



Département de la Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزئية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques / Biotechnologies / Écologie et Environnement

Spécialité : Biochimie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Optimisation de la biosynthèse d' α -amylase par *Aspergillus oryzae* cultivé sur déchets d'orange : intégration du plan Box-Behnken et de modèles d'intelligence artificielle (PSO)

Présenté par : Bensaad Aya **Le :** 28/06/2025
Abbaz Khaoula

Jury d'évaluation :

Président: Mme Bennamoun L. (MCA, UFM, Constantine 1).

Encadrant : Mme Dakhmouche S. (Pr., ENS Assia Djebbar, Constantine).

Co-Encadrant : Mme Haboul A. (MCB - ENS Assia Djebbar, Constantine).

Examinateur(s): Mme Banabdelhasid Z. (MCB, ENS Assia Djebbar, Constantine).

Année universitaire 2024 – 2025



Remerciements

Nous tenons tout d'abord et avant tout à remercier "ALLAH" de tout puissant qui nous a données durant toutes ces années le courage, la volonté, la patience et la foi en nous pour arriver à ce jour.

*Je remercie mon encadreur Mme. **Dakhmouche Scheherazé** , qui m'a prodigué les orientations et les conseils nécessaires qui m'ont permis d'effectuer ce travail. Je la remercie également pour sa gentillesse sa bienveillance et sa patience.*

*Ensuite Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon co-encadreur **Haboul Amel** pour la préparation du programme de travail. Son aide est précieuse pour l'organisation de mes recherches.*

*Mes sincères remerciements vont aussi aux membres du jury pour l'honneur qu'ils m'auront fait en acceptant de juger ce travail ; à Madame **Bennamoun Leila** pour avoir accepté de présider le jury, et à Madame **Banabdelhasid Zoheira** qui ont consacré leur temps à l'examen de ce travail.*





Dédicace

Je dédie ce mémoire à ceux qui ont toujours été ma force, mon soutien et ma source d'inspiration tout au long de ce parcours académique

*À mon père **Mouhammed El Cherif**, mon soutien au bras fort, à l'œil vigilant, et à la personne qui mérite toute ma gratitude et mon respect. Ta bienveillance et ton soutien ont été pour moi un grand secours tout au long de ma vie. Merci de m'avoir accompagné tout au long de mon parcours scolaire pendant 5 ans.*

*À ma chère mère **Nassima**, tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Rien au monde n'égale les efforts consentis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Que dieu te préserve et te procure santé et longue vie*

À celui qui m'a aidée par sa prière «mon grand-père»

*À mes frères : **Oussama** et **Chams Eddine** et mes adorables sœurs : **Amina**, **Ilhem** et **Khadidja**, je ne pourrais jamais exprimer l'attachement et l'affection que j'ai pour vous. Aucun mot ne pourrait exprimer la gratitude et l'amour que je vous porte. Vos sourires et vos conseils ont illuminé ce parcours parfois difficile.*

*À mon cher neveu **Abd el moaiz**, petit être plein de vie et de lumière, Ta présence est une source de joie et d'inspiration dans ma vie.*

*À mes chers amis **Yousra**, **Anfel**, **Amira** et **Oumayma**, merci pour votre présence constante, votre soutien indéfectible, vos encouragements sincères et vos mots réconfortants dans les moments de doute.*

A tous mes enseignants pour la qualité de l'enseignement qu'ils ont bien voulu me prodiguer durant mes études afin de me donner une formation efficace

Khaoula

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail À ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais Jamais à leur exprimer mon amour sincère.

À l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma Réussite et tout mon respect : mon cher père « Faouzi »

À la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais Dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour Me rendre heureuse : mon adorable mère « Iffham »

À mes chères sœurs « Youssra » » et « Amina » qui n'ont Pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au Long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offres la Chance et le bonheur.

À ma grand-mère « Rahima », pour sa sagesse ancestrale et son regard plein de discernement. Elle m'a appris l'importance de la patience, de la résilience.

Mon grand-père « Abd el Hamid », que Dieu lui fasse miséricorde et le fasse habiter .dans ses vastes jardins, il était, est et restera vivant dans nos cœurs .

Le meilleur oncle « Ahmed », du monde, le premier lien après mon père, qui ne sera plus répété, le propriétaire des conseils et le propriétaire du soutien, merci dans le nombre de gouttes de pluie.

À mes oncles et mes tantes et tout la famille « BENSAAD » et « BEGHIDJA ». Que Dieu leur Donne une longue et joyeuse vie.

À mes collègues, qui m'ont accompagné tout au long de ce parcours et avec qui j'ai partagé de nombreux moments de travail et de réflexion.

À mes professeurs à tous les niveaux d'études de qui j'ai beaucoup appris grâce à leur expérience et leur dévouement au travail.

Et notre cher encadreur : Madame, Dakhrouche Scheherazad

J'espère que vous êtes tous fiers de moi et de ce que j'ai accompli, et j'espère aussi que j'étais et que je suis toujours proche de vos cœurs.

Aya



Table des matières

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie I : synthèse Bibliographique

Introduction : Rôle Fondamental des Micro-organismes : Applications et Perspectives 3

Chapitre 1 : *Aspergillus oryzae* 4

1.1. Présentation générale d'*Aspergillus oryzae* 4

 1.1.1. Classification Taxonomique 4

2. Conditions de Croissance et Potentiel Biotechnologique d'*Aspergillus oryzae* 4

 2.1. Paramètres Optimaux de Croissance 4

 2.2. Capacités Biotechnologiques Remarquables 5

3. Importance Industrielle et Applications Biotechnologiques d'*Aspergillus oryzae* 5

 3.1. Outil Biotechnologique de Référence 5

 3.2. Applications Alimentaires Traditionnelles et Modernes 5

 3.3. Utilisation en Europe et dans l'Industrie des Enzymes 6

 3.3.1. Koji : Base de la Cuisine Japonaise 6

 3.3.2. Sécurité et Statut Réglementaire 6

Chapitre 2 : Importance des Enzymes Microbiennes dans l'Industrie 8

1. Définition, Origine et Potentiel des Enzymes Microbiennes 7

 1.1. Rôle et Intérêt Industriel des Enzymes 8

 1.2. Perspectives et Développements Futurs 8

2. Rôle et Applications des Enzymes Industrielles 8

 2.1. Protéases : Enzymes Clés de la Dégradation des Protéines 8

 2.1.1. Importance et Intérêt des Protéases 9

 2.1.1.1. Application des Protéases dans l'Industrie des Détergents 9

 2.1.1.2. Applications des Enzymes Microbiennes dans l'Industrie Alimentaire 10

 2.2. Applications des α -amylases dans l'industrie alimentaire et les biocarburants 13

Table des matières

2.2.1. Définition et rôle Biologique de l'α-Amylase	13
2.2.3. Rôle des α-amylases dans la production de biocarburants	13
2.2.4. Applications industrielles des α-amylases : secteurs alimentaires et papetier	14
2.3. Pectinases : Enzymes clés aux applications industrielles multiples	15
2.3.1. Définition et caractéristiques des pectinases	15
2.3.2. Applications industrielles des pectinases.....	16
Chapitre 3 : Valorisation des déchets d'orange.....	20
1. Nature et composition des déchets d'orange	20
2. Composition chimique des déchets d'orange	20
3. Valorisation et applications industrielles des déchets d'orange.....	21
3.1. Ressource précieuse et à faible coût pour la production d'enzymes.....	21
3.2. Production d'enzymes à partir des déchets d'agrumes	21
Chapitre 4 : Fermentation : un procédé clé pour la production d'enzymes	23
1. Types de fermentation.....	23
1.1. Fermentation en phase liquide (FPL)	23
1.1.1 Avantages et inconvénients de la fermentation en phase liquide.....	24
1.1.1.1 Avantages.....	24
1.1.1.2 Inconvénients	24
1.2. Fermentation en phase solide (FPS).....	24
Partie II : Matériels et Méthodes	
1. Introduction	29
2. Matériel Biologique	29
3. Réactivation de la souche fongique	29
3.1. Préparation du milieu de réactivation	29
3.2. Protocole de réactivation de la souche fongique	30
4. Préparation de l'inoculum	30
4.1. Préparation de la suspension de spores	30
4.2. Dénombrement des spores.....	30
5. Production des enzymes industrielles	31
5.1. Préparation de la fermentation en milieu solide (SSF).....	31

Table des matières

5.1.1. Extraction de l'enzyme	32
5.1.2. Détermination de la matière sèche (MS)	32
5.2. Fermentation liquide (submergée)	32
5.2.1. Récupération de l'extrait enzymatique en fermentation submergée (SmF)	33
6. Méthode de dosage	33
6.1. Dosage de l'activité protéolytique.....	33
6.1.1. Principe	33
6.1.2. Courbe d'étalonnage de la tyrosine.....	33
6.1.3. Dosage de l'activité protéolytique selon la méthode d'Anson (1938)	35
6.2. Dosage de l'activité pectinolytique	36
6.2.1. Principe	36
6.2.2. Courbe d'étalonnage à l'acide galacturonique.....	36
6.2.3. Dosage de l'activité polygalacturonase.....	37
6.3. Dosage de l' α -Amylase	38
6.3.1. Principe	38
6.4. Dosage de l'activité cellulasique.....	41
6.4.1. Activité FPase (Filter Paper Activity).....	41
6.4.1.1. Principe	41
6.4.1.2. Activité endoglucanase (CMCase).....	42
7. Mise en évidence des activités.....	43
7.1. Test qualitatif de l'activité pectinolytique	43
7.2. Activité amylolytique	44
7.2.1. Principe du test	44
7.3. Activité cellulolytique	44
7.3.1. Principe du test	44
7.4. Activité protéolytique.....	44
7.4.1. Principe du test	44
8. Optimisation des paramètres influençant la production de l'alpha amylase	45
8.1. Étude de l'optimisation de la production de l'alpha-amylase.....	45
8.2. Optimisation de la production enzymatique selon le plan statistique Box-Behnken	45

Table des matières

8.2.1. Analyse statistique de la matrice du plan de Box-Behnken.....	47
9. Optimisation par l' Intelligence artificiel	47
9.1. Acquisition et préparation des données	47
9.1.1. Diagnostic de l'ensemble de données	47
9.1.2. Fractionnement et prétraitement des données.....	48
9.2. La modélisation	48
9.2.1. Modèles de régression.....	48
9.2.2. Mesures de performance	50
9.3. Optimization par Métaheuristiques (Metaheuristic Optimization).....	52
9.3.1. Optimisation par essaimage de particules (PSO)	52
9.3.2. Variantes du PSO : introduction du facteur d'inertie.....	52
9.3.3. Méthodologie.....	56

Partie III : Résultats et Discussion

1. Évaluation Comparative de la Production d'Enzymes (Amylase, Cellulase, Pectinase et Protéase) par <i>Aspergillus oryzae</i> sur Déchets d'Orange en Fermentation Submergée et Solide.....	62
1.1. Activité amylasique d' <i>Aspergillus oryzae</i> cultivé sur des déchets d'orange : comparaison entre fermentation submergée et fermentation en milieu solide.....	62
1.2. Activité cellulase d' <i>Aspergillus oryzae</i> selon le mode de fermentation	63
1.3. Évaluation comparative de la production enzymatique d' <i>Aspergillus oryzae</i> sur substrat de déchets d'orange : fermentation submergée vs fermentation solide.....	65
1.3.1. Activité amylasique.....	65
1.3.2. Activité cellulase : un profil enzymatique restreint d' <i>Aspergillus oryzae</i>	67
1.3.3. Activité protéolytique d' <i>Aspergillus oryzae</i> sur déchets d'orange en fermentation solide et submergée.....	68
1.3.4. Activité polygalacturonase (pectinase) produite par <i>Aspergillus oryzae</i> sur déchets d'orange.....	70
2. Eude du patrimoine enzymatique chez <i>Aspergillus oryzae</i>	58
2.1. Mise en évidence de l'activité pectinolytique	58
2.2. Mise en évidence de l'activité amyloytique	59
2.3. Activité cellulolytique	59
2.4. Activité protéolytique.....	60

Table des matières

3. Optimisation des facteurs influençant la production α -amylasique	72
3.1. Graphique de Pareto	75
3.2. Tracés de contours et surfaces de réponses	75
3.3. Détermination des interactions entre les variables	76
3.3.1. Interactions entre C1 (amidon) et C2 (extrait de levure)	76
3.3.2. Interactions entre C1 (amidon) et C3 (CaCl_2)	77
3.3.3. Interactions entre C2 (extrait de levure) et C3 (CaCl_2)	77
3.4. Validation du modèle	79
3.5. Effet des facteurs utilisés sur la production de l' α -amylase	79
3.5.1. Effet de l'amidon sur la production de l' α -amylase	79
3.5.2. Effet de l'extrait de levure sur la production enzymatique	80
3.5.3. Effet de CaCl_2 sur la production de l' α -amylase	80
4. Modélisation et Optimisation de la Production Enzymatique : Une Approche Combinée de Régression et d'Algorithmes Bio-inspirés (PSO)	80
4.1. Sélectionner le meilleur modèle	80
4.2. Résultats Optimisation par essaimage de particules (PSO) Formulations mathématiques	82
Conclusion.....	86
Références.....	88
Annexes.....	94

Liste des abréviations

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ANOVA : Analyse of variances

CMCase : CarboxyMéthylCellulose

DNS : Acide dinitrosalicylique

F : Statistique test de Ficher

FMS : Fermentation milieu solide

ml : Millilitre

PDA : Potato Dextrose Agar

Rpm : Rotation par minute

RSM : Response Surface Methodology

SmF : Fermentation submergée

TCA : TriChloroacetic Acid

UI : Unité internationale

Liste des Figures

Liste des Figures

Liste des Figures

Figure 1 : <i>Aspergillus oryzae</i> cultivé sur PDA.....	4
Figure 2: Applications industrielles et biotechnologiques des protéases	11
Figure 3 : Applications industrielles et biotechnologiques de l'α-amylase.....	15
Figure 4 : Applications industrielles et environnementales des pectinases.....	18
Figure 5 :Fermentation solide.....	31
Figure 6 : Fermentation submergée.....	32
Figure 07 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine (μg/ml).....	34
Figure 08 : Courbe d'étalonnage d'acide galacturonique (μg/ml).....	37
Figure 09 : Courbe d'étalonnage du maltose (μg/ml).....	40
Figure 10 : Courbe d'étalonnage du glucose (g/l).....	43
Figure 11 : Régression par Forêt Aléatoire.....	50
Figure 12 : Mise en évidence de l'activité hydrolytique pectinolytique extracellulaire chez la moisissure <i>Aspergillus oryzae</i>.....	58
Figure 13 : Mise en évidence de l'activité amyloytique extracellulaire chez la moisissure <i>Aspergillus oryzae</i>.....	59
Figure 14 : Mise en évidence de l'activité cellulolytique extracellulaire chez la moisissure <i>Aspergillus oryzae</i>.....	60
Figure 15 : Mise en évidence de l'activité protéolitique extracellulaire chez la moisissure <i>Aspergillus oryzae</i>.....	61
Figure 16 : Étude comparative des activités enzymatiques en fermentation en milieu solide (FMS) et en fermentation submergée (SmF).....	71
Figure 17 : Diagramme de Pareto illustrant l'influence statistique des facteurs expérimentaux sur l'activité de l'α-amylase.....	75
Figure 18 : Courbes de contour (A) et les surface de réponse (B) de la production de l'α-amylase par <i>Aspergillus oryzae</i>.....	79
Figure 19 : Valeurs optimales des variables et de la réponse déterminées par « RSM » pour une meilleure activité amylasique.....	79

Liste des Figures

- Figure 20 :** Évolution de l'aptitude moyenne et de la meilleure aptitude au cours des itérations de l'algorithme PSO.....83

Liste des Tableaux

Liste des Tableaux

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Applications principales des pectinases.....	19
Tableau 02 : Préparation de la gamme d'étalonnage de tyrosine.....	34
Tableau 03 : Préparation de la gamme d'étalonnage d'acide galacturonique.....	37
Tableau 04 : Préparation de la gamme d'étalonnage de maltose.....	39
Tableau 05 : Préparation de la gamme d'étalonnage de glucose.....	43
Tableau 06 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels	46
Tableau 07 : Matrice expérimentale du plan Box-Behnken pour l'étude de trois variables en 15 essais.....	46
Tableau 08 : Valeurs expérimentales (observées) de l'activité amylasique par le Box-behnken.....	72
Tableau 09 : Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité amylasique.....	73
Tableau 10 : Paramètres statistiques de performance du modèle de régression quadratique obtenu par le plan Box-Behnken.....	73
Tableau 11 : Résultats de ANOVA du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité amylasique.....	74
Tableau 12 : Résultats de formation	81
Tableau 13 : Résultats de test	81

Introduction

Introduction

Introduction

Les enzymes sont de grandes biomolécules indispensables aux nombreuses transformations chimiques qui soutiennent la vie. Elles interviennent dans tous les processus métaboliques, chacune remplissant une fonction spécifique. Extrêmement efficaces, elles peuvent accélérer la vitesse des réactions chimiques de 100 millions à 10 milliards de fois par rapport à une réaction non catalysée. Avec les avancées en recombinaison génétique et en ingénierie des protéines, les enzymes sont devenues des molécules clés, largement utilisées dans les domaines industriels et thérapeutiques.

Aujourd’hui, les enzymes industrielles sont principalement de nature hydrolytique, servant à dégrader diverses substances naturelles (Gurung et al., 2013). On prévoit que le marché mondial des enzymes pour l’industrie a atteint 6,95 milliards de dollars en 2022, avec une croissance annuelle moyenne anticipée de 6,4 % entre 2023 et 2050 (Kumar et al., 2024).

Elles peuvent être produites à partir des plantes, des animaux ou des micro-organismes, mais la production industrielle repose surtout sur des sources microbiennes, notamment des bactéries, levures et champignons, cultivés via fermentation submergée (SmF) ou en milieu solide (SSF). Si la majorité de la production concerne des enzymes techniques pour les secteurs de l’alimentation, du textile, du cuir ou encore des biocarburants, certaines enzymes sont destinées à des usages analytiques, pharmaceutiques ou médicaux (Tarafdar et al., 2021).

Pour répondre aux besoins industriels, les micro-organismes doivent produire des enzymes extracellulaires en grandes quantités, qui soient sûres, stables et hautement actives (Niyonzima, 2019). Parmi les espèces utilisées, on retrouve *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* et *Bacillus* spp....

En particulier, *A. oryzae* occupe une place essentielle dans l’industrie des champignons filamentueux. Elle est utilisée depuis longtemps en Chine et au Japon dans la production d’aliments fermentés traditionnels tels que la pâte de soja et le saké. Cette souche est également reconnue comme sûre (GRAS) par la FDA américaine (Sun et al., 2024).

Cependant, la demande croissante en enzymes et les défis liés à la mise au point de biocatalyseurs efficaces et adaptés à chaque processus industriel nécessitent le développement de nouvelles enzymes aux propriétés innovantes. Ce besoin ouvre la voie à une biologie moléculaire de plus en plus performante, avec des perspectives prometteuses pour un développement industriel durable et respectueux de l’environnement.

Ce travail est structuré en trois chapitres principaux :

Introduction

- **Chapitre 1 :** Revue bibliographique consacrée à *Aspergillus oryzae*, aux principales enzymes industrielles, ainsi qu'à leurs domaines d'application dans divers secteurs économiques.
- **Chapitre 2 :** Étude expérimentale portant sur la production d'enzymes microbiennes industrielles, avec un focus sur l'optimisation de l'α-amylase à l'aide du plan Box-Behnken, ainsi que l'intégration de l'intelligence artificielle dans le processus d'optimisation.
- **Chapitre 3 :** Présentation, interprétation et discussion des résultats obtenus.

Enfin, une conclusion générale accompagne ce travail, mettant en lumière les principaux apports de l'étude, ainsi que les perspectives de recherche futures.

Partie I

Synthèse

bibliographique

Introduction : Rôle Fondamental des Micro-organismes : Applications et Perspectives

Bien qu'invisibles à l'œil nu, les micro-organismes jouent un rôle fondamental dans de nombreux aspects de la vie humaine. Leur contribution s'étend de la production alimentaire à la préservation de la santé, en passant par la dépollution de l'environnement. En effet, ces êtres microscopiques sont au cœur de multiples processus, tels que la fermentation des aliments, la fabrication de médicaments, le recyclage des déchets organiques et même la production d'énergie. Leur diversité et leur remarquable capacité d'adaptation en font des alliés précieux pour l'humanité, ouvrant la voie à des innovations majeures dans les domaines scientifique, médical, industriel et environnemental.

Chapitre 1 : *Aspergillus oryzae***1. Présentation générale d'*Aspergillus oryzae*****1.1. Classification Taxonomique**

Aspergillus oryzae est un champignon filamenteux aérobic, appartenant au groupe des moisissures dites « nobles » (Barbesgaard et al., 1992). Lors de son développement, la colonie est initialement blanche, puis elle évolue vers une teinte vert jaunâtre caractéristique (figure 01).

Sur le plan taxonomique, *A. oryzae* est classé comme suit (Daba et al., 2021) :

- Classe : *Eurotiomycetes*
- Ordre : *Eurotiales*
- Family:Aspergillaceae



Figure 01 : *Aspergillus oryzae* cultivé sur milieu PDA

2. Conditions de Croissance et Potentiel Biotechnologique d'*Aspergillus oryzae***2.1. Paramètres Optimaux de Croissance**

Aspergillus oryzae présente une croissance optimale à une température comprise entre 30 et 36 °C (\pm 1 °C) et ne peut se développer au-delà de 44 °C. Le pH idéal pour sa croissance se situe entre 5,0 et 6,0, bien qu'il soit capable de germer dans une large gamme de pH, allant de 2,0 à 8,0 (Daba et al., 2021).

Ce champignon peut également croître sur des substrats tels que la farine de maïs contenant environ 16 % d'eau, et il a été isolé de divers environnements naturels, notamment le sol et différentes plantes comme le riz, la fève, le tournesol, le soja et le blé.

Par ailleurs, *A. oryzae* peut se développer sur des milieux dont l'activité de l'eau (aw) est supérieure à 0,8, mais sa croissance devient très limitée en dessous de cette valeur (Gomi, 2014).

2.2. Capacités Biotechnologiques Remarquables

Au-delà de ses aptitudes de croissance, *Aspergillus oryzae* se distingue par sa remarquable capacité à sécréter une large gamme d'enzymes hydrolytiques, notamment des amylases et des protéases. Cette aptitude en fait un micro-organisme de référence pour la production industrielle d'enzymes, qu'elles soient natives ou issues de l'expression hétérologue (Jin et al., 2021).

Parmi ses principaux atouts figurent :

- Une croissance rapide,
- Une excellente capacité de synthèse et de sécrétion de protéines,
- Une culture facile et maîtrisée.

Ces caractéristiques font de *A. oryzae* une véritable « usine cellulaire », largement exploitée dans divers procédés biotechnologiques et applications industrielles (Jin et al., 2021).

3. Importance Industrielle et Applications Biotechnologiques d'*Aspergillus oryzae* :

3.1. Outil Biotechnologique de Référence

Aspergillus oryzae est un champignon multicellulaire microscopique considéré comme l'une des espèces les plus importantes en biotechnologie, largement exploité à travers le monde (Daba et al., 2021). Son intérêt majeur réside dans ses applications industrielles variées, notamment dans la production d'aliments fermentés.

3.2. Applications Alimentaires Traditionnelles et Modernes

Historiquement, *A. oryzae* est utilisé pour la fabrication de nombreux produits fermentés :

- Miso : pâte de soja.
- Shoyu : sauce soja.
- Tane-koji : malt de riz de semence.
- Douche : soja noir fermenté et salé.
- Assaisonnements à base de caillé de haricots.

- Vinaigre.

Ces applications sont rendues possibles grâce à la capacité de *A. oryzae* à produire des amylases et des protéases, des enzymes qui dégradent l'amidon et les protéines en sucres simples et en acides aminés, facilitant ainsi la fermentation (Daba et al., 2021).

3.3. Utilisation en Europe et dans l'Industrie des Enzymes

Depuis le début du XXe siècle, *A. oryzae* est également utilisé en Europe, notamment pour la production d'enzymes destinées à la brasserie et à la boulangerie, démontrant ainsi son intérêt industriel au-delà des traditions alimentaires asiatiques.

3.3.1. Koji : Base de la Cuisine Japonaise

Dans la cuisine japonaise, le koji est un ingrédient fondamental obtenu par la fermentation de fèves de soja et/ou de céréales cuites à l'aide de *A. oryzae*. Ce champignon est ainsi communément appelé "moisisseur de koji", en référence directe à son rôle central dans la préparation de ces produits fermentés (Daba et al., 2021).

3.3.2. Sécurité et Statut Réglementaire

Sur le plan de la sécurité, *A. oryzae* ne possède pas de marqueurs de séquences exprimées associés aux gènes de production d'aflatoxines, ce qui garantit l'absence de ces toxines dans ses produits (Chuenjit Chancharoonpong et al., 2012).

Par ailleurs, il est classé GRAS (*Generally Recognized As Safe*) par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis, confirmant ainsi son innocuité pour la consommation humaine (Jin et al., 2021).

Ainsi, *Aspergillus oryzae* occupe une place incontournable dans l'industrie agroalimentaire et biotechnologique, grâce à sa capacité à produire une large gamme d'enzymes et à sa sécurité d'utilisation reconnue. Son rôle dans la fermentation de produits traditionnels et sa contribution à la production d'enzymes industrielles illustrent pleinement son potentiel biotechnologique et économique (Daba et al., 2021).

Dans la partie suivante, nous aborderons plus en détail les enzymes produites par *A. oryzae*, en mettant l'accent sur leurs caractéristiques, leurs mécanismes d'action et leurs applications spécifiques, notamment dans les secteurs agroalimentaires, pharmaceutique et environnemental.

Chapitre 2 : Importance des Enzymes Microbiennes dans l'Industrie

Dans le contexte industriel moderne, les enzymes microbiennes sont devenues des outils incontournables grâce à leur capacité à catalyser efficacement une large gamme de réactions biochimiques. Contrairement aux procédés chimiques traditionnels souvent coûteux et polluants, l'utilisation d'enzymes permet de réaliser des transformations spécifiques à des températures et des pressions modérées, réduisant ainsi les coûts énergétiques et l'impact environnemental des industries.

Parmi les différentes sources d'enzymes, les micro-organismes, notamment les champignons filamenteux, se distinguent par leur fort rendement de production, leur adaptabilité à des procédés industriels à grande échelle, et leur capacité à sécréter des enzymes extracellulaires facilement récupérables.

Cette section mettra en lumière la nature biologique des enzymes, leur origine microbienne, ainsi que leur importance croissante dans divers secteurs industriels.

1. Définition, Origine et Potentiel des Enzymes Microbiennes

Les enzymes sont des protéines essentielles au fonctionnement de la vie, jouant le rôle de catalyseurs biologiques. Elles accélèrent les réactions chimiques au sein des cellules sans être consommées au cours du processus, ce qui permet aux réactions biochimiques de se dérouler efficacement et rapidement. Chaque enzyme est hautement spécifique à un substrat donné, qu'elle transforme en produit, assurant ainsi la précision et la régulation des réactions métaboliques (Palmer & Bonner, 2007).

Présentes chez tous les organismes vivants, y compris les bactéries, champignons, plantes, animaux et humains, les enzymes microbiennes représentent aujourd'hui la source la plus exploitée, notamment en biotechnologie, en raison de leur production facile, rapide et économique (Nigam, 2013).

Dans les industries biotechnologiques, l'accent est particulièrement mis sur les enzymes extracellulaires produites par les micro-organismes, capables de dégrader une grande variété de polymères naturels, tels que :

- Les amidons,
- Les lipides,
- Les protéines,
- Les celluloses,

- Les pectines (Werner et al., 2010).

1.1. Rôle et Intérêt Industriel des Enzymes

Les enzymes sont aujourd’hui perçues comme des outils polyvalents et indispensables, offrant des solutions innovantes pour améliorer l’efficacité des procédés industriels tout en réduisant leur impact environnemental. Leur capacité à agir dans des conditions spécifiques et contrôlées permet de développer des processus industriels plus performants, économiques et durables (Bhatt et al., 2023).

Parmi les différentes classes d’enzymes utilisées à l’échelle industrielle, les enzymes fongiques occupent une place de choix en raison de (Arora et al., 2020) :

- Leur grande efficacité catalytique,
- Leur spécificité élevée,
- Leur stabilité dans une large gamme de conditions environnementales.

1.2. Perspectives et Développements Futurs

Les recherches actuelles visent à découvrir et développer de nouvelles enzymes microbiennes, notamment issues de champignons, pour répondre aux besoins croissants de diverses industries : alimentaire, pharmaceutique, environnementale, énergétique, etc... Ces avancées ouvrent la voie à des applications innovantes, capables de transformer les procédés industriels et d’apporter des avantages concrets en termes de productivité et de durabilité (Arora et al., 2020).

Après avoir présenté le rôle central des enzymes microbiennes dans l’industrie, nous nous intéresserons plus particulièrement aux enzymes produites par *Aspergillus oryzae*, un champignon filamenteux reconnu pour sa capacité exceptionnelle à générer une variété d’enzymes aux applications multiples. La prochaine section analysera les principales enzymes issues d’*A. oryzae*, leurs caractéristiques, et leurs usages spécifiques dans les industries agroalimentaire, pharmaceutique et environnementale.

2. Rôle et Applications des Enzymes Industrielles

2.1. Protéases : Enzymes Clés de la Dégradation des Protéines

Les protéases, également appelées peptidases ou enzymes protéolytiques, sont des hydrolases capables de catalyser la rupture des liaisons peptidiques entre les acides aminés des protéines, les transformant en fragments peptidiques plus petits (Souza et al., 2015 ; S. Radha et al., 2012).

2.1.1. Importance et Intérêt des Protéases

L'intérêt croissant pour les protéases s'explique non seulement par leur rôle fondamental dans la régulation de nombreux processus métaboliques, mais aussi par leur large utilisation industrielle (Figure 2). Issues principalement de micro-organismes, ces enzymes présentent un fort potentiel d'applications dans divers secteurs (Naveed et al., 2020), notamment :

- Industrie agroalimentaire.
- Industrie des détergents.
- Industrie cosmétique.
- Industrie pharmaceutique.
- Dégradation du gluten.
- Industries du cuir et de la soie.

2.1.1.1. Application des Protéases dans l'Industrie des Détergents

Dans le secteur des détergents, les protéases occupent une place prépondérante, représentant environ 30 % de la production mondiale d'enzymes destinées à cette industrie. Elles sont devenues indispensables pour améliorer l'efficacité des détergents modernes, notamment pour l'élimination des taches tenaces d'origine protéique (Naveed et al., 2020).

Quelques données marquantes sur leur emploi dans les détergents :

- 25 % des détergents en poudre aux États-Unis contiennent des enzymes,
- 50 % des détergents liquides sont enrichis en enzymes,
- La quasi-totalité des agents de blanchiment en poudre utilisent des enzymes pour renforcer leur efficacité.

Ces protéases agissent en hydrolysant les grosses molécules protéiques fixées aux taches, en rompant les liaisons peptidiques qui maintiennent la structure de la protéine. Ce processus libère des polypeptides plus courts et des acides aminés, facilitant ainsi le détachement des taches de la surface des textiles. En d'autres termes, elles fonctionnent comme des ciseaux moléculaires, fragmentant les protéines complexes en composants solubles, ce qui optimise le nettoyage même en conditions de lavage douces (Naveed et al., 2020).

2.1.1.2. Applications des Enzymes Microbiennes dans l'Industrie Alimentaire**2.1.1.3. Utilisation des Protéases dans l'Industrie Agroalimentaire**

Depuis plus de quarante ans, les protéases sont largement exploitées pour la production d'hydrolysats de protéines, utilisés comme additifs alimentaires afin d'améliorer la valeur nutritionnelle des aliments et des aliments composés (Naveed et al., 2020). Ces enzymes jouent un rôle fondamental dans la fabrication de nombreux produits alimentaires, notamment :

- Fromages et autres produits laitiers fermentés ex. : yaourt.
- Viandes transformées.
- Produits de boulangerie.
- Procédés de maturation et d'attendrissement des aliments (Razzaq et al., 2019).

Grâce à leur capacité à catalyser l'hydrolyse des protéines complexes, les protéases contribuent à améliorer la texture, la saveur, la digestibilité et la valeur nutritionnelle des produits alimentaires finis.

2.1.1.4. Application des protéases en boulangerie : Amélioration du gluten et de la qualité du pain

En boulangerie, les protéases sont particulièrement utilisées pour modifier la structure du gluten, une protéine insoluble essentielle qui confère aux pâtes leurs propriétés viscoélastiques et leur capacité de rétention gazeuse pendant la fermentation et la cuisson.

L'ajout de protéases permet de :

- Réduire la force du gluten, facilitant ainsi le travail de la pâte.
- Améliorer l'élasticité et la maniabilité de la pâte.
- Raccourcir le temps de pétrissage.
- Augmenter le volume et la légèreté du pain.
- Diversifier les produits finis à partir de farines traitées

Les protéases d'*Aspergillus oryzae*, en particulier, sont très prisées dans le domaine de la boulangerie pour leur efficacité à modifier les réseaux protéiques du gluten tout en conservant la qualité sensorielle des produits. Ces enzymes contribuent ainsi à optimiser le processus de fabrication et à améliorer la qualité finale des pains et autres produits boulanger (J. G et al., 2018).

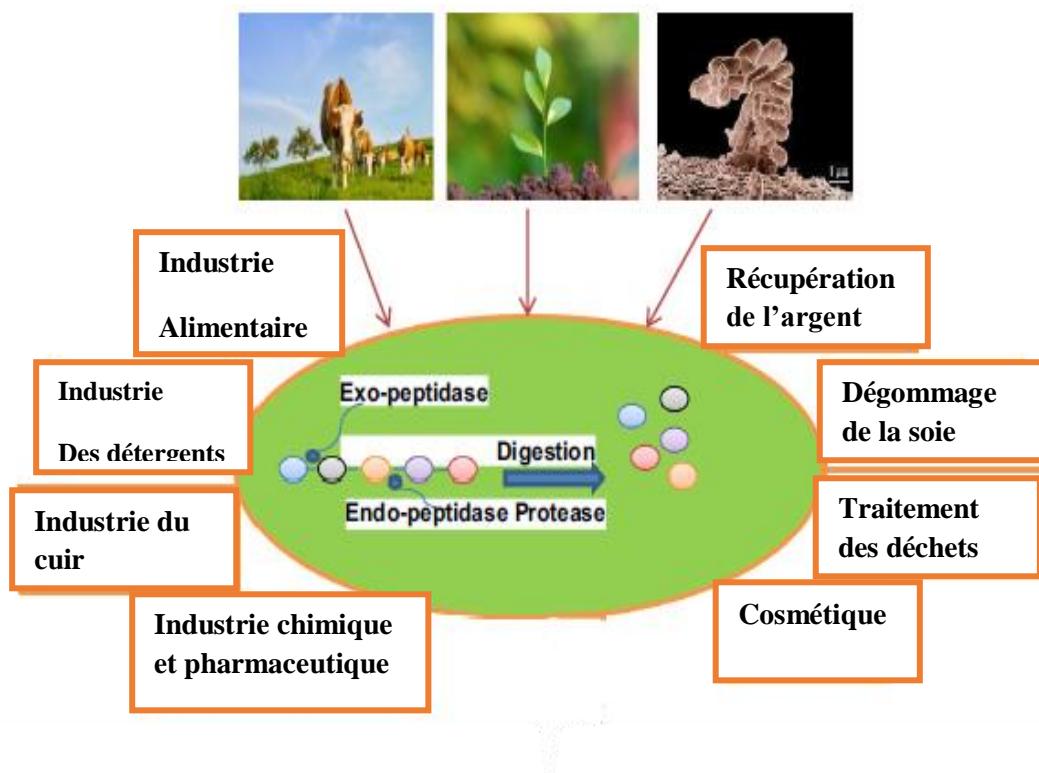


Figure 02: Applications industrielles et biotechnologiques des protéases (Naveed *et al.*, 2020).

2.1.1.5. Application des protéases dans l'industrie laitière : Fabrication du fromage et des produits fermentés

Les protéases microbiennes sont des outils essentiels dans la fabrication de fromages et autres produits laitiers fermentés, tels que le yaourt. Leur rôle principal est de catalyser l'hydrolyse de la caséine, une protéine majeure du lait, facilitant ainsi la coagulation et la formation du caillé.

Dans le processus de fabrication du fromage, les protéases jouent un rôle fondamental à plusieurs étapes critiques (Mamo *et al.*, 2020) :

- Elles permettent de précipiter la caséine, une étape clé pour la séparation efficace du lactosérum.
- Elles contribuent également au développement de la texture, de la saveur et du profil sensoriel du fromage pendant la maturation.
- L'utilisation de protéases spécifiques permet de contrôler la vitesse de coagulation, optimisant ainsi le rendement de la production.

Les protéases fongiques, en particulier celles produites par *Aspergillus oryzae*, sont souvent privilégiées par rapport aux enzymes animales traditionnelles (comme la présure), car elles offrent plusieurs avantages (Mamo *et al.*, 2020) :

- Elles répondent aux besoins alimentaires spécifiques, tels que la production de fromages végétariens ou casher.
- Elles permettent de réduire les coûts de production tout en garantissant une qualité constante.

Ainsi, les protéases fongiques ouvrent la voie à une production fromagère plus durable et innovante, répondant aux exigences actuelles du marché (Mamo et al., 2020).

2.1.1.6. Utilisation des protéases dans la transformation des viandes : Attendrissement et maturation

a) Rôle des Protéases dans l'Industrie de la Viande :

Dans l'industrie de la viande, les protéases jouent un rôle essentiel dans les processus d'attendrissement et de maturation, en améliorant les propriétés organoleptiques telles que la texture, la jutosité et la tendreté des produits carnés. Leur utilisation permet également d'optimiser la saveur par la libération de peptides et d'acides aminés aromatiques issus de la dégradation protéique, tout en réduisant le temps de maturation, ce qui accroît la productivité. Ces enzymes répondent ainsi aux exigences de qualité et de rendement dans la transformation des produits carnés. (Song et al., 2023)

b) Applications Stratégiques des Protéases :

Leur champ d'application couvre plusieurs usages stratégiques dans l'industrie de la viande, notamment l'hydrolyse contrôlée des protéines musculaires afin de ramollir les tissus et améliorer la mastication, l'enrichissement de la saveur par la libération de peptides et d'acides aminés aromatiques issus de la dégradation protéique, ainsi que la réduction du temps de maturation, ce qui permet d'augmenter la productivité tout en maintenant la qualité du produit final (Song et al., 2023).

c) Protéases Fongiques dans la Transformation de la Viande :

Les protéases fongiques, comme celles produites par *Aspergillus oryzae*, sont particulièrement efficaces pour ce type d'application, car elles peuvent agir à des températures modérées et dans des conditions compatibles avec les matrices carnées. (Song et al., 2023)

d) Applications dans les Produits Carnés Transformés :

Ces enzymes sont également utilisées pour la fabrication de produits carnés transformés, tels que les charcuteries, les viandes marinées, et les plats préparés, où elles permettent de (Song et al., 2023):

- Améliorer la texture et la digestibilité.
- Optimiser les qualités sensorielles.
- Répondre à la demande croissante de produits tendres et savoureux.

2.2. Applications des α -amylases dans l'industrie alimentaire et les biocarburants

2.2.1. Définition et rôle Biologique de l' α -Amylase

L' α -amylase est une enzyme extracellulaire appartenant à la famille des hydrolases, capable d'hydrolyser aléatoirement les liaisons α -1,4 glycosidiques de la chaîne d'amylose, un constituant principal de l'amidon.

Elle est produite comme métabolite primaire par divers micro-organismes (notamment les bactéries et les champignons) et son expression est inductive en présence de l'amidon ou de ses produits de dégradation, tels que le maltose (Bhatt et al., 2020).

2.2.2. Importance industrielle des α -amylases

Les α -amylases occupent une place centrale dans de nombreux secteurs industriels (Figure 3) en raison de leur capacité à décomposer l'amidon en sucres simples, facilitant ainsi de multiples processus de transformation. Elles sont largement exploitées dans les domaines suivants :

- **Industrie alimentaire et boissons** : production de sirops sucrés, jus, bière, édulcorants.
- **Boulangerie** : amélioration de la texture et du volume des pains.
- **Papeterie** : traitement de la pâte à papier.
- **Textile** : dégraissage et assouplissement des tissus.
- **Détergents** : élimination des taches riches en amidon.
- **Aides digestives et détachants pour nettoyage à sec** (Saranraj et Stella, 2013 ; Singh et al., 2011).

Le large spectre d'utilisation de ces enzymes démontre leur rôle indispensable dans l'optimisation des procédés industriels.

2.2.3. Rôle des α -amylases dans la production de biocarburants

Les amylases, et en particulier les α -amylases, figurent parmi les enzymes les plus utilisées dans la fabrication de biocarburants, notamment pour la production d'éthanol à partir de l'amidon.

Depuis plusieurs décennies, les enzymes microbiennes issues de bactéries et de champignons sont employées à des fins commerciales pour :

- Hydrolyser l'amidon par des procédés traditionnels : mouture sèche ou humide.
- Ou via des techniques innovantes comme l'hydrolyse de l'amidon granulaire.

Le processus de conversion de l'amidon en bioéthanol repose sur deux étapes clés :

1. **Liquéfaction** : fragmentation de l'amidon en molécules plus courtes sous l'action des α -amylases.

2. **Saccharification** : transformation de ces molécules courtes en sucres fermentescibles (ex : glucose).

Ces sucres sont ensuite convertis en éthanol par fermentation. L'amidon, largement disponible, représente ainsi une matière première de choix pour la production durable de biocarburants (Ramesh et al., 2020).

2.2.4. Applications industrielles des α -amylases : secteurs alimentaires et papetier

2.2.4.1. Utilisation des α -amylases dans l'industrie alimentaire

Les α -amylases jouent un rôle crucial dans de nombreux procédés alimentaires, notamment en boulangerie, brasserie, production de jus, sirops à base d'amidon, gâteaux, et compléments digestifs.

En boulangerie, ces enzymes sont ajoutées directement à la pâte pour hydrolyser l'amidon contenu dans la farine en petites particules. Ce processus conduit à la formation de dextrines, qui sont ensuite fermentées par les levures, favorisant ainsi la levée de la pâte et améliorant la texture et le volume du pain (Souza et al., 2010).

Dans la brasserie, les amylases facilitent la dégradation de l'amidon des céréales, rendant disponibles des sucres fermentescibles pour la production de bière et autres boissons alcoolisées. Ces enzymes sont également largement utilisées pour produire des sirops sucrés (comme le sirop de glucose), améliorer la clarification des jus de fruits, ou encore élaborer des aides digestives basées sur la pré-digestion de l'amidon (Souza et al., 2010).

2.2.4.2. Rôle des α -amylases dans l'industrie de la pâte et du papier

Dans l'industrie papetière, les amylases sont largement utilisées pour le traitement de l'amidon utilisé dans le couchage du papier. Ce procédé consiste à réduire la viscosité de l'amidon, tout en conservant un poids moléculaire élevé, afin d'améliorer :

- La qualité de surface (lissé),
- La rigidité et l'élasticité du papier,
- Les propriétés d'écriture et d'impression.

Lors du couchage du papier, l'amidon est partiellement hydrolysé par les amylases pour obtenir la viscosité souhaitée, dans un processus pouvant être continu ou discontinu. L'amidon est

ensuite appliqué sur la surface du papier au niveau de la presse à encoller, où il est absorbé grâce aux rouleaux.

La température du procédé est maintenue autour de 45 à 60 °C, et le contrôle précis de la viscosité est essentiel pour assurer une qualité homogène du produit final. De plus, la possibilité d'ajuster la viscosité de l'amidon permet de produire différentes qualités de papier selon les besoins du marché (Bhatt et al., 2020).

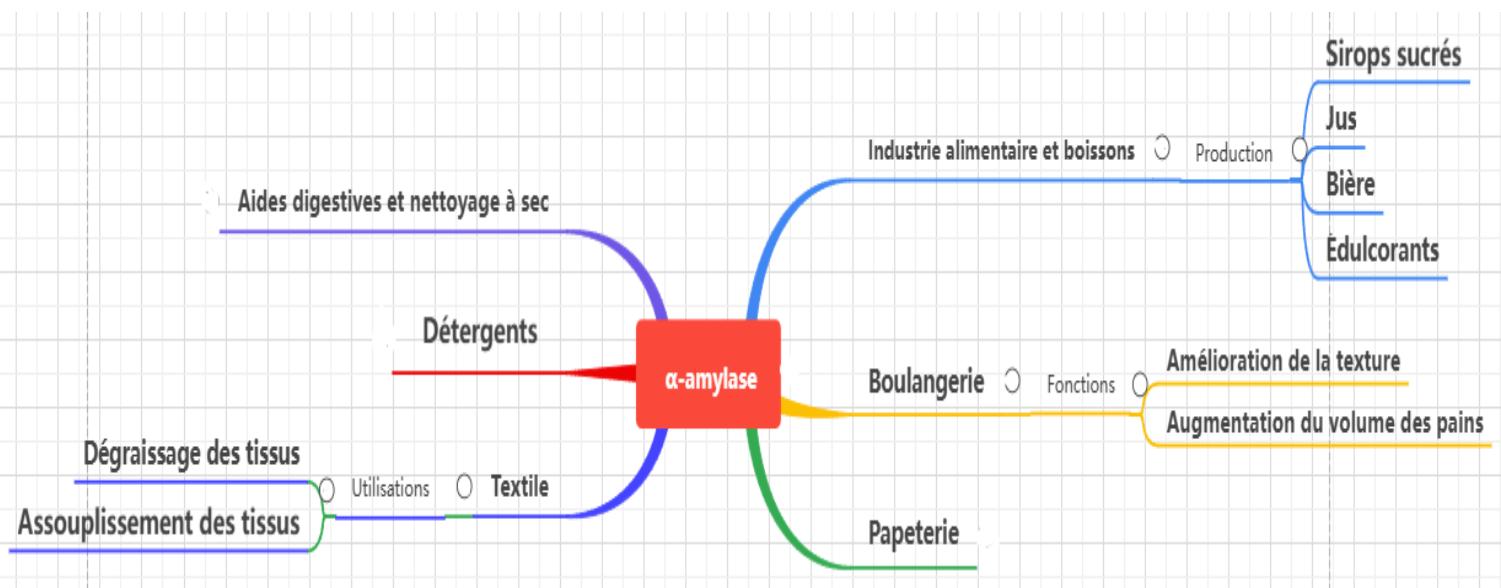


Figure 03 : Applications industrielles et biotechnologiques de l'α-amylase. (Saranraj et Stella, 2013 ; Singh et al., 2011).

2.3. Pectinases : Enzymes clés aux applications industrielles multiples

2.3.1. Définition et caractéristiques des pectinases

Les pectinases sont un groupe complexe d'enzymes (biocatalyseurs) spécialisées dans la dégradation des substances pectiques, présentes notamment dans les parois cellulaires végétales. Elles se distinguent par leur polyvalence, leur forte spécificité vis-à-vis de nombreux substrats, leur inductibilité, leur stabilité, ainsi que leur capacité à agir sur une grande variété de composés pectiques. Ces propriétés font des pectinases des enzymes incontournables dans diverses industries (Shrestha et al., 2021).

Les applications industrielles des pectinases sont vastes (Figure 4) et touchent de nombreux secteurs tels que le textile, le traitement des fibres végétales, la fermentation du thé et du café, l'extraction d'huiles végétales, ainsi que le traitement des eaux usées riches en pectine (Sharma et al., 2012).

2.3.2. Applications industrielles des pectinases**2.3.2.1. Industrie textile : un agent écoresponsable pour le traitement du coton**

Dans le secteur textile, les pectinases sont utilisées en synergie avec d'autres enzymes comme les amylases, lipases, cellulases et hémicellulases pour éliminer les agents d'encollage du coton de manière efficace et respectueuse de l'environnement.

Les avantages de leur utilisation incluent :

- **Spécificité d'action** (évite d'endommager les fibres),
- **Processus rapide** et moins énergivore,
- **Réduction de la consommation d'eau et de matières premières**,
- **Substitution aux procédés chimiques agressifs et coûteux**.

Le traitement aux pectinases améliore ainsi la mouillabilité et réduit le poids des tissus, tout en offrant une alternative durable aux traitements chimiques classiques (Shrestha et al., 2021).

2.3.2.2. Fermentation du thé et du café : rôle dans la qualité du produit final

Les pectinases jouent un rôle essentiel dans les processus de fermentation du thé et du café :

Dans la fermentation du thé, elles contribuent à améliorer le processus de fermentation et à réduire la mousse des thés instantanés en poudre en dégradant les pectines responsables de ce phénomène.

Dans le traitement du café, elles sont utilisées pour éliminer la couche de mucilage qui entoure les grains de café, facilitant ainsi la préparation des grains pour la torréfaction (Rehman et al., 2020).

2.3.2.3. Industrie de la pâte et du papier : alternative écologique aux procédés chimiques

Dans l'industrie papetière, l'utilisation de pectinases représente une solution écologique pour limiter le recours aux agents de blanchiment à base de chlore, connus pour générer des composés organochlorés toxiques, mutagènes et bioaccumulables, nuisibles à l'écosystème.

Les pectinases permettent notamment de :

- Dépolymériser les polymères d'acide galacturonique,
- Réduire la demande en cations dans les solutions pectiques,
- Faciliter la formation de la feuille de papier en diminuant la teneur en pectines de la matière première,
- Améliorer la qualité visuelle du papier (réduction de la décoloration).

Ainsi, les pectinases contribuent à réduire l'impact environnemental de la production de papier tout en améliorant la qualité du produit final (Haile et al., 2022).

2.3.2.4. Extraction d'huile : amélioration du rendement et de la qualité

Les pectinases jouent un rôle déterminant dans le processus d'extraction d'huiles végétales, notamment celles issues des fruits oléagineux (ex. : olive, avocat).

En dégradant les composés pectiques présents dans les parois cellulaires des fruits, les pectinases :

- **Facilitent la libération de l'huile**, ce qui augmente significativement le rendement d'extraction.
- **Améliorent la clarté et la stabilité de l'huile obtenue**, en réduisant la teneur en particules en suspension.
- **Réduisent la viscosité des purées** d'où l'huile est extraite, ce qui facilite la séparation huile/eau (Ortiz et al., 2016 ; Haile et al., 2022).

L'utilisation de ces enzymes est une alternative verte aux procédés mécaniques ou chimiques traditionnels, souvent plus agressifs et coûteux. Ce procédé permet ainsi de préserver la qualité nutritionnelle et organoleptique des huiles, tout en réduisant l'empreinte écologique du processus (Ortiz et al., 2016 ; Haile et al., 2022).

2.3.2.5. Traitement des eaux usées industrielles : solution écoresponsable pour les effluents riches en pectine

Les industries agroalimentaires, notamment celles spécialisées dans la transformation de fruits et légumes, produisent d'importantes quantités d'eaux usées contenant des matières pectiques. Ces substances, difficiles à dégrader, augmentent la charge organique des effluents, compliquant ainsi leur traitement.

L'application de pectinases dans ces systèmes permet de :

- **Hydrolyser les pectines**, réduisant ainsi la viscosité et facilitant la sédimentation ou la filtration des déchets.
- **Améliorer la biodégradabilité des effluents**, en transformant les macromolécules pectiques complexes en composés plus simples assimilables par les microorganismes.
- **Réduire la demande chimique en oxygène (DCO) et la charge polluante** des eaux usées, facilitant leur traitement ultérieur dans les stations d'épuration (Shrestha et al., 2021).

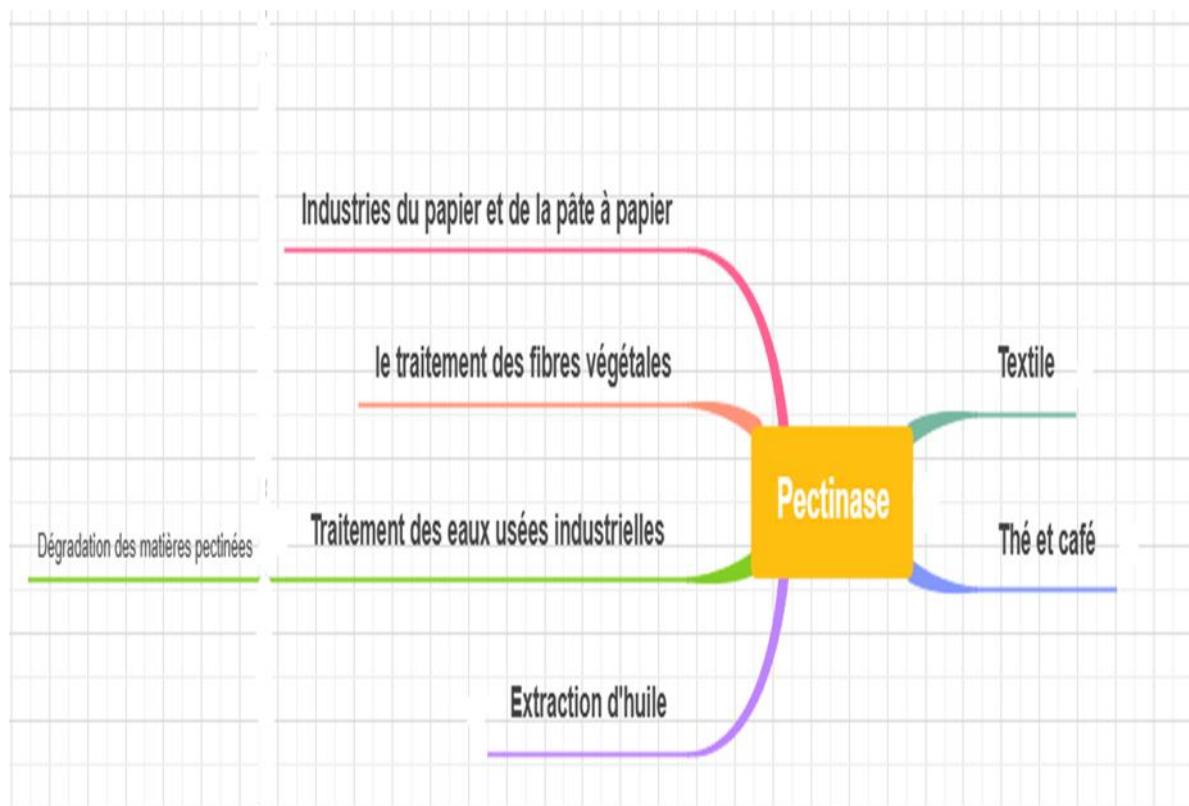


Figure 04 : Applications industrielles et environnementales des pectinases. (Sharma et al., 2012).

Ainsi, les pectinases offrent une solution biologique efficace et écologique, contribuant à la gestion durable des rejets industriels (Tableau 1) (Sharma et al., 2012).

Tableau 01 : Application principales des pectinases

Secteur d'application	Rôle principal des pectinases	Avantages majeurs
Industrie textile	Elimination les agents d'encollage	Procédé écologique, réduction des couts, respect des fibres
Fermentation du thé et du café	Dégradation de la pectine pour améliorer la fermentation	Qualité du produit, réduction de la mousse (thé instantané)
Industrie de la pâte et du papier	Remplacement des agents chlorés pour le blanchiment	Réduction des toxicités environnementales, meilleure qualité du papier
Extraction d'huile	Libération facilitée de l'huile des fruits	Meilleur rendement, qualité d'huile supérieure
Traitement des eaux usées industrielles	Hydrolyse des pectines dans les effluents industriels	Réduction de la charge organique traitement facilitée

Chapitre 3 : Valorisation des déchets d'orange

1. Nature et composition des déchets d'orange

Les déchets de jus d'orange sont des biodéchets agro-industriels produits à grande échelle, pouvant être transformés en source de matière première par séchage (Pinto *et al.*, 2025). Lors de la production de jus d'orange, seuls environ 50 % du poids des oranges fraîches sont transformés en jus. Le processus d'extraction génère ensuite de grandes quantités de déchets, notamment les pelures, la pulpe, les pépins, les feuilles d'oranger et les fruits entiers ne répondant pas aux exigences de qualité.

Les déchets d'écorces d'orange représentent environ 50 à 60 % du poids du fruit transformé. Ils sont constitués d'écorces, de tissus et de la fraction restante des pépins. Leur composition inclut 75 à 85 % d'eau, 6 à 8 % de sucres simples (glucose, fructose et saccharose) et 1,53 % de polysaccharides (pectine, cellulose et hémicellulose). Leur pH est compris entre 3 et 5, et ils contiennent une quantité significative d'huile essentielle, principalement composée de d-limonène (De Medina-Salas *et al.*, 2020).

Différentes voies de valorisation ont été proposées pour ces déchets, notamment la production de biocarburants, la bioraffinerie, l'extraction de pectine et l'alimentation animale, entre autres (Negro *et al.*, 2017).

2. Composition chimique des déchets d'orange

La composition de ces déchets est riche en polysaccharides structurels et en polymères associés, notamment la cellulose, l'hémicellulose, la pectine et la lignine. Ils contiennent également une quantité importante de sucres libres, tels que le glucose, le fructose et le saccharose, ainsi que d'autres composants, notamment des huiles essentielles et des protéines (de la Torre *et al.*, 2019).

La composition chimique exacte des oranges est influencée par divers facteurs. Cependant, les déchets d'écorce d'orange contiennent généralement 42,5 % de pectine, 16,9 % de sucres solubles, 10,5 % d'hémicellulose et 9,21 % de cellulose, qui en sont les principaux composants (Tardiolo *et al.*, 2023).

Cela est d'autant plus préoccupant que les épluchures et les graines des agrumes jetées renferment des composés bioactifs tels que des sucres, des glucides, des protéines, des lipides, des acides organiques, des flavonoïdes, des huiles essentielles et des pigments (Khamsaw *et al.*, 2022).

3. Valorisation et applications industrielles des déchets d'orange

Les écorces d'orange offrent de nombreuses applications industrielles potentielles en raison de leur abondance, de leur faible coût et de leur richesse en composés bioactifs (Yaradoddi *et al.*, 2022).

Traditionnellement, ces résidus sont principalement destinés à l'alimentation du bétail, au compostage, à l'incinération ou encore au stockage en décharge (de la Torre *et al.*, 2019). Cependant, leur potentiel va bien au-delà de ces usages conventionnels.

Les déchets d'écorces d'orange peuvent être valorisés comme source de pigments et d'arômes naturels dans l'industrie alimentaire. Leur forte teneur en glucides en fait également un substrat idéal pour la production d'éthanol, utilisé comme biocarburant ou comme matière première pour la synthèse d'autres produits chimiques.

Par ailleurs, ces déchets constituent une source précieuse d'huiles essentielles, notamment riches en d-limonène, largement exploitées dans les industries de la parfumerie et des cosmétiques. Enfin, les écorces d'orange trouvent aussi des applications dans la production de polymères biodégradables, contribuant ainsi au développement de matériaux plus durables et respectueux de l'environnement (Tahir *et al.*, 2023).

3.1. Ressource précieuse et à faible coût pour la production d'enzymes

Les déchets agro-industriels représentent une ressource précieuse et peu coûteuse pouvant être exploitée pour la production d'enzymes destinées à diverses industries (Kumar *et al.*, 2020).

3.2. Production d'enzymes à partir des déchets d'agrumes

La production d'agrumes génère des sous-produits substantiels, principalement issus du traitement des jus, qui représentent des défis environnementaux et économiques importants. Cependant, ces résidus, riches en polysaccharides, flavonoïdes, huiles essentielles et enzymes, offrent une ressource inexploitée pour les applications biotechnologiques. Cette revue explore le potentiel des sous-produits d'agrumes comme substrats pour la production d'enzymes, en se concentrant sur des enzymes industrielles clés telles que les cellulases, les pectinases, les xylanases, les ligninases, les lipases et les protéases. Diverses souches microbiennes ont démontré leur capacité à convertir les résidus d'agrumes en enzymes de haute valeur grâce à la fermentation en milieu solide et immergé. La valorisation des déchets d'agrumes s'aligne avec les principes de l'économie circulaire, réduisant les impacts environnementaux tout en soutenant le développement de bioproduits durables pour les industries alimentaires, de biocarburants, pharmaceutiques et textiles. Les recherches futures devraient se concentrer sur l'augmentation de la production d'enzymes à partir des déchets d'agrumes

afin d'améliorer la faisabilité économique et de faire progresser les bioraffineries industrielles (Lima et al., 2025).

Chapitre 4 : Fermentation : un procédé clé pour la production d'enzymes

La fermentation est un processus biologique au cours duquel des micro-organismes exploitent des voies métaboliques spécifiques pour produire divers métabolites d'intérêt (Yang *et al.*, 2025).

Elle est considérée comme l'une des technologies de biomodification les plus sûres et les plus efficaces. Les enzymes produites par les micro-organismes durant la fermentation jouent un rôle clé dans la dégradation des macromolécules et des facteurs antinutritionnels présents dans les substrats fermentés. Ce processus permet de convertir ces substrats en composés fonctionnels, tout en améliorant leur qualité sensorielle et leurs propriétés technofonctionnelles (Li *et al.*, 2025).

1. Types de fermentation

Deux principales méthodes de fermentation sont utilisées dans la production d'aliments fermentés : la fermentation en phase liquide (FPL) et la fermentation en phase solide (FPS). Des études ont montré que ces deux techniques pouvaient favoriser des modifications biochimiques bénéfiques, notamment en générant des métabolites plus simples aux effets potentiellement positifs sur la santé (Aloo *et al.*, 2025).

Les protéases, par exemple, sont des enzymes extracellulaires pouvant être produites aussi bien par fermentation submergée que par fermentation en état solide (Chutmanop *et al.*, 2008). Le choix entre ces deux méthodes dépend de divers facteurs tels que le type de substrat, les micro-organismes utilisés et les objectifs de production.

1.1. Fermentation en phase liquide (FPL)

La fermentation en phase liquide, également appelée fermentation submergée (SmF), est la méthode la plus couramment utilisée dans l'industrie. Elle se caractérise par l'immersion complète du substrat dans un milieu liquide contenant les nutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes (Li *et al.*, 2020).

Ce procédé fait l'objet de nombreuses recherches visant à optimiser la productivité, les rendements et l'efficacité économique des systèmes de fermentation (Somadder *et al.*, 2025). Grâce à une teneur en eau supérieure à 95 %, la FPL permet un contrôle précis des paramètres environnementaux tels que la température, le pH et l'aération. Elle est largement utilisée pour la production d'enzymes, de produits pharmaceutiques et le traitement des déchets liquides (Ferrero *et al.*, 2024).

1.1.1. Avantages et inconvénients de la fermentation en phase liquide

La fermentation en phase liquide (FPL) est l'une des méthodes les plus utilisées dans les bioprocédés industriels en raison de sa compatibilité avec les systèmes automatisés et les environnements stériles. Cependant, comme toute technologie, elle présente à la fois des atouts significatifs et des limites notables.

1.1.1.1. Avantages

La fermentation en phase liquide offre plusieurs avantages majeurs :

- Contrôle optimisé des paramètres environnementaux (pH, oxygène, température).
- Réduction des coûts de main-d'œuvre grâce à une automatisation plus facile.
- Besoin en espace réduit, ce qui facilite son intégration dans les environnements industriels.
- Évolutivité facilitée, permettant une montée en échelle plus rapide que la fermentation en état solide.

1.1.1.2. Inconvénients

Malgré ses avantages, la FPL présente aussi certains inconvénients :

- Coûts de production élevés, notamment en raison des milieux de culture coûteux.
- Consommation énergétique importante, liée au besoin de maintenir un environnement contrôlé.
- Durée de fermentation prolongée pour certains micro-organismes, en particulier les champignons filamenteux.
- Production excessive de mousse, nécessitant l'ajout d'agents antimousse.

1.2. Fermentation en phase solide (FPS)

La fermentation en phase solide (FPS) est une technique biotechnologique permettant la production de composés d'intérêt industriel à partir de la bioconversion de déchets agricoles riches en nutriments en produits à valeur ajoutée (Balachandran *et al.*, 2021). Ce procédé est particulièrement adapté aux champignons filamenteux, dont la croissance est favorisée par un environnement à faible humidité, et il est couramment utilisé pour la production de protéases et d'autres enzymes (Talhi *et al.*, 2022).

Dans la FPS, les micro-organismes aérobies ou anaérobies se développent à la surface de particules solides humides, en l'absence ou quasi-absence d'eau libre (Gassara, 2012). Ce mode de

fermentation permet une utilisation progressive et régulière du substrat, prolongeant ainsi la durée du processus et optimisant la production de métabolites (Subramaniyam et al., 2012).

1.2.1. Avantages de la fermentation en phase solide

La fermentation en phase solide présente plusieurs avantages par rapport à la fermentation liquide :

- Réduction des coûts d'investissement et d'exploitation : les infrastructures et équipements nécessaires sont souvent moins coûteux.
- Simplicité des processus en aval : la récupération des produits d'intérêt est facilitée.
- Utilisation de substrats peu onéreux : les résidus agro-industriels peuvent servir de support nutritif, réduisant ainsi les coûts de production (Aljammas, 2021).
- Faible taux de contamination : la faible teneur en humidité limite la croissance des contaminants indésirables.
- Meilleure productivité volumique : les substrats solides concentrés permettent une plus grande densité cellulaire et une production accrue.
- Absence de formation de mousse : contrairement à la fermentation liquide, aucun agent antimousse n'est requis.
- Enzymes plus stables : les enzymes produites en FPS sont moins sujettes aux répressions cataboliques, ce qui optimise leur rendement (Gassara, 2012).
- Adaptabilité aux enzymes fongiques : cette méthode est particulièrement efficace pour la production de protéases et autres enzymes fongiques (Aljammas et al., 2022).

L'inoculation dans ce procédé peut être réalisée avec la flore microbienne naturelle du substrat, des spores ou des cellules spécifiques (Aguilar and Gutierrez, 2008). Grâce à ces nombreux avantages, la FPS est de plus en plus explorée pour la production de métabolites d'intérêt industriel.

1.2.2. Inconvénients de la fermentation en phase solide

Malgré ses nombreux avantages, la FPS présente également certaines limitations qu'il est important de prendre en compte (Gassara, 2012).

- Difficulté de mise à l'échelle : le passage du laboratoire à la production industrielle reste un défi majeur.
- Impuretés dans le produit final : la dégradation des fibres par l'activité microbienne peut produire des composés indésirables (ex. mélanoïdines), qui compliquent les étapes de purification (Graminha *et al.*, 2008).
- Limitations liées aux micro-organismes : seuls les micro-organismes capables de se développer dans un environnement à faible humidité peuvent être utilisés efficacement.

- Difficulté de surveillance des paramètres : l'humidité, le pH, l'oxygène et le CO₂ sont difficiles à mesurer en temps réel, en raison du manque de capteurs adaptés.
- Problème de compactage du substrat : la structure du support peut se modifier au cours de la fermentation, ce qui complique le contrôle du processus et la récupération des produits finaux (Wang and Yang, 2007).
- Manipulation des solides : le traitement du substrat dans les bioréacteurs existants pose des défis techniques, entravant le développement de la FPS à grande échelle (Aguilar et al., 2008).

Malgré ces contraintes, la FPS reste une alternative prometteuse pour la valorisation des déchets agro-industriels et la production écoresponsable d'enzymes et de métabolites à haute valeur ajoutée. L'optimisation des bioréacteurs et des stratégies de contrôle pourrait permettre de surmonter ces limitations et d'accroître son application à l'échelle industrielle.

1.2.3. Facteurs influençant la fermentation en phase solide (FPS)

a) pH :

Le pH est un paramètre physico-chimique fondamental qui influence directement la croissance microbienne et l'efficacité du processus de fermentation en phase solide. Chaque groupe de micro-organismes présente une préférence spécifique en matière de pH :

- **Les bactéries** se développent généralement dans des conditions neutres (pH ~7).
- **Les levures et champignons** préfèrent des milieux légèrement acides (pH ~4-6).
- **Les champignons filamenteux** se distinguent par leur large tolérance au pH, ce qui les rend particulièrement adaptés à la SSF, où les conditions du substrat peuvent varier au cours du processus fermentaire (López-Gómez et al., 2020).

Un contrôle précis du pH est donc essentiel pour optimiser la croissance microbienne et la production des métabolites d'intérêt.

b) Température :

La température constitue l'un des facteurs physiques les plus déterminants en fermentation en phase solide (SSF), car elle influence à la fois la croissance microbienne et la production des métabolites. Son effet varie selon le type de micro-organisme utilisé et le métabolite ciblé. Une température inadaptée peut entraîner une inhibition enzymatique, une réduction de la croissance ou même la suppression de la synthèse de certains composés. Si elle devient excessive, elle peut provoquer la mort cellulaire et compromettre l'ensemble du processus fermentaire (Pandey, 2003). Les champignons filamenteux, couramment utilisés en SSF, se montrent particulièrement robustes, capables de se développer dans une large gamme de températures allant de 20 à 55 °C. Toutefois, la

température optimale pour la croissance mycélienne peut différer de celle requise pour la production efficace du métabolite d'intérêt (Yadav, 1988). Il est donc essentiel d'ajuster et de contrôler rigoureusement la température, en tenant compte de la chaleur générée par l'activité microbienne, afin d'optimiser la fermentation et d'assurer une productivité maximale.

c) Teneur en humidité et activité de l'eau :

La teneur en humidité et l'activité de l'eau (a_{nx}) sont des paramètres essentiels influençant la croissance microbienne et la réussite d'une fermentation en phase solide (SSF). Lorsque la capacité de saturation du substrat dépasse 80 % de teneur en humidité, de l'eau libre peut apparaître, créant des conditions favorables à la contamination bactérienne et compromettant ainsi la SSF. Les valeurs optimales de teneur en eau dépendent du type de substrat utilisé ainsi que du micro-organisme impliqué. L'activité de l'eau (a_{nx}) représente la quantité d'eau effectivement disponible pour la croissance microbienne et les réactions métaboliques. Les champignons filamenteux, en particulier, sont bien adaptés à la SSF grâce à leur capacité à se développer à de faibles valeurs d' a_{nx} , contrairement aux bactéries, qui exigent des milieux plus hydratés (López-Gómez et al., 2020). Il est donc crucial d'optimiser ce paramètre en maintenant une humidité suffisante pour soutenir l'activité enzymatique, tout en évitant l'excès d'eau libre, afin de maximiser la production des métabolites d'intérêt.

d) Exigences en aération et en oxygène :

En fermentation en phase solide (SSF), l'oxygénation constitue un facteur clé, car la majorité des micro-organismes utilisés sont aérobies. L'oxygène doit pouvoir diffuser efficacement à travers les espaces interparticulaires jusqu'à la biomasse, afin de maintenir des conditions aérobies optimales, essentielles à la croissance microbienne et à l'activité enzymatique. Par ailleurs, une bonne oxygénation permet également l'évacuation du dioxyde de carbone produit au cours de la fermentation. Toutefois, une limitation en oxygène peut survenir dans les zones profondes du substrat, réduisant ainsi la productivité. Pour remédier à ce problème, deux approches sont couramment utilisées : le retournement régulier du substrat, qui améliore la diffusion de l'air, et l'aération forcée, consistant à injecter de l'air dans le substrat pour favoriser l'échange gazeux et prévenir la formation de zones anoxiques (Finkler et al., 2017). Un ajustement adéquat de ces paramètres permet d'accroître l'efficacité métabolique des micro-organismes et d'optimiser la production d'enzymes et d'autres métabolites d'intérêt.

e) Taille des particules :

La taille des particules du substrat joue un rôle clé dans la croissance microbienne et le transfert de chaleur et de masse lors de la fermentation en phase solide. Elle influence plusieurs paramètres essentiels :

f) Rapport surface/volume :

Une réduction de la taille des particules augmente ce rapport, favorisant ainsi l'accessibilité des micro-organismes aux nutriments.

g) Accessibilité du substrat :

Des particules plus petites offrent une surface d'attaque plus grande pour les enzymes et les cellules microbiennes.

h) Densité de compactage :

Une granulométrie trop fine peut entraîner un compactage excessif du substrat, limitant la diffusion de l'oxygène et nuisant à la croissance des micro-organismes aérobies.

i) Optimisation :

Des particules de petite taille améliorent le transfert de chaleur et d'oxygène, tandis que des particules plus grandes facilitent une meilleure respiration cellulaire, mais réduisent la surface d'interaction pour l'activité enzymatique microbienne. Ainsi, un équilibre optimal entre la taille des particules et la porosité du substrat est essentiel pour maximiser l'efficacité de la fermentation (Krishna, 2005).

Partie II

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes**1. Introduction**

Dans le but d'explorer le potentiel biotechnologique d'*Aspergillus oryzae* pour la production enzymatique, la présente étude a été menée en utilisant des déchets d'orange comme unique substrat carboné. Ces résidus agroalimentaires, abondants et peu coûteux, constituent une matière première prometteuse dans une démarche de valorisation durable. Plusieurs enzymes d'intérêt industriel, notamment l' α -amylase, la cellulase (FPase), la protéase et la polygalacturonase, ont été ciblées pour évaluer la capacité enzymatique de la souche fongique en conditions contrôlées.

Deux types de fermentation ont été comparés : la fermentation submergée (SmF) et la fermentation en milieu solide (SSF). Ce choix expérimental visait à déterminer l'impact du mode de culture sur la production des différentes enzymes, en tenant compte du fait que l'expression enzymatique peut varier significativement selon les conditions physico-chimiques et l'accessibilité du substrat, même en présence d'une même souche et d'un même support lignocellulosique.

L'approche méthodologique adoptée a consisté à utiliser une étude statistique (plan de Box-Behnken) et l'intelligence artificielle pour maximiser la production enzymatique chez *Aspergillus oryzae*.

2. Matériel Biologique

La souche d'*Aspergillus oryzae* Arlburg 1072.27 Cohen fournie par l'Institut Pasteur (Paris, France) est une culture cataloguée lyophilisée, prête à être réhydratée pour utilisation.

3. Réactivation de la souche fongique**3.1.1. Préparation du milieu de réactivation**

Pour l'obtention des spores fongiques d'*Aspergillus oryzae*, un milieu solide de type PDA (Potato Dextrose Agar) a été utilisé en raison de sa richesse nutritive favorable à la sporulation. La préparation du milieu a débuté par l'extraction des composés nutritifs à partir de 200 g de pommes de terre pelées et coupées, bouillies dans 500 mL d'eau distillée pendant 30 minutes. Après filtration du bouillon obtenu, le volume a été ajusté à 1 L avec de l'eau distillée. Ensuite, 20 g de glucose et 15 g d'agar-agar y ont été dissous.

Le mélange ainsi préparé a été stérilisé par autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes, afin d'éliminer toute contamination microbienne. Une fois refroidi, le milieu stérilisé a été versé

aseptiquement dans des boîtes de Pétri sous hotte à flux laminaire, garantissant un environnement stérile propice au développement exclusif de la souche fongique souhaitée.

3.2. Protocole de réactivation de la souche fongique

L'ensemencement d'une souche lyophilisée d'*Aspergillus oryzae* a été réalisé dans des conditions aseptiques afin d'assurer la pureté de la culture. Le matériel utilisé comprenait : de l'eau physiologique stérile (ou un bouillon de culture), des pipettes stériles, des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé adapté (PDA), une anse de platine ou un étalon en verre stérile, ainsi que des gants et une hotte à flux laminaire.

La procédure a débuté par la réhydratation de la souche : 2,5 mL d'eau physiologique stérile ont été ajoutés au tube contenant la souche lyophilisée. Après un repos de 10 à 15 minutes permettant la réhydratation des spores, le contenu a été homogénéisé doucement. Une goutte de la suspension obtenue a ensuite été déposée sur la surface du milieu PDA, puis étalée soigneusement à l'aide d'une anse stérile ou d'un étalon en verre.

Les boîtes ont été incubées à une température comprise entre 25 et 30 °C pendant 48 à 72 heures. La croissance fongique a été suivie par observation de la formation des colonies caractéristiques d'*Aspergillus oryzae*. Pour une conservation à long terme, des cultures fraîches ont été transférées sur des milieux inclinés et stockées à 4 °C, ou suspendues dans une solution de glycérine stérile avant congélation à -80 °C.

4. Préparation de l'inoculum

L'inoculum d'*Aspergillus oryzae* a été préparé pour être utilisé dans les deux types de fermentation (solide et submergée), en vue de la production de diverses enzymes : protéases, pectinases, cellulase et α -amylase. La préparation de l'inoculum s'est déroulée en deux étapes principales :

4.1. Préparation de la suspension de spores

La préparation de la suspension de spores s'effectue en ajoutant 30 ml d'eau distillée stérile à la culture qui a été cultivée pendant 72h sur PDA dans une boîte de Pétri ou erlèn. Sous des conditions aseptiques, mélanger ou avec une anse de platine est utilisée pour déboîter superficiellement les spores.

4.2. Dénombrement des spores

A 1 ml de suspension de spores préalablement agitée, on ajoute 9 ml d'eau distillée. Le nombre de spores dans chaque dilution est déterminé par la technique de dénombrement. L'examen s'effectue

au microscope au grossissement x 40. La suspension est diluée de manière à obtenir un nombre de spores de 10^6 spores/ ml.

5. Production des enzymes industrielles

Cette étude a porté sur la production de quatre enzymes industrielles majeures : la protéase, l' α -amylase, la cellulase et la pectinase, à partir de la souche *Aspergillus oryzae*. Deux approches de fermentation ont été comparées : la fermentation en milieu liquide (SmF) et la fermentation en milieu solide (SSF), en utilisant comme unique substrat des déchets d'orange. L'objectif principal était d'évaluer l'efficacité relative de chaque procédé de culture pour la production de ces enzymes, tout en valorisant un coproduit agro-industriel abondant.

Les déchets d'orange utilisés, composés principalement de pulpe et de graines, ont été fournis par l'unité industrielle SIJUCO (Skikda, Algérie) le 17 février 2025. Après réception, les déchets ont été étalés et séchés à l'air libre à température ambiante (25–30 °C) pendant 3 à 4 jours. Une fois bien déshydratés, ils ont été broyés à l'aide d'un moulin électrique domestique jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Ce substrat a ensuite été utilisé tel quel pour les deux modes de fermentation (SSF et SmF), en tant que source principale de carbone et de nutriments.

6. Préparation de la fermentation en milieu solide (SSF)

Pour la fermentation en milieu solide, 5 g de poudre de déchets d'orange sont introduits dans des flacons Erlenmeyer de 250 mL. Chaque échantillon est humidifié avec 3,5 mL d'eau distillée, de manière à atteindre un taux d'humidité de 70 %, considéré optimal pour la production des enzymes protéase, α -amylase, cellulase et pectinase.

Le contenu de chaque flacon est homogénéisé à l'aide d'une tige stérile, puis soumis à une stérilisation en autoclave à 121 °C pendant 20 minutes (Figure 5). Après refroidissement à température ambiante, le milieu est inoculé aseptiquement avec 0,25 mL d'une suspension de spores d'*Aspergillus oryzae*. Les flacons sont ensuite agités délicatement pour assurer une répartition uniforme de l'inoculum, puis incubés à 30 °C pendant 72 heures.



Figure 05 :Fermentation solide**6.1.1. Extraction de l'enzyme**

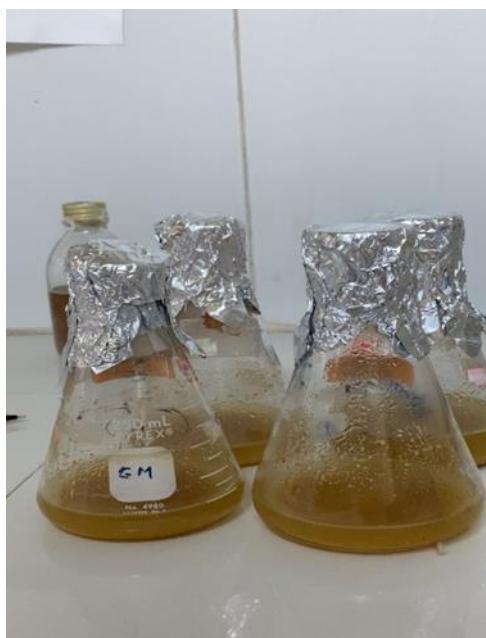
À l'issue de la fermentation, le substrat fermenté est traité avec 50 mL d'une solution de Tween 80 à 0,02 %. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un agitateur pendant 5 minutes, puis centrifugé à 5000 tr/min à 4 °C pendant 20 minutes. Le surnageant recueilli constitue l'extrait enzymatique brut. Celui-ci est conservé au congélateur pour des analyses enzymatiques ultérieures.

6.1.2. Détermination de la matière sèche (MS)

Pour évaluer l'évolution de la matière sèche (MS) au cours du processus de fermentation, une quantité précise de substrat fermenté est pesée dans des boîtes de Pétri en verre. Les échantillons sont ensuite placés dans une étuve à 70 °C pendant 48 heures, jusqu'à obtention d'un poids constant. La matière sèche est calculée par différence de masse avant et après séchage.

6.2. Fermentation liquide (submersée)

Le milieu de culture est préparé en dissolvant 1 g de déchets d'oranges secs dans 50 mL d'eau distillée. Le mélange est homogénéisé puis stérilisé à 121 °C pendant 20 minutes (Figure 6). Après refroidissement, le milieu estensemencé avec 2,5 mL de suspension de spores. L'homogénéisation est effectuée avec précaution pour éviter toute agrégation des spores. Les flacons sont ensuite incubés à 30 °C pendant 72 heures sous agitation constante à 150 rpm dans un incubateur agitateur (shaker), afin d'assurer une bonne oxygénation et une répartition uniforme des nutriments.

**Figure 06** : Fermentation submersée

6.2.1. Récupération de l'extrait enzymatique en fermentation submergée (SmF)

À la fin de la fermentation, le milieu de culture est filtré afin de séparer la biomasse (présente sous forme de pellets) du surnageant. Ce surnageant, ou milieu extracellulaire, constitue l'extrait enzymatique brut. La biomasse recueillie dans chaque Erlenmeyer est soigneusement pesée pour un suivi de la croissance fongique. L'extrait enzymatique brut est conservé au congélateur en vue des dosages ultérieurs de l'activité enzymatique et de la teneur en protéines.

7. Méthode de dosage**7.1. Dosage de l'activité protéolytique****7.1.1. Principe**

L'activité protéolytique est évaluée selon la méthode d'Anson (1938), basée sur l'hydrolyse de la caséine par une protéase. Cette réaction enzymatique libère des peptides et des acides aminés libres, principalement la tyrosine, dont la concentration est mesurée par une méthode colorimétrique.

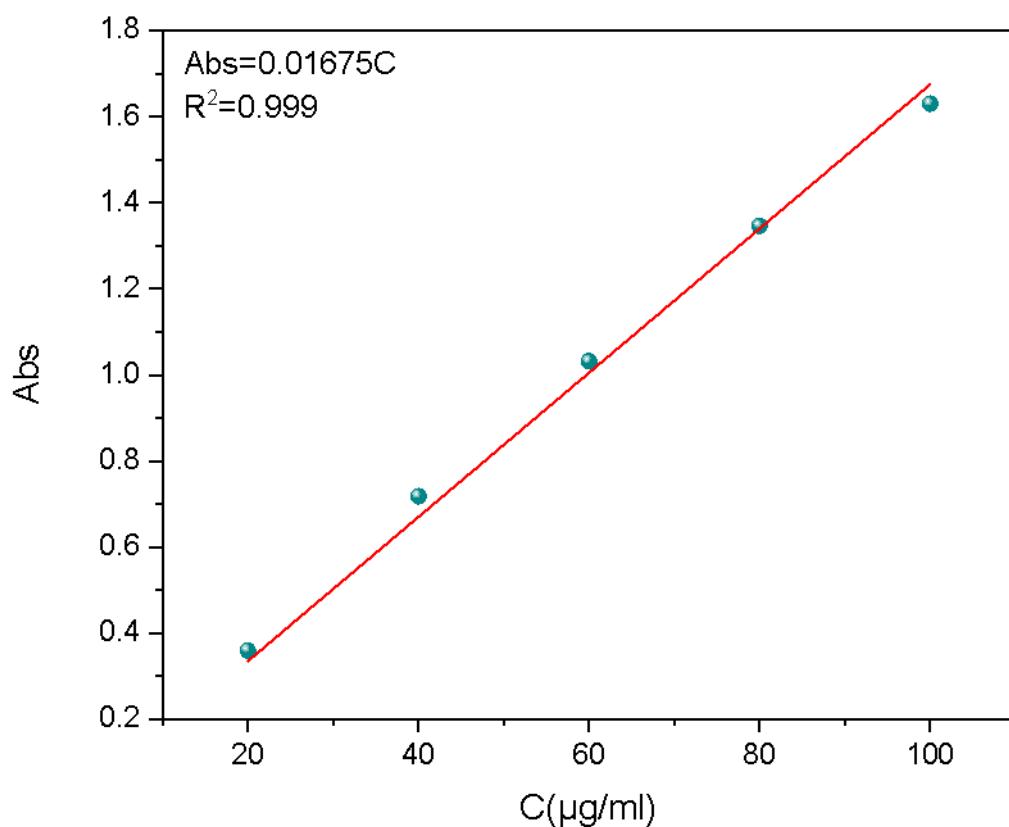
La tyrosine, présente dans toutes les protéines, est utilisée comme référence pour l'établissement d'une courbe d'étalonnage. Elle réagit avec le réactif de Folin-Ciocalteu en milieu alcalin pour former un complexe coloré bleu mesurable par spectrophotométrie. La réaction enzymatique est arrêtée par l'addition d'une solution de TCA (acide trichloroacétique), qui précipite les protéines non hydrolysées, permettant ainsi de doser uniquement les produits solubles de l'hydrolyse.

7.1.2. Courbe d'étalonnage de la tyrosine

La courbe d'étalonnage est préparée à partir d'une solution mère de tyrosine à raison de 0,1 g de tyrosine dissous dans 100 mL de TCA à 4 %. Une gamme d'étalons (Tableau 02) est ensuite constituée par dilution appropriée de cette solution, permettant de tracer une courbe absorbance/concentration en tyrosine (Figure 07).

Tableau 02 : Préparation de la gamme d'étalonnage de tyrosine.

Concentration de tyrosine ($\mu\text{g/ml}$)	0	20	40	60	80	100
Volume de tyrosine prélevé (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
TCA 4 %	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Na ₂ CO ₃ à 2% dans du NaOH 0,1N (ml)			2,5			
Agitation et incubation 10 min à 40 °C						
Réactif de Folin dilué 1/2 ème (ml)				0.25		
Mélanger de nouveau rapidement et énergiquement après chaque addition du réactif de Folin et laisser reposer à l'ombre pendant 30 min au minimum						

Figure 07 : Courbe d'étalonnage de la solution de tyrosine ($\mu\text{g/ml}$).

7.1.3. Dosage de l'activité protéolytique selon la méthode d'Anson (1938)

La manipulation s'effectue en deux étapes principales : la réaction enzymatique, suivie du dosage colorimétrique de la tyrosine libérée.

7.1.3.1. Réaction enzymatique

Cette étape consiste à appliquer l'extrait enzymatique sur un substrat protéique (caséine), dans un tampon citrate de sodium. Le mélange réactionnel est composé comme suit :

- 0,25 mL de l'extrait enzymatique (décongelé juste avant le test et dilué au 1/10e),
- 0,375 mL de tampon citrate de sodium 0,02 M (pH 5),
- 0,625 mL de solution de caséine à 2,5 % (préparée dans le même tampon).

Le mélange est agité doucement, puis incubé au bain-marie à 40 °C pendant 30 minutes. La réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout de 2,5 mL de TCA froid à 4 %, suivie d'un repos à température ambiante pendant 10 minutes. Le mélange est ensuite filtré à travers un papier Whatman n°1 pour éliminer les protéines non hydrolysées. Le filtrat contient les acides aminés libérés, principalement la tyrosine.

Le témoin (blanc) est préparé selon le même protocole, sauf que le TCA est ajouté avant le substrat, afin d'empêcher toute activité enzymatique.

7.1.3.2. Dosage colorimétrique de la tyrosine (Anson, 1938)

La concentration en tyrosine est estimée selon la réaction colorimétrique avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Le mélange pour le dosage se compose de :

- 0,5 mL du filtrat (produit de la réaction),
- 2,5 mL de Na_2CO_3 à 2 % dans NaOH 0,1 N,
- 0,25 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3.

Après chaque addition, le mélange est agité rapidement et vigoureusement. L'ensemble est ensuite laissé à l'abri de la lumière pendant au moins 30 minutes pour permettre le développement de la coloration bleue.

La lecture de l'absorbance est effectuée à 750 nm. La concentration en tyrosine est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec une gamme standard de tyrosine.

a) Définition de l'unité d'activité protéolytique :

Une unité de protéase (U.P.) est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine par mL d'extrait enzymatique et par minute, dans les conditions du test (Chimbekujwo et al., 2020).

Tous les dosages ont été effectués en double pour assurer la fiabilité des résultats.

7.2. Dosage de l'activité pectinolytique**7.2.1. Principe**

L'activité pectinolytique est déterminée selon la méthode colorimétrique de Miller (1959), adaptée à l'hydrolyse de la pectine. Cette méthode repose sur la capacité des enzymes pectinases à dégrader le substrat polysaccharidique, libérant ainsi des produits réducteurs tels que l'acide galacturonique, principal monomère de la pectine.

La quantité de produits formés est mesurée au moyen du réactif DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique), qui réagit spécifiquement avec les groupements réducteurs pour former un complexe coloré, détectable par spectrophotométrie.

La réaction enzymatique est stoppée après incubation, soit par chauffage, soit par ajout de réactif DNS, ce qui inactive l'enzyme et permet la mesure des produits formés uniquement pendant le temps de réaction.

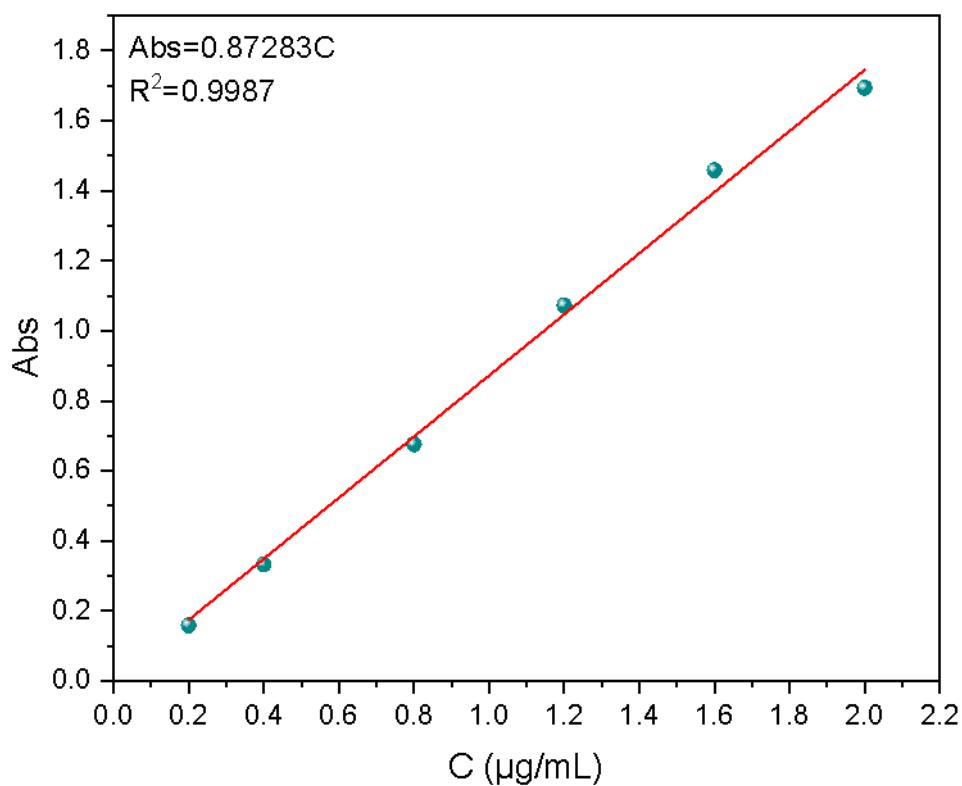
7.2.2. Courbe d'étalonnage à l'acide galacturonique

Une courbe d'étalonnage est établie en utilisant l'acide galacturonique comme standard (Figure 08). La solution mère est préparée en dissolvant 0,1 g d'acide galacturonique dans 50 mL d'eau distillée. Des dilutions successives sont ensuite réalisées afin d'obtenir une gamme étalon couvrant les concentrations attendues dans les échantillons à tester (Tableau 03).

Cette gamme sert de référence pour déterminer la concentration des produits réducteurs formés dans les échantillons d'extraits enzymatiques, à partir de l'absorbance mesurée à 540 nm après réaction avec le DNS.

Tableau 03 : Préparation de la gamme d'étalonnage d'acide galacturonique

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2
Solution acide galacturonique (ml)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	0
DNS (ml)	0,4						
Incubation à 100°C pendant 10minute après le refroidissement							
Eau distillée (ml)	4.4						
Agiter et lire les absorbances à 540 nm							

**Figure 08** : Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique ($\mu\text{g/ml}$).

7.2.3. Dosage de l'activité polygalacturonase

Le dosage de l'activité polygalacturonase repose sur la méthode colorimétrique utilisant le réactif DNS, qui permet d'estimer la concentration des sucres réducteurs libérés suite à l'hydrolyse

de la pectine. L'acide galacturonique, produit principal de cette hydrolyse, est utilisé comme standard de référence.

7.2.3.1. Protocole expérimental

Le mélange réactionnel est constitué comme suit :

- 100 µL de l'extrait enzymatique à tester (décongelé au moment de l'analyse),
- 100 µL de substrat : solution de pectine à 0,1% (m/v) préparée dans un tampon acétate de sodium (pH 5).

1. Le mélange est agité et incubé au bain-marie à 40 °C pendant 20 minutes.
2. À la fin de l'incubation, 400 µL de réactif DNS sont ajoutés pour stopper la réaction enzymatique.
3. Le mélange est ensuite chauffé à 100 °C pendant 15 minutes pour permettre le développement de la coloration.
4. Après refroidissement à température ambiante, 4,4 mL d'eau distillée sont ajoutés.
5. L'absorbance est mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

7.2.3.2. Détermination de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est exprimée en unités :

Une unité (U) de polygalacturonase est définie comme la quantité d'enzyme capable de libérer, en une minute, des sucres réducteurs équivalents à 1 mg d'acide galacturonique sous les conditions de l'essai.

La teneur en acide galacturonique est déterminée par interpolation sur la courbe d'étalonnage préalablement établie.

Toutes les analyses ont été effectuées en double pour garantir la fiabilité des résultats.

7.3. Dosage de l' α -Amylase

7.3.1. Principe

L'activité amylasique est déterminée selon la méthode de Bernfeld (1955), qui repose sur la quantification colorimétrique des sucres réducteurs (principalement le maltose) libérés lors de l'hydrolyse de l'amidon par l' α -amylase.

Le principe de la méthode est basé sur la réaction entre les oses réducteurs et le réactif DNSA (acide 3,5-dinitrosalicylique) en milieu alcalin et chauffé. Ce réactif jaune est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique, de couleur rouge orangé, proportionnelle à la concentration en sucres libérés.

L'intensité de la coloration est mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'activité enzymatique est exprimée en unités internationales (U/ml), une unité correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 µmole de maltose par minute et par ml d'extrait enzymatique dans les conditions de l'essai.

4.3.2. Courbe d'étalonnage de maltose

7.3.1.1. Préparation de la courbe d'étalonnage du maltose

Une courbe étalon est établi à partir d'une solution mère de maltose préparée en dissolvant 0,2 g de maltose dans 100 ml d'eau distillée. Des aliquotes de cette solution sont utilisées pour générer une gamme de concentrations, permettant de corrélérer l'absorbance mesurée à 540 nm à la quantité de maltose présente dans les échantillons.

Tableau 04 : Préparation de la gamme d'étalonnage de maltose.

Concentration µg/ml	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
Solution mère du maltose (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillée (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
DNSA (ml)	1	1	1	1	1	1
Agiter et incuber à 100c° pendant 10 min ; puis déplacer dans bain de glace						
Eau distillée (ml)	10 ml					
Agiter et Mesure l'absorbance à 540 nm						

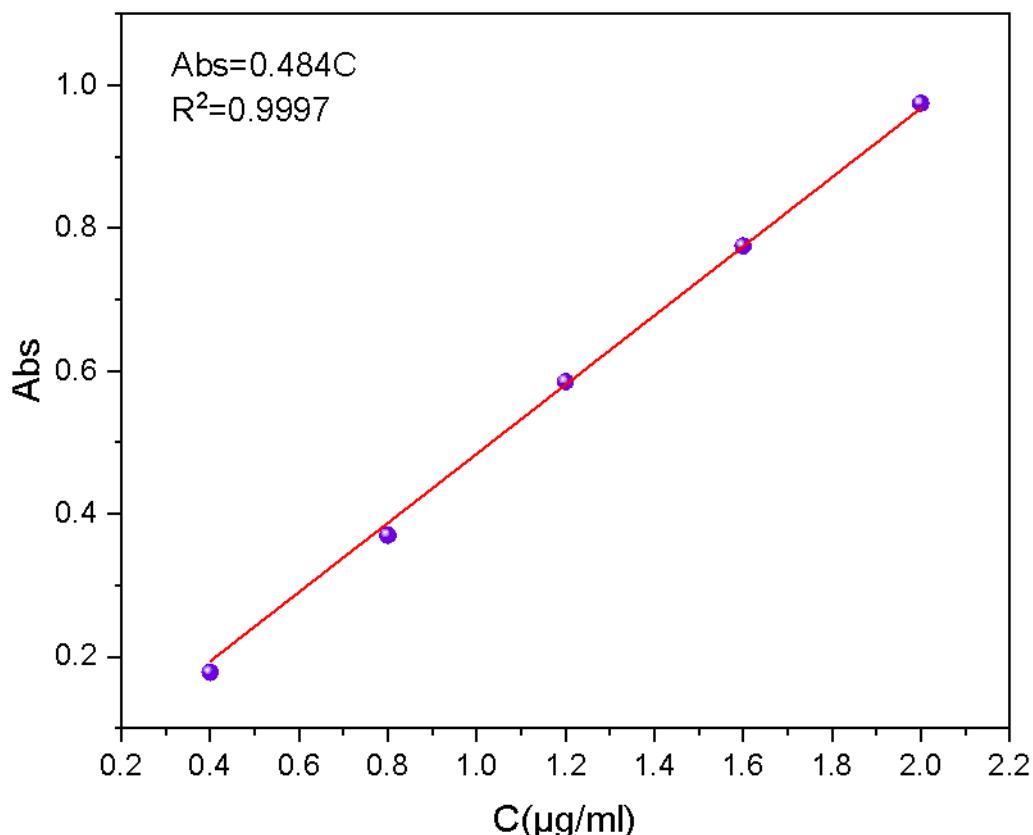


Figure 09 : Courbe d'étalonnage de la solution du maltose (µg/ml).

7.3.1.2. Mode opératoire du dosage de l' α -amylase (méthode de Bernfeld, 1955)

Le dosage repose sur l'hydrolyse de l'amidon par l' α -amylase, libérant des sucres réducteurs (notamment le maltose) qui réagissent avec le DNS (3,5-dinitrosalicylique) pour produire une coloration mesurable à 540 nm.

a) Préparation du mélange réactionnel

Le mélange enzymatique est préparé dans un tube à essai contenant :

- 0,5 mL d'extrait enzymatique (décongelé juste avant usage)
- 0,5 mL de solution d'amidon soluble à 1% (p/v), dissoute dans le tampon phosphate-citrate 0,1 M, pH 5

Le mélange est homogénéisé puis incubé au bain-marie à 40 °C pendant 30 minutes.

b) Arrêt de la réaction enzymatique

- Ajouter 1 mL de réactif DNS pour stopper l'action enzymatique.
- Agiter vigoureusement, puis placer le tube dans un bain-marie à 100 °C pendant 10 minutes pour développer la coloration.
- Après chauffage, refroidir immédiatement dans un bain de glace.

c) Lecture spectrophotométrique

- Ajouter 10 mL d'eau distillée au mélange.
- Homogénéiser puis mesurer l'absorbance à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

d) Calcul de l'activité enzymatique

La concentration en maltose libéré est déterminée par interpolation sur la courbe d'étalonnage du maltose (Figure 09).

Une unité enzymatique (U) est définie comme la quantité d'enzyme libérant 1 μ mol de maltose par minute et par millilitre d'extrait enzymatique, dans les conditions opératoires du test.

7.4. Dosage de l'activité cellulasique

Le dosage des enzymes cellulolytiques est réalisé selon la méthode de **Ghose (1987)** pour l'activité FPase (Filter Paper Activity) et celle de **Miller (1959)** pour l'endoglucanase (CMCase). Ces méthodes sont basées sur la mesure des sucres réducteurs libérés après hydrolyse enzymatique de substrats cellulosiques.

7.4.1. Activité FPase (Filter Paper Activity)**7.4.1.1. Principe :**

L'activité FPase reflète l'activité totale de la cellulase sur un substrat insoluble (papier filtre Whatman n°1). Elle évalue principalement l'action des exoglucanases. Les sucres réducteurs libérés sont dosés par la méthode colorimétrique au DNS.

7.4.1.2. Protocole expérimental :

- 0,5 ml d'extrait enzymatique
- 1 ml de tampon citrate de sodium 0,05 M (pH 5)
- 50 mg de papier filtre Whatman n°1 (coupé en petits morceaux ou plié)

-Le mélange est incubé à 50 °C pendant 60 minutes.

- La réaction est arrêtée par l'addition de 1,5 ml de réactif DNS, puis chauffée au bain-marie à 100 °C pendant 10 minutes.
- Après refroidissement dans un bain de glace, 0,5 ml du mélange est prélevé, dilué avec 1 ml d'eau distillée.
- L'absorbance est mesurée à 540 nm.

7.4.2. Activité endoglucanase (CMCase)**7.4.3. Principe :**

Cette méthode mesure l'activité des endoglucanases, capables d'hydrolyser les zones amorphes de la cellulose (carboxyméthylcellulose – CMC). Les sucres réducteurs sont quantifiés par la méthode au DNS (Miller, 1959).

7.4.3.1. Protocole expérimental :

- 500 µL de solution de CMC à 1% (préparée dans tampon citrate 0,05 M, pH 5)
- 500 µL d'extrait enzymatique dilué (dans le même tampon)
- Incubation à 50 °C pendant 30 minutes.
- La réaction est stoppée par l'ajout de 1 ml de réactif DNS.
- Le mélange est chauffé au bain-marie à 100 °C pendant 10 minutes, puis refroidi dans un bain de glace.
- 10 mL d'eau distillée sont ajoutés pour dilution.
- La lecture de l'absorbance est réalisée à 540 nm.

7.4.4. Définition de l'unité enzymatique (U) :

Une unité correspond à la quantité d'enzyme libérant 1 µmol de glucose par minute et par millilitre d'extrait enzymatique, à 50 °C et pH 5.

7.4.4.1. Courbe d'étalonnage du glucose**a) Préparation de la solution mère du glucose 1g/l :**

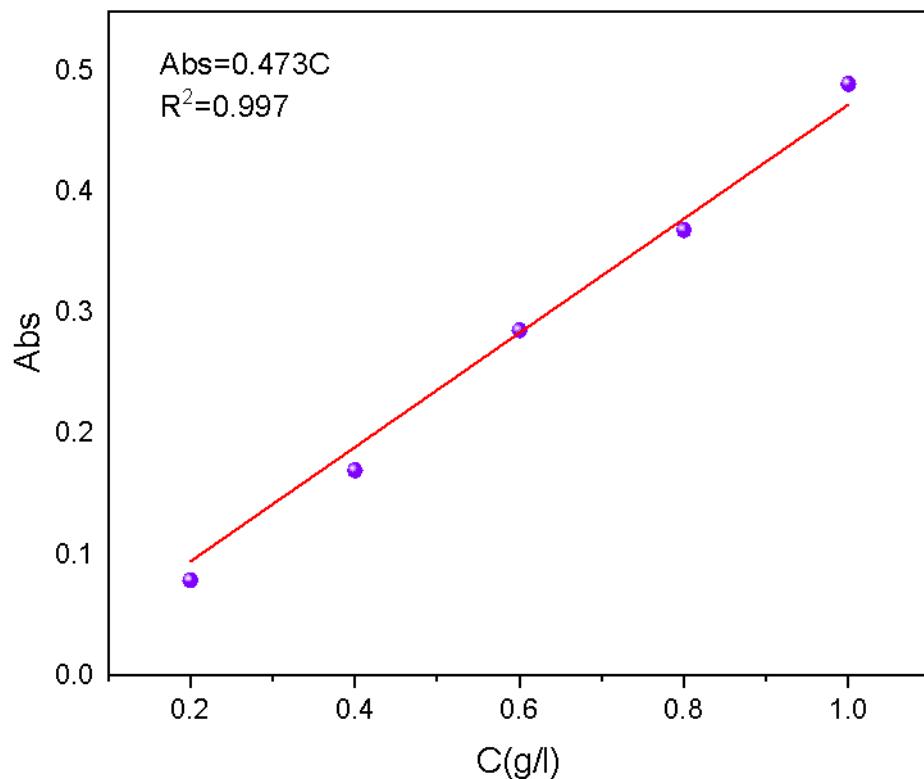
Peser 0,1 g de glucose Dissoudre dans 100 mL d'eau distillée.

b) Préparation de la gamme étalon:

Préparer une série de solutions de glucose par dilutions successives (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml) pour réaliser la courbe d'étalonnage.

Tableau 05 : Préparation de la gamme d'étalonnage de glucose.

Concentration g/l	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Solution mère du glucose (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillée (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
DNSA (ml)	1	1	1	1	1	1
Agiter et incuber à 100°C pendant 5 min ; puis déplacer dans bain de glace						
Eau distillée (ml)	10 ml					
Agiter et Mesure l'absorbance à 540 nm						

**Figure 10** : Courbe d'étalonnage de la solution du glucose (g/l).

8. Mise en évidence des activités enzymatiques

8.1. Test qualitatif de l'activité pectinolytique

L'activité pectinolytique est évaluée par un test qualitatif sur un milieu solide contenant la pectine comme unique source de carbone (milieu Pectine Agar). Après ensemencement, les boîtes de

Pétri sont incubées à 30 °C pendant 7 jours. À l'issue de cette période, les milieux sont inondés avec une solution de Lugol 1 pendant 15 minutes.

L'apparition d'un halo clair autour des colonies fongiques indique une dégradation enzymatique de la pectine, traduisant l'activité des pectinases produites par la souche testée.

Le rôle du KI dans Lugol 1 est de solubiliser l'iode dans l'eau en formant un complexe triiodure (I_3^-), assurant une meilleure réactivité dans les tests enzymatiques.

8.2. Activité amylolytique :

L'activité amylolytique est évaluée sur un milieu gélosé contenant 1 % d'amidon, servant de seule source de carbone. Après incubation à 30 °C pendant 7 jours, les boîtes de Pétri sont traitées avec la solution de Lugol 2, appliquée pendant 30 secondes, puis rapidement rincées à l'eau distillée.

8.2.1. Principe du test :

L'iode contenu dans la solution de Lugol 2 se lie à l'amidon non hydrolysé pour former un complexe bleu foncé. La présence d'un halo clair autour des colonies indique une dégradation enzymatique de l'amidon, révélant ainsi une activité amylasique.

8.3. Activité cellulolytique

L'activité cellulolytique est évaluée sur un milieu gélosé à base de carboxyméthylcellulose (CMC-agar) contenant 1 % de CMC, servant de substrat principal. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30 °C pendant 7 jours.

8.3.1. Principe du test :

Après incubation, les boîtes sont colorées avec une solution de Rouge Congo à 1 % pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, elles sont soigneusement lavées avec une solution de NaCl à 1 M pendant 1 heure. L'apparition de zones claires (halos) autour des colonies indique une dégradation enzymatique de la CMC, révélant la présence de cellulases extracellulaires.

8.4. Activité protéolytique

L'activité protéolytique est évaluée en milieu solide à l'aide d'une gélose au lait, qui permet de mettre en évidence la capacité des souches fongiques à hydrolyser les protéines, en particulier la caséine.

8.4.1. Principe du test :

La présence d'une zone claire et transparente autour de la colonie indique une hydrolyse de la caséine par des protéases extracellulaires. L'ensemencement est réalisé par touche centrale, et l'incubation se déroule à 30 °C pendant 5 à 7 jours.

9. Optimisation des paramètres influençant la production de l'alpha amylase**9.1. Étude de l'optimisation de la production de l'alpha-amylase**

Dans le but d'améliorer la production d'alpha-amylase par la souche fongique sélectionnée, une étude d'optimisation des paramètres physico-chimiques du milieu de culture a été entreprise. L'objectif principal était de déterminer les conditions les plus favorables à l'expression maximale de l'activité amylolytique.

Pour ce faire, un plan expérimental de type Box-Behnken a été appliqué, afin d'évaluer l'effet individuel et combiné de trois facteurs clés sur la production enzymatique : la source de carbone, la source d'azote, et la concentration en sel minéral (CaCl_2).

9.2. Optimisation de la production enzymatique selon le plan statistique Box-Behnken

L'optimisation de la production d'alpha-amylase a été réalisée à l'aide de la méthode des surfaces de réponse (RSM), en appliquant un plan expérimental de type Box-Behnken, reconnu pour sa simplicité de mise en œuvre et son efficacité dans l'établissement de modèles quadratiques (second degré).

Ce plan permet d'étudier l'effet de trois facteurs, chacun testé à trois niveaux codés : -1 (niveau bas), 0 (niveau moyen), et +1 (niveau haut). Les points expérimentaux sont répartis sur les faces du cube expérimental, à égale distance du centre du domaine d'étude, assurant ainsi une bonne couverture de l'espace expérimental.

Le plan Box-Behnken à trois facteurs comporte un total de 15 essais :

- 12 combinaisons correspondant aux milieux des arêtes du cube,
- 3 points centraux répétés (coordonnées 0,0,0), servant à estimer l'erreur expérimentale et à évaluer la reproductibilité du modèle.

Dans cette étude, le plan a été appliqué dans le but de maximiser la production d'alpha-amylase en fermentation submergée, en testant l'effet de trois variables indépendantes :

- Amidon (source de carbone),
- Extrait de levure (source d'azote organique),
- CaCl_2 (sel minéral).

Partie II

Matériels et méthodes

Tableau 06 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels

Codes	Variable	-1	0	+1
C1	Amidon (%)	1	5	9
C2	Extrait de levure (%)	0.1	0.3	0.5
C3	CaCl ₂ (g/l)	0.5	1	1.5

Le tableau 06 présente les valeurs réelles et codées des facteurs étudiés, tandis que le tableau 07 expose les 15 combinaisons expérimentales prévues dans le plan Box-Behnken.

Tableau 07 : Matrice expérimentale du plan Box-Behnken pour l'étude de trois variables en 15 essais

Essai	C1	C2	C3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

9.2.1. Analyse statistique de la matrice du plan de Box-Behnken

L'analyse statistique des données obtenues à partir du plan Box-Behnken a été réalisée à l'aide du logiciel *Minitab 22*, en ajustant un modèle polynomial de second ordre. La validité de ce modèle a été examinée au moyen de l'analyse de la variance (ANOVA), permettant d'évaluer la significativité globale du modèle ainsi que celle de chaque terme individuel (effets linéaires, interactions et termes quadratiques). Les coefficients de détermination (R^2 , R^2 ajusté et R^2 prédit) ont été utilisés comme indicateurs de la qualité de l'ajustement du modèle aux données expérimentales et de sa capacité prédictive. La réponse théorique Y , en fonction des variables étudiées, s'exprime selon l'équation (01) suivante

$$Y = \beta_0 + \beta_1 C_1 + \beta_2 C_2 + \beta_3 C_3 + \beta_{11} C_{12} + \beta_{22} C_{122} + \beta_{33} C_{32} + \beta_{12} C_1 C_2 + \beta_{13} C_1 C_3 + \beta_{23} C_2 C_3$$

Où :

Y : réponse mesurée (Activité enzymatique)

C_1, C_2, C_3 : variables codées (amidon, extrait de levure, CaCl_2)

β_0 : terme constant

β_i : effets linéaires

β_{ij} : effets d'interaction

β_{ii} : effets quadratiques

10. Optimisation par l'Intelligence artificiel

Afin de déterminer les valeurs optimales des facteurs pour maximiser le rendement, l'intelligence artificielle est utilisée en trois étapes essentielles : l'acquisition et la préparation des données, la modélisation et l'optimisation à l'aide de méthodes métahéuristiques.

10.1. Acquisition et préparation des données

10.1.1. Diagnostic de l'ensemble de données

Cette phase constitue le point de départ essentiel de toute analyse de données. Elle permet de comprendre la nature et la qualité des informations disponibles avant d'entamer les traitements plus avancés.

- **Évaluation de la structure** : Analyse de la forme et des dimensions de l'ensemble de données pour déterminer le volume d'informations disponible

- **Analyse des corrélations** : Calcul des coefficients de corrélation entre les variables explicatives et la variable cible pour identifier les relations linéaires et hiérarchiser l'importance des facteurs

10.1.2. Fractionnement et prétraitement des données

Le prétraitement des données représente une étape cruciale qui conditionne la qualité et la fiabilité des résultats obtenus. Une préparation adéquate garantit l'efficacité des algorithmes d'apprentissage et la validité de l'évaluation.

- **Division stratégique et répartition standard** : Séparation de l'ensemble de données selon le principe de fractionnement apprentissage-test pour éviter le surapprentissage, avec application du ratio 80/20 qui constitue un compromis optimal entre la quantité de données d'entraînement et la robustesse de l'évaluation
- **Validation de la taille** : Vérification que les sous-ensembles créés sont suffisamment représentatifs et appropriés pour l'analyse prévue

Cette étape fondamentale permet d'établir les bases méthodologiques nécessaires à une analyse rigoureuse, en s'assurant que les données sont correctement structurées et prêtes pour les phases suivantes de modélisation et d'évaluation.

10.2. La modélisation :

La modélisation par apprentissage machine consiste à construire des modèles capables d'apprendre automatiquement à partir de données afin de prédire ou de prendre des décisions. Cette démarche passe généralement par trois types d'apprentissage : supervisé, non supervisé, et par renforcement. Le choix du modèle dépend de la nature des données et des objectifs visés. Les modèles les plus utilisés incluent les arbres de décision, les SVM, et les réseaux de neurones. Une fois le modèle entraîné, ses performances sont évaluées à l'aide de métriques adaptées à la tâche.

Parmi les différentes approches d'apprentissage supervisé, les modèles de régression occupent une place essentielle lorsqu'il s'agit de prédire des valeurs numériques continues.

10.2.1. Modèles de régression

Afin de prédire ou d'expliquer la variable cible à partir des variables explicatives, plusieurs techniques de modélisation ont été mises en œuvre. Ces modèles couvrent à la fois des approches linéaires et non linéaires, permettant une comparaison de performance et une meilleure compréhension du comportement des données.

10.2.1.1. Régression linéaire

La régression linéaire est le modèle de base. Elle établit une relation linéaire entre les variables indépendantes et la variable dépendante. L'équation générale s'écrit sous la forme :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \cdots + \beta_n X_n + \varepsilon$$

Ce modèle est simple à interpréter, mais il peut échouer à capturer des relations complexes dans les données.

10.2.1.2. Régression Ridge (Ridge Régression)

La Régression Ridge est une variante régularisée de la régression linéaire, qui ajoute une pénalité sur la taille des coefficients pour limiter le sur-apprentissage (overfitting). Elle est particulièrement utile lorsque les variables explicatives présentent une multi-co-linéarité. La fonction coût minimisée est :

$$\text{Min} \left(\sum (y_i - \hat{y}_i)^2 + \lambda \sum \beta_j^2 \right)$$

Où λ est le paramètre de régularisation.

10.2.1.3. Régression quadratique (PolynomialFeatures)

Ce modèle consiste à étendre la régression linéaire en incluant des puissances (polynômes) des variables. Il permet de modéliser des relations non linéaires tout en gardant une base de régression linéaire.

Par exemple, pour une variable X , le modèle quadratique prendra la forme :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \varepsilon$$

Cette approche augmente la complexité du modèle tout en gardant une forme paramétrique.

10.2.1.4. Régression par Forêt Aléatoire (Random Forest Regressor)

La forêt aléatoire est un modèle d'ensemble basé sur une multitude d'arbres de décision. Elle est capable de capturer des relations complexes et non linéaires entre les variables. Ce modèle est robuste au bruit et à l'overfitting, surtout lorsque le nombre d'arbres est suffisant. Avantages : importance des variables, gestion des valeurs manquantes, et haute précision prédictive.

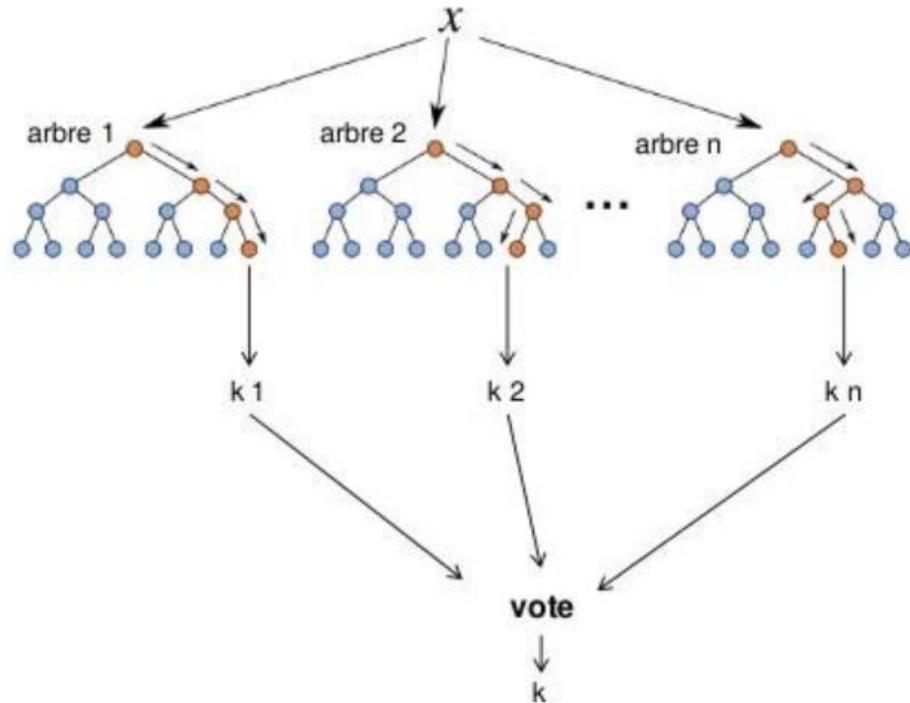


Figure 11 : Régression par Forêt Aléatoire

10.2.1.5. Régression XGBoost (Extreme Gradient Boosting)

XGBoost est un algorithme de boosting performant qui construit les arbres séquentiellement pour corriger les erreurs des arbres précédents. Il offre une grande flexibilité, gère les interactions complexes entre les variables, et est souvent utilisé dans les compétitions de science des données pour sa précision et sa rapidité. Il inclut des mécanismes de régularisation avancés pour éviter l'overfitting.

A la différence des forêts randomisées où des arbres sont créés aléatoirement, le modèle Gradient Boosting Model (GBM) crée un nouvel arbre en fonction du précédent. Ce nouvel arbre est créé de manière à diminuer l'erreur de prédiction. De manière générale, les modèles GBM ont une meilleure performance que les forêts randomisées.

10.2.2. Mesures de performance

L'évaluation de la performance des modèles de régression repose sur plusieurs métriques statistiques. Ces indicateurs permettent d'estimer la capacité du modèle à reproduire ou prédire les données réelles, tout en comparant objectivement différents algorithmes.

10.2.2.1. Coefficient de détermination (R^2)

Le R^2 , ou coefficient de détermination, mesure la proportion de la variance de la variable cible expliquée par les variables explicatives du modèle. Sa valeur est comprise entre 0 et 1 :

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$$

- $R^2 = 1$: prédiction parfaite.
- $R^2 = 0$: le modèle n'explique aucune variabilité.

Il donne une première idée de la qualité d'ajustement du modèle.

10.2.2.2. Erreur quadratique moyenne (RMSE)

Le Root Mean Squared Error (RMSE) est la racine carrée de l'erreur quadratique moyenne. Elle exprime l'écart type des résidus de la prédiction :

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}$$

- Plus la valeur est faible, meilleure est la performance.
- Elle est sensible aux grandes erreurs, donc utile pour détecter les écarts importants.

10.2.2.3. Erreur absolue moyenne (MAE)

La Mean Absolute Error (MAE) correspond à la moyenne des valeurs absolues des erreurs entre les valeurs observées et les valeurs prédites :

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i - \hat{y}_i|$$

- Moins sensible aux valeurs aberrantes que le RMSE.
- Interprétable directement dans les mêmes unités que la variable cible.

10.2.2.4. Erreur quadratique moyenne (MSE)

La Mean Squared Error (MSE) est la moyenne des carrés des erreurs :

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

- Utilisée pour la rétropropagation dans l'apprentissage automatique.
- Donne plus de poids aux grandes erreurs (comme le RMSE mais sans racine).

10.3. Optimization par Métaheuristiques (Metaheuristic Optimization)

Les métaheuristiques sont des algorithmes d'optimisation inspirés de phénomènes naturels, biologiques ou sociaux. Contrairement aux méthodes classiques (comme les gradients ou l'algèbre linéaire), elles n'exigent pas de dérivabilité de la fonction à optimiser et sont capables d'explorer des espaces de recherche complexes, vastes et non convexes. Elles sont particulièrement utiles pour les problèmes multi-paramètres, non linéaires, ou combinatoires, où les méthodes traditionnelles échouent à trouver l'optimum global.

Principales familles de métaheuristiques utilisées sont : Particle Swarm Optimization (PSO), Genetic Algorithms (GA), Simulated Annealing (SA), ...

10.3.1. Optimisation par essaimage de particules (PSO) :

L'Optimisation par Essaim Particulaire (PSO) est une méta-heuristique d'optimisation inspirée du comportement social des essaims d'oiseaux et des bancs de poissons. Proposée par Kennedy et Eberhart en 1995, cette méthode repose sur la dynamique collective d'un groupe d'agents appelés particules, évoluant dans un espace de recherche pour trouver une solution optimale à un problème donné.

Chaque particule représente une solution candidate. Elle se déplace dans l'espace de recherche en ajustant sa position et sa vitesse, influencée à la fois par sa propre meilleure solution rencontrée (appelée position personnelle optimale, ou pbest) et par la meilleure solution trouvée par l'ensemble de l'essaim (appelée position globale optimale, ou gbest). Ce mécanisme de collaboration permet à l'essaim d'explorer efficacement l'espace des solutions tout en convergeant vers des zones prometteuses.

10.3.2. Variantes du PSO : introduction du facteur d'inertie

Afin d'améliorer les performances du PSO d'origine, plusieurs variantes ont été proposées. L'une des plus influentes est le PSO avec facteur d'inertie (Inertia Weight PSO), qui introduit un paramètre supplémentaire dans la mise à jour de la vitesse des particules. Le facteur d'inertie contrôle l'équilibre entre exploration (recherche de nouvelles zones) et exploitation (affinement autour des bonnes solutions déjà trouvées). L'équation de mise à jour de la vitesse devient alors:

$$v_i(t+1) = w \cdot v_i(t) + c1 \cdot r1 \cdot (pbest_i - x_i(t)) + c2 \cdot r2 \cdot (gbest - x_i(t))$$

où :

- $v_i(t)$ est la vitesse de la particule i à l'instant t ,
- w est le facteur d'inertie, souvent décroissant au fil des itérations,
- $c1$ et $c2$ sont les coefficients d'accélération (personnel et social),
- $r1$ et $r2$ sont des variables aléatoires uniformes entre 0 et 1,
- $x_i(t)$ est la position actuelle de la particule.
- $pbest_i$: Meilleure position personnelle de la particule i
- $gbest$: Meilleure position globale de tout l'essaim
- $(pbest_i - X_i(t))$ = Composante cognitive
- $(gbest - X_i(t))$ = Composante sociale

Valeurs typiques :

- $w > 1$: Comportement divergent (exploration excessive)
- $0.8 \leq w < 1$: Bon équilibre exploration/exploitation
- $w < 0.4$: Convergence rapide mais risque de minimum local

10.3.2.1. Algorithme détaillé

Initialisation
$t = 0$
$w_{max} = 0.9$ (valeur initiale)
$w_{min} = 0.4$ (valeur finale)
t_{max} = nombre maximum d'itérations
N = nombre de particules

$\mu = 0,1$ = force de mutation (perturbation de 10 %)

POUR chaque particule $i = 1$ à N :

Initialiser $x_i(0)$ aléatoirement dans l'espace de recherche

Initialiser $v_i(0)$ aléatoirement (généralement proche de zéro)

$pbest_i = x_i(0)$

Évaluer $f(x_i(0))$

FIN POUR

$gbest =$ meilleure position parmi toutes les $pbest_i$

Recherche

TANT QUE (critère d'arrêt non atteint) :

POUR chaque particule $i = 1$ à N :

// Mise à jour de la vitesse

$v_i(t+1) = w \times v_i(t) + c_1 \times r_1 \times (pbest_i - x_i(t)) + c_2 \times r_2 \times (gbest - x_i(t))$

// Mise à jour de la position avec vérification des contraints

$x_i(t+1) = \text{clip}(x_i(t) + v_i(t+1))$

// Amélioration par diversité

Appliquée à 50 % des particules initiales sélectionnées au hasard

POUR chaque particule $j = 1$ à 3 :

$x_{ij}(0) = x_{ij}(0) + \text{rand}(-1,1) \times \mu \times (x_{\max,j} - x_{\min,j})$

FIN POUR

// Évaluation de la nouvelle position

Évaluer $f(x_i(t+1))$

// Mise à jour de la meilleure position personnelle

SI $f(x_i(t+1)) < f(pbest_i)$:

$pbest_i = x_i(t+1)$

FIN SI

FIN POUR

// Mise à jour de la meilleure position globale

SI $\min(f(pbest_i)) < f(gbest)$:

$gbest = \text{argmin}(f(pbest_i))$

FIN SI

// Mise à jour du coefficient d'inertie

$w(t) = w_{\max} - (w_{\max} - w_{\min}) \times t/t_{\max}$

$t = t + 1$

FIN TANT QUE

Résultat

RETOURNER $gbest$ (solution optimale trouvée)

10.3.2.2. Avantages de l'algorithme PSO

1. **Simplicité d'implémentation** : Peu de paramètres à ajuster
2. **Convergence rapide** : Particulièrement efficace sur les problèmes continus
3. **Robustesse** : Résistant aux minima locaux grâce à l'aspect social
4. **Parallélisation** : Facilement adaptable au calcul parallèle
5. **Flexibilité** : Applicable à une large gamme de problèmes d'optimisation

10.3.2.3. Applications typiques

- Optimisation de fonctions mathématiques complexes
- Réglage de paramètres dans l'apprentissage automatique
- Optimisation de réseaux de neurones
- Problèmes d'ordonnancement et de planification
- Optimisation de formes et de structures en ingénierie

10.3.3. Méthodologie

L'algorithme PSO optimise la fonction :

Objectif: Maximiser $f(C1, C2, C3) = \text{ML_Model.predict}([C1, C2, C3])$

Sous réserve de : $C1, C2, C3 \in [-1, +1]$

Utilisation : 30 particules sur 60 itérations avec un poids d'inertie adaptatif

Taille de la population (N) = 30 particules

Itérations maximales (T_max) = 60

Paramètre cognitif (c1) = 1,5

Paramètre social (c2) = 1,5

Poids d'inertie initial (w_max) = 0,9

Poids d'inertie final (w_min) = 0,4

Limites de l'espace de recherche :

$C1 \in [-1, +1]$

$C2 \in [-1, +1]$

$C3 \in [-1, +1]$

Critères de convergence : Arrêter lorsque : $t \geq T_{\text{max}} = 60$ itérations

10.3.3.1. Représentation des particules

Vecteur de position : $X_i(t) = [x_{i1}(t), x_{i2}(t), x_{i3}(t)]$

Où :

- $X_i(t)$ = Position de la particule i à l'itération t
- $x_{i1}(t)$ = Valeur du paramètre C1 pour la particule i
- $x_{i2}(t)$ = Valeur du paramètre C2 pour la particule i
- $x_{i3}(t)$ = Valeur du paramètre C3 pour la particule i
- t = Numéro de l'itération en cours

10.3.3.2. Equation d'aptitude**Fonction d'aptitude primaire**

$f(X_i) = \text{Model.predict}([x_{i1}, x_{i2}, x_{i3}])$

Où :

- $f(X_i)$ = Aptitude de la particule i
- $\text{Model.predict}()$ = Modèle d'apprentissage automatique pré-entraîné
- $[x_{i1}, x_{i2}, x_{i3}]$ = Paramètres d'entrée $[C1, C2, C3]$

Aptitude avec pénalité

$f(X_i) = \{ \text{Model.predict}(X_i) \text{ si l'évaluation est réussie}$

$-1 \times 10^6 \text{ si l'évaluation échoue} \}$

10.3.3.3. Initialisation des particules

Initialisation de la position

$$X_{ij}(0) = x_{\min,j} + \text{rand}(0,1) \times (x_{\max,j} - x_{\min,j})$$

Où :

- $x_{ij}(0)$ = Position initiale de la particule i dans la dimension j
- $x_{\min,j}$ = Limite inférieure pour la dimension $j = -1$
- $x_{\max,j}$ = Limite supérieure pour la dimension $j = +1$
- $\text{rand}(0,1)$ = Nombre aléatoire entre 0 et 1

Initialisation de la vitesse

$$V_{ij}(0) = \text{rand}(-1,1) \times 0,1 \times (x_{\max,j} - x_{\min,j})$$

Où :

- $v_{ij}(0)$ = Vitesse initiale de la particule i dans la dimension j
- $\text{rand}(-1,1)$ = Nombre aléatoire entre -1 et 1
- 0,1 = Facteur d'échelle de la vitesse (10 % de la plage de recherche)

Partie III

Résultats et discussions

Résultats et discussions

1. Éude du patrimoine enzymatique chez *Aspergillus oryzae*

Les potentialités enzymatiques d'*Aspergillus oryzae* ont été explorées à l'aide de tests spécifiques réalisés sur milieux solides. Cette approche a permis de mettre en évidence la production de ses principales enzymes extracellulaires, notamment la pectinase, l' α -amylase, la cellulase et la protéase.

1.1. Mise en évidence de l'activité pectinolytique

L'activité pectinolytique d'*Aspergillus oryzae* a été mise en évidence sur un milieu solide contenant de la pectine comme unique source de carbone. La croissance active de la moisissure sur ce milieu reflète sa capacité à dégrader la pectine, indiquant ainsi la production d'enzymes pectinolytique. La présence d'une zone claire d'hydrolyse autour de la colonie (figure 12) confirme la dégradation de la pectine par les pectinases produites.

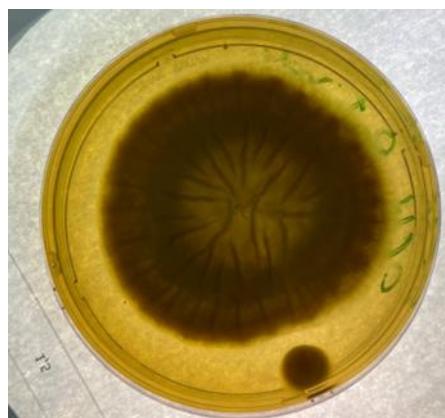


Figure 12 : Mise en évidence de l'activité hydrolytique pectinolytique extracellulaire chez la moisissure *Aspergillus oryzae*

Adeleke et al. (2012) ont évalué le potentiel de production de pectinase par *Aspergillus oryzae* en utilisant des pelures d'orange comme substrat dans un système de fermentation en phase solide (SSF). Leur étude a révélé une production optimale de polygalacturonase (un type de pectinase) au cinquième jour d'incubation, à un pH de 5,5, une température de 35 °C, et avec 0,2 % de persulfate d'ammonium comme source d'azote.

Par ailleurs, Duque Jaramillo et al. (2016) ont caractérisé une pectinase (PEC-I) isolée d'*Aspergillus oryzae* cultivé sur pulpe de fruit de la passion comme source de carbone. Ils ont montré que cette enzyme présentait une activité optimale à 50 °C et pH 7,0, avec une stabilité thermique

remarquable à 50 °C (demi-vie d'environ 8 heures). L'enzyme a également montré une activité accrue à pH 4,5 et à des températures de 55, 70 et 75 °C.

1.2. Mise en évidence de l'activité amylolytique

L'activité amylolytique d'*Aspergillus oryzae* a été révélée à l'aide d'un milieu solide contenant uniquement de l'amidon comme source d'énergie. L'ajout d'iode permet de détecter l'amidon non hydrolysé par une coloration bleu foncé. Ainsi, l'apparition d'un halo clair autour de la colonie (Figure 13) indique la dégradation de l'amidon, confirmant la production d'α-amylase par la souche testée.



Figure 13 : Mise en évidence de l'activité amylolytique extracellulaire chez la moisissure *Aspergillus oryzae*

Balakrishnan et al. (2021) ont mis en évidence le fort potentiel d'*Aspergillus oryzae* pour la production d'alpha-amylase, en optimisant le procédé par fermentation en phase solide (SSF). Leur étude a souligné l'intérêt de substrats à faible coût, notamment les tourteaux d'oléagineux comestibles tels que les tourteaux d'arachide, de coco et de sésame. L'utilisation de ces résidus agro-industriel, riches en nutriments, contribue non seulement à réduire les coûts de production, mais aussi à valoriser des déchets solides organiques.

De leur côté, Shah et al. (2014) ont optimisé la production d'α-amylase en utilisant la technologie de fermentation submergée (SmF). Ils ont obtenu une production maximale après 72 heures d'incubation à 45 °C, à un pH initial de 7, avec un inoculum de cinq disques de 8 mm de culture d'*A. oryzae*. Le substrat utilisé était constitué d'eaux usées riches en amidon issues d'une usine agroalimentaire, démontrant ainsi l'intérêt de valoriser des effluents industriels pour la production enzymatique.

1.3. Activité cellulolytique

La production de cellulase par *Aspergillus oryzae* a été évaluée sur un milieu sélectif contenant de la carboxyméthylcellulose (CMC) comme substrat. L'ajout de Rouge Congo à 1 % permet, après lavage au NaCl, de visualiser une zone claire autour de la colonie (Figure 14), révélatrice de l'activité

enzymatique. Cette décoloration indique la dégradation du substrat par les cellulases sécrétées, attestant de la capacité cellulolytique de la souche.



Figure 14 : Mise en évidence de l'activité cellulolytique extracellulaire chez la moisissure *Aspergillus oryzae*

Youssef (2011) a conduit des études physiologiques sur le complexe enzymatique cellulosique d'*Aspergillus oryzae*, en particulier sur la carboxyméthyl cellulase. L'objectif était d'optimiser la production des différentes activités cellulolytiques (endoglucanase, exoglucanase et cellulase globale, mesurée par l'activité FPA) en utilisant le lactosérum de fromage (cheese whey), un substrat soluble, abondant et économique. Les résultats ont mis en évidence l'efficacité d'*A. oryzae* comme producteur de cellulases.

Par ailleurs, Fadel et al. (2020) ont étudié la production de cellulase par la souche *Aspergillus oryzae* F-923, cultivée sur son de blé en fermentation en phase solide (SSF). Parmi vingt-cinq isolats fongiques locaux testés, *A. oryzae* F-923 s'est révélé le plus performant pour la production de cellulase, mais aussi d'alpha-amylase et de glucoamylase. Les conditions optimales déterminées pour la production de cellulase incluent un ratio humidité-substrat de 1:2 (p/v), un pH initial de 5,5, une température d'incubation de 28 °C pendant 72 heures. L'ajout de xylose à 10 % (p/p) en tant que source de carbone a significativement amélioré la production enzymatique, de même que le sulfate d'ammonium comme source d'azote. L'utilisation du son de blé, substrat à faible coût, illustre une approche durable et économiquement viable pour la production industrielle de cellulases par *A. oryzae*.

1.4. Activité protéolytique

L'activité protéolytique d'*Aspergillus oryzae* a été évaluée sur un milieu solide enrichi en protéines de lait. La formation d'un halo transparent autour de la colonie (Figure 15) témoigne de la dégradation des protéines par les exoprotéases sécrétées. La taille de cette zone d'hydrolyse est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme produite.



Figure 15 : Mise en évidence de l'activité protéolitique extracellulaire chez la moisissure *Aspergillus oryzae*

Zhao et al. (2018) ont mené des recherches approfondies démontrant le fort potentiel d'*A. oryzae* pour la production de protéases. Ils ont mis en évidence l'efficacité de la fermentation en phase solide (SSF), utilisant de la farine de soja dégraissée et du son de blé comme substrats, pour stimuler la production enzymatique. Ces résultats soulignent l'intérêt de cette souche pour des applications industrielles dans le domaine des enzymes.

De leur côté, Castro et al. (2014) ont également étudié la production de protéases par *Aspergillus oryzae* LBA 01 en SSF. Ils ont montré que certains substrats agro-industriels, tels que le son de blé, la farine de soja et la farine de graines de coton, favorisent significativement la synthèse enzymatique. Les propriétés physiques de ces substrats, notamment leur fort pouvoir d'absorption d'eau et leur granulométrie hétérogène, ont été identifiées comme des facteurs déterminants.

En conclusion, ces résultats confirment la grande polyvalence enzymatique d'*Aspergillus oryzae*, capable de produire différentes enzymes extracellulaires sur des substrats agro-industriels bon marché en fait un candidat de choix pour les applications biotechnologiques et industrielles.

2. Évaluation Comparative de la Production d'Enzymes (Amylase, Cellulase, Pectinase et Protéase) par *Aspergillus oryzae* sur Déchets d'Orange en Fermentation Submergée et Solide.

2.1. Activité amylasique d'*Aspergillus oryzae* cultivé sur des déchets d'orange : comparaison entre fermentation submergée et fermentation en milieu solide

L'évaluation de l'activité amylasique produite par *Aspergillus oryzae*, cultivé sur des déchets d'orange utilisés comme substrat carboné, a révélé des différences notables selon le mode de culture employé. En fermentation submergée (SmF), l'activité enzymatique mesurée atteint 1,70 U/mL, tandis qu'en fermentation en milieu solide (SSF), elle s'élève à 1,158 U/mL, soit 42,92 U/g de matière sèche.

Ces résultats suggèrent que, dans les conditions expérimentales appliquées, la SmF permet une production légèrement supérieure d' α -amylase par rapport à la SSF. Cette différence pourrait être attribuée à une meilleure diffusion des nutriments et à une oxygénation plus homogène dans le milieu liquide, facilitant la croissance fongique et la sécrétion enzymatique.

Le choix des déchets d'orange comme substrat s'inscrit dans une approche de valorisation des coproduits agroalimentaires, visant à réduire les coûts de production tout en diminuant l'impact environnemental. Riches en polysaccharides complexes (Gervasi et al. 2024), ces déchets stimulent la production d'amylases sans induire de répression catabolique rapide, ce qui en fait un substrat adapté à la production enzymatique.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés par (Braia et al., 2021), qui ont démontré l'efficacité de la fermentation submergée pour la production d' α -amylase à partir de résidus riches en amidon. Grâce à une optimisation des conditions de culture par approche statistique, ces auteurs ont atteint un rendement maximal de 14 076 U/L.

Bien que la SmF ait montré de meilleures performances en termes de rendement enzymatique dans notre étude, la fermentation en milieu solide demeure une alternative intéressante, notamment pour des applications industrielles à faible coût et dans les régions où les infrastructures technologiques sont limitées. (Balakrishnan et al., 2021) ont, par exemple, obtenu jusqu'à 10 994,74 U/gds d' α -amylase en SSF à l'échelle pilote, en utilisant des tourteaux oléagineux comme substrat et après une optimisation rigoureuse de paramètres tels que le pH, la température et le temps d'incubation.

La nature du substrat joue néanmoins un rôle déterminant. Les déchets d'orange utilisés dans notre étude, bien que riches en polysaccharides, présentent un profil nutritionnel différent de celui des tourteaux oléagineux, notamment en termes de teneur en azote, d'acidité naturelle, de fibres et de

présence éventuelle d'inhibiteurs. Cette différence pourrait expliquer la production enzymatique légèrement plus faible observée en SSF.

Ce constat rejoint les observations de (Melnichuk *et al.*, 2020), qui ont atteint des niveaux d'activité amylasique très élevés (jusqu'à 47 000 U/g de substrat sec) en SSF à partir d'écorces de soja et de résidus de minoterie. Leur étude, fondée sur une optimisation rigoureuse des conditions de culture (temps d'incubation, granulométrie du substrat, composition du milieu), montre qu'il est possible d'obtenir d'excellents rendements même en fermentation solide, à condition d'adapter le substrat et les paramètres opératoires.

Dans notre cas, l'activité enzymatique plus faible en SSF pourrait donc s'expliquer par l'utilisation exclusive des déchets d'orange, moins riches en azote et amidon que les résidus mixtes utilisés dans les études de référence. Toutefois, leur accessibilité, leur faible coût et leur abondance dans certaines régions en font une ressource intéressante pour une production locale, durable et économiquement viable d'enzymes.

L'efficacité accrue de la fermentation submergée observée dans cette étude pourrait être liée à une meilleure solubilisation des nutriments, à une aération optimisée et à un contrôle précis des paramètres tels que le pH et la température tout au long du processus fermentaire. Ces conditions favorisent une croissance fongique plus homogène et une sécrétion enzymatique plus efficace.

Cependant, la fermentation solide présente plusieurs avantages, notamment un coût d'infrastructure réduit, une consommation d'eau plus faible, et une meilleure adaptation aux substrats peu solubles ou fibreux. De plus, comme l'ont montré (Melnichuk *et al.*, 2020), la SSF est facilement extensible à l'échelle industrielle par simple multiplication des unités de culture (plateaux), ce qui la rend adaptée aux contextes à ressources limitées.

En comparant nos résultats à ceux de (Ousaadi *et al.*, 2021), qui ont obtenu une activité de 12,62 U/mL en SmF avec *Streptomyces sp* cultivé sur des déchets d'orange, on constate que le choix du microorganisme et l'optimisation du milieu de culture influencent fortement le rendement enzymatique. Contrairement à leur étude, notre travail n'a pas encore intégré d'optimisation statistique (type RSM), ce qui laisse entrevoir d'importantes marges d'amélioration.

2.2. Activité cellulasique d'*Aspergillus oryzae* selon le mode de fermentation

Les résultats de cette étude mettent en évidence une différence significative dans la production de cellulase par *Aspergillus oryzae* selon le type de fermentation utilisé. L'activité enzymatique mesurée par le test FPase (Filter Paper Assay) atteint 1,6 U/mL en fermentation en milieu solide (SSF), contre seulement 0,712 U/mL en fermentation submergée (SmF). Cette observation souligne

l'efficacité supérieure de la SSF pour la production de cellulases, en particulier lorsque des substrats lignocellulosiques tels que les déchets d'orange sont employés.

La fermentation solide reproduit davantage les conditions naturelles de développement des champignons filamenteux, ce qui favorise leur activité enzymatique. Le substrat utilisé — les déchets d'orange — présente une structure fibreuse propice à l'ancrage du mycélium et à la dégradation progressive des polymères cellulosiques. Ces conditions semblent stimuler spécifiquement la production d'exoglucanases (FPase), enzymes responsables de l'hydrolyse des régions cristallines de la cellulose.

Cependant, il est à noter qu'aucune activité CMC-ase (carboxyméthyl-cellulase, une endoglucanase) n'a été détectée. Cela suggère que dans les conditions testées (substrat à base d'orange et milieux SmF/SSF), *A. oryzae* exprime préférentiellement des enzymes ciblant les structures ordonnées de la cellulose, sans intervenir sur les régions amorphes. Ce profil enzymatique partiel peut constituer un facteur limitant dans une optique de saccharification complète de la biomasse, notamment dans les applications industrielles.

Ce comportement contraste avec celui observé chez d'autres souches fongiques, telles que *Penicillium citrinum*, étudiée par (Kumar et al.2020). Dans leur travail, une production équilibrée de FPase et de CMC-ase a été obtenue en SSF en utilisant du lactose, de la peptone et un pH de 6,0, atteignant 4,08 U/mL de FPase et conduisant à une saccharification efficace. Ces résultats soulignent l'importance d'une optimisation ciblée des conditions de culture, voire du choix ou de la modification des souches fongiques, pour obtenir une gamme complète d'enzymes cellulolytiques.

D'un point de vue biotechnologique, bien que l'absence d'activité CMC-ase limite l'hydrolyse complète de la cellulose, l'activité FPase détectée reste précieuse, notamment pour des étapes de préhydrolyse ou comme complément dans des formulations enzymatiques mixtes. L'utilisation des déchets d'orange constitue en outre un choix pertinent dans une démarche de valorisation des coproduits agroalimentaires, bien qu'un enrichissement du substrat (par prétraitement ou co-substrats) puisse s'avérer nécessaire pour optimiser l'induction enzymatique.

Ce constat est en accord avec les observations de (Boondaeng *et al.*, 2024), qui ont souligné l'avantage de la fermentation solide pour la production d'enzymes grâce à des conditions plus proches du milieu naturel des champignons. En SSF, la faible teneur en eau, la concentration accrue en nutriments et la meilleure accessibilité du substrat favorisent une production enzymatique plus élevée. Les déchets d'orange, riches en fibres et en sucres résiduels, ont vraisemblablement permis une bonne croissance mycélienne dans notre étude.

Un point limitant notable reste toutefois l'absence d'activité détectée sur la CMC, confirmant que seule l'activité exoglucanase (FPase) a été induite. Ainsi, seule la fraction cristalline de la cellulose est hydrolysée, sans action sur les structures amorphes, ce qui réduit l'efficacité globale du système enzymatique pour la conversion complète de la biomasse.

Cette spécificité enzymatique diffère des résultats obtenus par (Boondaeng *et al.*, 2024), avec la souche *Aspergillus sp.* IN5, qui a présenté des niveaux significatifs d'activités cellulo lytiques complémentaires : FPase (0,26 U/g), CMCase (3,32 U/g) et β -glucosidase (196,09 U/g), lors d'une fermentation solide optimisée sur résidus de soja. Ces résultats montrent que le profil enzymatique dépend à la fois de la souche utilisée et de la composition du substrat. Dans notre cas, la faible induction des endoglucanases pourrait être liée à la composition spécifique des déchets d'orange ou à une déficience naturelle de la souche *A. oryzae* en CMC-ase.

Malgré cela, la valeur obtenue de 1,6 U/mL en SSF reste prometteuse et confirme le potentiel des déchets d'orange comme substrat pour la production d'enzymes à intérêt industriel. Ce type de production peut notamment être valorisé dans des applications de saccharification partielle ou dans des systèmes enzymatiques combinés, représentant une solution durable, économique et adaptée à la gestion des déchets agroalimentaires.

2.3. Évaluation comparative de la production enzymatique d'*Aspergillus oryzae* sur substrat de déchets d'orange : fermentation submergée vs fermentation solide

2.3.1. Activité amylasique

L'évaluation de l'activité amylasique d'*Aspergillus oryzae* cultivé sur des déchets d'orange en tant que source carbonée a révélé des variations significatives selon le mode de fermentation. En fermentation submergée (SmF), l'activité enzymatique atteignait 1,70 U/mL, contre 1,158 U/mL en fermentation en milieu solide (SSF), soit 42,92 U/g sur matière sèche.

Ces résultats indiquent qu'aux conditions expérimentales appliquées, la SmF a permis une production légèrement supérieure d'amylase. Cette performance peut s'expliquer par une meilleure diffusion des nutriments et une oxygénation plus homogène dans le milieu liquide.

Les deux modes de fermentation ont été évalués avec le même substrat – des déchets d'orange – et les résultats montrent que la SmF, grâce à un contrôle plus précis des paramètres physico-chimiques (pH, température, agitation, oxygénation), favorise la croissance fongique et la sécrétion enzymatique. En revanche, la SSF est plus difficile à maîtriser, notamment en ce qui concerne l'humidité, qui influence directement l'activité métabolique du champignon.

L'utilisation des déchets d'orange s'inscrit dans une stratégie de valorisation durable des coproduits agroalimentaires, réduisant les coûts de production et l'impact environnemental. Leur

richesse en polysaccharides constitue un facteur favorable à l'induction de la production d'amylases, tout en évitant une répression catabolique précoce.

Nos observations sont cohérentes avec celles de (Braia *et al.*, 2021), qui ont démontré l'efficacité de la SmF pour la production d' α -amylase à partir de résidus riches en amidon, atteignant 14 076 U/L après optimisation par approche statistique.

Toutefois, bien que la SmF ait montré une meilleure productivité dans notre étude, la SSF demeure une alternative économiquement attractive, notamment dans des contextes à ressources limitées. Ainsi, (Balakrishnan *et al.*, 2021) ont obtenu jusqu'à 10 994,74 U/gds en SSF à l'échelle pilote à partir de tourteaux oléagineux, après optimisation de paramètres tels que le pH, la température et la durée d'incubation. Leur étude illustre le potentiel de la SSF, particulièrement avec des substrats riches comme le tourteau d'arachide.

La nature du substrat joue ici un rôle déterminant. Les déchets d'orange, bien que pertinents sur le plan écologique et économique, présentent probablement un profil nutritionnel moins favorable (teneur en azote, fibres, acidité naturelle) que les tourteaux oléagineux. Cette hypothèse est étayée par les résultats de (Melnichuk *et al.*, 2020), qui ont atteint jusqu'à 47 000 U/g de substrat sec en SSF à partir d'écorces de soja et de résidus de minoterie, grâce à l'optimisation fine du temps d'incubation, de la taille des particules et de la composition du substrat.

La faible activité obtenue en SSF dans notre étude pourrait ainsi être liée aux limitations inhérentes au substrat utilisé. Cependant, sa disponibilité locale, son faible coût et sa valeur écologique renforcent son intérêt dans une perspective de production durable et décentralisée d'enzymes.

La SmF, pour sa part, offre une solubilisation optimale des nutriments et un environnement homogène, qui favorisent la croissance fongique et la sécrétion enzymatique. Le maintien constant de paramètres tels que le pH et la température, plus difficile à assurer en SSF, constitue un avantage supplémentaire.

Malgré cela, la SSF reste attrayante pour sa simplicité, sa faible consommation d'eau, ses besoins réduits en infrastructure et son adaptation aux substrats fibreux. L'étude de (Melnichuk *et al.*, 2020), démontre également la faisabilité d'un passage à l'échelle industrielle de la SSF par simple multiplication des unités de production (plateaux), renforçant ainsi sa pertinence pour les pays en développement.

La performance supérieure de la SmF pourrait donc s'expliquer par un meilleur contrôle des paramètres de culture et une disponibilité accrue du substrat. Toutefois, la SSF demeure une solution

économiquement et écologiquement avantageuse, malgré une productivité enzymatique légèrement inférieure.

Enfin, l'étude de Ousaadi et al., qui a rapporté une activité amylasique de 12,62 U/mL en SmF avec *Streptomyces sp.* sur déchets d'orange, souligne l'importance du choix de la souche microbienne et de l'optimisation du milieu de culture. Dans notre étude, aucune optimisation (type RSM ou approches par intelligence artificielle ANN-GA) n'a encore été appliquée, ce qui ouvre des perspectives d'amélioration prometteuses.

2.3.2. Activité cellulasique : un profil enzymatique restreint d'*Aspergillus oryzae*

L'analyse de la production de cellulase par *Aspergillus oryzae* selon le type de fermentation a mis en évidence une nette supériorité de la SSF. L'activité enzymatique mesurée par le test FPase (Filter Paper Activity) atteignait 1,6 U/mL en SSF, contre 0,712 U/mL en SmF. Ce résultat témoigne de la meilleure adaptation des conditions de la SSF, plus proches de l'environnement naturel des champignons filamentueux.

La structure fibreuse des déchets d'orange a permis une colonisation efficace par le mycélium et une dégradation progressive des polymères cellulosiques, favorisant la production de FPase (exoglucanase). Cependant, aucune activité de CMC-ase (endoglucanase) n'a été détectée. Cela suggère que dans ces conditions spécifiques, *A. oryzae* n'exprime que des enzymes ciblant les zones cristallines de la cellulose, sans action sur les régions amorphes. Ce profil enzymatique limité pourrait réduire l'efficacité de l'hydrolyse complète de la biomasse.

Ce comportement contraste avec celui de *Penicillium citrinum*, étudié par (Kumar et al., 2020)(Kumar et al. ,2024), qui a montré une production équilibrée de FPase et CMC-ase en SSF, atteignant jusqu'à 4,08 U/mL dans des conditions optimisées (pH 6, lactose, peptone). Cette comparaison met en évidence l'importance de l'optimisation du milieu de culture et du choix de la souche pour maximiser le rendement enzymatique.

Malgré l'absence d'endoglucanase, l'activité FPase mesurée reste significative et exploitable dans le cadre de procédés de préhydrolyse ou en complément de cocktails enzymatiques. L'utilisation de déchets d'orange, bien que pertinente, pourrait être améliorée par un enrichissement ou un prétraitement du substrat.

L'étude de (Boondaeng et al., 2024) confirme la pertinence de la SSF pour la production d'enzymes cellulolytiques, en raison de la proximité des conditions de culture avec l'environnement naturel des champignons. Leur travail sur *Aspergillus sp.* IN5 a permis d'obtenir des activités complètes en FPase, CMC-ase et β -glucosidase à partir de résidus de soja, soulignant l'importance cruciale de la souche et du substrat dans le profil enzymatique obtenu.

Dans notre étude, l'absence de CMC-ase peut s'expliquer soit par un manque d'induction dû à la nature du substrat, soit par une limitation intrinsèque de la souche *d'Aspergillus oryzae* utilisée. Néanmoins, l'activité FPase observée en SSF (1,6 U/mL) reste prometteuse, illustrant le potentiel de valorisation des déchets fruitiers pour des applications industrielles ciblées.

2.4. Activité protéolytique d'*Aspergillus oryzae* sur déchets d'orange en fermentation solide et submergée

Les résultats expérimentaux de cette étude mettent en évidence une différence notable dans la production de protéase par *Aspergillus oryzae* selon le mode de fermentation utilisé. En fermentation sur milieu solide (FMS) à base de déchets d'orange, une activité protéolytique de 0,066 U/mL, soit 2,4466 U/ g de matière sèche, a été enregistrée. En revanche, la fermentation submergée (SmF) a généré une activité significativement plus faible, évaluée à 0,0834 U/mL.

2.4.1. Fermentation sur milieu solide (FMS) : un rendement prometteur

L'activité observée en FMS, particulièrement celle rapportée à la matière sèche (2,4466 U/mL), confirme l'efficacité de ce mode de culture pour la production de protéases par *A. oryzae*. Ce résultat est en parfaite cohérence avec les travaux de Farooq et al. (2024), qui ont étudié la « hyperproduction » de protéase par *A. oryzae* en FMS à partir de neuf substrats agro-industriels différents, parmi lesquels le son de blé, la bagasse de canne à sucre ou encore les coques d'arachide. L'activité maximale obtenue par ces auteurs, 2,146 U/mL (après optimisation avec le son de blé), se situe dans un ordre de grandeur très proche de celui obtenu dans la présente étude, renforçant la validité de notre approche. Leur travail, basé sur une optimisation par la méthode des surfaces de réponse (RSM) et une évaluation de l'applicabilité industrielle des enzymes (notamment dans les détergents), souligne également le fort potentiel d'exploitation des protéases issues de la FMS.

Dans le même esprit, Benkahoul et al. (2017) ont mis en œuvre une fermentation sur déchets d'orange enrichis avec *A. oryzae*, et ont obtenu une activité enzymatique élevée (jusqu'à 2 016 U/mL), bien qu'aucune valeur rapportée à la matière sèche ne soit mentionnée. Leur recours à un plan d'expériences pour optimiser les rendements confirme la réceptivité du système *A. oryzae* – déchets d'orange à l'amélioration des performances enzymatiques.

Par ailleurs, l'étude de Londoño-Hernández et al. (2024) insiste sur la variabilité des rendements en fonction des sources de carbone, des souches utilisées et des conditions de culture. Cette variabilité ouvre des perspectives d'optimisation futures pour renforcer davantage la productivité de notre système.

Dans ce contexte, notre activité de 0,066 U/mL, soit 2,4466 U/ g de matière sèche, se positionne favorablement par rapport à la littérature, soulignant la pertinence du choix des déchets d'orange comme substrat agroalimentaire valorisable en FMS pour la production de protéases.

2.4.2. Fermentation submergée (SmF) : une performance limitée par l'absence d'optimisation

À l'inverse, la faible activité mesurée en SmF (0,0834 U/mL) suggère un rendement enzymatique nettement inférieur, probablement en lien avec l'absence d'optimisation des conditions de culture. Cette constatation rejoue les observations de Belmessikh et al. (2013), ont réalisé une comparaison directe des deux méthodes avec *Aspergillus oryzae*, Ces auteurs ont optimisé la production de protéase neutre par *Aspergillus oryzae* NRRL 2220 en SmF, sur un milieu à base du marc de tomate. Après optimisation du milieu (ajustement du pH, température, sources nutritives, etc.), ces auteurs ont obtenu une activité protéolytique maximale de 10,5 U/mL, soit plus de cent fois supérieure à celle observée dans notre étude.

Bien que la nature du substrat soit différente (drêches de tomate versus déchets d'orange), leur travail démontre que *A. oryzae* est capable d'atteindre des niveaux élevés de production enzymatique en SmF, à condition que les paramètres critiques (pH, température, aération, agitation, composition du milieu) soient rigoureusement ajustés.

En comparaison, la FMS offre naturellement des conditions plus propices à la croissance de *A. oryzae*, en raison notamment d'une aération améliorée, d'une forte concentration en substrat, et d'un environnement physique plus proche du milieu naturel de ce champignon filamenteux. Ces facteurs peuvent expliquer l'induction enzymatique plus marquée observée en FMS dans notre étude.

2.4.3. Conclusion partielle

En conclusion, nos résultats démontrent clairement le potentiel des déchets d'orange en tant que substrat valorisable pour la production de protéases par *Aspergillus oryzae*, particulièrement en fermentation solide. L'activité enregistrée en FMS est non seulement compétitive par rapport à d'autres substrats testés dans la littérature, mais elle renforce aussi l'intérêt de cette approche pour des applications industrielles à faible coût et à faible impact environnemental.

La performance limitée en SmF souligne en revanche l'importance cruciale d'une optimisation préalable des conditions de culture. Si ce mode de fermentation devait être envisagé, des recherches supplémentaires seront nécessaires pour ajuster les paramètres clés et améliorer la productivité enzymatique.

2.5. Activité polygalacturonase (pectinase) produite par *Aspergillus oryzae* sur déchets d'orange

L'activité polygalacturonase a été déterminée selon la méthode de Miller (1959). L'absorbance mesurée des échantillons a été convertie en concentration de sucres réducteurs libérés à l'aide d'une courbe d'étalonnage préalable. Cette méthode permet une quantification indirecte mais fiable de l'activité enzymatique des pectinases.

Les activités enzymatiques obtenues étaient respectivement de 0,088 U/mL en fermentation sur milieu solide (FMS), soit 3,293 U/g de matière sèche, et de 0,090 U/mL en fermentation submergée (SmF).

2.5.1. Comparaison des performances FMS vs SmF

Ces résultats montrent une supériorité marquée de la FMS dans la production de pectinase par *Aspergillus oryzae* à partir de déchets d'orange. Bien que les activités enzymatiques absolues (en U/mL) semblent proches entre les deux procédés, la prise en compte de la matière sèche révèle une production bien plus efficace en FMS, soulignant l'intérêt de ce mode de culture pour valoriser les substrats lignocellulosiques.

Cette tendance est cohérente avec les travaux de Ahmed et Awad (2021), qui ont démontré l'efficacité des déchets de peaux d'orange comme substrat pour la production de pectinases par *Penicillium chrysogenum*. Bien que le micro-organisme diffère, leur étude appuie l'intérêt des coproduits agricoles dans une perspective de biovalorisation durable et économique.

En fermentation submergée, nos résultats (0,090 U/mL) apparaissent significativement inférieurs aux niveaux d'activité rapportés par Ketipally et Ram (2018), qui ont optimisé la production de pectinase par *Aspergillus oryzae* RR103 en SmF. Dans leur étude, une activité maximale d'environ 2,07 U/mL a été obtenue à un pH optimal de 6.0. Cette différence marquée suggère que nos conditions expérimentales en SmF n'étaient pas encore optimisées, notamment en ce qui concerne les paramètres physico-chimiques tels que le pH, la température, l'oxygénation, ou encore la nature et les concentrations des nutriments (sources de carbone et d'azote).

2.5.2. Efficacité remarquable de la FMS

En revanche, l'activité enzymatique atteinte en FMS dans notre étude (0,088 U/mL soit 3,293 U/g de matière sèche) dépasse non seulement celle obtenue en SmF, mais également les résultats rapportés par Ahmed et Awad (2021) (0,214 U/mL en SmF avec *P. chrysogenum* sur le même type de déchet). Ce résultat met en évidence l'adéquation entre le système *A. oryzae* – déchets d'orange et le procédé de fermentation solide pour la production de pectinase.

Cette efficacité accrue en FMS pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs :

- Des conditions de culture plus proches de l'environnement naturel de *Aspergillus oryzae*,
- Une concentration élevée du substrat solide qui favorise l'induction enzymatique,
- Une meilleure stabilité des enzymes dans des conditions d'humidité contrôlée,
- Une diffusion plus lente des métabolites, permettant une action enzymatique prolongée.

2.5.3. Conclusion partielle

Nos résultats démontrent que la fermentation en milieu solide constitue une approche très prometteuse pour la production de pectinase à partir de déchets d'orange. Elle offre non seulement un rendement enzymatique élevé, mais s'inscrit également dans une démarche écologiquement responsable et économiquement viable. La faible activité observée en fermentation submergée, en comparaison avec les données de la littérature, met en lumière la nécessité d'une optimisation rigoureuse si cette voie devait être envisagée.

En définitive, cette étude confirme le potentiel industriel de la FMS pour la valorisation des coproduits agroalimentaires par la production d'enzymes à haute valeur ajoutée comme les pectinases.

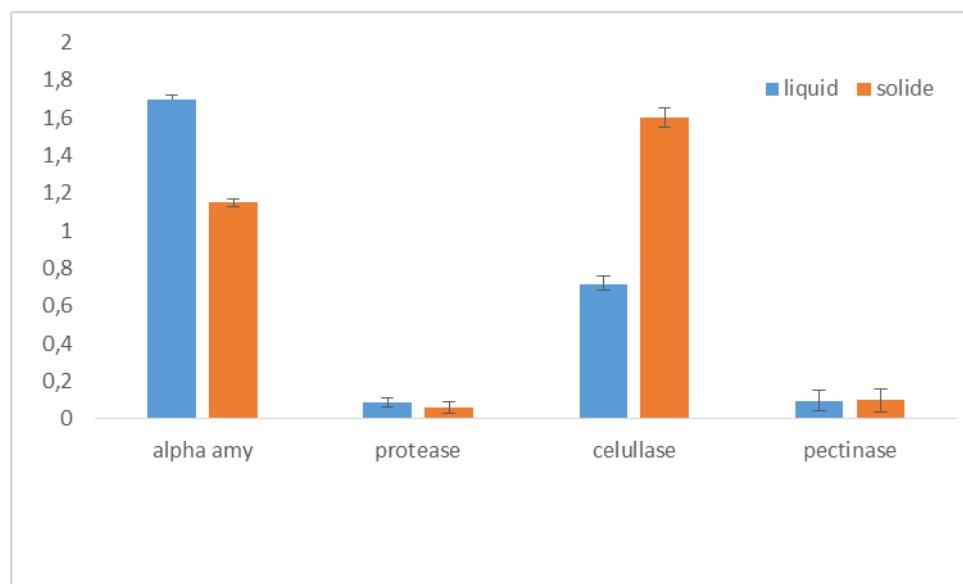


Figure 16 : Étude comparative des activités enzymatiques en fermentation en milieu solide (FMS) et en fermentation submergée (SmF)

3. Optimisation des facteurs influençant la production α -amylasique

Les effets interactifs des facteurs, à savoir l'amidon, l'extrait de levure et le chlorure de calcium, ont été examinés à l'aide de la méthode des surfaces de réponse (RSM) en utilisant le plan de Box-Behnken. Les résultats des expériences d'optimisation sont présentés dans le tableau (08) et ont été analysés à l'aide du logiciel Minitab 22, permettant le calcul des coefficients de l'équation de régression (voir tableau 09). La significativité statistique de chaque coefficient a été évaluée à partir des valeurs du test t et des valeurs p associées, également reportées dans ce tableau.

Tableau 08 : Valeurs expérimentales (observées) de l'activité amylasique par le Box-behnken.

Expérience	Facteurs			Activité amylasique (U/ml)
	C1	C2	C3	
1	-1	-1	0	2.46
2	1	-1	0	5.99
3	-1	1	0	2.28
4	1	1	0	2.08
5	-1	0	-1	1.74
6	1	0	-1	3.11
7	-1	0	1	2.04
8	1	0	1	4.25
9	0	-1	-1	4.21
10	0	1	-1	2.26
11	0	-1	1	4.83
12	0	1	1	2.02
13	0	0	0	2.50
14	0	0	0	2.86
15	0	0	0	2.50

Partie III

Résultats et discussions

Les valeurs de p inférieures à 0,05 indiquent que les termes du modèle sont statistiquement significatifs. Une valeur de t élevée associée à une valeur de p très faible reflète une forte contribution du terme concerné au modèle. À l'inverse, les termes non significatifs (avec p > 0,05) ont été éliminés de l'équation finale.

Tableau 09 : Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité amylasique.

Terme	Coeff	Coef ErT	Valeur de T	Valeur de p	FIV
Constante	2.620	0.139	18.82	0.000	
C1	0.8638	0.0853	10.13	0.000	1.00
C2	-1.1062	0.0853	-12.97	0.000	1.00
C3	0.2275	0.0853	2.67	0.044	1.00
C1*C1	0.019	0.126	0.15	0.887	1.01
C2*C2	0.564	0.126	4.49	0.006	1.01
C3*C3	0.146	0.126	1.17	0.296	1.01
C1*C2	-0.933	0.121	-7.73	0.001	1.00
C1*C3	0.210	0.121	1.74	0.142	1.00
C2*C3	-0.215	0.121	-1.78	0.135	1.00

L'équation de régression obtenue est la suivante :

$$Y = 2.620 + 0.8638 C1 - 1.1062 C2 + 0.2275 C3 + 0.019 C1*C1 + 0.564 C2*C2 + 0.146 C3*C3 - 0.933 C1*C2 + 0.210 C1*C3 - 0.215 C2*C3.$$

Où Y est l'activité de l'alpha-amylase et C1, C2, C3 sont l'amidon (%), l'extrait de levure (%) et CaCl2 (g/l).

Pour évaluer la qualité de l'ajustement du modèle, le coefficient de détermination R^2 a été calculé. Le modèle présente une valeur de $R^2 = 0,9665$, ce qui signifie que 96,65 % de la variabilité totale des données est expliquée par le modèle (voir tableau 10). Le R^2 prédict, qui est de 0,8390, est en bon accord avec le R^2 ajusté de 0,9622, indiquant une adéquation satisfaisante entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédictes pour la production de l' α -amylase.

Tableau 10 : Paramètres statistiques de performance du modèle de régression quadratique obtenu par le plan Box-Behnken.

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0.241153	96.65%	96.22%	83.90%

L'analyse de la variance (ANOVA) du modèle de régression quadratique montre que ce dernier est hautement significatif, avec une valeur de F de 40,56 et une valeur p associée de 0,000. Cela confirme que les effets combinés des variables indépendantes contribuent de manière significative à l'amélioration de la production d'α-amylase.

Par ailleurs, la valeur de F du test de manque d'ajustement est de 1,58 (voir tableau 11), avec une valeur p = 0,4, ce qui est non significatif. Cela indique que le modèle présente un bon ajustement, et que les données expérimentales sont en accord avec les prédictions du modèle.

Tableau 11 : Résultats de ANOVA du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité amylasique.

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur	Valeur de
				F	P
Modèle	9	21.2290	2.35878	40.56	0.000
Linéaires	3	16.1729	5.39096	92.70	0.000
C1	1	5.9685	5.96851	102.63	0.000
C2	1	9.7903	9.79031	168.35	0.000
C3	1	0.4141	0.41405	7.12	0.044
Carré	3	1.2166	0.40553	6.97	0.031
C1*C1	1	0.00130	0.00130	0.02	0.887
C2*C2	1	1.1735	1.17347	20.18	0.006
C3*C3	1	0.0790	0.07897	1.36	0.296
Interaction à 2 facteurs	3	3.8395	1.27984	22.01	0.003
C1*C2	1	3.4782	3.47823	59.81	0.001
C1*C3	1	0.1764	0.17640	3.03	0.142
C2*C3	1	0.1849	0.18490	3.018	0.135

Erreur	5	0.2908	0.05815
--------	---	--------	---------

3.1. Graphique de Pareto

Le diagramme de Pareto (Figure 17) illustre de manière graphique les résultats de l'analyse du plan d'expériences relatif à la production d' α -amylase, en mettant en évidence l'ordre de significativité des variables étudiées. Il apparaît clairement que les facteurs amidon, extrait de levure et CaCl_2 ont un effet significatif sur la production de l'enzyme, de même que certaines de leurs interactions (notamment $C1*C2$) et le terme quadratique $C2^2$. Tous ces effets dépassent le seuil critique de significativité fixé à 2,57.

En revanche, selon le diagramme de Pareto obtenu, les effets des interactions $C2*C3$ et $C1*C3$, ainsi que les termes quadratiques $C3^2$ et $C1^2$, ne présentent aucune significativité statistique, ce qui suggère qu'ils n'ont pas d'impact notable sur la production de l' α -amylase dans les conditions expérimentales testées.

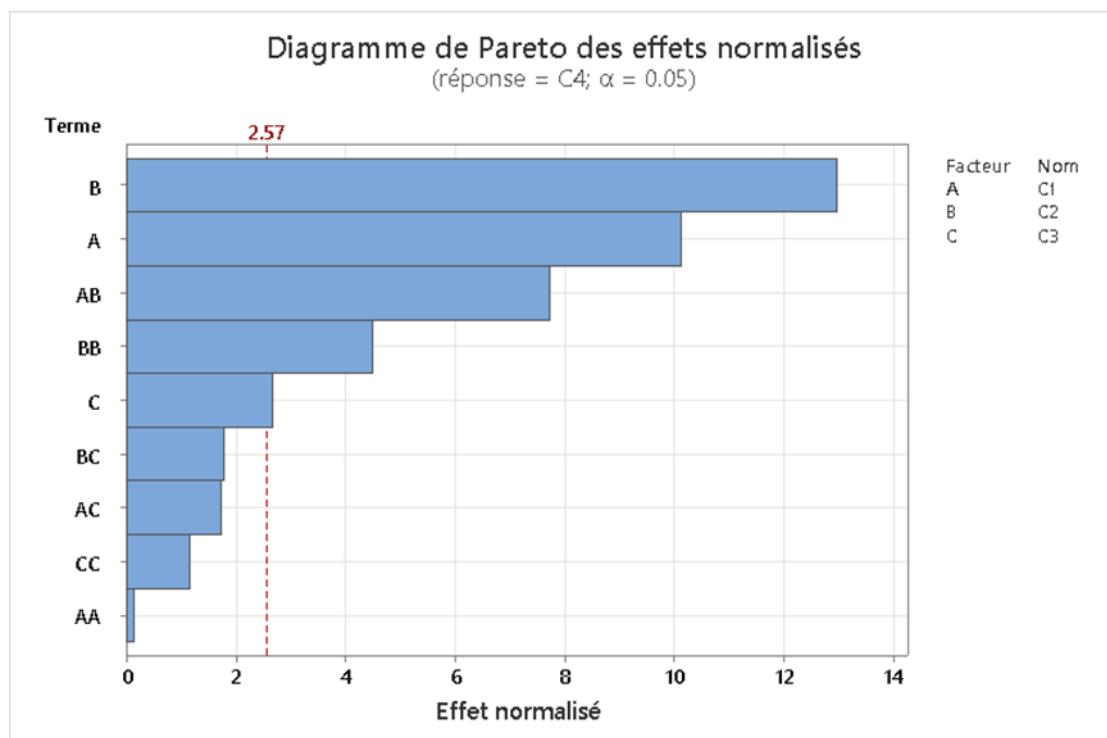


Figure 17 : Diagramme de Pareto illustrant l'influence statistique des facteurs expérimentaux sur l'activité de l' α -amylase.

3.2. Tracés de contours et surfaces de réponses :

Les surfaces de réponses de la production de l'alpha-amylase par *Aspergillus oryzae* Ont été générées à partir de l'équation (.) en utilisant Minitab version 22 et elles sont présentées dans la figure 18.

Les tracés de contour 2D sont aussi des représentations graphiques de l'équation de régression. Chaque courbe de contour représente un nombre infini de combinaison de deux variables en maintenant la troisième au niveau zéro.

Ces tracés interprètent visuellement l'interaction entre les deux variables, et facilitent la localisation des conditions expérimentales optimales. Les zones d'ombres sombres déterminent les conditions qui maximisent la production enzymatique

3.3. Détermination des interactions entre les variables

Les surfaces de réponse tridimensionnelles ainsi que les courbes de contour correspondantes, générées à l'aide du logiciel Minitab 22, sont présentées à la Figure 18. Elles illustrent les interactions entre paires de facteurs, permettant d'identifier les zones optimales de réponse en fonction de deux variables indépendantes.

Ces courbes ont été tracées dans le but de déterminer le niveau optimal de chaque facteur étudié, à savoir : C1 : amidon, C2 : extrait de levure, et C3 : CaCl_2 , et d'évaluer l'impact de leurs interactions croisées sur l'activité amylasique.

En général, les surfaces de réponse sont construites à partir du modèle de régression établi, en maintenant une variable indépendante à son niveau central, tandis que les deux autres varient dans les limites définies par le plan expérimental. Ainsi, trois surfaces de réponse ont été obtenues, couvrant l'ensemble des combinaisons possibles entre deux variables à la fois.

La forme des courbes de contour apporte des indications précieuses sur la nature des interactions :

- Des courbes circulaires suggèrent une absence d'interaction significative entre les deux variables concernées.
- En revanche, des courbes elliptiques ou en forme de selle indiquent une interaction significative, pouvant se traduire par un effet synergique (effet combiné amplifié) ou antagoniste (effet combiné atténué) (Sudha et al., 2020).

L'analyse des courbes obtenues montre que plusieurs interactions croisées entre les variables indépendantes influencent significativement la production de l' α -amylase, ce qui justifie pleinement l'approche multifactorielle employée dans ce travail.

3.4. Interactions entre C1 (amidon) et C2 (extrait de levure)

L'interaction entre les deux variables C1 (amidon) et C2 (extrait de levure) est illustrée par la surface de réponse (Figure 18.B.1) et les courbes de contour correspondantes (Figure 18.A.1), qui

traduisent visuellement l'effet combiné de ces deux facteurs sur l'activité α -amylasique de la souche étudiée.

La zone vert foncé observée dans la Figure 18.A.1 indique une activité enzymatique maximale (> 6 UI/ml), correspondant ainsi à une production élevée d' α -amylase. Cette zone optimale est atteinte à de faibles concentrations d'extrait de levure, combinées à de fortes concentrations d'amidon. En revanche, une augmentation excessive de l'extrait de levure ou une diminution de l'amidon entraîne une réduction progressive du rendement enzymatique.

La forme modérée de la surface de réponse et les contours elliptiques obtenus (figure 01) indique une parfaite interaction entre l'amidon et l'extrait de levure ($p = 0,001$), indiquant une interaction significative mais antagoniste entre les deux variables.

3.5. Interactions entre C1 (amidon) et C3 (CaCl₂)

L'interaction entre les deux variables C1 (amidon) et C3 (CaCl₂) est illustrée par la surface de réponse (Figure 18.B.2) et les courbes de contour correspondantes (Figure 18.A.2). Ces représentations permettent de visualiser les effets combinés de ces deux facteurs sur l'activité α -amylasique de la souche testée.

La zone en vert foncé visible sur la Figure 18.A.2 correspond à l'intervalle optimal des concentrations d'amidon et de CaCl₂, dans lequel une activité enzymatique élevée (> 4 UI/ml) est observée. Cette région optimale est atteinte lorsque la concentration en CaCl₂ et en amidon est élevée. En revanche, une diminution de l'amidon ou du CaCl₂ entraîne une baisse progressive de la production d' α -amylase.

L'analyse statistique révèle une interaction positive mais non significative entre l'amidon et le CaCl₂ ($p = 0,142$). Cela suggère que, bien que leur combinaison puisse avoir un effet favorable sur la réponse, cet effet n'est pas statistiquement significatif au seuil de 5 %, et peut donc être considéré comme secondaire par rapport à d'autres interactions.

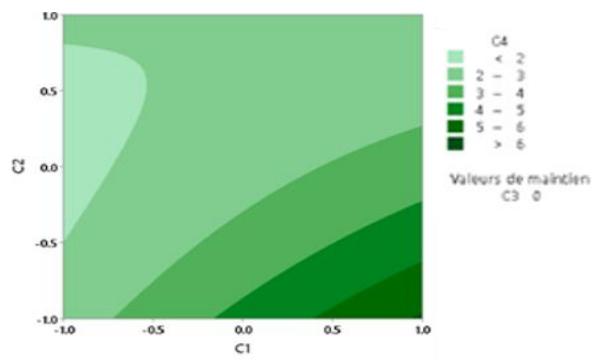
3.6. Interactions entre C2 (extrait de levure) et C3 (CaCl₂)

L'interaction entre les deux variables C3 (CaCl₂) et C2 (extrait de levure) est représentée par la surface de réponse (Figure 18.B.3) et les courbes de contour correspondantes (Figure 18.A.3). Ces figures illustrent l'effet combiné de ces deux facteurs sur l'activité amylasique de la souche étudiée, en mettant en évidence les zones de variation de la réponse en fonction des concentrations des deux variables.

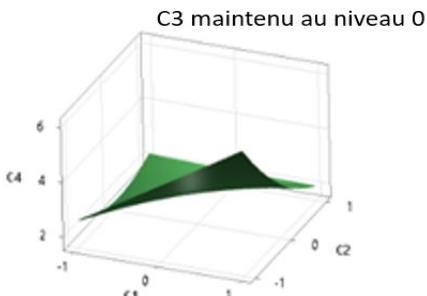
La zone en vert foncé observée sur la Figure 18.A.3 correspond à une activité enzymatique élevée ($> 4,5$ UI/ml). Cette réponse optimale est obtenue à des concentrations élevées de CaCl₂, associées à une faible teneur en extrait de levure. En revanche, une augmentation de la concentration en extrait de levure combinée à une diminution du CaCl₂ entraîne une réduction progressive de l'activité enzymatique.

L'analyse statistique met en évidence une interaction entre CaCl_2 et l'extrait de levure, avec un effet négatif mais non significatif ($p = 0,135$). Cela indique que cette interaction, bien qu'elle influence la réponse, n'est pas statistiquement significative au seuil de 5 %, et ne constitue donc pas un facteur déterminant dans l'optimisation du modèle.

A

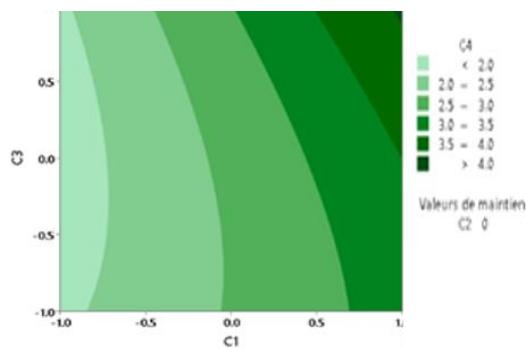


B



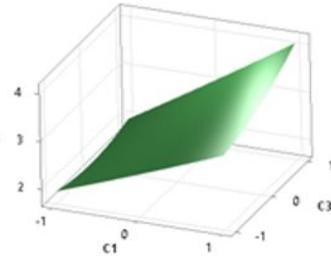
1

Activité amylogique C2 ; C1



2

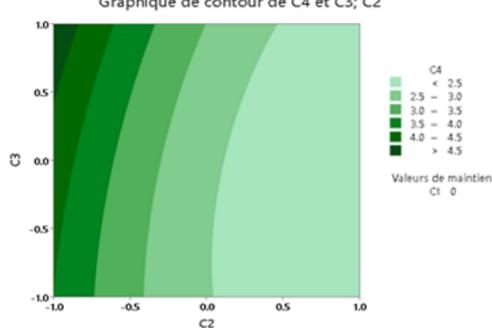
C2 maintenu au niveau 0



2

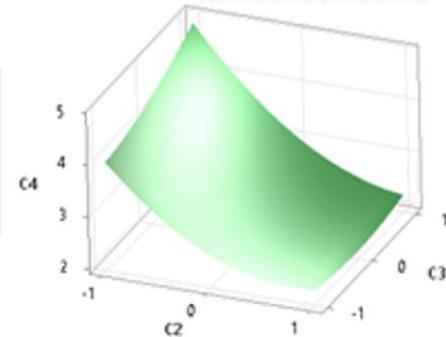
Activité amylogique C3 ; C1

Graphique de contour de C4 et C3; C2



3

C1 maintenu au niveau 0



3

Activité amylogique C3 ; C2

Figure 18 : les courbes de contour (A) et les surface de réponse (B) de la production de l’ α -amylase par *Aspergillus oryzae*.

La méthodologie de surface de réponse « RSM », a permis de déterminer les optima des trois variables étudiées à savoir : l’amidon (9%), l’extrait de levure (0.1%) et pour le CaCl₂ (1.5 g/l). Et la valeur maximale prédictive de l’activité amylasique est de 6.9038 UI/ml (figure 19).

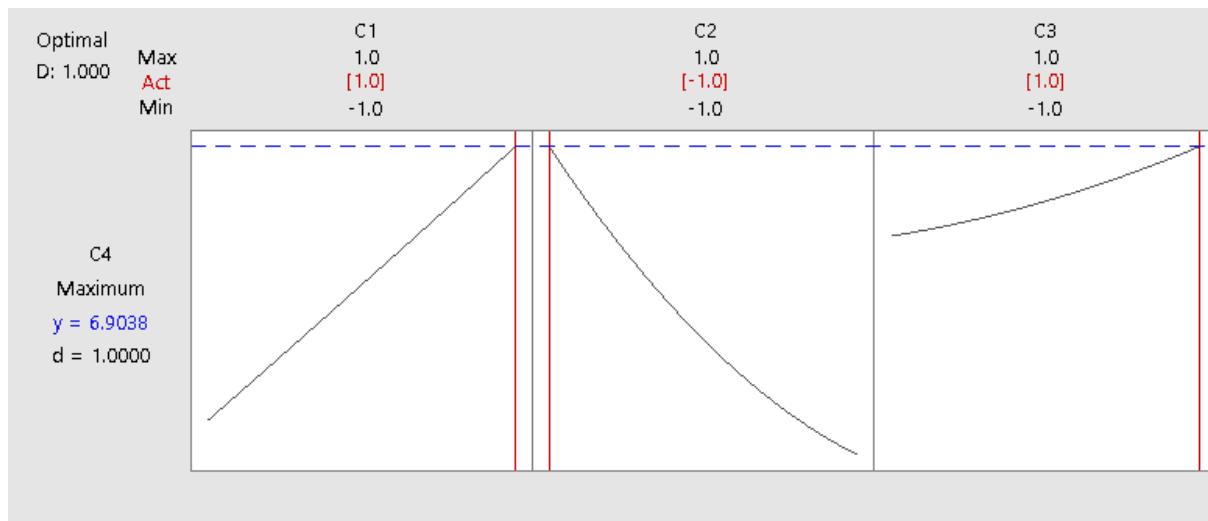


Figure 19 : Valeurs optimales des variables et de la réponse déterminées par « RSM » pour une meilleure activité amylasique.

3.7. Validation du modèle

L’optimisation des conditions de culture a permis une amélioration significative de l’activité enzymatique, passant de 1,70 U/ml avant optimisation à 6.90 U/ml après application du plan expérimental, soit une augmentation de plus de quatre fois. Ce résultat souligne l’importance déterminante des facteurs nutritionnels et physico-chimiques dans la biosynthèse des enzymes extracellulaires, en particulier l’ α -amylase.

3.8. Effet des facteurs utilisés sur la production de l’ α -amylase

3.8.1. Effet de l’amidon sur la production de l’ α -amylase

La source de carbone constitue l’un des facteurs les plus déterminants influençant la production enzymatique, en particulier lorsqu’elle joue également un rôle inducteur. Dans ce travail, L’ajout d’amidon a exercé un effet hautement significatif sur l’induction enzymatique ($p = 0,000$), bien que les déchets d’orange soient naturellement riches en carbone, la présence spécifique de l’amidon semble davantage stimuler la synthèse de l’enzyme.

Ce résultat corrobore plusieurs études antérieures montrant que l’amidon est non seulement une excellente source de carbone, mais aussi un inducteur spécifique de l’ α -amylase, en particulier

chez les champignons filamenteux tels qu'*Aspergillus oryzae* (référence) et aussi chez les souches bactériennes (référence). L'induction enzymatique en présence de son substrat est un phénomène bien connu dans la biosynthèse des enzymes extracellulaires. L'amidon favorise également la stabilité structurale de l'enzyme, notamment en limitant la dénaturation thermique et en facilitant le repliement protéique correct (Chimela et al. (2010),

3.8.2. Effet de l'extrait de levure sur la production enzymatique

En revanche, l'extrait de levure, utilisé comme source d'azote organique, a montré un effet inhibiteur très significatif ($p = 0,000$). Ce résultat pourrait s'expliquer par une concentration excessive d'azote, supérieure au seuil optimal, inhibant ainsi la production enzymatique (Pederson & Nielsen, 2000). De même, Sharma et al. (2014) ont rapporté qu'une concentration trop élevée de source d'azote organique telles que l'extrait de bœuf entraîne un déséquilibre nutritionnel ou l'induction de protéases, capables de dégrader les enzymes produites.

Il a été souligné qu'un apport azoté modéré est généralement plus favorable à la production d'enzymes extracellulaires, en raison du rôle de l'azote comme facteur de régulation métabolique (Pederson & Nielsen, 2000).

3.8.3. Effet de CaCl_2 sur la production de l' α -amylase

Le chlorure de calcium (CaCl_2) a également eu un effet positif significatif ($p = 0,044$) sur la production enzymatique. Ce résultat s'explique par le fait que l' α -amylase est une métalloenzyme nécessitant des ions Ca^{2+} pour son activation, sa stabilité thermique et sa résistance à la dégradation protéolytique.

De manière globale, l'ajustement du modèle statistique ($R^2 = 0,9665$; R^2 ajusté = 0,9622) et l'analyse ANOVA ($p = 0,000$; $F = 40,56$) confirment la robustesse du modèle quadratique utilisé pour prédire la production optimale d' α -amylase. L'absence de manque d'ajustement significatif ($p = 0,4$) témoigne d'un bon accord entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites.

Ces résultats mettent en évidence l'importance d'une formulation rationnelle du milieu de culture, intégrant des concentrations précises de substrats et cofacteurs, pour optimiser la production enzymatique à l'échelle de laboratoire, avec une perspective d'application industrielle dans des procédés biotechnologiques.

4. Modélisation et Optimisation de la Production Enzymatique : Une Approche Combinée de Régression et d'Algorithmes Bio-inspirés (PSO)

4.1. Sélectionner le meilleur modèle :

Tableau 12 : Resultats de formation :

Partie III

Résultats et discussions

Model	R ²	RMSE	MAE	MSE
Quadratic Regression	0.995511	0.084853	0.04	0.0072
XGBoost	0.992004	0.113243	0.091447	0.012824
Linear Regression	0.802447	0.562877	0.435148	0.31683
Ridge Regression	0.785997	0.585843	0.508778	0.343213
Random Forest	0.742926	0.642097	0.461254	0.412289

Tableau 13 : Resultats de test :

Model	R ²	RMSE	MAE	MSE
Quadratic Regression	-9.79155	0.590903	0.436667	0.349167
Linear Regression	-24.5692	0.909563	0.749832	0.827304
Ridge Regression	-16.4809	0.752066	0.645013	0.565603
Random Forest	-35.3611	1.084658	0.932898	1.176483
XGBoost	-32.5622	1.042077	0.850823	1.085925

- Sélectionner le meilleur modèle

Meilleur modèle : Régression quadratique

Meilleur score R² d'entraînement : 0.995511

Meilleur score R² de test : -9.7916

Coefficients de régression quadratique :

0	Intercept	2.6200
1	C1	0.8950
2	C2	-0.9600
3	C3	0.3600
4	C1 ²	-0.1275
5	C1 C2	-0.9950
6	C1 C3	0.2100
7	C2 ²	0.6475
8	C2 C3	0.0500
9	C3 ²	0.2925

4.2. Résultats Optimisation par essaimage de particules (PSO) Formulations mathématiques

L'algorithme d'optimisation par essaim de particules (PSO) a été utilisé dans le but d'identifier les valeurs optimales des paramètres C1, C2 et C3 maximisant la valeur prédictive de la variable cible C4. L'évolution des performances de l'algorithme au fil des itérations est illustrée dans le graphique (Figure 20), qui présentent respectivement l'aptitude moyenne (favg) et la meilleure aptitude (fbest) à chaque itération.

L'analyse des résultats révèle une convergence rapide vers la solution optimale. Dès la deuxième itération, l'algorithme atteint une valeur maximale de fbest=6,8025, qui reste constante jusqu'à la fin des itérations (itération 59). L'aptitude moyenne atteint également cette valeur à partir de la cinquième itération, indiquant que l'ensemble des particules s'est aligné sur la solution optimale, signe d'une convergence collective de l'essaim.

Les paramètres optimaux trouvés pour atteindre cette performance maximale sont les suivants :

- C1=1
- C2=-1
- C3=1
- Valeur maximale atteinte pour C4 =6,8025

L'amélioration de l'aptitude, calculée comme la différence entre la meilleure aptitude finale et celle observée initialement, est donnée par :

$$\Delta f_{best} = f_{best}(T_{max}) - f_{best}(0) = 6,8025 - 5,4528 = 1,3497$$

Cette amélioration rapide met en évidence l'efficacité du PSO à localiser des solutions optimales dans des espaces de recherche complexes et multidimensionnels. La stabilité de la solution sur l'ensemble des itérations finales suggère que l'algorithme a atteint un optimum global, ou du moins un optimum local de très bonne qualité, sans manifestation de dérive ni de surajustement.

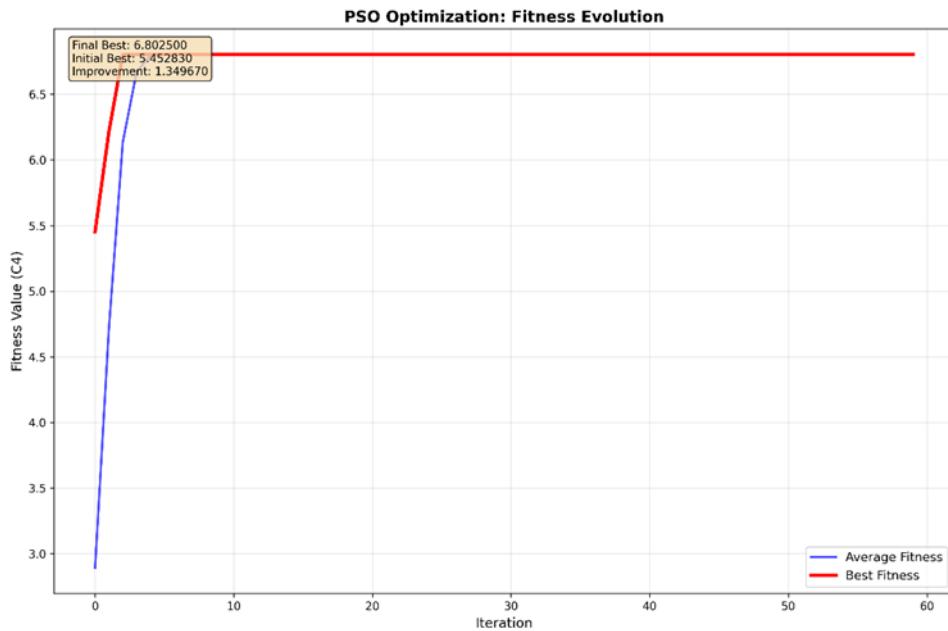


Figure 20 : Évolution de l'aptitude moyenne et de la meilleure aptitude au cours des itérations de l'algorithme PSO.

En conclusion, les efforts d'optimisation ont conduit à des résultats très prometteurs. La méthode de Box-Behnken a fourni une valeur prédictive optimale de 6,9038, en parfaite adéquation avec la valeur expérimentale validée de 6,90. De même, l'optimisation par l'algorithme d'Essaim Particulaire (PSO) a également donné d'excellents résultats, avec une valeur prédictive de 6,8025 et une valeur validée expérimentalement 6,816.

Ces fortes concordances entre les prévisions et les résultats expérimentaux attestent de la robustesse et de la fiabilité des méthodes d'optimisation utilisées, confirmant leur efficacité pour atteindre les performances souhaitées.

Conclusion générale

Conclusion générale

Conclusion générale

L'étude du patrimoine enzymatique d'*Aspergillus oryzae*, menée à partir de tests réalisés sur milieux solides, a permis de mettre en évidence la remarquable capacité de cette souche à produire diverses enzymes extracellulaires d'intérêt biotechnologique.

La mise en culture sur des milieux spécifiques a révélé une activité pectinolytique, attestée par la formation de zones de clarification autour des colonies cultivées sur un milieu contenant de la pectine. Cette observation traduit l'aptitude de la souche à hydrolyser les polysaccharides complexes présents dans les parois cellulaires végétales.

De même, la production d' α -amylase a été démontrée par l'hydrolyse de l'amidon, mise en évidence par la disparition de la coloration à l'iode autour de la colonie, confirmant ainsi la sécrétion active d'enzymes amylolytiques.

Concernant l'activité cellulolytique, les tests réalisés sur un milieu contenant de la carboxyméthylcellulose ont montré une dégradation nette du substrat, illustrée par l'apparition de halos clairs après révélation, traduisant la production d'enzymes capables de dégrader les polymères cellulosiques.

Enfin, la sécrétion de protéases a été mise en évidence sur un milieu enrichi en protéines de lait, par la formation de zones de lyse protéique autour des colonies, indiquant l'hydrolyse des protéines par des exoprotéases fongiques.

L'ensemble de ces résultats expérimentaux met en lumière la polyvalence enzymatique d'*Aspergillus oryzae*, capable, en conditions solides, de produire au moins quatre types majeurs d'enzymes extracellulaires : pectinases, amylases, cellulases et protéases. Ce profil enzymatique diversifié confère à cette souche un fort potentiel pour des applications industrielles, notamment dans la valorisation des résidus agroalimentaires, la transformation des biomasses végétales, ou encore la bioconversion enzymatique en milieu durable.

Les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence la capacité d'*Aspergillus oryzae* à produire une large gamme d'enzymes extracellulaires à partir de déchets d'orange, en utilisant deux modes de culture distincts : la fermentation en milieu solide (FMS) et la fermentation submergée (SmF).

L'analyse de l'activité amylasique révèle une production plus élevée en SmF (1,70 U/mL) par rapport à la FMS (1,158 U/mL, soit 42,92 U/g), ce qui suggère que les conditions liquides favorisent une meilleure diffusion des nutriments et un contrôle plus précis des paramètres physico-chimiques, facilitant ainsi la sécrétion d' α -amylase.

Conclusion générale

À l'inverse, l'étude de l'activité cellulase montre une tendance opposée : la FMS permet une production significativement plus élevée (1,60 U/mL, soit 59,31 U/g), contre seulement 0,712 U/mL en SmF. Cette différence pourrait être liée à la structure physique du substrat solide, qui favorise l'expression des enzymes impliquées dans la dégradation des polymères lignocellulosiques.

En ce qui concerne l'activité protéolytique, une supériorité nette a été enregistrée en FMS (0,066 U/mL, soit 2,4466 U/g), par rapport à la SmF (0,0834 U/mL), confirmant l'efficacité du milieu solide pour la production de protéases, particulièrement lorsqu'un substrat complexe comme les déchets d'orange est utilisé.

Enfin, l'activité pectinolytique, évaluée par dosage de la polygalacturonase, présente également une variabilité selon le procédé : bien que les chiffres soient proches, la SSF tend à favoriser cette production enzymatique, ce qui peut s'expliquer par la présence accrue de composés pectiques dans les parois végétales solides du substrat.

Dans l'ensemble, ces observations soulignent le rôle déterminant du mode de fermentation sur le profil de production enzymatique d'*Aspergillus oryzae*. Tandis que la SmF se révèle plus appropriée pour la production d'α-amylase, la SSF optimise significativement la synthèse de cellulases, protéases et pectinases. Par ailleurs, le recours aux déchets d'orange comme substrat s'inscrit dans une stratégie de valorisation durable des résidus agroalimentaires, renforçant leur potentiel en tant que ressource locale, économique et écologique pour la bioproduction enzymatique.

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour le pilotage différencié de la production enzymatique, selon le type d'enzyme recherché et le procédé technologique choisi.

L'optimisation de la production d'α-amylase par *Aspergillus oryzae*, réalisée à l'aide du plan Box-Behnken et de la méthodologie des surfaces de réponse (RSM), a permis d'identifier avec rigueur les facteurs nutritionnels clés influençant l'activité enzymatique. L'étude a mis en évidence l'effet significatif de trois variables principales : l'amidon, l'extrait de levure et le chlorure de calcium (CaCl₂), ainsi que l'importance de leurs interactions croisées.

L'analyse statistique a confirmé la validité du modèle quadratique de régression, avec un coefficient de détermination R² élevé (0,9665), un R² ajusté de 0,9622, et une absence significative de manque d'ajustement (p = 0,4). Ces résultats attestent de la robustesse du modèle prédictif, fiable pour l'optimisation de la production enzymatique. La surface de réponse obtenue a permis de déterminer des conditions optimales menant à une activité prédictive de 6,9038 U/mL, soit une amélioration de plus de quatre fois par rapport à l'activité initiale (1,70 U/mL).

Sur le plan individuel, l'amidon s'est révélé être un inducteur majeur de la production enzymatique. En revanche, l'extrait de levure, à la concentration testée, a montré un effet inhibiteur

Conclusion générale

notable, probablement lié à un excès d'azote organique. Le CaCl₂, quant à lui, a eu un effet positif, probablement en stabilisant l'enzyme ou en modulant la perméabilité membranaire.

L'étude des interactions entre les facteurs a mis en évidence des effets combinés significatifs, notamment une interaction antagoniste entre l'amidon et l'extrait de levure, statistiquement significative, qui a influencé négativement la synthèse enzymatique à certaines concentrations. Les courbes de contour et les graphiques de surface de réponse ont permis une visualisation claire des zones optimales, facilitant le réglage fin des paramètres du milieu de culture.

Ce travail illustre l'efficacité d'une approche statistique multifactorielle dans l'optimisation rationnelle du milieu de culture pour la production d'α-amylase par *A. oryzae* en fermentation submergée. Ces résultats ouvrent des perspectives industrielles prometteuses, notamment dans le cadre de la valorisation biotechnologique de substrats agroalimentaires à l'échelle locale.

De manière concomitante, l'algorithme d'Essaim Particulaire (PSO – *Particle Swarm Optimization*) a été mis en œuvre dans le but d'optimiser la production d'α-amylase. Cette approche métaheuristique a abouti aux mêmes conditions optimales que celles identifiées par le plan de Box-Behnken, confirmant ainsi la robustesse des paramètres sélectionnés. Le PSO a permis de prédire une activité enzymatique de 6,8025 UI/mL, tandis que la validation expérimentale a révélé une valeur très proche, de 6,816 UI/mL, témoignant d'une très bonne concordance entre les données simulées et les résultats réels.

En conclusion, les deux méthodes d'optimisation utilisées ; la méthodologie des surfaces de réponse (RSM) via le plan Box-Behnken et l'algorithme PSO ; se sont révélées hautement efficaces pour améliorer la production d'α-amylase à partir de résidus agroalimentaires. Leur complémentarité et la précision de leurs prédictions confirment leur utilité en tant qu'outils fiables et performants pour l'optimisation des procédés biotechnologiques, en particulier dans une démarche de valorisation durable des déchets agro-industriels.

Références

Références

- Abd-Elhalim, B. T., Gamal, R. F., El-Sayed, S. M., & Abu-Hussien, S. H. (2023).** Optimizing alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* on bread waste for effective industrial wastewater treatment and textile desizing through response surface methodology. *Scientific Reports*, 13(1), 19216. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46384-6>.
- Adeleke, A. J., Odunfa, S. A., Olanbiwonnninu, A., & Owoseni, M. C. (2012).** Production of Cellulase and Pectinase from Orange Peels by Fungi. *Nature and Science*, 10(5), 107-112. <http://www.sciencepub.net/nature>
- Adetiloye, O. A., Solomon, B. O., Omolaiye, J. A., & Betiku, E. (2025).** Optimization of thermostable amylolytic enzyme production from *Bacillus cereus* isolated from a recreational warm spring via Box Behnken design and response surface methodology. *Microbial Cell Factories*, 24(1), 87.
- Aguilar, C. N., & Gutierrez, G. (2008).** Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American journal of biochemistry and biotechnology*, 4(4), 354-366. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2008.354.366>.
- Aguilar, J. G. dos Santos, & Sato, H. H. (2018).** Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>.<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819720-2.00004-7>.
- Ahmed, N. E., & Awad, H. M. (2021).** OPTIMIZING THE PRODUCTION OF PECTINASE OF ORANGE PEEL WASTE BY *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* MF318506 USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY IN SUBMERGED FERMENTATION. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 11(1), e3931. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.3931>
- Aljammas, H. A. (2021).** Utilization of agroindustrial residues for the production of microbial secondary metabolites: general aspects. In *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science* (pp. 57-74). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819720-2.00004-7>.
- Aljammas, H. A., Yazji, S., & Azizieh, A. (2022).** Optimization of protease production from *Rhizomucor miehei* Rm4 isolate under solid-state fermentation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), p. 82. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00358-9>.
- Aloo, S. O., Park, S., Oyinloye, T. M., Lee, Y. W., Cho, Y. E., Park, S. J., & Oh, D. H. (2025).** Effects of liquid state vs. solid state lactic fermentation on drying, nutritional composition, phytochemical profile, and in vitro neuro-related bioactivities of Cheungsam industrial hempseed (Korean breed). *Food Bioscience*, 63, 105708. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105708>.
- Arora, N. K., Mishra, J., & Mishra, V. (Eds.). (2020).** *Microbial enzymes: roles and applications in industries* (Vol. 11). Berlin Heidelberg: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5>
- Balachandran, C., Vishali, A., Nagendran, N. A., Baskar, K., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2021).** Optimization of protease production from *Bacillus halodurans* under solid state fermentation using agrowastes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8), 4263-4269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.069>.
- Balakrishnan, M., Jeevarathinam, G., Kumar, S. K. S., Muniraj, I., & Uthandi, S. (2021).** Optimization and scale-up of α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. *BMC biotechnology*, 21(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00686-7>.

Références

- Balakrishnan, M., Jeevarathinam, G., Kumar, S. K. S., Muniraj, I., & Uthandi, S. (2021).** Optimization and scale-up of α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. *BMC Biotechnology*, 21(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00686-7>
- Barbesgaard, P., Heldt-Hansen, H. P., & Diderichsen, B. (1992).** On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 36, 569-572. <https://doi.org/10.1007/BF00183230>.
- Bauer, W. J., Badoud, R., & Löliger, J. (2010).** *Science et technologie des aliments: principes de chimie des constituants et de technologie des procédés*. Ed: Presses polytechniques et universitaires romandes. 719p.
- Benkahoul, M., Belmessikh, A., Boukhalfa, H., & Mechakra-Maza, A. (2017).** Optimisation à l'aide d'un plan d'expériences de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels. *Déchets Sciences et Techniques*, (70), 41-48. <https://doi.org/10.4267/dechets-sciences-techniques.3703>
- Bhatt, B. M., Trivedi, U. B., & Patel, K. C. (2020).** Extremophilic amylases: microbial production and applications. *Microbial enzymes: Roles and applications in industries*, 185-205. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_7.
- Bhatt, P., Ahmad, S., Joshi, S., & Bhatt, K. (2022).** Recent advancement in microbial enzymes and their industrial applications. In *Industrial applications of microbial enzymes* (pp. 1-17). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003202998-1>.
- Bhatt, P., Ahmad, S., Joshi, S., & Bhatt, K. (2023).** Recent Advancement in Microbial Enzymes and Their Industrial Applications. In P. Bhatt (Ed.), *Industrial applications of microbial enzymes* (1st ed.). CRC Press, Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1201/9781003202998-1>
- Boondaeng, A., Keabpimai, J., Trakunjae, C., Vaithanomsat, P., Srichola, P., & Niyomvong, N. (2024).** Cellulase production under solid-state fermentation by *Aspergillus sp.* IN5: Parameter optimization and application. *Helixon*, 10(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26601>.
- Braia, M., Cabezudo, I., Barrera, V. L., Anselmi, P., Meini, M.-R., & Romanini, D. (2021).** An optimization approach to the bioconversion of flour mill waste to α -amylase enzyme by *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*, 111, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.07.019>.
- Bukhari, S. I., Al-Agamy, M. H., Kelany, M. S., Al Hazani, M. R., & Hamed, M. M. (2021).** Production optimization using Plackett-Burman and Box-Behnken designs with partial characterization of amylase from marine actinomycetes. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-169538/v1>.
- Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2014).** Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 20-25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.12.002>
- Chancharoonpong, C., Hsieh, P. C., & Sheu, S. C. (2012).** Enzyme production and growth of *Aspergillus oryzae* S. on soybean koji fermentation. *Apcbee Procedia*, 2, 57-61. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.011>.
- Daba, G. M., Mostafa, F. A., & Elkhateeb, W. A. (2021).** The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00408-z>.

Références

- De la Torre, I. D., Martin-Dominguez, V. I. C. T. O. R., Acedos, M. G., Esteban, J., Santos, V. E., & Ladero, M. I. G. U. E. L. (2019).** Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 5975-5991. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09929-2>.
- De Medina-Salas, L., Giraldi-Díaz, M. R., Castillo-González, E., & Morales-Mendoza, L. E. (2020).** Valorization of orange peel waste using precomposting and vermicomposting processes. *Sustainability*, 12(18), 7626. <https://doi.org/10.3390/su12187626>.
- Duque Jaramillo, P. M., Andreaus, J., de Souza Neto, G. P., de Souza Castro, C. F., & Ferreira Filho, E. X. (2016).** The characterization of a pectin-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae* grown on passion fruit peel as the carbon source and the evaluation of its potential for industrial applications. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(2), 140-152. <https://doi.org/10.3109/10242422.2016.1168817>
- Fadel, M., AbdEl-Halim, S., Sharada, H., Yehia, A., & Ammar, M. (2020).** Production of Glucoamylase, α -amylase and Cellulase by *Aspergillus oryzae* F-923 Cultivated on Wheat Bran under Solid State Fermentation. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 23(4), 8-22. DOI: 10.9734/jabb/2020/v23i430149.
- Farooq, K., Anwar, Z., Khalid, W., Hasan, S., Afzal, F., Zafar, M., ... & Al-Maaqar, S. M. (2024).** Optimization and Detergent Compatibility of Protease Produced from *Aspergillus oryzae* by Utilizing Agro Wastes. *ACS omega*, 9(15), 17446-17457. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c00274>
- Ferrero, D., Moscato, E., Spina, F., Cavalluzzi, M. M., Rotondo, N., Oddon, S. B., ... & Varese, G. C. (2024).** The fungal alternative: Insights on medicinal mushrooms-based protein-rich biomasses by submerged fermentation of agro-industrial by-products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 95, 103721. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103721>.
- Finkler, A. T. J., Biz, A., Pitol, L. O., Medina, B. S., Luithardt, H., de Lima Luz Jr, L. F., ... & Mitchell, D. A. (2017).** Intermittent agitation contributes to uniformity across the bed during pectinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 121, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.01.011>.
- Gassara, F. (2012).** *Production économique d'enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide des déchets agroindustriels et leurs applications*. Institut National de la Recherche Scientifique (Canada).
- Gervasi, T., & Mandalari, G. (2024).** Valorization of agro-industrial orange peel by-products through fermentation strategies. *Fermentation*, 10(5), 224. <https://doi.org/10.3390/fermentation10050224>.
- Gomi, K. (2014).** *Aspergillus oryzae* (Vol. 1, pp. 92-96). Oxford, UK: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00011-2>.
- Graminha, E. B. N., Gonçalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Da Silva, R., & Gomes, E. (2008).** Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144(1-2), 1-22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.029>.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013).** A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, 2013, 329121. <https://dx.doi.org/10.1155/2013/329121>
- Haile, S., & Ayele, A. (2022).** Pectinase from microorganisms and its industrial applications. *The Scientific World Journal*, 2022(1), 1881305. <https://doi.org/10.1155/2022/1881305>

Références

- Jin, F. J., Hu, S., Wang, B. T., & Jin, L. (2021).** Advances in genetic engineering technology and its application in the industrial fungus *Aspergillus oryzae*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 644404. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.644404>.
- Ketipally, R., & Ram, M. R. (2018).** Optimization of Pectinase Production by *Aspergillus Oryzae* RR 103. *Current Agriculture Research Journal*, 06(1), 37-44. <http://dx.doi.org/10.12944/CARJ.6.1.05>
- Khamsaw, P., Lumsangkul, C., Karunaratna, A., Onsa, N. E., Kawichai, S., Chuttong, B., & Sommano, S. R. (2022).** Recovery of orange peel essential oil from 'Sai-Namphaung'tangerine fruit drop biomass and its potential use as citrus fruit postharvest diseases control. *Agriculture*, 12(5), 701. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050701>.
- Krishna, C. (2005).** Solid-state fermentation systems—an overview. *Critical reviews in biotechnology*, 25(1-2), 1-30. <https://doi.org/10.1080/07388550590925383>.
- Kumar, A., Dhiman, S., Krishan, B., Samtiya, M., Kumari, A., Pathak, N., Kumari, A., Aluko, R. E., & Dhewa, T. (2024).** Microbial enzymes and major applications in the food industry: a concise review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 6(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s43014-024-00261-5>
- Kumar, D., & Singh, V. (2020).** Bioconversion of processing waste from agro-food industries to bioethanol: creating a sustainable and circular economy. *Waste Valorisation: Waste Streams in a Circular Economy*, 161-181. <https://doi.org/10.1002/9781119502753.ch7>.
- Li, H., Pan, L., Wu, X., Liao, A., Yu, G., Hou, Y., & Huang, J. (2025).** Untargeted metabolomics reveals biochemical changes in wheat by-products during fermentation. *Food Bioscience*, 65, 106158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106158>.
- Li, L., Wang, L., Fan, W., Jiang, Y., Zhang, C., Li, J., ... & Wu, C. (2020).** The application of fermentation technology in traditional Chinese medicine: A review. *The American journal of Chinese medicine*, 48(04), 899-921. <https://doi.org/10.1142/S0192415X20500433>.
- Lima, C. A., Contato, A. G., de Oliveira, F., da Silva, S. S., Hidalgo, V. B., Irfan, M., ... & Bento, H. B. (2025).** Trends in enzyme production from Citrus by-products. *Processes*, 13(3), 766. <https://doi.org/10.3390/pr13030766>.
- López-Gómez, J. P., Manan, M. A., & Webb, C. (2020).** Solid-state fermentation of food industry wastes. In *Food Industry Wastes* (pp. 135-161). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817121-9.00007-3>.
- López-Gómez, J.P., Manan, M.A. and Webb, C. (2020)** 'Chapter 7 - Solid-state fermentation of food industry wastes', in M.R. Kosseva and C. Webb (eds) *Food Industry Wastes (Second Edition)*. Academic Press, pp. 135–161. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817121-9.00007-3>.
- Mamo, J., Getachew, P., Kuria, M. S., & Assefa, F. (2020).** Application of milk-clotting protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for Danbo cheese production. *Journal of Food Quality*, 2020, Article ID 8869010, 12 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/8869010>
- Mamo, J., Getachew, P., Kuria, M. S., & Assefa, F. (2020).** Application of milk-clotting protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for Danbo cheese production. *Journal of Food Quality*, 2020, Article ID 8869010, 12 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/8869010>

Références

- Melnichuk, N., Braia, M. J., Anselmi, P. A., Meini, M. R., & Romanini, D. (2020).** Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste Management*, 106, 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.03.025>
- Naili, B., Sahnoun, M., Bejar, S. et al.** Optimization of submerged *Aspergillus oryzae* S2 α -amylase production. *Food Sci Biotechnol* 25, 185–192 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0028-4>
- Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. (2020).** Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. *Catalysis Letters*, 151(2), 307–323. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>
- Negro, V., Ruggeri, B., Fino, D., & Tonini, D. (2017).** Life cycle assessment of orange peel waste management. *Resources, Conservation and Recycling*, 127, 148-158. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.08.014>
- Nigam, P. S. (2013).** Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, 3(3), 597-611. <https://doi.org/10.3390/biom3030597>
- Niyonzima, F. N. (2019).** Production of Microbial Industrial Enzymes. *Acta Scientific Microbiology*, 2(12), 75-89. <https://doi.org/10.31080/ASMI.2019.02.0434>
- Ortiz, G. E., Ponce-Mora, M. C., Noseda, D. G., Cazabat, G., Saravalli, C., López, M. C., Gil, G. P., Blasco, M., & Albertó, E. O. (2016).** Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(12), 1873-1886. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1873-0>
- Ousaadi, M. I., Merouane, F., Berkani, M., Almomani, F., Vasseghian, Y., & Kitouni, M. (2021).** Valorization and optimization of agro-industrial orange waste for the production of enzyme by halophilic Streptomyces sp. *Environmental Research*, 201, 111494. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111494>
- Palmer, T., Bonner, P.L.R., 2007.** Enzymes: biochemistry, biotechnology and clinical chemistry, 2nd ed. ed. Horwood, Chichester.
- Pandey, A. (2003).** Solid-state fermentation. *Biochemical engineering journal*, 13(2-3), 81-84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- Pinto, G. H. A., Sukunza, X., Olazar, M., Freire, J. T., & Freire, F. B. (2025).** Drying of orange juice waste in a mechanically stirred spouted bed. *Food and Bioproducts Processing*, 150, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.12.017>
- Radha, S., Babu, R. H., Sridevi, A., Prasad, N. B. L., & Narasimha, G. (2012).** Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation. *European Journal of Experimental Biology*, 2(5), 1517-1528.
- Ramesh, A., Harani Devi, P., Chattopadhyay, S., & Kavitha, M. (2020).** Commercial applications of microbial enzymes. In N. K. Arora, J. Mishra, & V. Mishra (Eds.), *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries* (pp. 137–184). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_6
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019).** Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>

Références

- Rehman, H. U., Baloch, A. H., & Nawaz, M. A. (2020).** Pectinase: Immobilization and Applications. A review. *Trends in Peptide and Protein Sciences*, 6, 1-6. <https://doi.org/10.22037/tpps.v6i0.33871>
- S.Radha, R. B., Sridevi, A., Prasad, N. B., & Narasimha, G. (2012).** Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for improved production of acid protease in submerged and solid state fermentation. *European Journal of Experimental Biology*, 1517-1528.
- Saranraj, P., & Stella, D. (2013).** Fungal amylase—a review. *Int. J. Microbiol. Res*, 4(2), 203-211. DOI : 10.5829/idosi.ijmr.2013.4.2.75170.
- Shah, I. J., Gami, P. N., Shukla, R. M., & Acharya, D. K. (2014).** Optimization for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using submerged fermentation technology. *Basic Research Journal of Microbiology*, 1(4), 01-10.
- Sharma, N., Rathore, M., & Sharma, M. (2012).** Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 11(3), 253–263. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9276-9>.
- Shrestha, S., Rahman, M. S., & Qin, W. (2021).** New insights in pectinase production development and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(24), 9069–9087. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11705-0>
- Singh, S. U. R. E. N. D. R. A., Sharma, V. I. N. N. I., Soni, M. L., & Das, S. H. I. P. R. A. (2011).** Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1), 486-496.
- Somadder, P. D., Trzcinski, A., Chen, G., Chow, Y., & Manan, M. A. (2025).** Fermentation of sorghum with *Aspergillus* strains: A promising and sustainable pathway to enzyme production-comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 213, 115456. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2025.115456>
- Song, P., Zhang, X., Wang, S., Xu, W., Wang, F., Fu, R., & Wei, F. (2023).** Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1236368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236368>
- Souza, P. M. D. (2010).** Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*, 41, 850-861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Souza, P. M. D., Bittencourt, M. L. D. A., Caprara, C. C., Freitas, M. D., Almeida, R. P. C. D., Silveira, D., ... & Magalhães, P. O. (2015).** A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 337-346 <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>
- Subramaniyam, R., & Vimala, R. (2012).** Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int J Sci Nat*, 3(3), 480-486.
- Sudha, A., Suganya, S., Priya, R., Mahendran, N., Janani, R., & Shankar, T. (2018).** Central composite design (ccd) for cellulase production using *aspergillusniger* isolated from kattalagarkovil, tamilnadu. 9, 24231–24237. <https://doi.org/10.24327/ijrsr.2018.0902.1622>
- Sun, Z.; Wu, Y.; Long, S.; Feng, S.; Jia, X.; Hu, Y.; Ma, M.; Liu, J.; Zeng, B.** *Aspergillus oryzae* as a Cell Factory: Research and Applications in Industrial Production. *J. Fungi* 2024, 10, 248. <https://doi.org/10.3390/jof10040248>
- Tahir, Z., Khan, M. I., Ashraf, U., Adan, I. R. D. N., & Mubarik, U. (2023).** Industrial application of orange peel waste; a review. <https://doi.org/10.47278/journal.ijab/2023.046>.

Références

- Talhi, I., Dehimat, L., Jaouani, A., Cherfia, R., Berkani, M., Almomani, F., ... & Chaouche, N. K. (2022).** Optimization of thermostable proteases production under agro-wastes solid-state fermentation by a new thermophilic *Mycothermus thermophilus* isolated from a hydrothermal spring Hammam Debagh, Algeria. *Chemosphere*, 286, 131479. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131479>.
- Tarafdar, A., Sirohi, R., Gaur, V. K., Kumar, S., Sharma, P., Varjani, S., Pandey, H. O., Sindhu, R., Madhavan, A., Rajasekharan, R., & Sim, S. J. (2021).** Engineering interventions in enzyme production: Lab to industrial scale. *Bioresour. Technol.*, 326, 124771. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124771>
- Tardiolo, G., Nicolò, M. S., Drago, C., Genovese, C., Fava, G., Gugliandolo, C., & D'Antona, N. (2023).** Orange Peel Waste as Feedstock for the Production of Glycerol-Free Biodiesel by the Microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Molecules*, 28(19), 6846. <https://doi.org/10.3390/molecules28196846>
- Uygut, M.A., Tanyildizi, M.Ş.** Optimization of Alpha-Amylase Production by *Bacillus amyloliquefaciens* Grown on Orange Peels. *Iran J Sci Technol Trans Sci* 42, 443–449 (2018). <https://doi.org/10.1007/s40995-016-0077-9>.
- Wang, L., & Yang, S. T. (2007).** Solid state fermentation and its applications. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*, 465-489. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50019-0>
- Werner J.B., Badoud R., LoligerJ. et al. (2010)** Principes de chimie des constituants et de technologie des procedes. Ed: Presses polytechniques et universitairesromandes. 719p.
- Yadav, J. S. (1988).** SSF of wheat straw with alcaliphilic *Coprinus*. Vol. 31, No. 5, 414-417 <https://doi.org/10.1002/bit.260310504>
- Yang, C., Zhang, Y., Jia, M., Qu, Q., Li, Z., Zhou, Q., ... & Shi, X. (2025).** Fermentation interactions and lipid-lowering potential of *Monascus purpureus* fermented Ginseng. *Food Bioscience*, 66, 106260. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106260>.
- Yaradoddi, J. S., Banapurmath, N. R., Ganachari, S. V., Soudagar, M. E. M., Sajjan, A. M., Kamat, S., ... & Ali, M. A. (2022).** Bio-based material from fruit waste of orange peel for industrial applications. *Journal of Materials Research and Technology*, 17, 3186-3197 <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.09.016>
- Youssef, G. A. (2011).** Physiological studies of cellulase complex enzymes of *Aspergillus oryzae* and characterization of carboxymethyl cellulase. *African Journal of Microbiology Research*, 5(11), 1311-1321. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.164>
- Zhao, G., Ding, L-L., Pan, Z-H., Kong, D-H., Hadiatullah, H., Fan, Z-C.,** Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid-state fermentation by manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae*, *Food Chemistry* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.199>

Annexes

Annexe

Annexe 1

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

- Pomme de terre 200 g
- Agar 15 g
- Glucose 20 g
- Eau distillée..... 1000 ml
- Stérilisation à l'autoclave

TCA 4% :

- TCA 4g
- Eau distillie 100ml

NaOH (0,1N) :

- NaOH 0,1N 4g
- Eau distille 1000 ml

Na₂CO₃ à 2% dans NaOH (0,1N) :

- Na₂CO₃ 2g
- NaOH..... 100ml

Tampon citrat de sodium 0,02M PH 5

- Na₂HPO₄ 0,02M..... 1,5g
- Eau distille..... 500mL
- Citrate 0,02M 1,92g
- Eau distille..... 500ml

Solution de caséine 2,5% dans le citrate de sodium à 0,02 M

- Caséine 2,5 g
- Tampon citrate de sodium 0,02M..... 100ml

Réactif de DNS :

Dissoudre 1g de DNS dans 20ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée. Ajouter 30g de tartrate double Na, K et compléter à 100 ml avec l'eau distillée sous agitation continu.

Annexe

Tampon acetate de sodium (PH 5) :

- Acétate de sodium 2,05 g
- Eau distillée 500 ml
- Acide acétique 1,45 ml
- Eau distillée 500 ml

Soude (NaOH) 2N :

- NaOH 40 g
- Eau distillée 500 ml

Tampon phosphate citrate 0.1 M pH=5

- KH_2PO_4 0.1 M 6.8043 g
- Eau distillée 500 ml
- Na_2HPO_4 0.1 M 7.098 g
- Eau distillée 500 ml

Tampon citrate de sodium 0.05 M pH= 5

- Na_2HPO_4 0.05 M 3.549g
- Eau distillée 500 ml
- Citrate 0.05 M 4.8012g
- Eau distillée 500 ml

Annexe

Annexe 2

Pectine agar :

- Pectine.....5g
- extrait de levure 2g
- peptone 4g
- glucose..... 4g
- Agar 5g
- Eau distillée.....200ml
- stérilisation à 110°C pendant 30 minutes

Eau iodée (lugol 1) :

- Iode (I₂)0,30 g
- Iodure de potassium (KI).....1,51g
- Eau distillée.....100ml

- Dissolvez 1,51g d'iodure de potassium dans une petite quantité d'eau distillée, puis incorporez 0,30g d'iode. Par la suite, complétez avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre un volume total de 100ml (n'hésitez pas à ajouter un peu plus d'iode pour garantir la dissolution complète de l'iode).

Remarque : Le rôle du KI est de solubiliser l'iode dans l'eau en formant un complexe triiodure (I₃⁻), assurant une meilleure réactivité dans les tests enzymatiques.

Preparation de milieu gélosé amidon 1% :

- Amidon soluble.....4 g
- Extrait de levure1g
- Peptone2g
- Agar 4 g
- Eau distillée.....200ml

Lugol 2 (eau iodée) :

- Iode 1g
- Iodure de potassium 2g
- Eau distillée..... 100ml

Annexe

- Dissoudre 2g d'iodure de potassium dans un peu d'eau distillée puis ajouter 1g diode
- Compléter à 100ml d'eau distillée (ajouter éventuellement un peu d'iode pour permettre la dissolution totale de l'iode).

Préparation du milieu CMC-agar:

- CMC 4 g
- Agar 4 g
- Peptone 2g
- Extrait de levure 1 g
- Eau distillé 200ml
- Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

Rouge Congo à 1% :

- Rouge Congo... 1g
- Eau distillée 100ml

– Dissoudre 0.1g de rouge Congo dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 100ml

Solution de chlorure de sodium (NaCl) 1M

- Chlorure de sodium 5.844g
- Eau distillée 100ml

Milieu lait gélosé à 20% d'agar

- Lait écrémé.....20g
- Agar.....4g
- Eau distillée.....200ml

- Dissoudre l'agar dans de l'eau distillée chaude.

- Agiter jusqu'à homogénéisation pour obtenir l'eau gélosée.

- Stériliser par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

- Ajouter le lait écrémé stérile juste avant l'utilisation du milieu.

Résumé

Ce travail de recherche a pour objectif la production d'enzymes microbiennes (α -amylase, protéase, cellulase et pectinase) à partir d'*Aspergillus oryzae*, en valorisant des déchets d'orange comme substrat. Dans un premier temps, une comparaison a été établie entre deux modes de culture: la fermentation en milieu solide (FMS) et la fermentation submergée (SmF). Les résultats ont révélé des différences notables entre les deux procédés : l'activité protéolytique était de 0,066 U/mL en FMS (2,4466 U/g) contre 0,0834 U/mL en SmF ; l'activité polygalacturonasique de 0,088 U/mL en FMS (3,293 U/g) contre 0,090 U/mL en SmF ; l'activité amylolytique de 1,15 U/mL en FMS (42,92 U/g) contre 1,7 U/mL en SmF ; et l'activité cellulase de 1,60 U/mL en FMS (59,31 U/g) contre 0,712 U/mL en SmF. Ces données ont conduit à privilégier la fermentation submergée (SmF) pour l'optimisation de la production d' α -amylase, en raison de son activité initiale plus élevée dans ce mode de culture. La seconde phase de l'étude a porté sur l'optimisation de cette production à l'aide du plan de Box-Behnken, basé sur la méthode des surfaces de réponse (RSM). Les conditions optimales déterminées étaient les suivantes : amidon (4,5 g), extrait de levure (0,05 g) et CaCl₂ (0,075 g). Dans ces conditions, une activité enzymatique validée de 6,90 UI/mL a été atteinte, en parfaite concordance avec la valeur prédictive de 6,9038 UI/mL. Cette optimisation a permis une augmentation significative de l'activité amylolytique, passant de 1,7 à 6,90 UI/mL, soit une amélioration d'environ quatre fois par rapport à l'activité initiale non optimisée. En parallèle, l'algorithme d'Essaim Particulaire (PSO) a également été appliqué à des fins d'optimisation, aboutissant aux mêmes conditions optimales. Le PSO a prédicté une activité de 6,8025 UI/mL, et la validation expérimentale a confirmé une valeur de 6,816 UI/mL. En conclusion, les deux approches d'optimisation, Box-Behnken et PSO, ont permis d'améliorer de manière significative la production d' α -amylase, avec une excellente concordance entre les prédictions théoriques et les valeurs expérimentales, démontrant ainsi leur efficacité et leur fiabilité comme outils puissants pour maximiser la production enzymatique à partir de résidus agroalimentaires.

Mots-clés : *Aspergillus oryzae*, α -Amylase, Optimisation, Box-Behnken, PSO (Particle Swarm Optimization), Fermentation submergée (SmF), Fermentation en milieu solide (FMS)

Abstract

This research aimed to produce microbial enzymes (α -amylase, protease, cellulase, and pectinase) from *Aspergillus oryzae*, using orange waste as a substrate. Initially, a comparison was made between two cultivation methods: solid-state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). The results revealed significant differences between the two processes: proteolytic activity was 0.066 U/mL in SSF (2.4466 U/g) compared to 0.0834 U/mL in SmF; polygalacturonase activity was 0.088 U/mL in SSF (3.293 U/g) versus 0.090 U/mL in SmF; amylolytic activity reached 1.15 U/mL in SSF (42.92 U/g) compared to 1.7 U/mL in SmF; and cellulolytic activity was 1.60 U/mL in SSF (59.31 U/g) versus 0.712 U/mL in SmF. Based on these data, submerged fermentation (SmF) was selected for the optimization of α -amylase production due to its higher initial enzymatic activity in this mode. The second phase of the study focused on optimizing this production using the Box-Behnken design, based on Response Surface Methodology (RSM). The optimal conditions identified were as follows: starch (4.5 g), yeast extract (0.05 g), and CaCl_2 (0.075 g). Under these conditions, a validated enzymatic activity of 6.90 U/mL was achieved, in perfect agreement with the predicted value of 6.9038 U/mL. This optimization led to a significant increase in amylolytic activity, rising from 1.7 to 6.90 U/mL—an improvement of approximately fourfold compared to the non-optimized initial activity. In parallel, the Particle Swarm Optimization (PSO) algorithm was also applied for optimization purposes and resulted in the same optimal conditions. PSO predicted an activity of 6.8025 U/mL, and experimental validation confirmed a value of 6.816 U/mL. In conclusion, both optimization approaches, Box-Behnken and PSO, significantly enhanced α -amylase production, with excellent agreement between theoretical predictions and experimental values, demonstrating their effectiveness and reliability as powerful tools for maximizing enzyme production from agro-industrial residues.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, α -Amylase, Optimization, Box-Behnken, PSO (Particle Swarm Optimization), Submerged Fermentation (SmF), Solid-State Fermentation (SSF).

الملخص

يهدف هذا البحث إلى إنتاج إنزيمات ميكروبية- α (أميلاز، بروتياز، سيليلولاز، وبكتيناز (انطلاقاً من استخدام نفاثات البرتقال كركيزة. في المرحلة الأولى، تم إجراء مقارنة بين نمطي زراعة *Aspergillus oryzae* مختلفين: التخمير في الحالة الصلبة (SSF) والتخمير المغمور (SmF). وقد أظهرت النتائج اختلافات واضحة بين النمطين: بلغ النشاط البروتوليفي 0.066 وحدة/مل في SSF (2.4466 وحدة/غ) مقابل 0.0834 وحدة/مل في SmF ، في حين بلغ نشاط البوليجالاكتوروناز 0.088 وحدة/مل في SSF (3.293 وحدة/غ) مقابل 0.090 وحدة/مل في SmF. أما النشاط الأميلازي فقد بلغ 1.15 وحدة/مل في SSF (42.92 وحدة/غ) مقابل 1.7 وحدة/مل في SmF. ونطراً لنشاطه الإنزيمي الابتدائي المرتفع. في المرحلة الثانية من الدراسة، تم تحسين إنتاج- α أميلاز باستخدام تصميم Box-Behnken المعتمد على منهجية استجابة السطح (RSM). وقد حدّدت الشروط المثلث على النحو التالي: النشا (4.5 غ)، مستخلص الخميرة (0.05 غ)، وكلوريد الكالسيوم (0.075 غ). في ظل هذه الظروف، تم التوصل إلى نشاط إنزيمي بلغ 6.90 وحدة/مل، وهو ما يتوافق تماماً مع القيمة المتوقعة البالغة 6.9038 وحدة/مل. وقد أدى هذا التحسين إلى زيادة كبيرة في النشاط الأميلازي، حيث ارتفع من 1.7 إلى 6.90 وحدة/مل، أي بما يعادل أربعة أضعاف تقريباً مقارنة بالنشاط الأولي غير المحسّن. بالتوالي، تم تطبيق خوارزمية سرب الجسيمات (PSO) لأغراض التحسين، وأدت إلى نفس الشروط المثلث، حيث توقعت PSO نشاطاً قدره 6.8025 وحدة/مل، وأكّدت التجربة القيمة المتوقعة بنتيجة بلغت 6.816 وحدة/مل. في الختام، ساهم كل من تصميم بوكس-بنهken وخوارزمية PSO في تحسين إنتاج- α أميلاز بشكل كبير، مع توافق ممتاز بين القيم النظرية والتجريبية، مما يدل على كفاءتهما وموثوقيتهما كأدوات قوية لتعظيم إنتاج الإنزيمات من المخلفات الزراعية والصناعية.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus oryzae*، أميلاز، تحسين، تصميم Box-Behnken، خوارزمية سرب الجسيمات (PSO)، التخمير المغمور (SmF)، التخمير في الحالة الصلبة (SSF).

Année universitaire : 2024-2025

Présenté par : Bensaad Aya

Abbaz Khaoula

Optimisation de la biosynthèse d' α -amylase par *Aspergillus oryzae* cultivé sur déchets d'orange : intégration du plan Box-Behnken et de modèles d'intelligence artificielle (PSO)

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Ce travail de recherche a pour objectif la production d'enzymes microbiennes (α -amylase, protéase, cellulase et pectinase) à partir d'*Aspergillus oryzae*, en valorisant des déchets d'orange comme substrat. Dans un premier temps, une comparaison a été établie entre deux modes de culture: la fermentation en milieu solide (FMS) et la fermentation submergée (SmF). Les résultats ont révélé des différences notables entre les deux procédés : l'activité protéolytique était de 0,066 U/mL en FMS (2,4466 U/g) contre 0,0834 U/mL en SmF ; l'activité polygalacturonasique de 0,088 U/mL en FMS (3,293 U/g) contre 0,090 U/mL en SmF ; l'activité amylolytique de 1,15 U/mL en FMS (42,92 U/g) contre 1,7 U/mL en SmF ; et l'activité cellulase de 1,60 U/mL en FMS (59,31 U/g) contre 0,712 U/mL en SmF. Ces données ont conduit à privilégier la fermentation submergée (SmF) pour l'optimisation de la production d' α -amylase, en raison de son activité initiale plus élevée dans ce mode de culture. La seconde phase de l'étude a porté sur l'optimisation de cette production à l'aide du plan de Box-Behnken, basé sur la méthode des surfaces de réponse (RSM). Les conditions optimales déterminées étaient les suivantes : amidon (4,5 g), extrait de levure (0,05 g) et CaCl_2 (0,075 g). Dans ces conditions, une activité enzymatique validée de 6,90 UI/mL a été atteinte, en parfaite concordance avec la valeur prédictive de 6,9038 UI/mL. Cette optimisation a permis une augmentation significative de l'activité amylolytique, passant de 1,7 à 6,90 UI/mL, soit une amélioration d'environ quatre fois par rapport à l'activité initiale non optimisée. En parallèle, l'algorithme d'Essaim Particulaire (PSO) a également été appliqué à des fins d'optimisation, aboutissant aux mêmes conditions optimales. Le PSO a prédit une activité de 6,8025 UI/mL, et la validation expérimentale a confirmé une valeur de 6,816 UI/mL.

En conclusion, les deux approches d'optimisation, Box-Behnken et PSO, ont permis d'améliorer de manière significative la production d' α -amylase, avec une excellente concordance entre les prédictions théoriques et les valeurs expérimentales, démontrant ainsi leur efficacité et leur fiabilité comme outils puissants pour maximiser la production enzymatique à partir de résidus agroalimentaires.

Mots-clefs : *Aspergillus oryzae*, α -Amylase, Optimisation, Box-Behnken, PSO (Particle Swarm Optimization), Fermentation submergée (SmF), Fermentation en milieu solide (FMS).

Laboratoires de recherche : Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Président du jury : Mme Bennamoun L. (MCA-UFM, Constantine 1).

Encadrant : Mme Dakhmouche S. (Prof - ENS Assia Djebbar, Constantine)

Co-Encadrant : Mme HABOUL A. (MCB-ENS Assia Djebbar, Constantine)

Examinateur(s) : Mme Banabdelhasid Z. (MCB-ENS Assia Djebbar, Constantine)