inconvénients :

- Un faible taux d'humidité peut limiter la croissance des micro-organismes.
- L'élimination de la chaleur métabolique est un problème dans les fermentations à grande échelle à l'état solide.
- Difficultés à surveiller les paramètres du processus.

2.2.2. Milieu de culture

Le milieu de culture représente 30% du coût d'un processus de fermentation et sa composition se reflète sur la croissance microbienne et la production de métabolites, par conséquent, joue un rôle important dans la production des enzymes. D'autres facteurs tels que la température, le pH et le temps d'incubation influencent également le métabolisme microbien. Chaque micro-organisme a ses propres conditions pour une production maximale d'enzymes (**Abidi et al., 2008**).

De nombreuses recherches doivent être effectuées pour établir le milieu approprié dans un processus de fermentation ; cependant, certains points sont communs à tout type de milieu de culture. Tous les micro-organismes ont besoin d'eau, de sources d'énergie, de carbone, d'azote, de minéraux, de vitamines et d'air (**Abraham et al., 2014**).

2.2.2.1. Source de carbone

Les levures étant des chimiohétérotrophes ont besoin de sources carbonées (**Walker, 2009**) et de précurseurs pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés comme les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques (**Botton, 1991**). Plus de 400 espèces de ces microorganismes identifiées dans la littérature sont capables de métaboliser le glucose, le fructose et le mannose (**Pol, 1996 ; Walker, 2009**), le glucose peut avoir un effet répressif et inhibiteur sur l'assimilation d'autres sucres par les levures (**Walker, 1998**). Certaines d'entre elles utilisent des saccharides, des polyols, des alcools (éthanol, méthanol, glycérol), des polysaccharides (amidon soluble, pectine), l'acide lactique et l'acide citrique grâce aux enzymes de leur capital génétique (**Kurtzman and Suzuki, 2010**). Les souches de *Schwanniomyces castellii*, *S. fibuligera* produisent la biomasse à partir de l'amidon non hydrolysé (amidon de pommes de terre ou leurs pelures, l'amidon soluble) (**Ouédrago et al., 2012**), les hydrolysats de plantes, le moût de pomme (**Bekatorou et al., 2006**).

2.2.2.2. Source azotée

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques (peptone, extrait de levure, glutamine, base purines et pyrimidines...), l'extrait de levure constitue le principal stimulateur de la croissance microbienne en particulier pour les levures (**Walker 1998 et Deak, 2006**) et des sources inorganiques pour la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997 ; Guiraud, 1998 et Deak, 2006**). Toutes les levures sont pratiquement capables d'utiliser l'azote minéral comme les sels d'ammonium utilisés dans les milieux de culture (**Bourgeois, 1996**). Contrairement à *Hansenula* et *Citeromyces*, certains genres de levures sont incapables d'utiliser les nitrates :

Saccharomyces, *Kluyveromyces*, *Pichia* et *Debaryomyces*. Par contre, les nitrites sont métabolisables par *Debaromyces hansenii* et *Pichia pinus* (Bourgeois, 1996).

2.2.2.3. Minéraux, oligoéléments et vitamines

Les minéraux sont importants pour les levures et constituent des facteurs de croissance ou des cofacteurs pour les enzymes (Leblon , 1988). Pour un développement adéquat, elles ont besoin d'oligo-éléments variés (Al, Cr, Br, Cu, Pb, Mn, Zn, Sn...) et en très faible concentration servant de stabilisateurs des biomolécules ou constituants essentiels des systèmes enzymatiques (LarpentGourgaud et Sanglier, 1992). D'autres facteurs comme les vitamines (la biotine et la thiamine...) peuvent être des éléments constitutifs de coenzymes variés essentiels à la croissance des levures (Botton *et al.*, 1990) comme pour *Sacharomyces cerevisiae* qui a besoin de biotine pour croître. Par contre, certaines levures peuvent se multiplier en l'absence de vitamines comme la souche *Candida lusitaniae* qui n'a pas besoin de vitamines pour sa croissance. Les besoins en vitamines varient selon l'espèce.

2.2.3. Température et pH

La température et le pH sont des paramètres de contrôle importants dans le processus de fermentation pour une croissance microbienne maximale et une production enzymatique conséquente. Selon Sharma (2017), le pH de la culture affecte les processus enzymatiques et le transport de plusieurs composants par la membrane cellulaire. Il est possible que, dans le pH optimal, l'efficacité métabolique relative soit élevée, car la force motrice des protons dans la chimiosmose est affectée par la valeur du pH moyen. Les variations des valeurs de pH au cours de la fermentation peuvent fournir des informations sur le début et la fin de la période de la production de protéase (Kumar and Takagi, 1999).

3. Optimisation de production de protéase

Les progrès dans la manipulation génétique des micro-organismes ouvrent de nouvelles possibilités pour l'introduction de changements prédéfinis résultant en la production de protéases sur mesure avec de nouvelles et pour répondre aux exigences de la multitude d'applications de protéases avec des propriétés souhaitables. La diversité microbienne représente une ressource inestimable pour les innovations biotechnologiques et joue un rôle important dans la recherche d'une souche améliorée de micro-organismes utilisés dans l'industrie.

Les chercheurs et les ingénieurs de procédés ont utilisé plusieurs méthodes pour augmenter le rendement des protéases par rapport à leurs exigences industrielles à savoir le criblage des souches

hyperproductrices, le clonage et la surexpression, les fermentations en batch, les fermentations chimiostatiques et l'optimisation du milieu de fermentation par une approche statistique, telle que la méthodologie de surface de réponse.

3.1.Optimisation par le génie génétique

L'amélioration des souches bactériennes par mutagenèse conventionnelle (exposition aux UV ou chimique) ou par la technologie de l'ADN recombinant (ADNr) pour générer sélectivement des mutants présentant une production de protéases plus élevée est également utilisée pour améliorer la production de protéases dans les micro-organismes. Un certain nombre de gènes bactériens codant pour la protéase souhaités ont été clonés et exprimés dans de nouveaux hôtes. Certaines des enzymes importantes sur le plan industriel sont maintenant produites à partir de micro-organismes génétiquement modifiés dans le but de surproduction d'enzymes par effet de dosage de gènes et de génie protéique pour localiser les résidus du site actif et/ou pour modifier les propriétés enzymatiques en fonction de ses applications commerciales (**Web 6**).

La dernière tendance dans les détergents à base d'enzymes est l'utilisation de la technologie de l'ADN recombinant pour produire des enzymes bio-ingénierie avec une meilleure stabilité. L'agent de blanchiment et la stabilité à l'oxydation ont été introduits par l'ingénierie des protéines par le remplacement de certains résidus d'acides aminés. De plus, il est recommandé d'améliorer la production et sa stabilité dans des conditions extrêmes en exprimant le gène codant pour la protéase dans différents systèmes de vecteurs (**Web 6**).

3.2.Optimisation du milieu de fermentation par une approche statistique

3.2.1. One Factor At-a- Time (OFAT) :

Un facteur à la fois (OFAT) est une technique de résolution de problèmes pour identifier les facteurs critiques pour un effet à partir d'un pool de facteurs potentiels. L'approche adoptée consiste à modifier un facteur, ceteris paribus, c'est-à-dire en gardant tout le reste (tous les autres facteurs) constant. Le test d'hypothèse est l'outil le plus couramment utilisé pour l'OAT.

3.2.2. Plans de Box et Wilson :

Ce plan d'expérience a été introduit par Box et Wilson (1951), les points de l'expérience sont générés sur une sphère centrée autour d'un point central. Le nombre de niveaux des différents facteurs est minimisé. Le calcul du point central est répété à plusieurs reprises de façon à maximiser la précision de la prédiction autour du point supposé optimal (**Web 7**).

3.2.3. Plans des Box – Behnken

Dans le cas de plans $2^{(k-p)}$, Plackett et Burman (1946) ont développé des plans hautement fractionnés permettant d'obtenir le nombre maximum d'effets (principaux) avec le minimum d'essais. L'équivalent pour un plan $3^{(k-p)}$ est un plan dit de Box-Behnken (Box et Behnken, 1960 ; voir aussi Box et Draper, 1984). Ces plans ne possèdent pas de générateurs de plan simple (ils sont construits en combinant des plans factoriels à deux niveaux avec des plans incomplets de blocs), et possèdent des interactions confondues complexes. Ces plans ont toutefois l'avantage d'être économiques et donc particulièrement utiles lorsque les essais expérimentaux à réaliser sont coûteux. Ce plan d'expérience a été introduit par Box G.E.P. et Behnken D.W (1960). Il est basé sur le même principe que le plan composite centré mais nécessite moins d'expériences (**Web 7**).

3.2.4. Plans des Plackett et Burman

A propos d'un processus ou d'un phénomène, les premiers problèmes auxquels les plans d'expériences peuvent apporter de l'information sont ceux de criblage des paramètres. Une étude de criblage peut être définie comme une étape permettant de repérer rapidement, dans un grand nombre (k) de facteurs, ceux qui sont effectivement influents sur un processus dans un domaine expérimental fixé. Cette étude permettra de déterminer le "poids" de chaque niveau de chaque facteur, pour ensuite les classer par ordre d'importance (**Horadam, 2007**).

Les matrices d'expériences de criblage les plus connues sont les matrices d'Hadamard (**Horadam, 2007**) ou matrices de Plackett et Burman pour lesquelles le nombre de simulations est proche du nombre de facteurs étudiés (**Claeys-Bruno et al., 2009**). Ces plans sont des matrices à colonnes orthogonales composées uniquement des valeurs +1 ou -1 (**Tinsson., 2010**) et pour laquelle la matrice d'information $X'X$ est telle que : $X'X^* = NIN$ avec, IN : matrice identité d'ordre N . Ces plans sont le plus souvent saturés et le modèle mathématique est un modèle sans interactions (**Goupy, 2006**).

Le plan de Plackett et Burman est un plan factoriel fractionné, et l'effet principal d'une telle conception peut être simplement calculé comme la différence entre la moyenne des mesures effectuées au niveau haut (+1) du facteur et la moyenne des mesures effectuées au niveau bas (-1). Cela permet la détermination de l'effet de chaque facteur. Un grand contraste coefficient positif ou négatif indique qu'un facteur a un grand impact sur la réponse ; tandis qu'un coefficient proche de zéro signifie qu'un facteur a peu ou n'a pas d'effet. Ces plans sont donc utilisés pour sélectionner les facteurs efficaces ; ayant un effet significatif sur la production. Cette technique diminue

considérablement le nombre des expériences nécessaires pour déterminer les variables importantes (Levin *et al.*, 2005).

L'analyse statistique de ces plans est réalisée par plusieurs logiciels tel que : Minitab, Statgraphics, Genstat.....ect. Le Minitab est essentiellement un outil de compilation de statistiques qui analyse les résultats et vous aide à les examiner sous tous les angles. Cela commence par les bases, comme la création d'un graphique à secteurs qui montre comment les bénéfices ont évolué au fil du temps, sous forme d'histogrammes et de divers autres graphiques vous permettant d'analyser l'impact de vos données. Ce qui brille vraiment avec Minitab, c'est l'Assistant qui fournit un guide étape par étape pour utiliser le logiciel et qui permet également d'analyser les données. Cela inclut l'analyse graphique des capacités et les tests d'hypothèses. Associé à des fonctionnalités professionnelles de dessin graphique (Web 10).

Minitab génère des plans pour un nombre maximal de 47 facteurs. Chaque plan est basé sur le nombre d'essais, à indiquer en multiple de 4, entre 12 et 48. Le nombre de facteurs doit être inférieur au nombre d'essais. Par exemple, un plan en 20 essais vous permet d'estimer les effets principaux pour un maximum de 19 facteurs (Web 10).

	Pattern	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}
1	+++++	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	-+-++-+-	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
3	--+---+	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
4	+--+-++-	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
5	-+---++-	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
6	--+-+---	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
7	---+---++	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
8	+---+---++	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
9	++---+---+	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
10	+++---+---	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
11	-+++---+---	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1
12	+---+++---	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1

Figure 07 : Plackett-Burman pour 12 expériences et 11 facteurs.

The image features a collection of laboratory glassware set against a blue and purple gradient background. On the left is a large round-bottom flask with a stopper, partially filled with a clear liquid. In the center is a graduated cylinder with markings at 20, 30, and 40. To the right is an Erlenmeyer flask with a stopper, also containing a clear liquid. In the foreground, a beaker is partially visible, containing a clear liquid. The glassware is arranged on a reflective surface, creating subtle reflections. The text 'Matériels et Méthodes' is overlaid in a black, cursive font, centered over the middle of the image.

*Matériels et
Méthodes*

1. Matériel biologique :

1.1. Isolement de la souche

La souche levurienne utilisée dans ce travail a été isolée à partir de pelures de pomme de terre. La souche pure est conservée dans les cryobilles et stockées dans laboratoire Génie Enzymatique et Application GEA.

1.2. Identification de la souche

L'identification de la souche utilisée est réalisée par la galerie ID 32C qui est un système standardisé d'identification des levures, utilisant 32 tests d'assimilation miniaturisés et une base de données. La liste complète des levures qu'il est possible d'identifier avec ce système se trouve dans un tableau d'identification. La lecture et l'interprétation se font automatiquement ou manuellement.

- **Principe**

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

Les colonies de la souche sont transférées dans une quantité de l'eau distillée stérile jusqu'à une opacité similaire à celle du MacFarland 4. Puis 250 µl de cette suspension sont ajoutés dans une ampoule de milieu semi-solide API C fournie par le fabricant. Après homogénéisation, chaque cupule de la galerie est inoculée par 135µl de milieu ensemencé. La galerie recouverte d'un couvercle est mise à incuber à 30°C pendant 48h dans un atmosphère humide.

1.3. Préparation de l'inoculum

1.3.1. Préparation de la suspension de cellulaire :

- 50 ml du milieu YPGA est coulé dans un erlenmeyer de 250 ml.
- Après refroidissement, le milieu est ensemencé à la surface par de jeunes colonies.
- Les erlens sont bouchées avec du coton cardé stérile et papier aluminium et incubés 48h à 30°C.
- Après deux jours, 40ml de l'eau distillée sont ajoutée pour obtenir une suspension de cellules levuriennes par simple agitation manuelle.

1.3.2. Dénombrement des cellules

L'estimation du nombre de cellules de la suspension cellulaire est effectuée à l'aide de la cellule de Thoma sous microscope photonique, au grossissement (x40). On dépose, entre la cellule et lamelle, une goutte de la suspension de levure, puis on fait le comptage des cellules levuriennes.

2. Méthode de fermentation

2.1. Milieux de culture

Le milieu de culture est préparé à partir des déchets de tomate (la peau) et les restes de pain. Les déchets sont séchés à l'air libre (30 - 35C°) jusqu'à poids constant puis broyés et tamisés pour obtenir une farine.

2.1.1. Fermentation solide

Cinq gramme de déchets de tomates (milieu 1), de restes de pain (milieu 2) et de mélange des deux déchets (2,5g déchets de tomates et 2,5g restes des pains) (milieu 3) sont introduits dans des erlenmeyer de 250 ml (2 essais sont effectués pour chaque déchet) puis, une quantité de l'eau distillée est ajoutés à un teneur de 60%.

Par la suite, les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé et du papier aluminium puis autoclavés à 121°C pendant 20 min.



Figure 08 : Milieu de culture de FMS.

2.1.2. Fermentation liquide :

Le milieu liquide des déchets de tomates DT et des restes du pain RP est préparé à raison de 5% dans l'eau distillée.

Après agitation de 20min à une température modérée pour extraire au maximum les nutriments. Le mélange est centrifugé ou filtré. Le filtrat ou le surnageant constitue le milieu de production enzymatique. Le milieu 3 est préparé de la même manière avec 2,5% DT et 2,5% RP

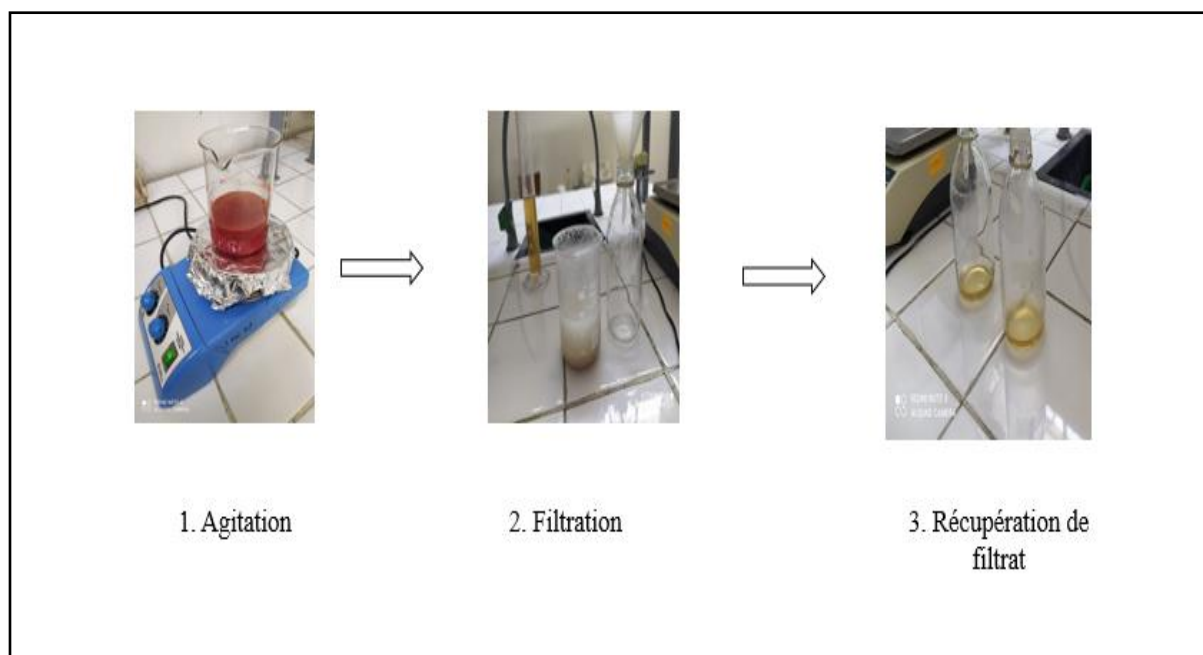


Figure 09 : Préparation de milieu de culture de FML.

Les milieux (filtrats) sont répartis en erlenmeyer de 250ml à raison de 40 ml par erlen. Les erlenmeyers sont bouchées par cotons cardés et avec du papier d'aluminium puis autoclavés à 121C° pendant 20 minutes.

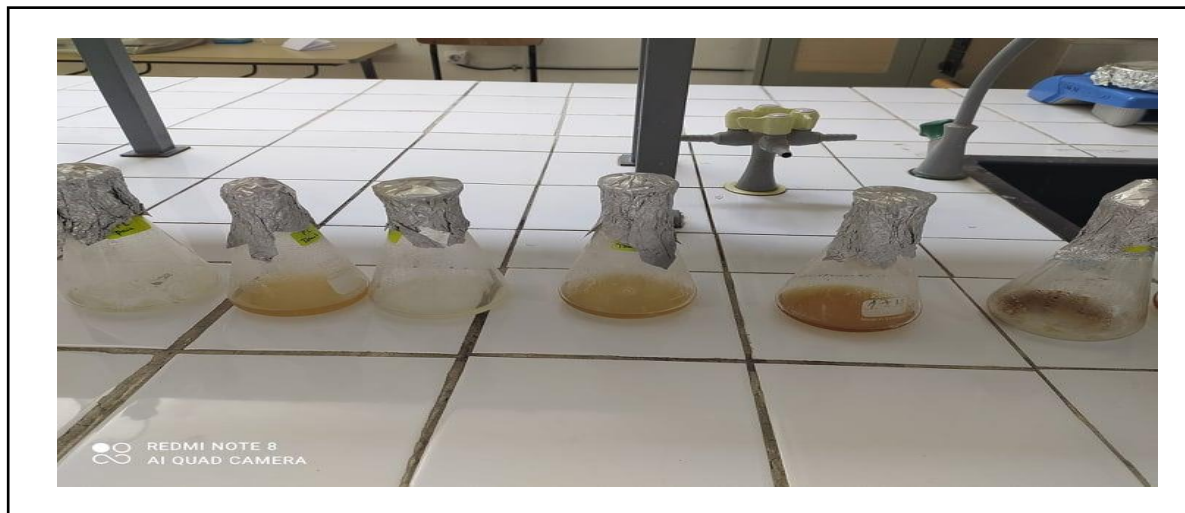


Figure 10 : Milieu de culture de FMS.

2.2. Ensemencement des milieux

2.2.1. Milieu solide (FMS)

Après refroidissement des erlenmeyers, les milieux sont inoculés à partir d'une suspension de levure fraîche de 24 à 48h, le contenu doit être bien mélangé à l'aide d'une tige stérile puis incubés dans l'étuve pendant 48h à 30 C°.



Figure 11 : Ensemencement des milieux de production

2.2.2. Milieu liquide (FML)

Après refroidissement des erlenmeyers, les milieux sont inoculés avec la suspension cellulaire fraîche et incubés à 30°C pendant 48 h sous agitation à 150 rpm dans un incubateur à agitateur (shaker incubator).



Figure 12 : incubateur à agitateur.

2.3. Extraction enzymatique

2.3.1. Milieu solide

Après fermentation, une quantité connue (2,5 g) de substrat fermenté est mélangée avec 25 ml de solution de Tween 80 (0,1%). Le mélange est mixé pendant 5 minutes et centrifugé à 10000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. Ensuite le surnageant est récupéré, ce dernier représente l'extrait enzymatique brut, il est conservé dans le congélateur pour des dosages ultérieurs.

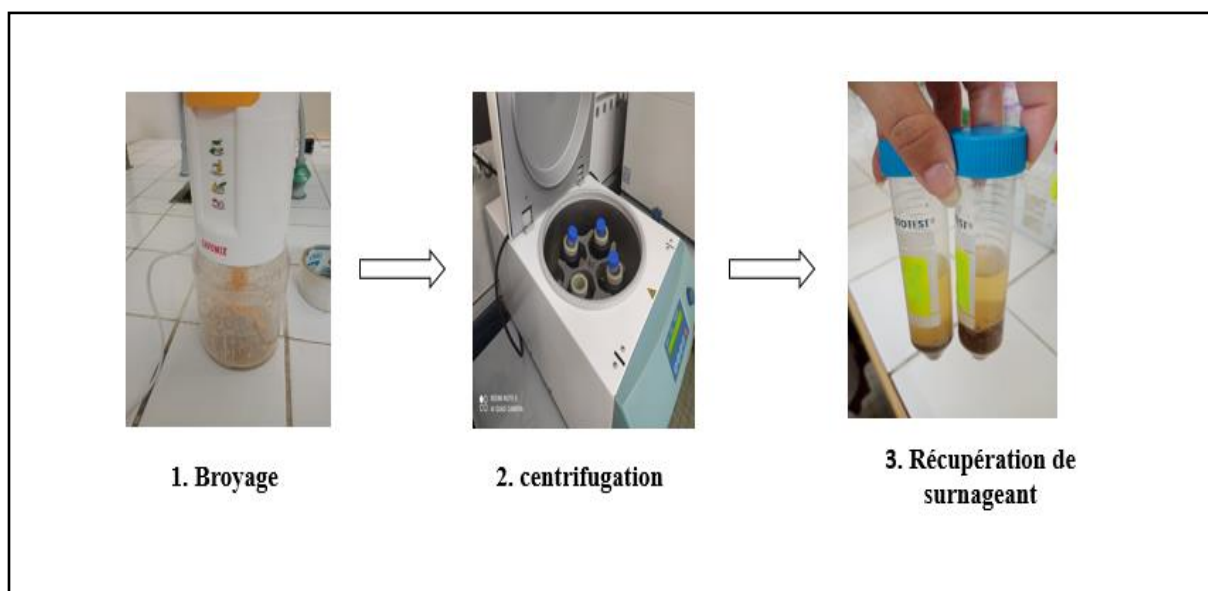


Figure 13 : Extraction enzymatique.

2.3.2. Milieu liquide

Après fermentation, les milieux de culture sont centrifugés à 10000 rpm à 4C° pendant 10 minutes. Le surnageant représente l'extrait enzymatique brut. Il est congelé pour les dosages ultérieurs.

3. Méthodes analytiques

3.1. Détermination de la matière sèche

La matière sèche des déchets est déterminée par séchage d'un échantillon de 2,5 g introduit dans des boites de petri en verre pesés préalablement séchée et placée dans une étuve à 50 C° pendant 48h jusqu'à poids constant.

$$MS (\%) : [(PF-PS) / PF] \times 100$$

MS : Matière sèche

PF : Poids frais

PS : Poids sec

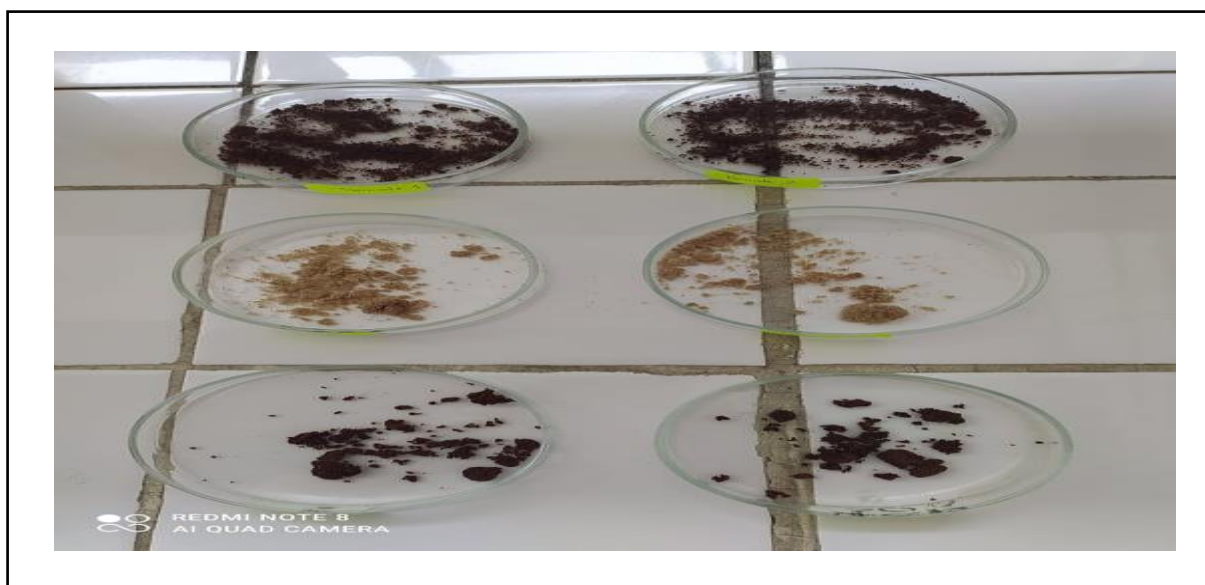


Figure 14 : Détermination de la matière sèche.

3.2. Effet de pH sur la production de protéase

Trois solutions de tampon sont utilisées pour déterminer la nature de protéase levurienne. Pour les pH, différents tampons sont préparés : tampon citrate de sodium pour le pH= 5, tampon phosphate pour pH= 7 et le tampon glycine pour pH= 9 (Voir l'annexe 4).

3.3. Dosage des protéines (Lowry et al. 1951)

Le dosage des protéines par la méthode de Lowry est basé sur la réaction du biuret avec des étapes et des réactifs supplémentaires pour augmenter la sensibilité de détection. Dans la réaction du biuret, le cuivre interagit avec quatre atomes d'azote de peptides pour former un complexe cuivreux. Lowry ajoute de l'acide phosphomolybdique/phosphotungstique également connu sous le nom de réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif interagit avec les ions de cuivres et les chaînes latérales de la tyrosine, du tryptophane et de la cystéine pour produire une couleur bleu-vert qui peut être détectée entre 650et 750 nm. (Le protocole est décrit en Annexe 2)

Après dosage, le taux de protéines est calculé par référence à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution standard de *Bovin Serum Albumine* (BSA) (voir Figure 25 dans Annexe 2).

3.4. Dosage de l'activité protéolytique (ANSON 1938)

Après l'hydrolyse des protéines par les protéases elles libèrent des acides aminés et des peptides simples, les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA. La tyrosine est un acide aminé aromatique présent dans toutes les protéines ; il est utilisé comme standard de dosage colorimétrique de l'activité protéasique à l'aide de réactif de folin. Ce dernier réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner une coloration bleu. (Le protocole est décrit dans l'annexe3).

L'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard (voir Figure 26 dans l'annexe 3). Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1 µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme.

4. Optimisation protéolytique

La production de protéase est influencée par divers paramètres de production, notamment des paramètres nutritionnels et environnementaux. Pour cela, la composition du milieu de culture est optimisée selon des méthodes statistiques en utilisant deux plans d'expériences. Le plan de Plackett et Burman (1946) permet de sélectionner les facteurs ayant un effet significatif positif ou négatif sur la production de la protéase acide. Le second est le plan composite central de Box et Wilson (1951).il permet de déterminer les optima des paramètres sélectionnés.

4.1. Plan d'expériences de Plackett et Burman

Le plan de Plakett et Burman a été appliqué pour évaluer l'importance relative de divers paramètres en utilisant le nombre minimum des expériences. Un ensemble de 12 expériences ont été menées pour évaluer les effets des 11 variables (8 réels, 3 irréels ou erreurs), y compris température, humidité, inoculum, glucose, corn steep liquor, (NH₄) SO₄, temps d'incubation, NaCl et deux pour l'erreur (Tableau 3). Deux niveaux ont été fixés pour chaque variable, élevé et faible, codé par (+1) et (- 1) respectivement.

Tableau 05 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs étudiés dans la matrice de Plackett et Burman.

Facteurs	Niveau		Unité
	-1	+1	
A : température	30	50	C°
B : Humidité	50	80	%
C : Inoculum	10 ⁵	10 ⁷	Cellules/ml
D : Erreur	–	–	–
E : Glucose	0	0,5	%
F : corn steep liguor	0	0,5	%
G : (NH ₄) SO ₄	0	0,5	%
H : Erreur	–	–	–
I : NaCl	0	0,1	g/l
J : temps d'incubation	24	72	H
K : Erreur	–	–	–

Tableau 06 : Matrice de Plakett et Burman pour l'étude de 11 facteurs avec 12 expériences.

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

4.2. Plan composite centré de Box et Wilson (CCD : central composite design)

Le plan composite centré est un outil expérimental efficace permettant l'identification des facteurs effectifs, l'étude de leurs interactions et la sélection des conditions optimales d'un système multi variable. Ce plan est originalement introduit par Box et Wilson en 1951.

Le plan composite centré de Box et Wilson (1951) a été sélectionnés pour optimiser les valeurs des trois facteurs significatifs par le plan de Plakett et Burman à savoir l'humidité, le temps d'incubation et l'inoculum. Chaque facteur du plan est étudié à cinq niveaux (Tableau 7).

Tableau 07 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan centré de Box et Wilson.

Facteurs	Niveau				
	-1,168	-1	0	+1	+1,168
C2 : Humidité(%)	63,18	70	80	90	96,82
C3 : Inoculum (cellule/ml)	$2,08 \times 10^2$	10^3	10^4	10^5	$0,5 \times 10^6$
C10 : Temps d'incubation (h)	31,62	48	72	96	112

Tableau 08 : Matrice expérimentale du plan composite pour l'étude de trois facteurs.

Essai	C ₂	C ₃	C ₁₀
1	1,682	0	0
2	0	0	0
3	0	0	1,682
4	1	1	-1
5	1	-1	1
6	0	0	0
7	1	-1	-1
8	0	0	0
9	-1	-1	1
10	-1	-1	-1
11	0	0	1
12	-1	1	0
13	0	0	0
14	0	-1,682	0
15	0	1,682	0
16	-1,682	0	-1
17	-1	1	0
18	0	0	-1
19	1	1	1
20	0	0	-1,682

4.3. Essais en conditions optimales

La levure *Candida sp*, a été cultivée en conditions optimales (humidité : 96,82%, inoculum : $0,5 \times 10^6$ cellule/ml et le temps d'incubation : 112h) en triple et en erlenmeyers de 250 ml. Ceci afin de confirmer si l'activité protéasique obtenue est adéquate avec la valeur de la production prédite (obtenue par l'étude statistique).

A photograph of various pieces of laboratory glassware, including a large round-bottom flask, a graduated cylinder, and several Erlenmeyer flasks, all containing liquids. The scene is lit with a strong blue and purple light, creating a dramatic, scientific atmosphere. The glassware is arranged on a reflective surface, and the background is a soft, out-of-focus gradient of the same colors.

*Résultats et
discussions*

1. Identification de la souche (Galerie API 32C)

Parmi les substrats les plus utilisés par les levures, on notera les composés carbonés. Une large gamme de ses derniers sont utilisés par certains levures alors que d'autres en assimilent moins. Vue l'importance de ce critère dans la physiologie des levures nous avons utilisé la galerie API 32C pour l'identification notre levure utilisé. Les résultats ont été obtenus après une durée de 48h par observation visuel de la galerie et ces résultats ont été enregistrés et clarifiés dans la figure suivante :

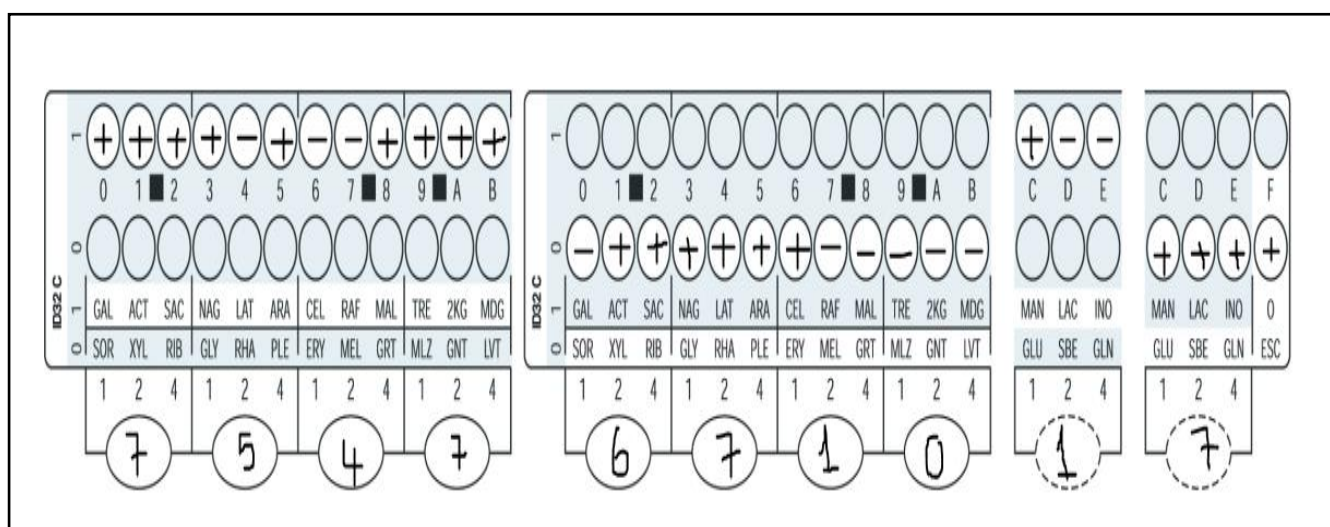


Figure 15 : Galerie API 32 C.

Le code obtenu de la galerie est 7547671017 qui correspond à une souche de *Candida sp* selon le téléchargement d'APIWEB fourni par le fabricant.

2. Production de protéase

Trois milieux ont été utilisés pour la production de la protéase. Le milieu 1 est constitué des déchets de tomate le milieu 2 est représenté par les restes du pain et le milieu 3 est un mélange des deux substrats (50% reste du pain et 50% déchets de tomate).

La production de protéase est étudiée en FML et FMS. Et e afin de déterminer le type de protéase produit par la souche *Candida sp* P₃, le dosage enzymatique est effectué à trois pH différents : pH = 5, pH= 7 et pH= 9. Les résultats de la production protéasique par FML et FMS et à différents pH sont présentés dans les figures 16 et 17.

2.1. Fermentation liquide

La figure 16 montre que :

- Les déchets de tomates ont donné des activités spécifiques à pH= 5, pH= 7 et pH= 9 de 117,37 UI/g, 150,52 UI/g et 276,91 UI/g respectivement, nous remarquons que l'activité protéasique alcaline est le plus importante.
- Le milieu 2 présente la meilleure activité spécifique de 456,16UI/g à pH= 7 suivie de 387,99 UI/g et à pH= 5 et l'activité la plus faible activité est à de 80,84 UI/g à pH= 9.
- Le milieu 3 a montré une activité protéasique alcaline importante de 366,38 UI/g alors que des activités acide et neutre réduites de 84,42 UI/g et de 62,57 UI/g respectivement, ont été enregistrées.

D'après ces résultats, il ressort que la meilleure activité spécifique de 456,16 UI/g est observée par le milieu 2 à pH= 7 suivie de protéase acide 387,99 UI/g obtenue par le même milieu.

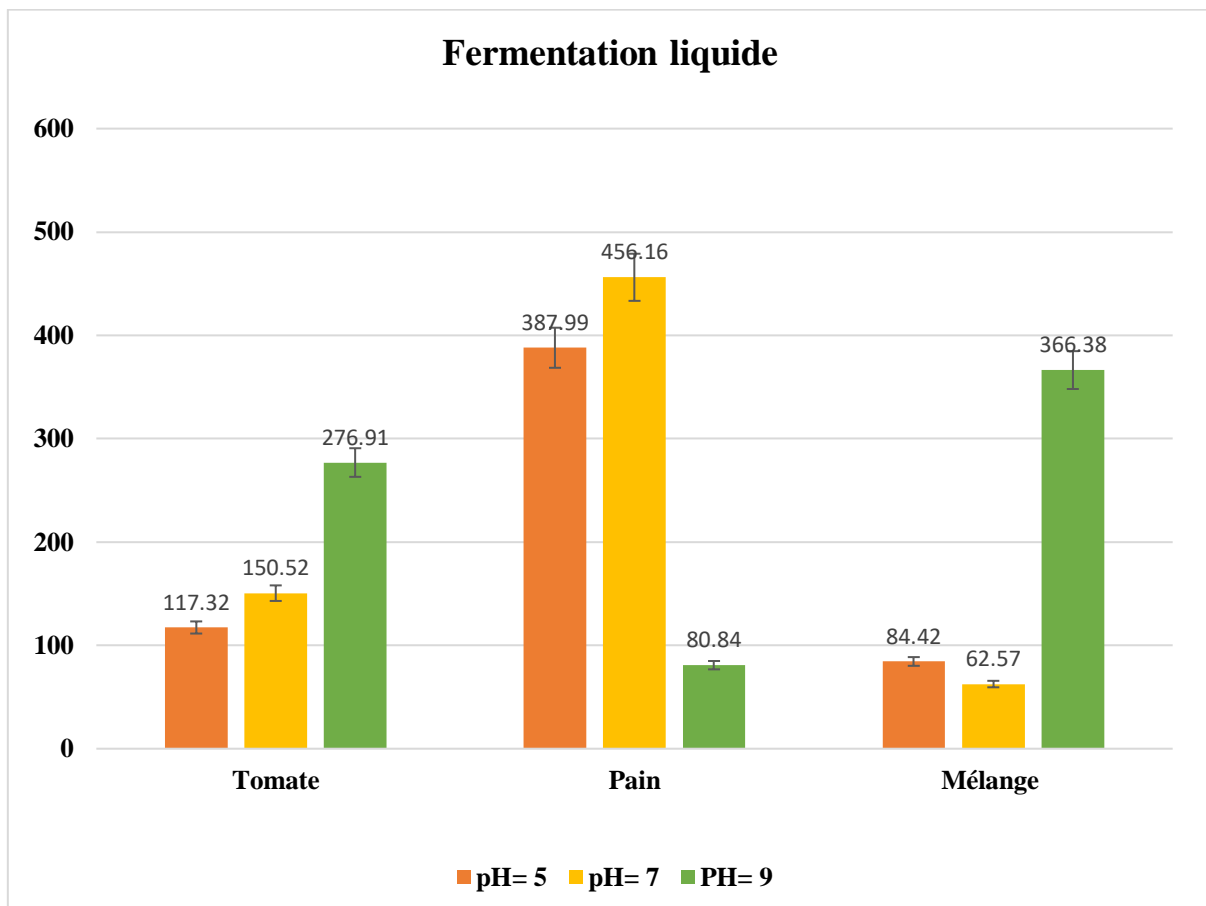


Figure 16 : Production protéolytique sur milieu liquide.

2.2.Fermentation solide

D'après la figure 17, nous observons que la souche *Candida sp* est productrice de protéase acide en milieu 1, ou milieu 2 ou en milieu 3 (10315,46 UI/g, 10882,48 UI/g et 24905,78UI/g respectivement). Une faible production de protéase neutre et protéase alcaline a été aussi détectée.

On conclut que la meilleure production obtenue par la fermentation liquide et de 456,16 UI/g obtenu par le milieu 2 et à pH= 7, et celle donnée par la fermentation solide est de 24905,78 UI/g à pH= 5 en utilisant le milieu 3. Donc par rapport à la fermentation liquide, la fermentation solide est meilleure pour la production de la protéase par *candida sp* P₃ car elle a donné la meilleure production de protéase acide de 24905,78 UI/g.

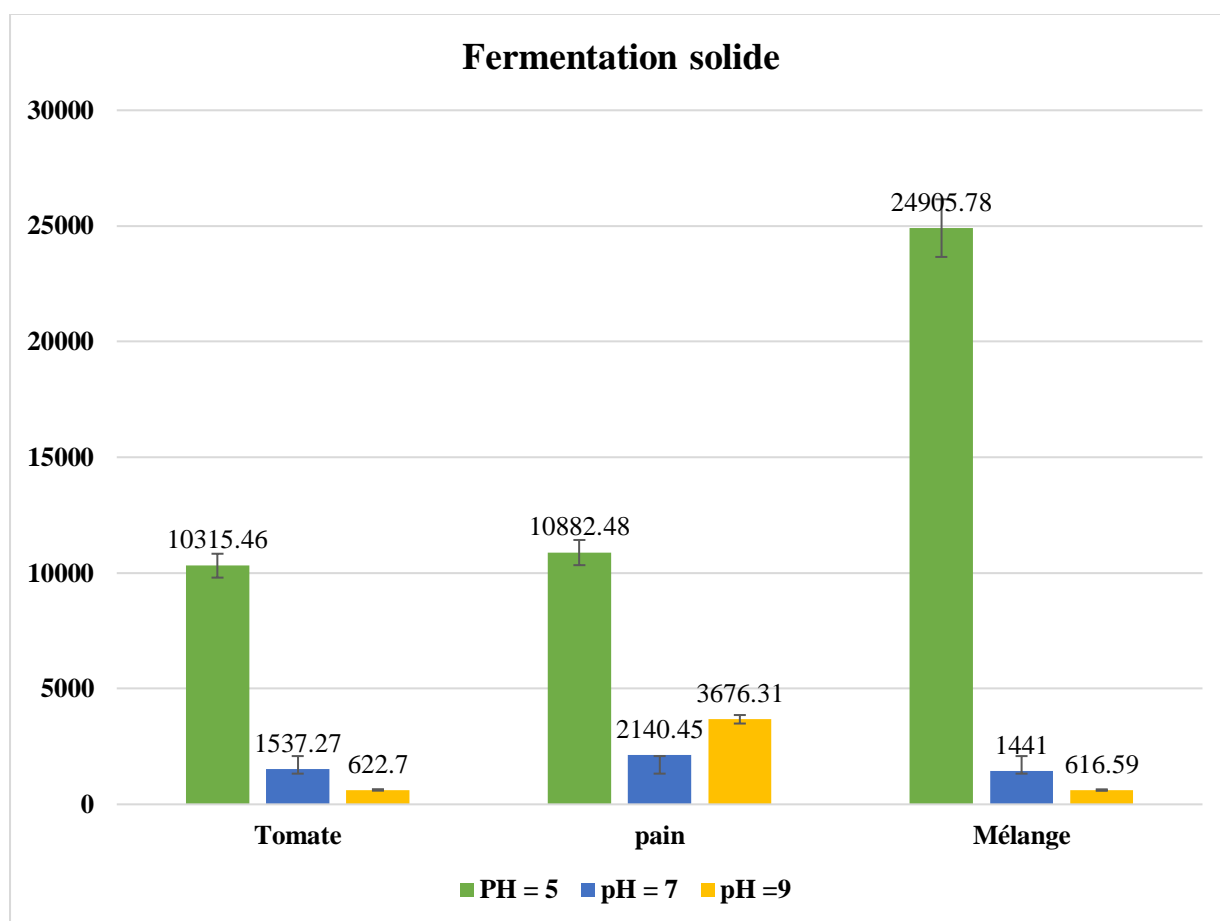


Figure 17 : Production protéolytique sur milieu solide.

2.3.Effet du pH

Les levures tolèrent une large gamme de pH allant de 2,4 à 8,6. L'optimum de pH varie de 4 à 6,5. Les levures du genre *Candida* se multiplient activement en milieu acide, de pH 2 à pH 6 mais peuvent survivre à pH 9.

Dans ce travail nous avons dosé l'activité protéasique à pH= 5, pH= 7 et pH= 9, pour déterminer le type de protéase produit par *candida sp* P₃. La meilleure activité de 24905.78 UI/g est obtenu par la fermentation solide sur le milieu 3 et à pH= 5.

La production protéasique par la fermentation liquide a été réalisée par différentes souches. Ont indiqué **Naif et al., (2020)** que la protéase produite par *Streptomyces sp* a une activité optimale de 147.1 U/ml à pH= 9. Les travaux de **Naaz et al.,(2020)** montre que *Basillus Subtilis* aussi produit une protéase avec une activité spécifique optimale à un pH 9 en utilisant le lait crémé comme substrat. Aussi **Ayantunj et al., (2020)** ont notés une activité spécifique de 26.404(U/ml) produite par *Bacillus cereus* à pH= 10.

La fermentation solide fait l'objet de plusieurs recherches. Les travaux de **kuzhalvaymani et al., (2019)** ont montré que la protéase produite par *Wareuprella spinulosa* a une activité spécifique optimale à pH=7, Cependant, les travaux de **Konjerimam et al., (2020)** rapportent une activité spécifique estimé à 2304U/ml à pH= 9, de la protéase a d' *Aspergillus brasiliensis*. Ces résultats sont très proches de ceux obtenus pour la production de la protéase alcaline par *Penicillium sp* à pH= 9 (**Benluvankar.V et al., 2015**) qui a une activité spécifique de 4177.6U/ml.

Les travaux décrits par **Abdlbar et al., (2020)** indiquent que la souche fongique produit une protéase acide (pH= 4,5) par FMS en utilisant le son de blé comme substrat.

2.4. Effets de substrats

Le substrat solide fournit des nutriments aux organismes en plus de l'ancrage. Ainsi, la sélection d'un meilleur substrat solide est un facteur critique qui implique le criblage des substrats pour la croissance microbienne et la production de métabolites.

Dans ce travail on a étudié l'influence de 2 déchets ainsi que leur mélange afin de sélectionner le meilleur substrat pour la production de la protéase par *candida sp* P₃, le meilleur résultat 24905.78 UI/g est obtenu par le milieu 3 qui est constitué de 50% de restes du pain et de 50% des déchets de tomates utilisé comme support de FMS et aussi comme substrat pour la croissance de la levure *Candida sp* P₃ et la production de protéase.

Par contre, dans la fermentation liquide en présence du milieu 2, la meilleure activité protéolytique 456.16 UI/g a été observée (le restes du pain).

Afin de réduire le cout du processus de la production enzymatique, il serait intéressant d'utiliser les déchets agroalimentaires comme substrat de fermentation. Ceci permettre d'une part de diminuer la pollution de l'environnement et d'autre part de produire des métabolites de haute valeur apoulé destinées à l'industrie. **Chee Kuan Ooi et al., (2021)** ont étudié la production de la protéase par *Aspergillus niger* dans un milieu de fermentation à base de carapace de crevette. L'activité optimale était de 3.5 U/ml. La protéase produite par une souche fongique a une activité spécifique optimale de 107.4 U/ml lorsque le son de blé est utilisé comme substrat, et une activité faible de 48.5 U/ml en présence de son de riz (**Abdlbar et al., 2020**). **Konjeriman et al., (2020)** ont noté une activité spécifique de 2318 U/ml produite par *Aspergillus brasiliensis* en présence de son du blé.

D'autres résultats déclarés par **Kuzhalvaymani et al., (2019)** indique que la protéase produite par *Warcupiella spinal* a une activité optimale qui atteint 10616 (U/ml) dans un milieu de fermentation à base de canne de sucre.

2.5.Conclusion partielle

En conclusion, une bonne production de protéase acide de *candida sp* P₃ nécessite l'utilisation du mélange de restes du pain et de déchets de tomate (50 :50) comme substrat de fermentation solide.

3. Optimisation des conditions de culture pour la production de protéase par les méthodes statistiques :

3.1. Plan de Plackett et Burman

La production de la protéase par *Candida sp* P₃ a été étudiée par le plan de Plackett et Burman, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 09 : Activités enzymatiques selon le plan de Plackett et Bruman.

Expériences	Facteurs											Activité protéolytique (UI/g)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	36610,6
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	13135,1
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	27242,4
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	19835,1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	30664,3
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	50023,6
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	61325,6
8	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	25864 ,1
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	43660,6
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	30346,1
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	17982,4
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	28276,6

A : température, **B** : Humidité, **C** : Inoculum, **D** : Erreur, **E** : Glucose, **F** : corn steep liquor, **G** : (NH₄) SO₄, **H** : Erreur, **I** : NaCl, **J** : temps d'incubation, **K** : Erreur.

D'après le Tableau 09 l'activité protéolytique est varié, la valeur la plus faible est de 13135,1 UI/g, observée à l'essai 2 contenant: 10⁷ cellule/ml d'inoculum, 0,5% glucose, corn steep liquor, NH₄SO₄ à une température de 30C° avec 80% d'humidité, et la valeur la plus grande est de 61325,6 UI/g obtenu par l'essai 7 contenant: 10⁵ cellule/ml d'inoculum, 0,5% glucose, NH₄SO₄, 0,1 g/l de NaCl a une température de 50C°, et avec une humidité de 50%.

3.1.1. L'analyse des résultats (tableau 10)

L'analyse statistique permis de déterminer l'effet de chaque facteur par le calcul du coefficient de corrélation et son niveau de signification sur l'activité protéasique par la mesure de la probabilité (P) : Le principe d'exploitation consiste à calculer les coefficients du modèle polynomial, plus sa valeur absolue est élevée, plus le terme correspondant à une influence importante sur la réponse étudiée. S'il est faible, il a peu ou pas d'effet. S'il est négatif, dans ce cas l'augmentation de la valeur du facteur exerce une diminution de la réponse. La signification statistique est déterminée grâce au test de la probabilité (P) :

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

Tableau 10 : Analyse statistique des résultats du plan de Plackett-Burman pour la production de protéase

Terme	Coeff	Coef ErT	Valeur de T	Valeur de P	FIV
Constante	32081	1199	26.76	0	1.00
Température	3367	1199	2.81	0.067	1.00
Humidité	-3839	1199	-3.2	0.049	1.00
Inoculum	-4909	1199	-4.09	0.026	1.00
Glucose	-2155	1199	-1.8	0.17	1.00
Corn steep liquor	-1491	1199	-1.24	0.302	1.00
NH₄SO₄	3790	1199	3.16	0.051	1.00
NaCl	-742	1199	-0.62	0.058	1.00
Temps d'incubation	10025	1199	8.36	0.004	1.00

Le test- t- a été utilisé pour identifier l'effet de chaque facteur sur la production de protéase. Le tableau 10 montre que humidité (C2) avec $p = 0.049$, inoculum (C3) avec $p = 0.026$, temps d'incubation (C10) avec $p = 0.004$ sont les facteurs significatifs ($p < 0,05$). Selon le modèle, la température (C1), NH₄ SO₄ (C7) ont exercé un effet positif. Cependant, humidité, inoculum, glucose, corn steep liquor et NaCl ont exercé des effets négatifs sur la production de protéase. Inoculum, humidité, temps d'incubation ont été sélectionnés car ces facteurs

présentent des effets significatifs positifs ou négatifs sur la production de la protéase par *Candida sp* P₃.

d'après un analyse fait par (**Mhamdi S *et al.*, 2014**) qui a étudiés: le temps d'incubation CF (farines de pois chiche), FF (féverole), la température, CaCl₂, NaCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄, Température et vitesse d'agitation comme série de facteurs afin de sélectionner les meilleurs pour la production protéolytique, ceux qui ont un effet significatif sont : le temps d'incubation CF, FF, la température parmi ces facteurs choisis le temps d'incubation avait un effet positivement significatif.

Selon les travaux de **Rayda S *et al.*, (2012)** les facteurs étudiés pour améliorer la production de protéase sont :le temps d'incubation, la température, KH₂PO₄, température et pH. Parmi ces facteurs, le temps d'incubation est sélectionné car il a un effet positif significatif.

Biswanath B *et al.*, (2012) ont étudié l'effet de différents facteurs à savoir : temps d'incubation, température, vitesse d'agitation et pH sur la production de la protéase. Les résultats ont permis de sélectionner tous les facteurs étudiés car ils présentaient un effet significatif.

3.1.1.1.Effet de température

La température est un paramètre critique qui doit être contrôlé et varié d'un organisme à l'autre pour une croissance cellulaire et une production d'enzymes maximales. L'exigence de température optimale rapportée pour la production de protéase par différents micro-organismes diffère considérablement (**Kanupriya *et al.*, 2017**).

Selon l'analyse des résultats de Plackett et Burman, la température n'a pas un effet significatif sur la production de la protéase (P=0.0671).

3.1.1.2.Effet d'Humidité

L'eau facilite l'activité de la levure en améliorant la mobilité des cellules de levure, en dissolvant les constituants fermentescibles et en assurant le contact entre les enzyme et le substrat.

L'analyse statistique par le plan de Plackett et Burman, indique que la variation de l'humidité de 50% à 96% a un effet négativement significatif (P=0.0491) sur la production de la protéase de *Candida sp*.

3.1.1.3.Effet d'Inoculum

L'inoculum doit être adéquat pour une bonne croissance des microorganismes et donc pour la production des métabolites.

Abdlbar et al. (2021) à essayer des différentes quantités d'inoculum (0.2ml, 0.5ml, 1ml, 1.5ml et 2 ml) dont l'activité protéolytique optimale produite par la souche fongique a été enregistré à 3.2×10^6 spores/ml. **Apoorva G et al. (2020)** a annoncé dans son travail que parmi les pourcentages suivantes (1%, 2%, 3%, 4% et 5%) 3% de la suspension cellulaire dans le milieu de fermentation a permis d'obtenir la meilleur activité protéolytique.

Selon l'analyse des résultats de Plakett et Burman, l'inoculum à un effet négatif significatif sur la production de la protéase ($P=0.0261$) par *Candida sp.*

3.1.1.4.Effet de glucose

Le glucose est utilisé plus rapidement que n'importe quelle autre source de carbone et produit une plus grande variété d'intermédiaires métaboliques. Ces derniers peuvent alors agir comme répresseur de la production enzymatique (**Pardee., 1961**).

Ce permet de conclure que le mélange de déchets utilisé (déchets des tomates et les restes du pain) constitue une source de carbone adéquate car riches en glucides surtout les restes du pain qui renferment 54% de glucides (**Web 3**).

L'analyse statistique par le plan de Plakett et Burman, indique que le glucose na pas un effet significatif sur la production de la protéase ($P=0.1701$).

3.1.1.5.Effet du corn steep liquor

Le corn-steep liquor est fourni par SAIDAL (Médéa, Algérie) sous forme liquide. Un sous-produit de l'extraction de l'amidon, il est très utilisé pour sa richesse comme nutriment des microorganismes dans les fermentations. Avant son utilisation le corn-steep liquor est clarifié par centrifugation à 15000 g pendant 20 minutes et le surnageant obtenu est utilisé dans l'enrichissement du milieu de culture. (**Benkahoul et al., 2017**).

Le corn steep liquor est considéré comme une source azotée, son effet est non significatif est du probablement à la richesse des déchets utilisés. Les déchets de tomates renferment 22g pour 100g de matière sèche (**INRA ,1988**).

3.1.1.6.Effet des sels

Les sels minéraux sont non seulement importants pour la croissance de micro-organismes, mais également pour la production d'enzymes et leur activité.

L'activité enzymatique peut être altérée, en présence de certains sels ; ils peuvent augmenter ou réduire l'activité de l'enzyme des protéases sont impliquées (**Zhang et al ., 2019**).

Ce résultat s'explique par le fait que les déchets des tomates et les restes du pain fournissent suffisamment d'oligo-éléments nécessaires à la croissance de la levure et par conséquent à la synthèse protéique.

Selon l'analyse des résultats de Plaquett et Burman, les sels (NH_4SO_4 et NaCl) n'ont pas un effet significatif sur la production de la protéase ($P=0.0511$ et $P=0.5801$ respectivement).

3.1.1.7.Effet du Temps d'incubation

La période, au cours de laquelle une enzyme est obtenue à partir de la culture, est un facteur important dans la production d'enzymes. La plupart des rapports de la littérature ont confirmé que la sécrétion maximal d'enzymes se produit généralement à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Selon **Gupta et al. (2003)**, la sécrétion maximal d'enzyme à la fin de la phase de la croissance en raison de la réduction de la répression catabolique car les nutriments sont épuisés dans le milieu de croissance.

La plupart des microorganismes protéolytiques étudiés montrent une sécrétion maximale de la protéase après 48h d'incubation.

Madh P.C et Nimy.P (2018) à essayer des durés d'incubation de 0h jusqu'à 112h, la différence entre les valeurs est 8h, la production de protéase la plus forte a été noté à 82h par la souche bactérienne sélectionnée.

D'un autre côté, (**Abdalbar et al.,2021**) à essayer des valeurs de temps d'incubation qui varie dans l'intervalle (24h et 144h) ou l'activité protéolytique optimale produite par la souche fongique a été enregistrée à 120h.

Les travaux décrits par **Apoorva G et al. (2020)** qui a essayé différents temps d'incubation (24h, 48h, 72h, 96h et 120h). L'activité enzymatique idéale a été obtenue à 120h par une souche fongique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Selon l'analyse des résultats de Plaquett et Burman, le temps d'incubation sur la production de protéase est positivement significatif avec une valeur de ($P= 0,0041$).

Exposition des résultats :

Le modèle qu'on a choisi est adéquat pour la production de protéase. La production de la protéase peut être présentée par l'équation de régression suivante :

Activité protéolytique = $32081 + 3367 \mathbf{C1}$ (température) – $3839 \mathbf{C2}$ (Humidité) – $4909 \mathbf{C3}$ (Inoculum) – $2155 \mathbf{C5}$ (Glucose) – $1491 \mathbf{C6}$ (corn steep liquor) + $3790 \mathbf{C7}$ ($(\text{NH}_4)\text{SO}_4$) – $742 \mathbf{C9}$ (NaCl) + $10025 \mathbf{C10}$ (Temps d'incubation).

Les coefficients de régressions sont représentés dans le Tableau 8

L'équation réduite

$$\mathbf{C12} = - 3839 \mathbf{Humidité} + - 4909 \mathbf{Inoculum} + 10025 \mathbf{Temps d'incubatio}$$

3.1.2. Graphiques de Pareto

Le diagramme de Pareto est un outil relativement simple pour faire un classement de plusieurs phénomènes par ordre d'importance. Il s'agit d'un histogramme (figure 19, figure 21) représente graphiquement l'analyse du plan de Plackett et Burman pour la production des protéines. D'après le diagramme da Pareto obtenu, les factures qui dépassent le seuil, qui est de 3.182 sont significatifs et ces factures sont C10 (Temps d'incubation), C3 (Inoculum) et C2 (Humidité).

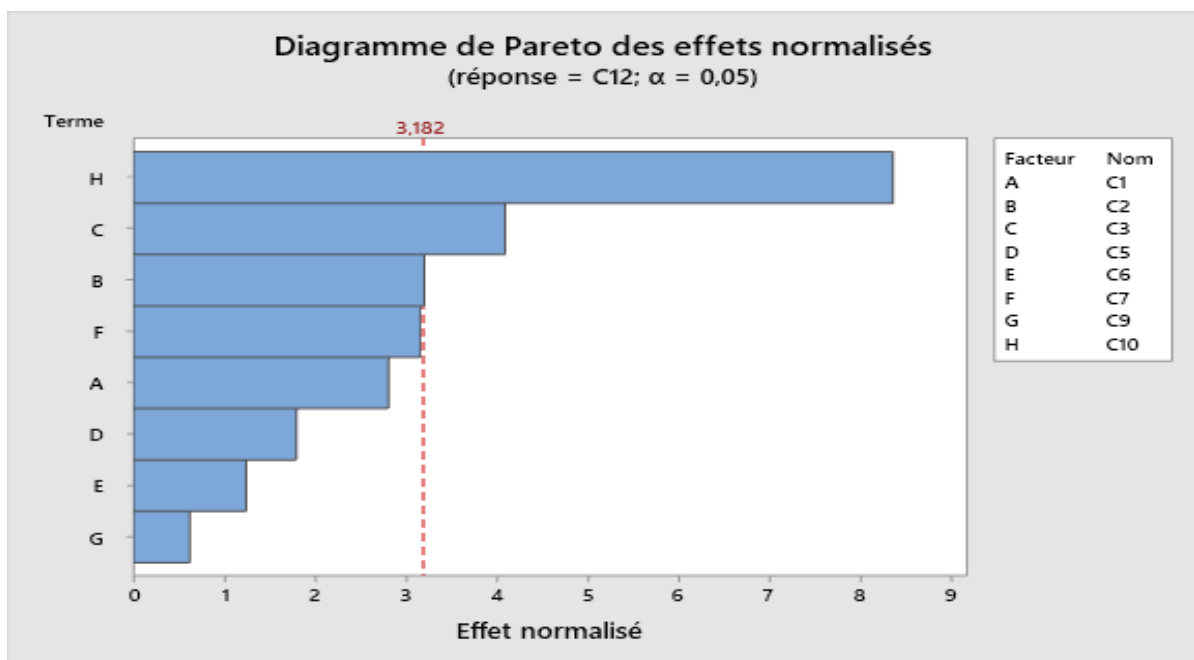


Figure 19 : Représentation de Pareto des effets des différents facteurs sur la production de protéase.

3.1.3. Conclusion

L'utilisation des plans d'expériences de Plackett et Burman, ont permis de sélectionner les facteurs explicatifs à effet significatif positif ou négatif sur la production de protéase de *Candida* *sp* P₃. La production de protéase est nettement influencée par l'humidité, l'inoculum et temps d'incubation. Les optima de ces facteurs sélectionnés seront déterminés par l'utilisation d'une autre conception : plan composite centré de Box et Wilson, (1951).

3.2. Optimisation de la production des enzymes selon le plan statistique de Box et Wilson

Le CCD est utilisé pour étudier l'interaction entre les facteurs sélectionnés précédemment, par le plan de Plackett et Burman et aussi pour déterminer leur niveau optimal. Ce plan est basé sur la méthode des surfaces de réponse qui est la plus couramment utilisée dans ce type d'expériences (Jun Li *et al.*, 2015). Elle consiste à modéliser les résultats sous la forme de fonctions polynomiales du second degré soit un modèle quadratique. L'aboutissement des expériences de l'optimisation sont analysés par le logiciel Minitab 19, le plan expérimental ainsi que l'activité sont montrés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Production de la protéase selon le plan de Box et Wilson.

Expérience	Facteurs			Activité protéolytique (UI/g)
	Humidité	Inoculum	Temps d'incubation	
1	1,682	0	0	25561.3
2	0	0	0	22031.6
3	0	0	1,682	23217.5
4	1	1	-1	23422.3
5	1	-1	1	22156.6
6	0	0	0	21879.4
7	1	-1	-1	24514.1
8	0	0	0	23226.5
9	-1	-1	1	21636.1
10	-1	-1	-1	24053.6
11	0	0	1	23101.4
12	-1	1	0	25515.4
13	0	0	0	22976.3
14	0	-1,682	0	23896.2
15	0	1,682	0	25895.7
16	-1,682	0	-1	23697.1
17	-1	1	0	20731.3
18	0	0	-1	22088.8
19	1	1	1	25721.6
20	0	0	-1,682	19864.7

RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse de régression du modèle est présentée par le tableau 10. Et l'analyse de la variance est représentée dans les tableaux 12 et 13 respectivement.

D'après le Tableau 11 l'activité protéolytique la plus faible est de 19864,7 UI/g est observé dans l'essai 20, contenant : 10^6 cellule/ml d'inoculum avec 90% d'humidité et incubation de 96 h, et la valeur la plus grande est de 25721,6 UI/g obtenu par l'essai 19 contenant 10^4 cellule/ml d'inoculum avec 80% d'humidité et incubation de 31 h.

Les coefficients sont nécessaires pour comprendre le modèle des interactions mutuelles entre les meilleures variables pour cela on utilise les valeurs P comme un outil pour vérifier la signification de chacun de ces coefficients. Lorsque les valeurs de P sont inférieures à 0,05, cela indique que les coefficients sont significatifs. Plus l'amplitude de la valeur du test- t est grande et plus la valeur de p tend vers 0 indique la signification du coefficient correspondant. Et les variables ayant des coefficients négligeables ont été omis.

Le tableau 12 résume les coefficients de régression significatifs de l'activité protéolytique déterminés par les valeurs du test de student et la probabilité.

Tableau 12 : Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité protéolytique.

Terme	Coeff	Coef ErT	Valeur de T	Valeur de P	FIV
Constante	22560	282	79.98	0	
Humidité	514	187	2.74	0.021	1.00
Inoculum	468	187	2.5	0.031	1.00
Temps d'incubation	582	187	3.11	0.011	1.00
Humidité X Humidité	674	182	3.7	0.004	1.00
Inoculum X Inoculum	768	182	4.22	0.002	1.00
Temps d'incubation X Temps d'incubation	-418	182	-2.29	0.045	1.00
Humidité X Inoculum	240	245	0.98	0.035	1.00
Humidité X Temps d'incubation	-303	245	-1.24	0.243	1.00
Inoculum X Temps d'incubation	1480	245	6.06	0	1.00

L'activité protéolytique peut être présentée par une équation de régression suivante :

$$\text{Activité protéolytique} = 22560 + 514 \mathbf{A} + 468 \mathbf{B} + 582 \mathbf{C} + 674 \mathbf{A} \times \mathbf{A} + 786 \mathbf{B} \times \mathbf{B} - 418 \mathbf{C} \times \mathbf{C} + 240 \mathbf{A} \times \mathbf{B} - 303 \mathbf{A} \times \mathbf{C} + 1482 \mathbf{B} \times \mathbf{C}$$

A: Humidité, **B:** Inoculum, **C:** Temps d'incubation

L'analyse statistique indique que l'ajustement du modèle a également été exprimé par le coefficient de détermination R^2 , qui s'est avéré être de 0.9096 pour l'activité protéolytique. Cela indique que le modèle peut expliquer 90.96% de la variabilité de la réponse. Le R^2 ajusté (0,8282) a indiqué un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites pour la production de protéase. Tous les résultats ont révélé que le modèle d'équation est efficace pour décrire la réponse de l'expérience donnant le meilleur rendement en protéase.

Les résultats ont été analysés en utilisant la méthode statistique de variance (ANOVA) comme étant approprié au modèle expérimental utilisé. L'ANOVA du modèle de régression quadratique démontre que le modèle de Fisher pour l'activité de protéase est hautement significatif, comme le montre la valeur F du modèle de protéase qui est de 11.17 avec une probabilité de valeur très faible $p=0,000$.

Cela indique que les effets combinés de toutes les variables indépendantes ont contribué de manière significative à l'amélioration de la production de protéase. De plus, la valeur F pour un ajustement inadéquat était de 1,55. La valeur F élevée et l'ajustement inadéquat non significatif indiquent que le modèle est un bon ajustement. La valeur P pour le modèle (0,000) et l'ajustement inadéquat 0,32 a également suggéré que les données expérimentales obtenues correspondaient bien au modèle.

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 13 : ANOVA pour l'activité protéolytique.

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de P
Modèle	9	48102748	5344750	11.17	0,000
Linéaire	3	11218692	3739564	7.82	0,006
Humidité	1	3601680	3601680	7.53	0,021
Inoculum	1	2992533	2992533	6.26	0,031
Temps d'incubation	1	4624479	4624479	9.67	0,011
Carré	3	18112537	6037512	12.62	0,001
Humidité X Humidité	1	6544993	6544993	13.68	0,004
Inoculum X Inoculum	1	8504734	8504734	17.78	0,002
Temps d'incubation X Temps d'incubation	1	2516749	2516749	5.26	0,045
Interaction à 2 facteurs	3	18771518	6257173	13.08	0,001
Humidité X Inoculum	1	458973	458973	0.96	0,350
Humidité X Temps d'incubation	1	734987	734987	1.54	0,243
Inoculum X Temps d'incubation	1	175777558	17577558	36.75	0,000
Erreur	10	4782970	478297		
Inadéquation de l'ajustement	5	2908402	581680	1.55	0,321
Erreur pur	5	1874568	374914		
Totale	19	52885718			

3.2.1. Détermination des interactions entre les variables

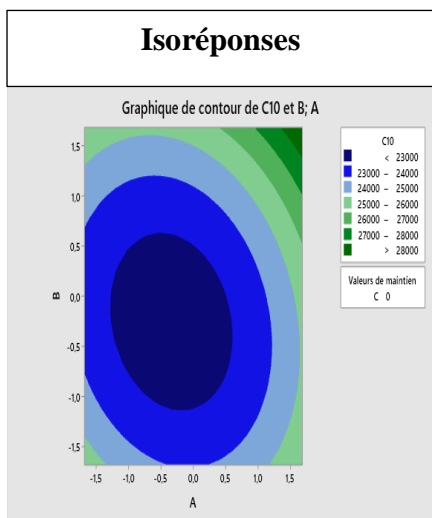
Les surfaces de réponse sont des graphiques en trois dimensions (contours de repenses, les isorepenses et surfaces de repense). Elles sont obtenues par le modèle polynomial de second degré. Le plan horizontal de la figure matérialise le domaine de variation de deux facteurs ; l'axe vertical matérialise la variation de la réponse à partir du modèle. Au-delà de deux facteurs, il est nécessaire de maintenir à un niveau constant les facteurs dont les variations ne sont pas décrites dans le plan horizontal. Ces graphiques permettent d'illustrer les effets linéaires, quadratiques et interactifs sur chaque variable. En effet, elles sont utilisées pour prédire les valeurs optimales pour différentes variables de test, afin d'obtenir la réponse maximale de protéase.

Les figures (20 A1) et (20 A2) montre les interactions entre les deux variables : A (humidité) et B (inoculum) et leurs effets sur la production de protéase. La zone en vert foncé de la figure (A1) représente l'intervalle entre les valeurs en A (humidité) et B (inoculum) où l'on retrouve la zone d'activité protéasique la plus importante >28000. Ce qui indique une production élevé de protéase dont cet intervalle se situe aux hauts niveaux des facteurs (valeurs supérieurs à 1.5). Lorsque la probabilité de l'interaction entre les facteurs A et B est supérieure à 0.05 ($p = 0.350$) il n'ya pas d'effet significatif.

Les figures (20 B1) et (20 B2) montre les interactions entre les deux variables : A (humidité) et C (temps d'incubation) et leurs effets sur la production de protéase. La zone en vert foncé de la figure (B1) représente l'intervalle entre les valeurs en A (humidité) et C (temps d'incubation) où l'on retrouve la zone d'activité protéolytique la plus importante >25000. Ce qui indique une production élevé d'enzyme de protéase dont cet intervalle se situe à des niveaux élevés des facteurs. Lorsque la probabilité de l'interaction entre les facteurs A et B est supérieure à 0.05 ($p = 0.243$) il n'ya pas d'effet significatif.

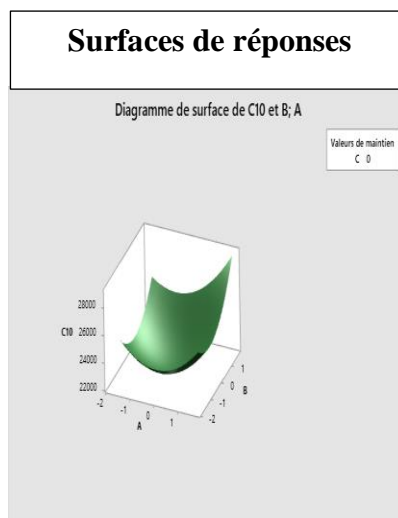
Les figures (20 C1) et (20 C2) montre les interactions entre les deux variables : B (inoculum) et C (temps d'incubation) et leurs effets sur la production de protéase. La zone en vert foncé de la figure (1. A. 3) représente l'intervalle entre les valeurs en C (temps d'incubation) et B (inoculum) où l'on retrouve la zone d'activité protéolytique la plus importante >28000. Ce qui indique une production élevé de protéase dont cet intervalle se situe aux hauts niveaux des facteurs (valeurs supérieurs à 1.5). Lorsque la probabilité de l'interaction entre les facteurs B et C est inférieure à 0.05 ($p = 0.000$) ont conclu que l'effet positivement significatif.

RESULTATS ET DISCUSSION

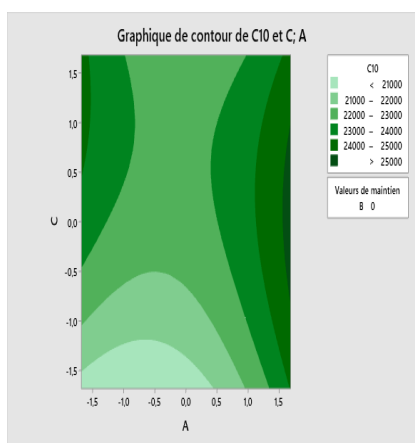


1

B (inoculum), A (humidité)

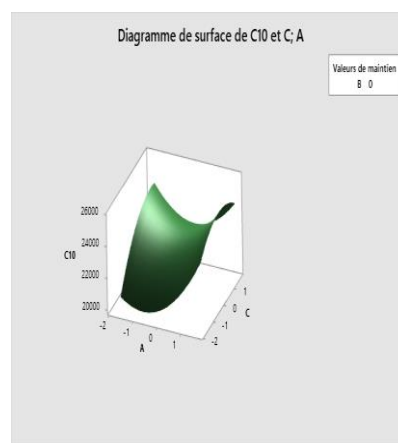


2

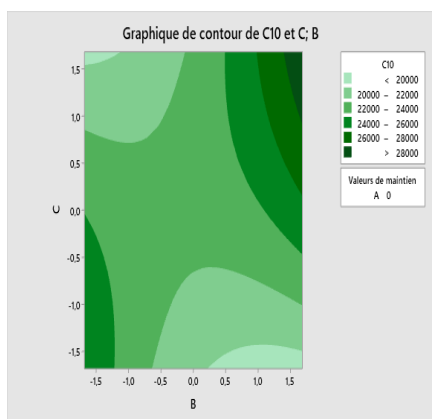


1

A (humidité), C (temps d'incubation)

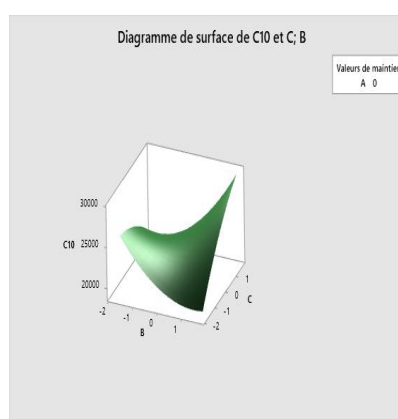


2



1

B (inoculum), C (temps d'incubation)



2

Figure 20 : Courbes de contour (1) et la surface de réponse (2)

3.2.2. Graphiques de Pareto :

Le diagramme de Pareto représente graphiquement les résultats de l'analyse du plan pour la production de la protéase et illustre l'ordre de signification des variables.

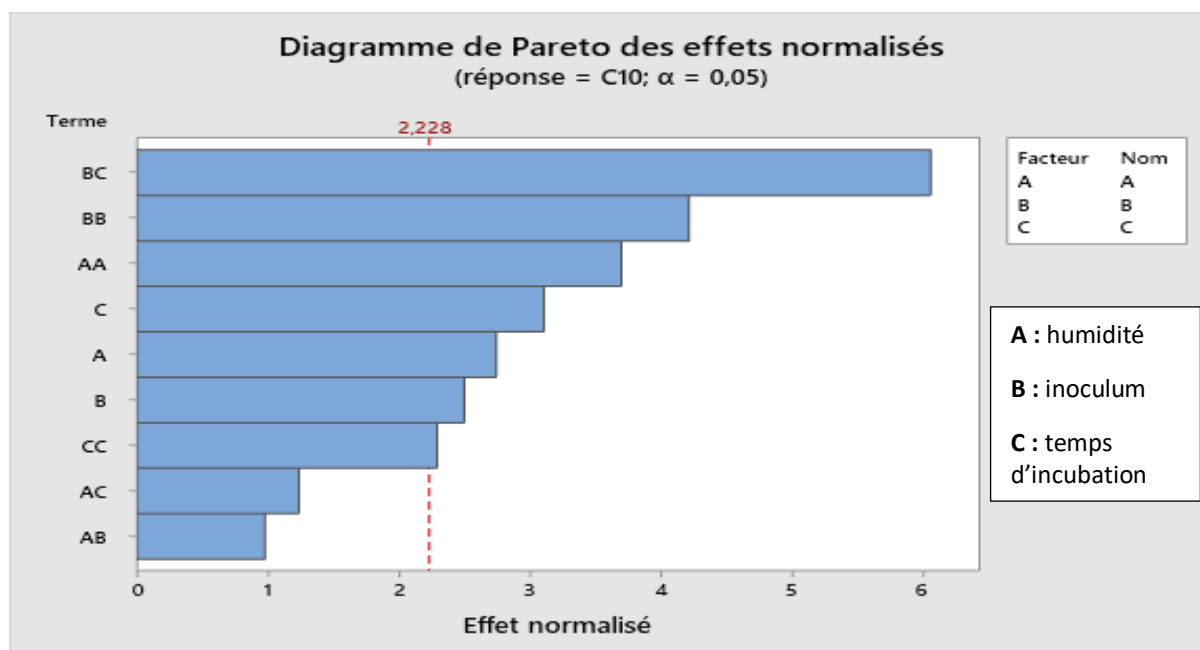


Figure 21 : Représentation de Pareto des effets des facteurs sur la production de protéase.

On remarque que : humidité, inoculum et temps d'incubation sont significatifs sur la production de protéase, ainsi que interactions inoculum (B) × temps d'incubation (C) au leur effet dépasse le seuil de 2.228. Par contre les effets de l'interaction humidité (A) × temps d'incubation (C) et humidité (A) × inoculum (B) ne sont pas significatifs sur la production de protéase

La RSM (Réponse Surface Methodology) est une analyse qui a permis de déterminer les valeurs optimales des trois variables retenues pour avoir la meilleure activité protéolytique possible. L'optimisation de la production de protéase nécessite soit l'évaluation de l'influence de chaque paramètre sur l'activité étudiée d'une part et les effets des interactions par paire de facteurs d'autre part. La réalisation par la méthodologie de surface de réponse permis d'obtenir l'humidité 96,82%, inoculum $0,5 \times 10^6$ cellule/ ml et le temps d'incubation 112 h.

Après avoir adopté les valeurs optimales de chaque facteur temps d'incubation : 112 heures, humidité : 96.82% et inoculum : 0.5×10^6 cellules/ ml, nous attendons un résultat du rendement protéasique allant jusqu'à 32099.2 UI/g.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le plan composite centré de Box et Welson couplé à la méthode des surfaces de réponse (RSM) ont permis de déterminer les optima des facteurs étudiés (inoculum, humidité et temps d'incubation) (Figure 22).

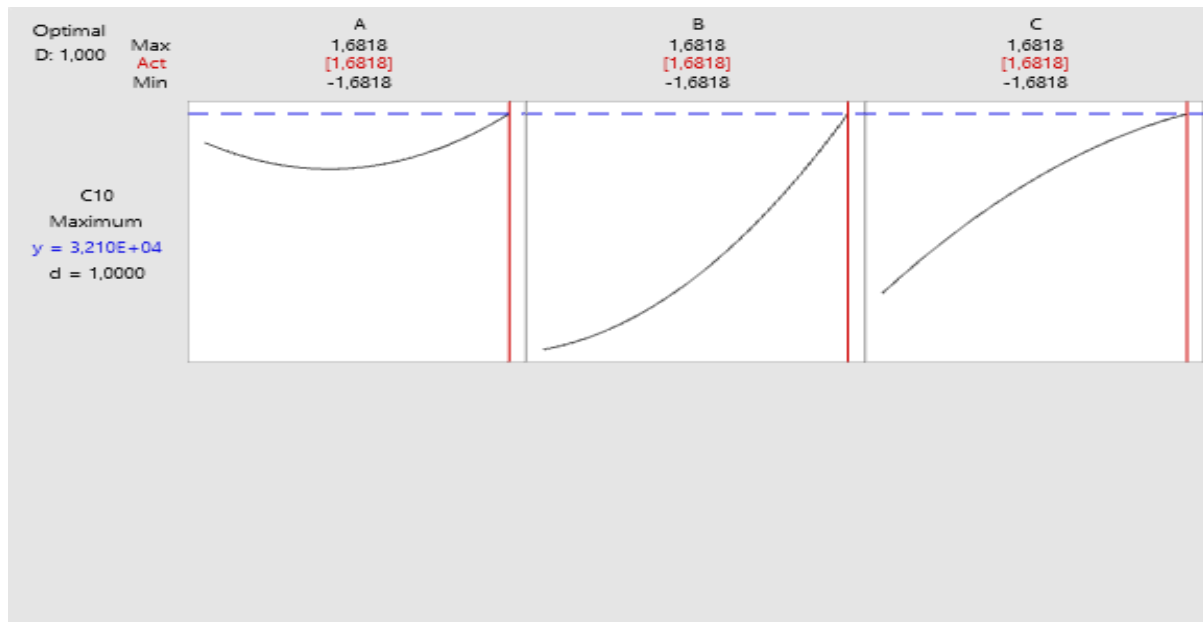


Figure 22 : Valeurs optimales des variables et de la réponse déterminées par « RSM » pour une meilleure activité protéolytique.

3.3. Validation expérimentale du modèle

La culture de la levure *Candida sp*, en conditions optimales (Humidité : 96,82%, Inoculum : $0,5 \times 10^6$ cellules/ml, temps d'incubation : 112h) a permis l'obtention d'une activité protéasique acide (pH = 5) de 31450 UI/g

Conclusion partielle

La production protéasique par *Candida sp* sur milieu solide est de 24905,78 UI/g et après l'optimisation elle a augmenté à 31450 UI/g.



*Conclusion
générale*

Conclusion générale

Notre étude a démontré que le mélange de déchets de tomates et les restes du pain (1:1) constituent la meilleure source de carbone et d'énergie pour le développement de la levure *Candida sp* et la production de la protéase. Ce recyclage de déchets permet d'une part de lutter contre la pollution de l'environnement, et d'autre part de produire des enzymes à utilisation industrielle.

Notre étude comparative de la production de la protéase de *Candida sp*, P₃ par fermentation en milieu solide (FMS) et fermentation en milieu liquide (FML) a montré que la fermentation solide est meilleure pour la production protéasique.

En industrie, il serait intéressant d'améliorer (optimiser) la production d'enzymes microbiennes. Pour cela, nous avons utilisé les plans de Plackett-Burman pour l'étude de l'effet de 07 facteurs (température, humidité, inoculum, glucose, corn steep liquor, (NH₄) SO₄, NaCl et le temps d'incubation) sur la production de la protéase. Les résultats ont révélé que trois facteurs à savoir l'humidité, l'inoculum et le temps d'incubation ont des effets significatifs (P=0,0491, P=0,0261, et p= 0,0041 respectivement) sur la réponse et par conséquent, ils sont sélectionnés. L'utilisation du deuxième plan qui est le plan de Box-Wilson a permis d'étudier l'effet des interactions entre les trois facteurs étudiés sur la production protéasique et aussi de déterminer leurs optimums: L'humidité 96,82%, l'inoculum 0,5 X 10⁶ cellules/ml et le temps d'incubation de 112h). La production protéasique obtenue par la culture de la levure sur le milieu optimisé est de 31450UI/g. Cette valeur est en accord étroit avec la valeur prédite. Les outils statistiques tels que les plans de Plackett-Burmann et Box-Wilson sont très efficace pour l'optimisation de la production de la protéase de *Candida sp*, P₃

L'application du plan de Box et Wilson a permis de déterminer, d'une part, l'effet des interactions entre les facteurs étudiés, et d'autre part leurs optima : 112h pour temps d'incubation avec 96.82% d'humidité et 0.5×10⁶ Cellules/ml d'inoculum. La production de protéase acide de *candida Sp* dans le déchet de tomate et le reste du pain est prometteuse. Il y a espoir que ce bioprocédé soit éventuellement transféré à l'industrie. Ce bioprocédé deviendra alors un exemple de biotechnologie respectant le fondement du développement durable.

-En perspectives, il sera intéressant d'étudier la cinétique de la croissance de la levure et de la production de la protéase.

-Purifier l'enzyme et étudier ses caractéristiques.

-Faire des essais d'applications industrielles.

A photograph of various pieces of laboratory glassware, including a large round-bottom flask with a stopper, a graduated cylinder, and several Erlenmeyer flasks, all containing liquids. The scene is lit with a blue and purple glow, and the word 'Références' is overlaid in a black, cursive font.

Références

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdilbar Usman**, Said Mohammed, Jermen Mamo., Production, Optimization and Characterization of an Acid Protease From Filamentous Fungi by Solidstate Fermentation., (2020)., Debre Berhan University
- Abidi, F.**, Limam, F., & Nejib, M. M. (2008). Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. *Process Biochemistry*, 43, 1202–1208.
- Abraham, J.**, Gea, T., & Sánchez, A. (2014). Substitution of chemical dehairing by proteases from solid–state fermentation of hair wastes. *Journal of Cleaner Production*, 74, 191– 198.
- Arouak, L.**, & Zenad, A. (2019) Valorisation des sous-produits de quatre variétés de tomate industrielle (*Solanum esculentum* L) dans l’Est algérien. Mémoire de doctorat. Université Badji Mokhtar - ANNABA.
- Arun Kumar**, Sharma, Vinay Sharma et al 2015 ; Optimization of protease production from bacteria from soil. *Applied Research Journal*. ; 1: 388-394.
- Banerjee, G.**, Mukherjee, S., Bhattacharya, S., & Ray, A. K. (2016). Purification and characterization of extracellular protease and amylase produced by the bacterial strain, *Corynebacterium alkanolyticum* ATH3 isolated from fish gut. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 41, 9–16
- Benluvankar V**, Jebapriya GR, Gnanadoss JJ (2015) Protease production by *Penicillium* sp. LCJ228 under solid state fermentation using groundnut oilcake as substrate. *Life* 50:1 12
- Botton B.** (1991). La physiologie des levures ds : Larpent J.P., *Biotechnologie des levures*. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. 97-127.
- Botton B.**, Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. 34-428.
- Charles P**, Devanathan V, Anbu P et al (2008) Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *J Basic Microbiol* 48(5):347–352
- Contesini, F. J.** (2014). Production, characterization and application of proteases from *Bacillus* sp. São Paulo, Brazil: School of Food Engineering, University of Campinas, Phd thesis.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Costa, R.d.S.;** de Almeida, S.S.; Cavalcanti, E.d.A.C.; Freire, D.M.G.; Moura Nunes, N.; Monteiro, M.; Perrone, D. (2021) Enzymes produced by solid state fermentation of agro-industrial by-products release ferulic acid in bioprocessed whole-wheat breads. Food Res.Int., 140, 109843.
- Dakhmouche, S.** (2016). Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine.
- DALI Nadine Sofia.,** HAMAME Afaf (2016) Recherche de levures productrices d'enzymes glycolytiques exocellulaires thermostables : Production (sur boîte de Pétri et en batch) et Caractérisation des enzymes produites.. Mémoire de master. Université Frères MENTOURI Constantine.
- Deak Tibor.** (2006). Chapitre 8: environmental Factors. Influencing yeasts, in yeast handbook : biodiversity and ecophysiology of yeasts, Carlos rosa, gabor peter (eds.). Springer Verlag Berlin Heidelberg. : 155-174.
- Ellaiah, P.,** Srinivasulu, B., & Adinarayana, K. (2002). A review on microbial alkaline proteases. Journal of Scientific & Industrial Research, 61, 690–704.
- ENSMIC –ALIMENTATION HUMAINE – Condensé de cours –Annick Le Blanc, (2007-2008), LA FERMENTATION PANAIRE https://lamainalapate.asso-web.com/uploaded/Cours3_La%20fermentation.pdf.
- Fekadu, Alemu;** 2015 Isolation and screening of Protease Enzyme Producing Bacteria from cheese at dilla university, Ethiopia. International Journal of Nutrition and Food sciences; 4(2): 163-168.
- Goutam Banerjee & Arun Kumar Ray** (2017): Impact of microbial proteases on biotechnological industries, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, DOI: 10.1080/02648725.2017.1408256.
- Guiraud J. P.** (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. : 310-321.
- Gupta, R.,** Beeg, Q. K., Khan, S., & Chauhan, B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Applied Microbiology and Biotechnology, 60(4), 381–395
- Gupta, R.,** Gigras, P., Mahapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. Process Biochemistry, 38(11), 1599–1616.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Husain, Q.** (2010). Beta galactosidases and their potential applications: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(6), 41–62.
- J. Goupy**, (2006) Les plans d'expériences. *Revue MODULAD*. Vol. 34, pp. 74-116.
- Jemli, S.**, Ayadi-Zouari, D., Hlima, H. B., & Bejar, S. (2016). Biocatalysts: Application and engineering for industrial purposes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 246–258.
- K.J. Horadam**, (2007) *Hadamard Matrices and Their Applications*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Kellil, Souad.** (2015). Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie. 5(2) : 120-230.
- Kumar, C G.**, & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17(7), 561–594.
- Kurtzman, C P.** and Suzuki M. (2010). Coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form *Priceomyces* and *Scheffersomyces*. *Mycoscience*. 51(1) : 2-14.
- Kanupriya Miglani Sharma**, Rajesh Kumar, Surbhi Panwar, Ashwani Kumar, (2017) Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* (2017) 15, 115–126.
- L. Levin, F.** Forchiassin and A., (2005) “Viale, Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements“, *Process Biochemistry*, vol. 40 , pp. 1381–1387.
- Larid R.**, 2012. Valorisation des sous produits de tomate en vue de leur incorporation dans l'aliment de volaille (cas des poules pondeuses). Diplôme de Magister Technologie Alimentaire. Université Tlemcen. P73, 15, 13, 23,7.
- Larpent-gourgaud M.** et Sanglier J.J. (1992). *Biotechnologies, principes et méthodes*. Edition Doin. 574-581.
- Leblon C.** (1988). Etude des levures de vinification et des facteurs agissant sur la fermentation alcoolique. Thèse: Pharmacie: Nancy 1. (51) : 235.
- M. Claeys-Bruno**, M. Dobrijevic and M. Sergent, (2009) ., analyse de sensibilité : comparaison entre les plans d'expériences et la méthode Monte Carlo in: 41èmes Journées de Statistique, Bordeaux, pp. 1-6.
- M. Sergent**, D. Dupuy, B. Corre and M. Claeys-Bruno, (2009) ., comparaison de méthodes de criblage pour la simulation numérique in : 41èmes Journées de Statistique, pp. 1–6 , Bordeaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Matkawala, F.;** Nighojkar, S.; Kumar, A.; Nighojkar, A. (2019). Enhanced production of alkaline protease by *Neocosmospora* sp. N1 using custard apple seed powder as inducer and its application for stain removal and dehairing. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101310.
- Meghavarnam, A.K.;** Janakiraman, S. (2017) Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 124-130.
- Melikoglu M.,** Lin C.S.K, Webb C. (2015). Solid state fermentation of waste bread pieces by *Aspergillus awamori*: Analysing the effects of air flow rate on enzyme production in packed bed bioreactors. *Food and Bioproducts Processing*. 95, 63-75.
- Motyán JA,** Toth F, Tozser J (2013) Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules* 3(4):923–942.
- Mouhcine Fadil.,** Abdellah Farah, Bouchaib Ihssane , Taoufik Haloui , and Saâd Rachiq (2014)., Application de plan de Plackett Et Burman dans le criblage des paramètres agissants sur le processus d'hydrodistillation de Thym du Maroc (*Thymus vulgaris* L.). 4 Vol. 6 No 4, pp. 530-540.
- Muhammad Naveed ,** Tahir Mehmood , Fareeha Nadeem 2021 , Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review , DOI: 10.1007/s10562-020-03316-7.
- Nadeem F,** Mehmood T, Naveed M et al (2019) Protease production from *Cheotomium globosum* through central composite design using agricultural wastes and its immobilization for industrial exploitation. *Waste Biomass Valor.* <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00890-9>
- Novelli PK,** Barros MM, Fleuri LF (2016) Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. *Food Chem* 198:119–124
- OL Ramos ,** FX Malcata , 2017 , dans *Comprehensive Biotechnology* (troisième édition) ,, Science direct., <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/protease>
- Ouédraogo N.,** Savadogo A., Zongo C., Somda K. M. A. and Traoré S. (2012). High performance amyolytic yeast strains isolation and identification for valorization of potatoes waste available in Burkina Faso. *International Food Research. J.* 19(4): 1463-1469.
- Padmapriya, M., & Williams, B. C.** (2012). Purification and characterization of neutral protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(4), 612–618.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Pandey, A.** Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 2003, 13, 81-84.
- Paulo Jorge**, et Isabel Sá-Correia. (2014). Phylogenetic and syntenic analyses of the 12 spanner drug: H⁺ antiporter family 1 (DHA1) in pathogenic *Candida* species: Evolution of MDR1 and FLU1 genes and Genomics. 104 (1) : 45–57.
- Pardee, AB.** (1961). Response on enzyme synthesis and activity to environment. Dans: *Microbial reaction to environment*. Eleventh symposium of the society for general microbiology, Royal Institution Londres, The Syndics of the Cambridge University Press, Cambridge, Angleterre pp, 19-40.
- Pietrazak W.**, Kawa-Rygielska J. (2015). Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of waste wheat–rye bread at very high solids loading: Effect of enzymatic liquefaction conditions. *Fuel* 147 236–242,
- Rajagopalan, G.**, & Krishnan, C. (2008). α -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresources Technology*, 99(8), 3044–3050
- Rao MB**, Tanksale AM, Ghatge MS et al (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(3):597–635.
- Riviere J.** (1975). Les applications industrielles de la microbiologie. Collection Sciences agronomiques. Masson et Cie (édition.).31-195.
- Samaha Mhamdi**, Anissa Haddar, Ibtissem Hamza Mnif, Fakher Frikha , Moncef Nasri , Alya Sellami Kamoun. (2014)., Optimisation de la production de protéase par *Bacillus mojavensis* A21 sur pois chiche et féverole *Avancées en biosciences et biotechnologie*, 5 , 1049-1060.
- Sani JT**, Gharibi SOS, Shariati MA (2017) The importance of alkaline protease commercial applications: a short review. *Ind J Resin Pharm Biotechnol* 5(1):5.
- Sanna T.**, Sayed E., 2001 “Purification and characterization of raphanin, A neutral protease, from *Raphanus sativus* leaves”, *Pakistan journal of biological sciences*, vol. 4, pp. 564-568.
- Sarikaya E.** and Gurgun V. (2000). Increase of the α -amylase yield by some *Bacillus* strains. *Turk J. Biol.*24: 299-308.
- Sawant R**, Nagendran S (2014) Protease: an enzyme with multiple industrial applications. *world journal pharmacy and pharmaceutical science* 3:568–579.
- Sharma AK**, Sharma V, Saxena J et al (2015) Isolation and screening of extracellular protease enzyme from bacterial and fungal isolates of soil *International Journal of Scientific Research in Environmental* 3(9):0334–0340

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sharma N** (2019) A review on fungal alkaline protease. *J Emerg Tech Innov Res* 6(6):1–14
- Sharma, K. M., Kumar, R., Panwar, S., & Kumar, A.** (2017). Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 115–126.
- Silvana M., Mónaco, María E. Rodríguez, et Christian A. Lopes.** (2016). *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. *International journal of food microbiology*. 230 : 31–39.
- Simitsopoulou, Maria, Athanasios Chatzimoschou, et Emmanuel Roilides.** (2016). Biofilms and Antifungal Susceptibility Testing. *Candida Species: Methods and Protocols*. : 183–197.
- Singhania, R.R.; Patel, A.K.; Soccol, C.R.; Pandey, A.** (2009). Recent advances in solid-state fermentation *Biochemical Engineering Journal.*, 44, 13-18.
- Siroya H, Patel S, Upadhyay D** (2020) Industrial applications of protease: a review *Studies In Indian Place Names* 40(71):224–232.
- Soccol, C.R.; Costa, E.S.F.d.; Letti, L.A.J.; Karp, S.G.; Woiciechowski, A.L.;** (2017) Vandenberghe, L.P.d.S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1, 52-71.
- Souza PM, Werneck G, Aliakbarian B et al** (2017) Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus* *Food and Chemical Toxicology Journal* 109:1103–1110.
- Souza, P. M., Bittencourt, M. L. A., Caprara, C. C., de Freitas, M., d’Almeida, R. P. C., Silveira, D., ... Magalhães, P. O.** (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 337–346.
- Stanbury PF., Whitaker, A., Hall, S. J.** (1995). *Principles of fermentation technology* (2nd Edition). Oxford: Butterworth Heinemann.
- Subba Rao, C., Sathish, T., Ravichandra, P., & Prakasham, R. S.** (2009). Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*, 44, 262–268.
- Suresh, PV.; Sachindra, N.M.; Bhaskar, N.** (2011) Solid state fermentation production of chitin deacetylase by *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676 using different substrates. *Journal of Food Science and Technology.*, 48, 349-356.
- Thakur N, Goyal M, Sharma S et al** (2018) Proteases: industrial applications and approaches used in strain improvement. *Biol Forum J* 10(1):158–167.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Theron LW**, Divol B (2014) Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(21):8853–8868.
- Thomas, L.**, Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146–161
- Thomas, L.**; Larroche, C.; Pandey, A. (2013) Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.*, 81, 146-161.
- Turk B**, Turk D, Turk V (2012) Protease signalling: the cutting edge. *The EMBO Journal* 31(7):1630–1643.
- Tania Wade.** (2014), SYSTEMES INNOVANTS DU SENEGAL, INOCULUM DE MICROORGANISME, Laboratoire Commun de Microbiologie.
- Van der Maarel**, M. J., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2), 137–155.
- Veloortalappil NJ**, Robinson BS, Selvanesan P et al (2013) Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research* 1(3):1–13.
- W. Tinsson** , (2010) *Plans D'expérience: Constructions et Analyses Statistiques*. Springer, Berlin.
- Walker G. M.** (2009). Yeast. In. M. Schaechter, ed. *Desk Encyclopedia of microbiology*. 2nd Edition. London : Elsevier/ Academic Press. : 1174-1187.
- Ward, OP.**, Rao, M. B., & Kulkarni, A. (2009). Proteases. In: Schaechter, M. (Edition), *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 495–511). Amsterdam: Elsevier.
- Xiao, L.**; Yang, L.; Zhang, Y.; Gu, Y.; Jiang, L.; Qin, B. (2009) Solid state fermentation of aquatic macrophytes for crude protein extraction *Ecological Engineering - Journal.*, 35, 1668-1676.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Sites web :

1. Aqua portail.com ; publiée le 29/09/2009 (mise à jour le 25/05/2021)., Levure : définition, explications <https://www.aquaportail.com/definition-5597-levure.html>
2. Algérie Press Service ; 22 Avril 2021 ; Alger : 9 tonnes de pain rassis collectées durant les 10 premiers jours de Ramadhan., <https://www.aps.dz/societe/120894-alger-9-tonnes-de-pain-rassis-collectees-durant-les-10-premiers-jours-de-ramadhan>
3. Food navigator.com., 05/mars/2020., pain perdue utilisé pour nourrir les microbes des aliments fermentés :«la technologie est extrêmement simple»., https://www.foodnavigator.com/Article/2020/03/05/Waste-bread-used-to-feed-microbes-for-fermented-foods-The-technology-is-extremely-simple?utm_source=copyright&utm_medium=OnSite&utm_campaign=copyright
4. Algérie Press Service ; 26 Décembre 2020 ; L'année 2020 à Guelma : la production de la tomate industrielle bonifiée., <https://www.aps.dz/regions/114924-l-annee-2020-a-guelma-la-production-de-la-tomate-industrielle-bonifiee>
5. Strophansays.com ., Différence entre la fermentation à l'état solide et la fermentation submergée., <https://fr.strephonsays.com/solid-state-fermentation-and-submerged-fermentation-4974>
6. XLSTAT.com., Plans de surface de réponse., <https://www.xlstat.com/fr/solutions/fonctionnalites/surface-response-designs>
7. PTC.com., Plans d'expériences de Box-Behnken et Box-Wilson., https://support.ptc.com/help/mathcad/r7.0/fr/index.html#page/PTC_Mathcad_Help/box_behnken_and_box_wilson_designs.html
8. <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/en/node/9889>
9. XLSTAT.com., Plans de surface de réponse., <https://www.xlstat.com/fr/solutions/fonctionnalites/surface-response-designs>



Annexes

Annexe 1

1. Préparation de milieu de culture :

Le milieu utilisé est : YPGA (Yeast extract-Peptide-Gelose-Agar)

Composition de milieu de culture :

- ✓ pour la préparation de 300 ml :
- _ Extrait de levure 1,5g
- _ Peptone 6g
- _ Glucose 6g
- _ Agar 6g

L'autoclavage a été effectué à 120°C pendant 20 min. 50 ml du milieu a été coulé dans un erlenmeyer de 250 ml pour le repiquage de la souche.

2. Dénombrement des cellules par comptage sur la cellule de Thomas

Le comptage ou numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis d'une suspension. On exprime le résultat d'un comptage en concentration cellulaire, c'est à dire en unité d'événements par unité de volume (par ex. nombre de cellules / ml).

2.1. Principe de comptage cellulaire

On dépose, entre cellule et lamelle, une goutte de l'échantillon, dilué ou non, puis on compte dans le quadrillage (volume précis) les éléments voulus.

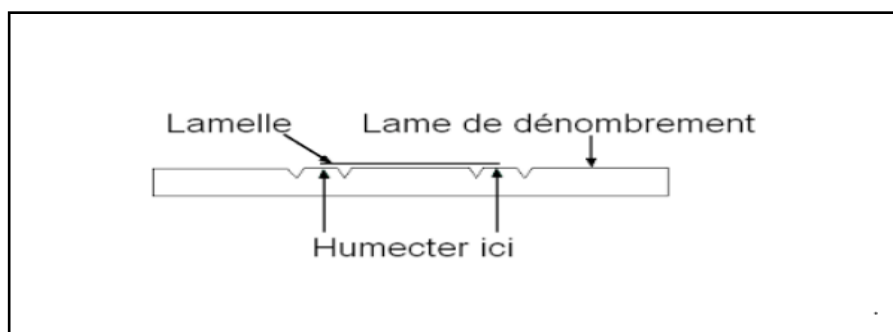


Figure 23 : Comptage cellulaire

Avant de faire le comptage :

- faire une observation à l'objectif x10 non seulement pour repérer le quadrillage mais aussi pour vérifier que les cellules à compter sont réparties de façon homogène ; si l'homogénéité est jugée insuffisante il faut tout recommencer, c'est-à-dire charger un nouvel suspension à partir de la suspension réhomogénéisée.
- passer à l'objectif x40 pour effectuer le comptage

Pour les éléments chevauchent les lignes, comptez tous ceux qui chevauchent les lignes à gauches et en haut. Ne comptez aucun élément qui chevauche les lignes à droite et en bas.

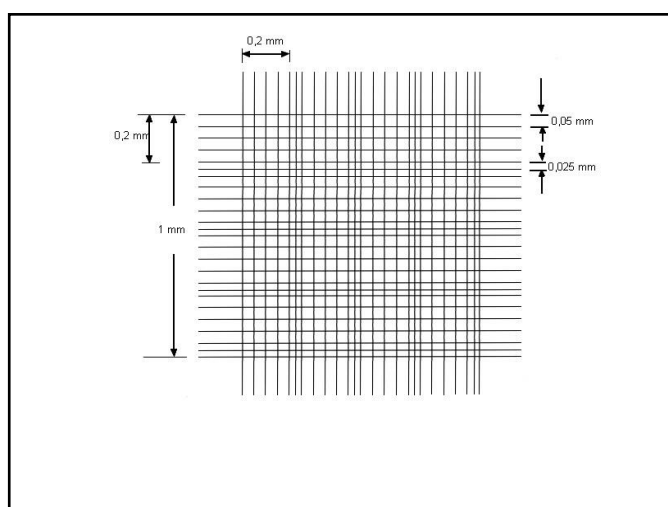


Figure 24 : Quadrillage de cellule de thomas

Concentration cellulaire = nombre des cellules x facteurs de dilution x le facteur de conversion

Annexe 2

Dosage des protéines

● Mode opératoire :

➤ Préparation des solutions

- _ Solution A : Na_2CO_3 à 2% dans le NaOH 0,1N.
- _ Solution B : Tartrate à 2%.
- _ Solution C : $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ à 1%.
- _ Solution D : 0,5 ml C + 0,5 ml B + 50 ml A
- _ Folin-Ciocalteu diluée 3 fois dans l'eau distillée
- _ Solution mère : BSA

➤ Préparation du courbe étalon :

Tube	Blanc	1	2	3	4	5
BSA (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Solution D (ml)	5	5	5	5	5	5
Agitation						
Incubation à température ambiante pendant 10 minutes						
Folin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Agitation						
Incubation à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes						
Lecture de l'absorbance à 650 nm						

- Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines

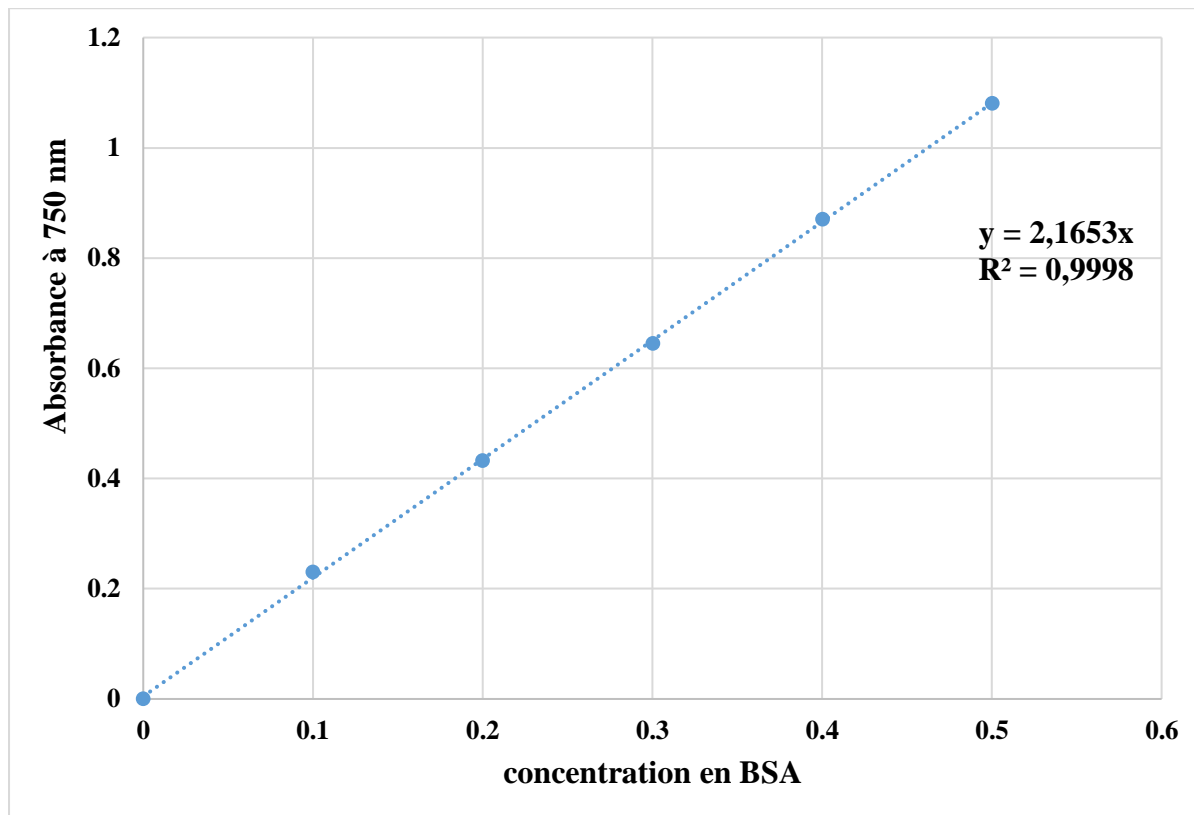


Figure 25 : Courbe étalon pour le dosage des protéines

- Protocole de dosage

<ul style="list-style-type: none"> ○ 0.5 ml extrait enzymatique (dilué à 1/10 éme) ○ 2.5 ml de solution D
Agitation
Incubation à température ambiante pendant 10 minutes
<ul style="list-style-type: none"> ○ 0.25 ml de folin-ciocalteu dilué à 50%
Agitation
Incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes
Lecture de l'absorbance à 750 nm

Annexe 3

Dosage de l'activité enzymatique

- Mode opératoire

- Préparation des solutions utilisées

- _ Caséine à 2,5% dans le citrate de sodium 0,02M

- _ Solution mère de tyrosine à une concentration de 100 µg/ml dans le TCA à 4%

- _ Solution de TCA à 4%

- _ Solution de Na₂CO₃ à 2% dans le NaOH 0,1N

- _ Réactif de Folin-Ciocalteu diluée à 50%

- Préparation du courbe étalon

La gamme étalon est établie à partir d'une solution de tyrosine, les concentrations sont comprises entre 0 et 100 µg/ml selon le tableau suivant :

Concentrations des dilutions (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Solution de tyrosine (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
TCA (ml)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Na ₂ CO ₃ (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Agitation						
Incubation pendant 10 minutes à température ambiante						
Réactif dilué à ½ (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agitation						
Incubation à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes						
Lecture de l'absorbance à 750 nm						

- **Courbe d'étalonnage de la tyrosine**

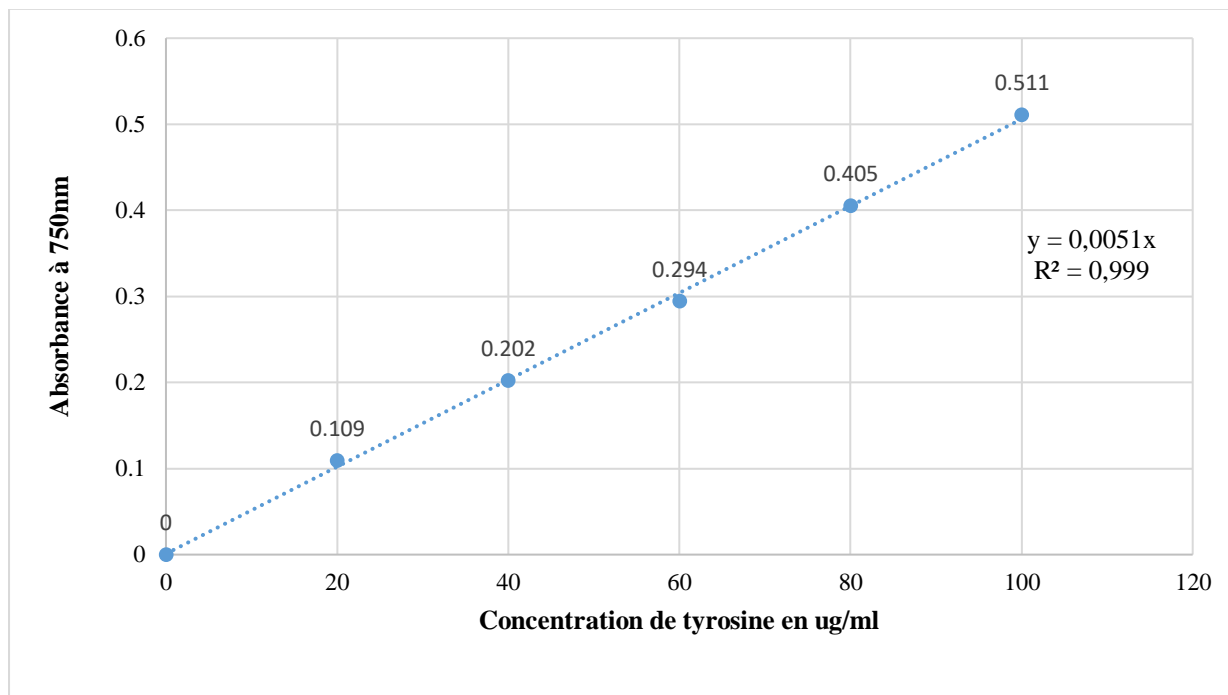


Figure 26 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine

- **Activité enzymatique** : Réalisé en 2 étapes

- **Etape 01** : Préparation du mélange réactionnel

<ul style="list-style-type: none"> ○ 0,375 ml Tampon ○ 0,25ml Extrait enzymatique ○ 0,625ml substrat
Agitation
Incubation dans le bain marie à 40C° pendant 30 minutes
<ul style="list-style-type: none"> ○ 2,5 ml TCA
Agitation et repos pendant 10 minutes
Filtration

Pour la préparation du Blanc, le TCA est ajouté avant le substrat sans incubation.

Etape 02 : Dosage de l'activité

- 2,5 ml Na_2CO_3
- 0,5 ml Filtrat
- 0,25 ml Folin dilué 1/4

Agitation

Incubation à température ambiante, à l'obscurité pendant 30 minutes

Lecture de l'absorbance à 750 nm

Annexe 4**Préparation des solutions tampon****1. Tampon Citrate de Sodium (pH= 5)**

- ✓ Solution A: acide citrique $C_6H_8O_7$ (0,1M)
- ✓ Solution B: le dissodique Na_2HPO_4 (0,2M)

Le pH est déterminé par le pH-mètre.

2. Tampon phosphate (pH= 7)

- ✓ Solution A : Le monosodique NaH_2PO_4 (0,2M)
- ✓ Solution B : le dissodique Na_2HPO_4 (0,2M)

Le pH est déterminé par le pH-mètre.

3. Tampon glycine (pH= 9)

- ✓ Solution A : Glycine (0,2M)
- ✓ Solution B : NaOH (0,2M)

Le pH est déterminé par le pH-mètre.

A collection of laboratory glassware is arranged on a reflective surface. On the left is a large round-bottom flask containing a clear liquid. In the center is a graduated cylinder with markings at 20 and 30. To the right are two Erlenmeyer flasks, one of which contains a clear liquid. The background is a soft, out-of-focus gradient of light blue and white. The word 'Résumé' is written in a black, cursive font across the center of the image.

Résumé

Résumé

Une étude comparative de la production et l'optimisation de la protéase acide par la souche *candida sp* sur deux types de fermentations (FMS et FML) est réalisée sur un milieu à base de déchets de tomates et les restes du pain (1 :1) dans le but de sélectionner le substrat et le type de fermentation ayant une bonne influence sur la production de la protéase acide. Pour cela, les milieux de fermentation solide choisis sont optimisés suivant des méthodes statistiques en utilisant deux plans d'expériences. Le premier correspond aux matrices de Plackett et Burman utilisé pour sélectionner les facteurs contribuant à la production protéolytique, 11 facteurs (07 réels et 04 erreurs) sont étudiés à savoir : (température, humidité, inoculum, glucose, corn steep liquor, $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$, temps d'incubation, NaCl) pour 12 expériences. Le deuxième est le plan composite centré de Box et Wilson qui permet de définir les valeurs optimales des facteurs sélectionné par Plackett et Burman pour la production de protéase. Les optima obtenus sont : (0.5×10^6 d'inoculum, 96.82% de l'humidité et 112h d'incubation). La production optimale obtenue est de 31450 UI/g, elle concorde la valeur prédite de 32009,2 UI/g.

Mots clés :

Protéase acide, *candida sp*, FML, FMS, plans d'expériences, optimisation, plan composite centré, Plackett et Burman, production.

Abstract

A comparative study of the production and optimization of the acid protease by the strain *Candida sp* on two types of fermentation (FMS and FML) is carried out on a medium based on tomato waste and the remains of the bread (1: 1) in order to select the substrate and the type of fermentation having a good influence on the production of the acid protease. For this, the selected solid fermentation media are optimized according to statistical methods using two experimental designs. The first corresponds to the Plackett and Burman matrices used to select the factors contributing to the proteolytic production, 11 factors (07 real and 04 errors) are studied namely: (temperature, humidity, inoculum, glucose, corn steep liquor, $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$, incubation time, NaCl) for 12 experiments. The second is the Box and Wilson composite centered plan which allows to define the optimal values of the factors selected by Plackett and Burman for the production of protease. The optima obtained are: (0.5×10^6 of inoculum, 96.82% of humidity and 112h of incubation). The optimum production obtained is 31450 IU / g, it agrees with the predicted value of 32009.2 IU / g.

Key words :

Acid protease, *Candida sp*, FML, FMS, design of experiments, optimization, composite centered design, Plackett and Burman, production.

الملخص

يتم إجراء دراسة لمقارنة إنتاج وتحسين البروتياز الحمضي بواسطة سلالة *Candida sp* على نوعين من التخمر (الصلب والسائل) تعتمد هذه الدراسة على نفايات الطماطم وبقايا الخبز (1:1) بالترتيب لاختيار الركيزة ونوع التخمر الذي له تأثير جيد على إنتاج البروتياز الحمضي.

لهذا الغرض، يتم تحسين وسائط التخمر الصلبة المختارة وفقاً للطرق الإحصائية باستخدام تصميمين تجريبيين. الأول يتوافق مع مصفوفات بلاكيت وبورمان المستخدمة لتحديد العوامل المساهمة في إنتاج التحلل البروتيني، تمت دراسة 11 عاملاً (07 حقيقية و04 أخطاء) وهي: وقت الحضانة، كلور الصوديوم، درجة الحرارة، الرطوبة، اللقاح، الجلوكوز، وسائل الذرة من أجل 12 تجربة. والثاني هو تطبيق بوكس و ويلسون لتي تسمح بتحديد القيم المثلى للعوامل التي اختارها بلاكيت وبورمان لإنتاج البروتياز: اللقاح $10^6 0,5 X$, الرطوبة: 96,82 خلية/مل, وقت الحضانة 112 ساعة. الإنتاج الأمثل الذي تم الحصول عليه هو 31450 وحدة وطينية/ غرام, وهو يتوافق مع القيمة المتوقعة البالغة 32099,2 وحدة وطينية/غرام.

الكلمات المفتاحية

البروتياز الحمضي, المبيضيّات, التخمر الصلب, التخمر السائل, تصميم التجارب, التحسين, بلاكيت و بورمان, التصميم المركب.

• **Présenté par :**

**AMEUR Fatima Zahra
ABDELMOUMENE Rania**

Encadré par : Dr AKHMOUCHE Schahrazed

**Titre : Optimisation de la production de la protéase de *Candida sp.*
Cultivé en FMS**

Résumé

Une étude comparative de la production et l'optimisation de la protéase acide par la souche *candida sp* sur deux types de fermentations (FMS et FML) est réalisée sur un milieu à base de déchets de tomates et les restes du pain (1 :1) dans le but de sélectionner le substrat et le type de fermentation ayant une bonne influence sur la production de la protéase acide. Pour cela, les milieux de fermentation solide choisis sont optimisés suivant des méthodes statistiques en utilisant deux plans d'expériences. Le premier correspond aux matrices de Plackett et Burman utilisé pour sélectionner les facteurs contribuant à la production protéolytique, 11 facteurs (07 réels et 04 erreurs) sont étudiés à savoir : (température, humidité, inoculum, glucose, corn steep liquor, $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$, temps d'incubation, NaCl) pour 12 expériences. Le deuxième est le plan composite centré de Box et Wilson qui permet de définir les valeurs optimales des facteurs sélectionné par Plackett et Burman pour la production de protéase. Les optima obtenus sont : (0.5×10^6 d'inoculum, 96.82% de l'humidité et 112h d'incubation). La production optimale obtenue est de 31450 UI/g, elle concorde la valeur prédite de 32009,2 UI/g.

Mots clés :

Protéase acide, *candida sp*, FML, FMS, plans d'expériences, optimisation, plan composite centré, Plackett et Burman, production.

• **Jury d'évaluation :**

Présidente de jury : Bennamoun L.

Encadreur : Dakhmouche S.

Examinatrice : Labbani F.Z.K.

M.C.B, Université Frères Mentouri 1.

M.C.A, ENS Assia Djebar Constantine.

M.C.B, ENS Assia Djebar Constantine.

