



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



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

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

## Amélioration de la production conjointe d' $\alpha$ -amylase et de lipase par *Aspergillus* sp. 61 à partir de déchets de fruits: Optimisation statistique par RSM

---

Présenté par : Bensalhia Ayat Errahmane

Le : 28/06/2025

Boukhedenna Amani

Jury d'évaluation :

**Présidente :** Mme Abdelaziz wided (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri)

**Encadrante :** Mme Benkahoul Malika (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri)

**Co-encadrante :** Mme Chaib Ibtissem (Docteur - U Constantine 1 Frères Mentouri)

**Examinatrice :** Mme Boucherit zeyneb (MAA - U Constantine 1 Frères Mentouri)

Année universitaire

2024 – 2025

## **Remerciements**

*Nous tenons tout d'abord à remercier **Dieu** le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*On voudrait dans un premier temps à exprimer notre profonde gratitude envers notre directrice de mémoire, **Mme BENKAHOUL MALIKA**, pour son appui continu, sa patience, sa guidance et ses précieux conseils. Son accessibilité et son accompagnement ont joué un rôle crucial dans la réussite de ce travail et de ce mémoire.*

*Elle nous a beaucoup appris sur les enjeux à surmonter dans le domaine de la microbiologie. Ainsi qu'elle a transmis son savoir et ses expériences dans ce domaine, tout en nous faisant confiance et en nous accordant une grande autonomie dans la réalisation de notre travail.*

*Nos sincères remerciements vont également envers notre co-encadrante, **Mme CHAIB IBTISSEM**, pour sa précieuse contribution, son expertise et ses conseils avisés qui ont été d'une grande aide pour la réalisation de ce mémoire.*

*On remercie également toute l'équipe pédagogique de l'université frères Mentouri de Constantine et les intervenants professionnels responsables de notre formation, pour avoir contribué au succès de notre travail.*

*Nous tenons aussi à exprimer notre profonde reconnaissance à nos chers parents, en leur adressant nos remerciements sincères, notre respect et toute notre gratitude, pour leur soutien indéfectible et leurs encouragements constants tout au long de ce parcours.*

*Enfin, nous souhaitons adresser nos sincères remerciements aux membres de **JURY ABDELAZIZ WIDED** et **BOUCHERIT ZEYNEB**, pour leur présence, ainsi que pour avoir accepté d'évaluer notre travail et de l'enrichir par leurs remarques et suggestions constructives.*

## Dédicace

*C'est avec une profonde gratitude et des mots empreints de sincérité que je dédie ce modeste mémoire à :*

*À mes chers parents, **SOFIANE** et **KARIMA**, grâce à leurs encouragements constants et leurs immenses sacrifices, Ils ont su instaurer un environnement bienveillant et favorable à notre réussite, tout en éclairant notre voie par leurs précieux conseils. Je prie Dieu de les bénir, de leur accorder bonheur et longévité, et de les protéger, tout en espérant qu'ils continueront à être fiers de moi.*

*À mes adorées sœurs, **NABIHA**, **CHAHINEZ** et **HOUDA**, pour leur soutien inconditionnel, leur affection constante et leur rôle essentiel dans mon parcours.*

*À **BOUKHEDENNA AMANI**, mon amie et mon binôme de mémoire en master que je respecte et j'aime beaucoup.*

*À mes chers amies **SADALLAH RAMLA** et **FALEK NOUSSEIBA ISRA** depuis longtemps.*

*À tous nos enseignants, Leur générosité et leur support se traduisent par l'expression de mon respect et ma considération.*

*À tous ceux qui occupent une place précieuse dans mon cœur.*

**AYA BENS**

## Dédicace

*Au nom de **Dieu**, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux,  
Je dédie ce travail à tous ceux qui m'ont soutenue tout au long de ce parcours.*

*À mon cher père, **Salim Boukhedenna** – que Dieu ait son âme – mon modèle et ma source de  
force.*

*À ma chère mère, **Zaber Nassira**, pour son amour inconditionnel et ses sacrifices silencieux.*

*À mon frère **Ayman**, mon soutien fidèle,*

*À mes sœurs **Safwa** et **Chahde**, que j'aime profondément.*

*À mon amie et binôme, **Bensalhia Ayat Errahmane**, merci pour ta présence et ton soutien  
précieux.*

*Merci à vous tous. Sans votre présence, je ne serais pas là aujourd'hui.*

**AMANI**

## Table des matières

Les abréviations.....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des tableaux .....	xi
Introduction .....	1

### Partie I : Synthèse bibliographique

#### Chapitre I : *Aspergillus* sp.

1 Généralité .....	3
2 Classification et taxonomie .....	4
3 Morphologie des <i>Aspergillus</i> sp.....	4
4 Mode de reproduction des <i>Aspergillus</i> sp. ....	5
5 Enzymes produites par les <i>Aspergillus</i> .....	5

#### Chapitre II : Enzymes

1 Généralité .....	7
2 Lipases.....	8
2.1 Généralités et historique .....	8
2.2 Définition et mécanisme d'action.....	8
2.3 Structure de lipase microbienne .....	9
2.4 Origine des lipases.....	9
2.5 Classification des réactions catalysées par les lipases .....	10
2.6 Applications industrielles .....	10
3 Amylases .....	11
3.1 Généralités et historique .....	11
3.2 $\alpha$ -Amylases .....	11
3.2.1 Définition et mécanisme d'action .....	11
3.2.2 Structure de l' $\alpha$ -amylase.....	12
3.2.3 Origine des $\alpha$ -amylases .....	13
3.2.4 Applications industrielles .....	13

### **Chapitre III : Optimisation du processus de la production enzymatique**

1	Production d'enzymes .....	15
1.1	Fermentation en milieu solide (FMS).....	15
1.2	Fermentation submergée (FML).....	15
2	Optimisation des processus de fermentation .....	16
2.1	Optimisation par la technologie de l'ADN recombinant.....	16
2.2	Optimisation des conditions de culture .....	17
2.2.1	OFAT (One Factor at a Time).....	17
2.2.2	Plan de Plackett-Burman .....	18
2.2.3	Plans factoriels complets à deux niveaux.....	18
2.2.4	Plans factoriels fractionnaires à deux niveaux .....	18
2.2.5	Plans de surfaces de réponses (RSM) .....	19
2.2.5.1	Plan composite central (CCD) .....	19
2.2.5.2	Plan de Box-Behnken (BBD).....	19
2.2.5.3	Plan de Doehlert.....	20

### **Chapitre IV : Déchets agroalimentaires**

1	Ecorces de grenade.....	21
1.1	Généralité sur les grenades ( <i>Punica granatum</i> L.) .....	21
1.2	Composition des écorces de grenade.....	22
1.3	Valorisations des écorces de grenade .....	23
2	Pelures de mandarine .....	24
2.1	Généralité sur la mandarine ( <i>Citrus reticulata</i> blanco).....	24
2.2	Composition des pelures de mandarine .....	24
2.3	Valorisation des pelures de mandarine .....	25

### **Partie II : Matériel et méthodes**

1	Repiquage des souches.....	26
2	Mise en évidence qualitative de l'activité hydrolytique.....	26
2.1	Production de la lipase.....	26

2.2	Production d' $\alpha$ -amylase .....	26
2.3	Indice enzymatique .....	27
3	Confirmation de l'activité enzymatique en milieu synthétique.....	27
4	Valorisation des déchets agroalimentaires pour la production de lipase et d' $\alpha$ -amylase en fermentation liquide .....	27
4.1	Préparation du substrat .....	27
4.2	Production de lipase et d' $\alpha$ -amylase par FML .....	27
5	Optimisation des conditions de culture pour la production de l'enzyme .....	28
5.1	Conception expérimentale selon le plan de Plackett-Burman .....	28
5.2	Plan CCD (Central Composite Design).....	30
6	Détermination de la biomasse .....	31
7	Dosage de l'activité lipolytique.....	31
8	Dosage de l'activité $\alpha$ -amylolytique .....	32

### **Partie III : Résultats et discussion**

1	Echantillon biologique .....	33
2	Mise en évidence qualitative de l'activité hydrolytique.....	33
2.1	Production de la lipase.....	34
2.2	Production d' $\alpha$ -amylase .....	35
3	Confirmation de l'activité enzymatique en milieu synthétique.....	36
4	Valorisation des déchets agroalimentaire pour la production de lipase et d' $\alpha$ -amylase en fermentation liquide .....	40
5	Optimisation des conditions de culture pour la production de l'enzyme .....	40
5.1	Conception expérimentale selon le plan de Plackett-Burman .....	40
5.1.1	Effet des facteurs testés sur la production de la biomasse .....	41
5.1.2	Effet des facteurs testés sur la production de l' $\alpha$ -amylase .....	43
5.1.3	Effet des facteurs testés sur la production de la lipase .....	46
5.2	Conception expérimentale selon le Plan Composite Central.....	46
5.2.1	Optimisation de la réponse .....	52

Conclusion générale .....	53
---------------------------	----

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## **Résumé**

## **Abstract**

## **ملخص**

## **Les abréviations**

**YPSA** : yeast extract peptone soluble starch agar.

**PDA** : potato dextrose agar.

**DNSA** : 3,5-Dinitrosalicylic acid.

**DO** : densité optique.

**AE** : activité enzymatique.

**EC** : enzyme commission numbers.

**GH-13** : glycosides hydrolases 13.

**BLA** : Biologics License Applications.

**PBD** : Plackett-Burman design.

**OFAT** : One Factor at a Time.

**CCD** : Central Composite Design.

**RSM** : Response surface method.

**BBD** : Box Behnken design.

**EFSA** : European Food Safety Authority.

**TAG** : triacylglycérols.

**XOS** : xylooligosaccharides.

**FMS** : fermentation en milieu solide.

**FML** : fermentation en milieu liquide.

**IUBMB** : International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Structure cristalline de la lipase (Fan <i>et al.</i> , 2018). .....	9
<b>Figure 2 :</b> Représentation graphique de l'action de l' $\alpha$ -amylase sur l'amidon (Visvanathan <i>et al.</i> , 2020). .....	12
<b>Figure 3 :</b> La structure de l' $\alpha$ -amylase selon le modèle du BLA (Biologics License Applications). Les trois acides du site actif sont indiqués en rouge. Vert : domaine A ; magenta : domaine B ; cyan : domaine C (Nielsen <i>et al.</i> , 1999).....	13
<b>Figure 4 :</b> Diverses parties de la plante <i>Punica granatum</i> L (A : Arbre ; B : Fleur ; C : Écorce ; D : Fruit et E : Graines) (Ge <i>et al.</i> , 2021). .....	22
<b>Figure 5 :</b> Mandarine <i>Citrus reticula</i> blanco (Usman et Fatima, 2018).....	24
<b>Figure 6 :</b> Évaluation de la production de lipase par <i>Aspergillus</i> sp. 61 (A) et <i>Aspergillus</i> sp. 12 (B) sur gélose enrichie en huile d'olive et au rouge de phénol. ....	34
<b>Figure 7 :</b> Mise en évidence de la production d'alpha amylase par la souche <i>Aspergillus</i> sp. 61 .....	35
<b>Figure 8 :</b> Résultats de la fermentation réalisée dans un milieu synthétique pour la mise en évidence de la production des enzymes par la souche <i>Aspergillus</i> sp. 12.....	37
<b>Figure 9 :</b> Résultats de la fermentation réalisée dans un milieu synthétique pour la mise en évidence de la production des enzymes par les souches <i>Aspergillus</i> sp. 61 .....	37
<b>Figure 10 :</b> Histogramme représentatif des activités enzymatiques des souches <i>Aspergillus</i> sp. 61 et <i>Aspergillus</i> sp. 12.....	38
<b>Figure 11 :</b> Droite de Henry illustrant l'effet de chacun des facteurs du plan de Plackett-Burman sur la production de la biomasse pour un niveau de test $\alpha = 0,05$ .....	43
<b>Figure 12 :</b> Diagramme de Pareto des effets normalisés illustrant l'effet de chacun des facteurs du plan de Plackett-Burman sur la production d' $\alpha$ -amylase pour un niveau de test $\alpha = 0,05$ .....	45
<b>Figure 13 :</b> Diagramme de Pareto des effets normalisés illustrant l'impact des facteurs combinés issus du plan CCD sur la production d' $\alpha$ -amylase, avec un niveau de signification de $\alpha = 5\%$ . ....	50
<b>Figure 14 :</b> Graphique de contour 2D montrant l'effet des interactions entre l'extrait de levure et le pH .....	51
<b>Figure 15 :</b> Graphiques 3D de surface de réponse représentant l'influence des interactions entre les trois facteurs significatifs ainsi que leurs niveaux optimaux sur la production d' $\alpha$ -amylase par <i>Aspergillus</i> sp. 61 .....	51

**Figure 16 :** Graphique d’optimisation de la réponse (les lignes rouges verticales représentent les niveaux actuels des facteurs ; la ligne bleue horizontale indique la valeur de la réponse associée à ces niveaux ; Y : valeur prédite de l’activité amylolytique maximale ; d : fonction de désirabilité individuelle)..... 52

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Taxonomie du genre <i>Aspergillus</i> selon NCBI. ....	4
<b>Tableau 2 :</b> Tableau représentatif des enzymes produites par quelques espèces d' <i>Aspergillus</i> ainsi que leur rôle. ....	6
<b>Tableau 3 :</b> Profil chimique de la poudre d'écorce de grenade fraîche (Kushwaha <i>et al.</i> , 2013 ; Pathak <i>et al.</i> , 2016). ....	23
<b>Tableau 4 :</b> Composition chimique des pelures de citrus <i>reticulata blanco</i> selon différentes sources. ....	25
<b>Tableau 5 :</b> La relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs. ....	29
<b>Tableau 6 :</b> Plan d'expérience de PBD pour le criblage des variables de procédé significatives influençant la production enzymatique. ....	29
<b>Tableau 7 :</b> Valeurs réelles des niveaux codés pour le plan composite central à 2 facteurs (X1 : extrait de levure, X2 : pH). ....	30
<b>Tableau 8 :</b> Matrice expérimentale du plan CCD appliquée à deux variables. ....	30
<b>Tableau 9 :</b> Observation macroscopique d' <i>Aspergillus</i> sp. 12 et <i>Aspergillus</i> sp. 61 .....	33
<b>Tableau 10 :</b> Tableau représentatif des indices enzymatiques calculés pour la souche <i>Aspergillus</i> sp. 61 et <i>Aspergillus</i> sp. 12 .....	33
<b>Tableau 11 :</b> Quantification de la biomasse, de l' $\alpha$ -amylase et de la lipase produites selon le plan de Plackett-Burman. ....	41
<b>Tableau 12 :</b> Analyse statistique des facteurs étudiés selon le plan de Plackett-Burman (PBD) pour la production de biomasse par <i>Aspergillus</i> sp. 61. ....	42
<b>Tableau 13 :</b> Analyse statistique des facteurs étudiés selon le plan de Plackett-Burman (PBD) pour la production d' $\alpha$ -amylase par <i>Aspergillus</i> sp. 61. ....	44
<b>Tableau 14 :</b> Analyse statistique des facteurs étudiés selon le plan de Plackett-Burman (PBD) pour la production de lipase par <i>Aspergillus</i> sp. 61 .....	46
<b>Tableau 15 :</b> Matrice du Plan CCD à deux facteurs comportant 11 essais, avec les activités amylolytiques mesurées et exprimées en U/ml. ....	47
<b>Tableau 16 :</b> Coefficients de régression du modèle quadratique de surface de réponse généré à partir du plan CCD pour l'optimisation de la production d' $\alpha$ -amylase par <i>Aspergillus</i> sp. 16 .....	47
<b>Tableau 17 :</b> Analyse de la variance (ANOVA) du modèle CCD appliqué à l'optimisation de la production d' $\alpha$ -amylase. ....	48

# INTRODUCTION

## Introduction

Les enzymes sont des catalyseurs polyvalents, efficaces et spécifiques, qui sont responsables des réactions chimiques se produisant dans les organismes vivants (Rao *et al.*, 2014). Depuis l'introduction de la biocatalyse, de nombreux procédés utilisant des enzymes ont été développés pour fabriquer des produits précieux notamment dans de nombreux secteurs industriels (Choi *et al.*, 2015 ; Victorino *et al.*, 2021). Elles sont produites par la plupart des organismes vivants (Sharma *et al.*, 2019). Celles d'origine microbienne sont particulièrement intéressantes pour une utilisation à grande échelle, car elles sont plus faciles à produire que celles provenant de sources végétales ou animales (Kuddus *et al.*, 2024). De plus, leur faible impact environnemental, leur efficacité et la qualité supérieure des produits obtenus, expliquent leur importante application dans plusieurs secteurs (Singh *et al.*, 2016).

D'autre part, elles sont commercialement privilégiées pour leur coût de production réduit, l'accessibilité aux matières premières, leur stabilité, la rapidité de croissance des micro-organismes et la capacité de répondre à différents besoins industriels grâce à la modification génétique (Singh *et al.*, 2016 ; Sharma *et al.*, 2019).

Les champignons ont la capacité de produire des enzymes de manière extracellulaire, ce qui facilite leur purification par des méthodes simples. On outre, la bonne stabilité de ces enzymes garantit une durée de conservation satisfaisante des produits et une conformité aux exigences du marché (El-Gendi *et al.*, 2022). Parmi ces enzymes on trouve : les amylases, les lipases, les protéases et les cellulases (Xu, 2023). Le genre *Aspergillus* constitue le principal organisme utilisé pour la production d'enzymes industrielles (Kango *et al.*, 2019). Il s'agit d'un champignon filamenteux largement répandu dans la nature. Il est capable de produire plusieurs enzymes extracellulaires, telles que les amylases, les lipases, les cellulases et les pectinases (Mojsov, 2016).

La demande en enzymes connaît une croissance continue, avec un marché mondial des enzymes industrielles ayant dépassé les 10,6 milliards de dollars aux États-Unis en 2020, ce qui reflète leur importance grandissante, notamment celles d'origine fongique (Dhevagi *et al.*, 2021). Parmi elles, les amylases occupent une place centrale en raison de leur large utilisation dans des secteurs variés tels que l'agroalimentaire, le textile, les détergents, l'industrie sucrière et dans la bioremédiation (Al-Bedak *et al.*, 2025). De même, les lipases fongiques sont employées dans de nombreuses applications industrielles, en particulier dans l'agroalimentaire, le textile, la médecine, la pharmacie, la dépollution des eaux usées ainsi que dans les produits cosmétiques et les soins personnels qui représentent un marché important

(Kumar *et al.*, 2023). Ces enzymes industrielles peuvent être obtenues en optimisant les conditions du procédé de production par des méthodes statistiques permettant d'améliorer le rendement et de produire des quantités suffisantes (Niyonzima *et al.*, 2020).

Afin de répondre aux attentes du marché industriel, il est essentiel de se conformer à des exigences prédéfinies en termes de coût, d'activité enzymatique, de rendement et de stabilité. Des méthodes statistiques telles que le plan de Plackett-Burman (PPB) et le plan composite central (PCC) ont été utilisées pour améliorer les performances des alpha amylases et des lipases fongiques notamment dans les secteurs industriels où une production à grande échelle est requise (Kadam *et al.*, 2024). Elle permet d'adapter finement les paramètres de fermentation afin de maximiser l'efficacité biologique des souches productrices et d'assurer une meilleure maîtrise du processus de production (Prajapati *et al.*, 2014 ; Dhayalan *et al.*, 2025).

L'objectif de notre étude est de sélectionner une souche pertinente pour la production de lipase et d' $\alpha$ -amylase, puis d'optimiser les conditions de production de ces deux enzymes d'intérêt industriel majeur, produites par la souche fongique *Aspergillus* sp. 61 sélectionnée par la fermentation en milieu liquide à base de déchets agroalimentaires. Cette optimisation est effectuée à l'aide de deux méthodes statistiques : le plan de Plackett-Burman et le plan composite central.

Ce travail est structuré en trois grandes parties :

La première partie est une étude bibliographique composée de quatre chapitres. Le premier chapitre porte sur les enzymes, en particulier la lipase et l' $\alpha$ -amylase. Le deuxième chapitre est consacré au genre *Aspergillus*. Le troisième chapitre traite deux déchets agroalimentaires : les écorces de grenade et les pelures de mandarine. Le dernier chapitre aborde l'optimisation du processus de production enzymatique, en particulier par la technique de l'ADN recombinant et l'amélioration des conditions de culture.

La deuxième partie est une approche expérimentale, qui vise à sélectionner la souche la plus performante pour la production de lipase et d' $\alpha$ -amylase, puis à optimiser les conditions de culture pour maximiser la production de ces deux enzymes par la souche *Aspergillus* sp. 61. La troisième partie concerne les résultats obtenus qui seront présentés et discutés. Le travail sera clos par une conclusion et des perspectives.

# **PARTIE I :**

## **Synthèse bibliographique**

# CHAPITRE I :

*Aspergillus* sp.

## 1 Généralité

Les champignons (mycètes ou fungi) sont des organismes eucaryotes, uni-cellulaire ou pluri-cellulaire (Cordova, 1998; Chabasse *et al.*, 2002). Dans la classification du monde vivant, ils constituent également un règne distinct, séparé de celui des plantes et des animaux (Chabasse *et al.*, 2002). Certains vivent en symbiose avec les plantes, d'autres parasitent les végétaux ou les animaux, tandis que certains se nourrissent de matières organiques en décomposition en tant que saprophytes (Hamoudi, 2021).

Les mycètes possèdent une remarquable capacité d'adaptation leur permettant de survivre dans des environnements hostiles. En général, ils se développent préférentiellement dans des conditions de pH légèrement acide, comprises entre 3 et 7, et à des températures optimales situées entre 20 et 30 °C. Toutefois, certaines espèces dites psychrophiles sont capables de croître à des températures très basses, inférieures à 15 °C, voire même en milieu subzéro (Bouldjedj *et al.*, 2021). Les champignons se divisent en macromycètes, visibles à l'œil nu grâce à leurs structures reproductrices développées, et en micromycètes, souvent appelés moisissures, de forme microscopique et filamenteuse ou levuriforme (Lecellier, 2013).

Le genre *Aspergillus* comprend environ 250 espèces de champignons filamenteux ubiquistes, souvent saprophytes, capables de décomposer la matière organique dans divers environnements (Krenke et Grabczak, 2011; Ancuceanu *et al.*, 2022). En 1729, Micheli fut le premier à décrire ce genre, dont le nom fait référence à la similarité entre ses structures reproductrices et l'aspergillum utilisé dans les rituels religieux (Amaiike et Keller, 2011). Cette appellation a été ultérieurement validée par Haller en 1768, puis confirmée par Fries en 1832 (Samson *et al.*, 2014). L'espèce *A. glaucus* est la référence taxonomique du genre (Samson *et al.*, 2014). Ces champignons présentent une grande variabilité morphologique et physiologique, notamment dans leurs hyphes (Krijgsheld *et al.*, 2013), dont la paroi est constituée principalement de chitine et de glucanes (St, 2021). Certaines espèces sont industrielles, comme *A. oryzae* et *A. niger*, alors que d'autres, telles que *A. fumigatus*, sont pathogènes chez les immunodéprimés (Yu, 2010).

## 2 Classification et taxonomie

La taxonomie moderne d'*Aspergillus* sp. repose principalement sur des analyses moléculaires. Ces approches ont permis une meilleure compréhension des relations phylogénétiques et conduisant à une classification plus précise (Tableau 1).

**Tableau 1 :** Taxonomie du genre *Aspergillus* selon NCBI.

<b>Domaine</b>	<i>Eukaryota</i>
Clade	<i>Opisthokonta.</i>
Royaume	<i>fungi.</i>
Sous-Royaume	<i>Dikarya.</i>
Phylum	<i>Ascomycota.</i>
Clade	<i>saccharomyceta</i>
Subphylum	<i>Pezizomycotina.</i>
Clade	<i>Leotiomyceta</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes.</i>
Sous-classe	<i>Eurotiomycetidae.</i>
Commande	<i>Eurotiales.</i>
Famille	<i>Aspergillaceae.</i>
Genre	<i>Aspegrillus</i>

## 3 Morphologie des *Aspergillus* sp.

Les *Aspergillus* possèdent un thalle constitué de filaments mycéliens hyalins, septés et régulièrement ramifiés. Leur identification repose sur l'observation des têtes aspergillaires formées de conidiophores non cloisonnés se terminant par une vésicule portant des phialides. Celles-ci produisent des conidies par un mode blastique phialidique, alignées en chaînes non ramifiées selon un ordre basipète (Chabasse *et al.*, 2002). Leurs spores sont toujours unicellulaires et présentent des formes variées. Elles peuvent être globuleuses, subglobuleuses ou elliptiques. Ils présentent une surface lisse ou ornée d'aspérités plus ou moins prononcées, et leur pigmentation diffère selon les espèces. Les phialides peuvent être fixées directement sur la vésicule, formant ainsi des têtes unisériées, ou bien être portées par de petites cellules appelées métules, donnant des têtes bisériées (Chabasse *et al.*, 2002).

Pour décrire une colonie d'*Aspergillus* sp. il est important de prendre en compte des facteurs comme l'âge de la culture, la vitesse de croissance, la température d'incubation ainsi que la nature du substrat utilisé (Thom et Raper, 1945).

#### 4 Mode de reproduction des *Aspergillus* sp.

*Aspergillus* sp. se reproduit de façon asexuée (phase anamorphe) par des conidiophores portant des conidies, et de manière sexuée (phase téléomorphe) par des ascocarpes contenant des ascospores (Dyer et O’Gorman, 2012; Krijgsheld *et al.*, 2013).

La reproduction asexuée par spores est la principale forme de propagation chez *Aspergillus* sp., (Park et Yu, 2012), facilitant une dispersion efficace des spores par le vent ou l'eau (Chi et Craven, 2013). Ce cycle comporte deux phases : la croissance, qui débute par la germination d’une conidie qui forme un réseau mycélien (Kwon *et al.*, 2010), suivie de la conidiogenèse régulée par l’expression génique, les interactions cellulaires et les signaux environnementaux (Park et Yu, 2012). Ce processus commence par la formation de tiges aériennes à partir des cellules du pied, supportant un conidiophore typique en ‘aspergillum’ avec une vésicule à son extrémité, portant les métules et les phialides qui génèrent des conidies en chaînes. Bien que la structure générale soit similaire, la morphologie des conidiophores varie selon les espèces, comme *A. nidulans* qui produit deux types de filaments, ou *A. oryzae* pouvant sporuler de manière unisére ou bisére (Dyer et O’Gorman, 2012; Chi et Craven, 2013; Krijgsheld *et al.*, 2013; Ojeda *et al.*, 2018).

La reproduction sexuée est observée dans environ 36 % des espèces d'*Aspergillus* (Ojeda *et al.*, 2018). Lors de ce mode de reproduction, les spores sexuelles, appelées ascospores, se forment dans des structures spécialisées nommées cleistothécies. À maturité, les cleistothécies se dégradent, libérant les ascospores (Dyer et O’Gorman, 2012; Ojeda *et al.*, 2018). Le cycle sexué commence par la fusion des gamètes, formant un mycélium hétérocaryotique, d’où se développent des spores méiotiques dans des structures spécialisées comme les cleistothécies ou périthèques (Pontecorvo *et al.*, 1953; Nieuwenhuis et James, 2016).

#### 5 Enzymes produites par les *Aspergillus*

Les micro-organismes sont les sources les plus courantes d'enzymes commerciales en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques, de leurs conditions de culture adaptées et de la facilité avec laquelle ils peuvent être manipulés (Suryawanshi et Pandya, 2017).

La majorité des enzymes industrielles sont produites par des souches bactériennes et fongiques telles que *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae*, en raison de leur long historique d’utilisation, de leur facilité de modification

génétique et de leur capacité à surexprimer efficacement des protéines d'intérêt en fermentation (Ravindran et Jaiswal, 2016).

Les souches d'*Aspergillus* sont largement utilisées dans la production d'enzymes (Tableau 1) en raison de leur capacité à libérer dans leur environnement divers types d'enzymes en quantité importante, telles que la lipase, l'amylase, la cellulase, l'aminopeptidase et la pectinase, dont la valeur marchande est considérable à l'échelle mondiale (Somadder *et al.*, 2025).

**Tableau 2 :** Tableau représentatif des enzymes produites par quelques espèces d'*Aspergillus* ainsi que leur rôle.

Espèces	Enzymes	Références bibliographiques
<i>A. niger</i>	$\alpha$ -galactosidase, pectinase	(Li <i>et al.</i> , 2020)
	Amylase, cellulase	(Bellaouchi <i>et al.</i> , 2021)
	Lipase	(Al-Khattaf <i>et al.</i> , 2024)
<i>A. foetidus</i>	Amylase, protéase, xylanase et pectinase.	(Ashwini et Raghavendra., 2016)
<i>A. Oryzae</i>	Cellulase	(Bárbara <i>et al.</i> , 2025)
	Métalloprotéase	(Benkahoul <i>et al.</i> , 2012)
	Lipase	(Li <i>et al.</i> , 2025)
<i>A. candidus strain MKA05</i>	Protéase	(Moussi <i>et al.</i> , 2025)
<i>A.fumigatus</i>	$\alpha$ -amylase	(Yandri <i>et al.</i> , 2023)
	$\beta$ -glucosidase	(Saroj <i>et al.</i> , 2022)
	Cellulase	(Saroj <i>et al.</i> , 2020)
<i>A. nidulans</i>	Protéase $\alpha$ -amylases	(Gnanadoss et Devi, 2015) (Sun <i>et al.</i> , 2024)
<i>A. terreus</i>	Lipase	(Mahmoud et al., 2015)
	Cellulase	(Sharma <i>et al.</i> , 2014)
<i>A. flavus</i>	Protéase	(Gnanadoss et Devi, 2015)
	Amylase	(Ahmad <i>et al.</i> , 2024)
<i>A. Awamori</i>	$\beta$ -xylosidase, $\beta$ -xylanase	(Somadder <i>et al.</i> , 2025)

# **CHAPITRE II :**

## **ENZYMES**

## 1 Généralité

À la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle, le physiologiste Italien Lazzaro Spallanzani a été le premier à observer la catalyse enzymatique en étudiant l'effet des sucs gastriques de requin sur les aliments. Par la suite, Anselme Payen et Jean-François Persoz ont découvert l'existence de la première enzyme, la diastase, en traitant un extrait aqueux de malt avec de l'éthanol (Jarrar, 2011).

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques présents dans les organismes vivants. Il s'agit de macromolécules principalement de nature protéique et chirale, ce qui signifie qu'elles ne sont pas superposables à leur image miroir et qu'elles comportent des sites actifs capables d'interagir spécifiquement avec des substrats (Hanson, 1972 ; Jarrar, 2011). Elles sont des molécules connues par leur accélération des réactions biochimiques. On distingue deux types d'enzymes impliquées dans la dégradation des substrats : les endoenzymes : produites à l'intérieur de la cellule pour dégrader les substrats solubles et les exoenzymes : synthétisées dans la cellule, mais libérées à l'extérieur à travers le mucus qui entoure la cellule (Merlin *et al.*, 2014).

Jusqu'aux années 1960, la plupart des applications commerciales dans l'industrie alimentaire utilisaient des enzymes d'origine animale et végétale, car celles-ci étaient perçues comme exemptes des risques de toxicité et de contamination associés aux enzymes microbiennes. Cependant, avec l'augmentation de la demande et les progrès de la technologie de fermentation, les enzymes microbiennes ont rapidement gagné en popularité en termes de coûts et de leurs nombreuses applications industrielles (Al-Manhel, 2018 ; Sharma et Upadhyay, 2020). Ces enzymes présentent des avantages économiques, techniques et éthiques. Elles peuvent être produites rapidement et en grande quantité dans des petites installations de production. De plus, Elles sont sécrétées extracellulairement, ce qui simplifie leur extraction et purification (Robinson, 2015).

L'année 1896 marque le véritable tournant de la technologie microbienne moderne, avec la première commercialisation de la Taka-diastase par le scientifique Japonais Jōkichi Takamine. Il s'agit d'un extrait brut d'enzymes hydrolytiques obtenu par la culture d'*Aspergillus oryzae* sur du son de blé (Ismael et Radhi, 2023). Au fil du temps, les applications des enzymes se sont diversifiées, englobant des domaines spécifiques tels que la chimie analytique et l'agro-alimentaire, faisant ainsi de l'enzymologie une discipline scientifique à part entière (Jarrar, 2011).

La commission internationale des enzymes a divisé les enzymes en six catégories principales : EC1 Oxydoréductases, EC2 Transférases, EC3 Hydrolases, EC4 Lyases, EC5 Isomérases et EC6 Ligases (Farooq *et al.*, 2021).

## 2 Lipases

### 2.1 Généralités et historique

La découverte de la lipase remonte à 1856, lorsque Claude Bernard identifia la présence de cette enzyme dans le suc pancréatique (Chandra *et al.*, 2020). Plusieurs années plus tard, en 1901, des bactéries productrices de lipases furent identifiées pour la première fois (Verma *et al.*, 2021). Puis, en 1935, la première lipase microbienne a été isolée à partir des champignons *Aspergillus flavus* et *Penicillium oxalicum* (Verma *et al.*, 2021). Enfin, en 1990, la structure de la lipase provenant de *Rhizomucor miehei* fut analysée, marquant une avancée majeure dans la compréhension de cette enzyme (John et Satoru, 2008).

### 2.2 Définition et mécanisme d'action

La lipase ou triacylglycérol acylhydrolase est une enzyme de la super-famille des sérines hydrolases, dont le nom systématique est « glycérol-ester-hydrolase » (Annette et Claude, 1985; Cordova, 1998). Elle catalyse l'hydrolyse des triglycérides à longue chaîne en acides gras libres, monoglycérides et/ou diglycérides, principalement en milieu aqueux (Barriuso *et al.*, 2020). Son activité dépend de divers facteurs environnementaux tels que la température, le pH et la pression (Chandra *et al.*, 2020). En plus de leur fonction principale, elles participent aussi à des réactions de synthèse comme l'estérification, l'intérêtérification, l'acidolyse, l'alcoololyse et l'aminolyse, lorsque les conditions favorisent ces processus non hydrolytiques (Lima *et al.*, 2019).

Selon la nomenclature enzymatique de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB), les lipases sont classées sous le numéro EC 3.1.1.3, correspondant à la dénomination officielle triacylglycérol lipase.

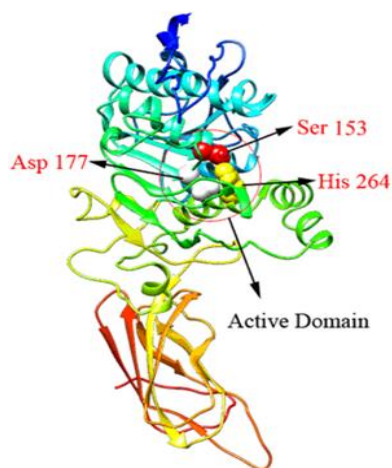
Le mécanisme des lipases comprend deux étapes essentielles : La première est l'acylation, où la sérine de la triade catalytique attaque le substrat formant un intermédiaire acyle-enzyme, la deuxième est la déacylation, où une molécule d'eau ou un monoglycéride attaque l'intermédiaire, libérant ainsi l'acide carboxylique et régénérant l'enzyme (Reis *et al.*, 2009; Nehal, 2017).

Dans des conditions où les substrats sont faiblement solubles dans l'eau, les lipases catalysent l'hydrolyse des triacylglycérols à l'interface entre les phases aqueuse et lipidique

sans cofacteur. Le site actif de l'enzyme est protégé par une structure oligopeptidique qui se réarrange pour permettre l'accès au substrat (Angajala *et al.*, 2016). L'interface lipidique joue un rôle crucial dans l'efficacité des réactions enzymatiques (Reis *et al.*, 2009).

### 2.3 Structure de lipase microbienne

Les lipases microbiennes possèdent une architecture tridimensionnelle conservée, centrée sur un repli  $\alpha/\beta$ -hydrolase, comprenant la triade catalytique (sérine, histidine et acide aspartique ou glutamique) (Figure 1) et le trou oxyanion (Fischer et Jürgen, 2003). Elles ont une structure  $\alpha/\beta$  formée de huit brins  $\beta$  parallèles torsadés en super hélice, entourés de plusieurs hélices  $\alpha$  (Debashrita *et al.*, 2024). Un couvercle spécifique permet l'exposition d'une zone hydrophobe en présence de substrat, facilitant l'accès au site catalytique (John et Satoru, 2008).



**Figure 1 :** Structure cristalline de la lipase (Fan *et al.*, 2018).

En plus de cette structure centrale, les lipases peuvent inclure des modules structuraux supplémentaires, tels que des couvercles, capuchons ou domaines N- et C-terminaux, qui jouent un rôle clé dans la mutagenèse et la modification de leurs propriétés catalytiques (Gupta *et al.*, 2015). Le site actif des lipases se trouve dans une cavité hydrophobe située au sommet de la structure en feuillet  $\beta$ , dont les caractéristiques varient selon les lipases (Casas *et al.*, 2012).

### 2.4 Origine des lipases

Les lipases sont des enzymes omniprésentes dans les organismes vivants, y compris les plantes, animaux et micro-organismes, où elles sont souvent produites sous forme de macromolécules protéiques (Fickers *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2010).

Les lipases d'origine microbienne ont occupé une place importante dans les applications industrielles, notamment en raison des coûts de production réduits et de la simplicité des manipulations. Les lipases microbiennes qui sont généralement extracellulaire, produites principalement par les champignons, les levures et les bactéries. Elles sont plus abondantes et leur production peut être facilement optimisée par modification génétique des micro-organismes (Gonçalves *et al.*, 2019) et par des méthodes statistiques (Rajendran et Thangavelu, 2007). Les lipases sont présentes chez les bactéries (Gram + et Gram -), les levures (comme *Candida* et *Geotrichum*), et les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* et *Thermomyces* (Fickers *et al.*, 2008).

## 2.5 Classification des réactions catalysées par les lipases

Les lipases permettent non seulement de réaliser des réactions d'hydrolyse, mais également des réactions d'estérification et de transestérification, y compris avec des esters peu solubles dans l'eau. Les réactions catalysées par les lipases se répartissent principalement en deux grandes catégories : l'hydrolyse et la synthèse (Reis *et al.*, 2009).

- (1) Hydrolyse : les lipases catalysent l'hydrolyse des tri-, di- et monoglycérides en acides gras et glycérol (Casas-Godoy *et al.*, 2012).
  - (2) Synthèse : les réactions de synthèse catalysées par les lipases incluent principalement l'estérification (un acide gras réagit avec un alcool pour former un ester, libérant une molécule d'eau) et la transestérification (regroupe des réactions telles que l'alcoololyse, l'acidolyse, l'aminolyse et l'intérêtérification) qui se produisent dans des conditions de faible activité en eau.
- ✓ Ces réactions se déroulent généralement dans des milieux sans solvant ou dans un solvant organique (Casas-Godoy *et al.*, 2012).

## 2.6 Applications industrielles

Les lipases sont des enzymes indispensables à de nombreuses industries, dont le marché mondial est en augmentation, notamment dans les secteurs pharmaceutiques, des biocarburants et agroalimentaire (Casas *et al.*, 2012). Elles peuvent être utilisées dans une large gamme d'applications industrielles.

Dans l'industrie alimentaire, les lipases jouent un rôle clé dans divers secteurs alimentaires, notamment dans la laiterie, la boulangerie, la brasserie, la boucherie et la poissonnerie, ainsi que dans les huileries (Annette et Claude, 1985; Casas *et al.*, 2012 ; Nehal, 2017; Chandra *et al.*, 2020; Abdelaziz *et al.*, 2025).

Dans l'industrie des détergents, les lipases sont également utilisées dans l'industrie des détergents pour l'hydrolyse des taches lipidiques et la réduction du taux de phosphates dans les produits, contribuant ainsi à la lutte contre la pollution environnementale (Annette et Claude, 1985; Casas *et al.*, 2012; Nehal, 2017; Sharma *et al.*, 2019; Chandra *et al.*, 2020).

Dans la production de biodiesel, les lipases microbiennes, notamment celles provenant de *Candida antarctica* et *Rhizomucor miehei*, sont utilisées pour convertir les huiles végétales et les graisses usagées en biodiesel. Ce processus contribue à réduire la pollution et à valoriser les déchets lipidiques (Annette et Claude, 1985; Abdelaziz *et al.*, 2025).

Dans la bioremédiation, les lipases sont également employées dans le domaine de la bioremédiation pour dégrader les polluants organiques et transformer les contaminants en substances non toxiques, contribuant ainsi à la dépollution de l'environnement (Annette et Claude, 1985; Chandra *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2023).

### 3 Amylases

#### 3.1 Généralités et historique

L'histoire des amylases a commencé en 1811, lorsqu'une enzyme qui dégrade l'amidon a été découverte par Kirchhoff dans le blé, établissant ainsi les bases de la recherche sur l'amylase. Ensuite, la première amylase a été isolée par Anselme Payen en 1833 (Tiwari *et al.*, 2015). Les amylases sont des enzymes hydrolases principales qui hydrolysent les liaisons glycosidiques dans les molécules d'amidon, produisant des dextrines et des oligosaccharides. Deux types d'amylases sont distingués : les exo-amylases qui hydrolysent l'extrémité non réductrice de l'amidon, et les endo-amylases qui hydrolysent les liaisons glycosidiques à l'intérieur de la molécule d'amidon (Farooq *et al.*, 2021).

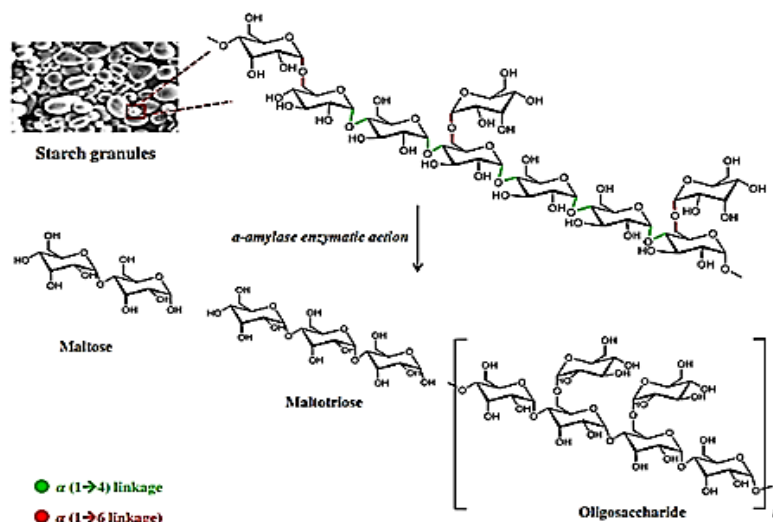
De plus, ces enzymes sont classées selon la manière dont les liaisons glycosidiques sont attaquées en trois groupes qui sont les  $\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1), les  $\beta$ -amylases (EC 3.2.1.2) et les  $\gamma$ -amylases (EC 3.2.1.3) (Tiwari *et al.*, 2015).

#### 3.2 $\alpha$ -Amylases

##### 3.2.1 Définition et mécanisme d'action

Les  $\alpha$ -amylases sont des enzymes cruciales pour la dégradation des amidons en sucres plus simples (Shad *et al.*, 2025). Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4-O-glycosidiques dans les polysaccharides, produisant des molécules de faible poids moléculaire comme le glucose, le maltose et le maltotriose. L'origine de la dénomination de l' $\alpha$ -amylase

attribué par Kuhn en 1925, provient de leur capacité à maintenir la configuration  $\alpha$ -anomérique dans les produits hydrolysés (Mobini-Dehkordi et Afzal Javan., 2012 ; Shad *et al.*, 2025). Ces enzymes agissent de manière aléatoire sur les molécules d'amidon, générant un mélange d'oligosaccharides de différentes tailles, incluant du maltose, du maltotriose, et des chaînes ramifiées de 6 à 8 unités de glucose, comportant des liaisons  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 (figure 2). Toutefois, les résidus de glucose terminaux et les liaisons  $\alpha$ -1,6 ne peuvent pas être clivés par l' $\alpha$ -amylase (Visvanathan *et al.*, 2020).

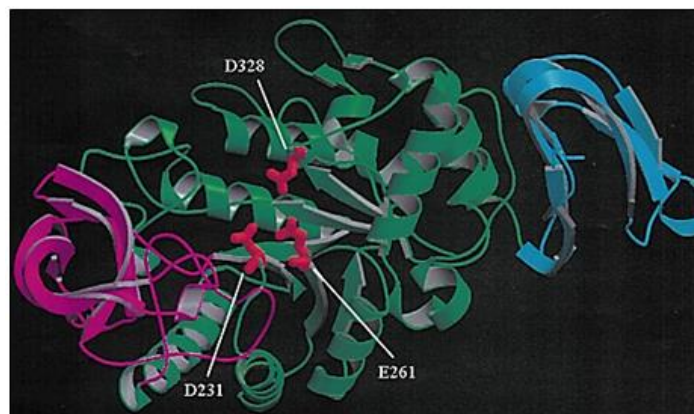


**Figure 2 :** Représentation graphique de l'action de l' $\alpha$ -amylase sur l'amidon (Visvanathan *et al.*, 2020).

### 3.2.2 Structure de l' $\alpha$ -amylase

Les  $\alpha$ -amylases appartiennent à la famille des glycosides hydrolases 13 (GH-13) (Nielsen *et al.*, 2004). Leur structure tridimensionnelle se compose généralement de trois domaines distincts (figure 3) :

- ✓ Le domaine A : un domaine de type barrette ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, largement conservé au sein de la famille. Il comporte trois résidus catalytiques invariants (Asp231-Glu261-Asp328) et des ions de calcium qui contribuent à la stabilisation du repliement protéique.
- ✓ Le domaine B : un domaine supplémentaire inséré dans le domaine A. La taille et la structure de ce domaine varient considérablement entre les différentes  $\alpha$ -amylases, ce qui explique probablement les différences de spécificité de substrat et de la stabilité observées parmi ces enzymes.
- ✓ Le domaine C : situé à l'extrémité C-terminale, ce domaine  $\beta$ -feuilleté comporte un motif de type "clé grecque" (Nielsen *et al.*, 1999 ; Ochiai *et al.*, 2014).



**Figure 3 :** La structure de l' $\alpha$ -amylase selon le modèle du BLA (Biologics License Applications). Les trois acides du site actif sont indiqués en rouge. Vert : domaine A ; magenta : domaine B ; cyan : domaine C (Nielsen *et al.*, 1999).

### 3.2.3 Origine des $\alpha$ -amylases

Les  $\alpha$ -amylases sont des enzymes présentes chez les animaux, les champignons, les plantes, ainsi que chez les bactéries et les archées (Tiwari *et al.*, 2015).

Chez les animaux, l' $\alpha$ -amylase est principalement présente dans le pancréas et les glandes salivaires, où elle participe à la digestion des glucides dans la bouche et l'intestin grêle. Chez les plantes, cette enzyme se trouve surtout dans les parties vertes, avec des concentrations maximales dans les grains et les tissus riches en amidon. (Williams, 2017 ; Singh *et al.*, 2019).

Chez les microorganismes, cette enzyme est produite par une large gamme de micro-organismes, mais pour des applications commerciales, elle est principalement dérivée du genre *Bacillus*, notamment *B. licheniformis* et *B. amyloliquefaciens* (Konsoula et Liakopoulou-Kyriakides, 2007). Par ailleurs, l' $\alpha$ -amylase est largement produite par des sources fongiques sous forme extracellulaire. Des études récentes ont confirmé la sécurité de ces enzymes issues de micro-organismes. Par exemple, une  $\alpha$ -amylase produite par la souche *Aspergillus niger* DP-Azb60 non génétiquement modifiée a été évaluée par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). Ces enzymes microbiennes offrent une activité catalytique supérieure, une meilleure stabilité et un rendement économique plus élevé par rapport aux enzymes végétales et animales, tout en étant produites en grande quantité sans sous-produits indésirables (Ünal *et al.*, 2025).

### 3.2.4 Applications industrielles

Les  $\alpha$ -amylases sont largement exploitées dans diverses industries telles que celle de l'amidon, des détergents, des boissons, du textile, du papier, ainsi que dans les secteurs alimentaires et pharmaceutiques (Gayathri et Preetha., 2025).

Dans l'industrie de l'amidon, l' $\alpha$ -amylase est utilisé dans la production des sirops de glucose et de fructose, lesquels servent d'édulcorants dans l'industrie des boissons (Ajita et Murthy., 2014). Parmi les bactéries utilisées dans l'industrie de l'amidon pour le processus de conversion on trouve : *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* et *Pyrococcus furiosus* (Mobini-Dehkordi et Afzal Javan., 2012).

Dans la fabrication de détergents enzymatiques, les  $\alpha$ -amylases sont utilisées dans la fabrication des détergents liquides pour le lavage du linge et la vaisselle automatique afin de décomposer les résidus alimentaires amylacés, tels que les pommes de terre, les sauces, la crème anglaise, le chocolat, en dextrines et autres oligo-saccharides de plus petite taille (Tauseef *et al.*, 2025).

Dans le tissage des textiles, la pâte d'amidon est utilisée lors de l'ourdissage pour renforcer les fils et améliorer la solidité des tissus. Elle permet également de réduire l'usure des fils due au frottement, aux coupures et à l'électricité statique, en rendant la surface du fil plus souple grâce à l'enroulement. Une fois le tissage est terminé, l'amidon est retiré du tissu par l'application d' $\alpha$ -amylase (Ritu *et al.*, 2017).

# **CHAPITRE III :**

## **Optimisation du processus de la production enzymatique**

## 1 Production d'enzymes

La production d'enzymes est une branche en pleine progression dans le domaine de la biotechnologie. Elle s'effectue principalement par fermentation submergée, ainsi que par fermentation en milieu solide, notamment pour les enzymes fongiques (Viniegra-González *et al.*, 2003). Afin de produire l' $\alpha$ -amylase à l'échelle commerciale, deux techniques sont employées : la fermentation submergée et la fermentation en milieu solide. La production de cette enzyme par ces méthodes a été étudiée en utilisant des sources fongiques, comme *Aspergillus fumigatus* par fermentation submergée (Sundarram et Murthy, 2014).

De plus, la production de lipase peut être effectuée par plusieurs microorganismes, notamment *Aspergillus* sp. en pratiquant la fermentation en milieu liquide et en milieu solide (Treichel *et al.*, 2009).

### 1.1 Fermentation en milieu solide (FMS)

La fermentation en milieu solide (FMS) est caractérisée par l'absence d'eau libre, tout en nécessitant un substrat suffisamment humide pour permettre la croissance microbienne (Pandey, 2003). Elle permet également de valoriser les déchets agro-industriels comme substrats, contribuant ainsi à une gestion durable des déchets solides (Maurice, 2019). Parmi les micro-organismes capables de se développer sur ces substrats, les champignons filamenteux se distinguent par leur grande aptitude à croître en absence d'eau libre (Pandey, 1992).

Les avancées en modélisation et optimisation ont permis à la fermentation en milieu solide de s'affirmer comme une approche performante pour la production de produits à haute valeur ajoutée, tels que les enzymes, les antibiotiques et les acides organiques, tout en réduisant les coûts de production (Bhargav *et al.*, 2008).

### 1.2 Fermentation submergée (FML)

La fermentation submergée (FML) est un procédé dans lequel la croissance des micro-organismes s'effectue dans un milieu liquide enrichi en nutriments, optimisé pour favoriser leur développement. Cette méthode est largement utilisée dans l'industrie pour la production d'enzymes, en raison de la facilité de contrôle des conditions de culture et de sa simplicité de mise en œuvre (Singhania *et al.*, 2010 ; Doriya *et al.*, 2016).

La FML est particulièrement adaptée aux micro-organismes comme les bactéries, qui nécessitent un taux d'humidité élevé. Elle présente également l'avantage de simplifier les

étapes de purification des produits (Subramaniyam et Vimala, 2012). La différence principale entre la FMS et la FML réside dans la nature du substrat utilisé : solide dans le cas de la FMS, et liquide dans celui de la FML (Ashok et Kumar, 2017).

## **2 Optimisation des processus de fermentation**

Pour renforcer les capacités de production microbienne et à garantir que les enzymes sont produites sous une forme facile à extraire et à purifier, il est essentiel d'optimiser les processus de fermentation. L'optimisation de ces processus est donc cruciale pour augmenter le rendement, réduire les coûts et améliorer l'efficacité globale de la production d'enzymes. Alors que la demande d'enzymes industrielles ne cesse de croître, des innovations et des optimisations permanentes seront essentielles pour y répondre à l'évolution de la demande (Klaus, 2024).

Deux approches principales sont proposées : des techniques de l'ADN recombinant et l'amélioration des conditions de culture (les plans factoriels, plan de Plackett-Burman, les méthodologies de surface de réponse, notamment le plan composite central et le plan de Box-Behnken) (Chaib *et al.*, 2025).

### **2.1 Optimisation par la technologie de l'ADN recombinant**

La technique de l'ADN recombinant, initiées par Stemmer (1994) et Arnold (1996), permet d'accélérer la sélection d'enzymes aux propriétés optimisées grâce à la sélection naturelle *in vitro* (Moore *et al.*, 2000). *Escherichia coli* est considéré comme l'organisme hôte convenable pour la production industrielle de protéines recombinantes non glycosylées grâce à sa vitesse élevée de réplication, de son coût réduit et de sa simplicité d'utilisation (Papaneophytou, 2019).

Cette technique est employée pour favoriser une production efficace d'enzymes, son application à la production d'amylase nécessite le choix d'un gène d'amylase performant, l'introduction du gène dans un vecteur adapté, et la transformation au sein d'un système bactérien efficace afin de générer une importante quantité de protéine recombinante (Gopinath *et al.*, 2017). De plus, cette technique assure la limitation du coût de l'utilisation industrielle des lipases. Une lipase adéquate est choisie pour une application précise et clonée dans un système d'expression afin de générer et purifier cette enzyme en grande quantité (Houde *et al.*, 2004).

## **2.2 Optimisation des conditions de culture**

Il est possible d'optimiser la production d'enzymes microbiennes spécifiques en ajustant les conditions de fermentation. Pour assurer la rentabilité de cette production, il est crucial d'utiliser des substrats économiques, tels que les résidus agricoles et les déchets. Ainsi, la coproduction d'enzymes ayant des applications similaires dans un même milieu de fermentation permet de réduire les coûts tout en maintenant la stabilité des enzymes (Kumar *et al.*, 2020).

Par ailleurs, la production industrielle d'enzymes comme la lipase et l' $\alpha$ -amylase par les micro-organismes dépend de plusieurs facteurs, tels que le temps d'incubation, l'agitation, le pH, la concentration de l'inoculum, la température, les sources de carbone, les ions métalliques et l'azote. L'optimisation de ces paramètres est essentielle pour maximiser le rendement enzymatique et produire des enzymes en quantités adéquates. Ces facteurs sont généralement optimisés un par un en maintenant les autres constants, et les conditions optimisées sont intégrées dans les étapes suivantes de l'expérimentation (Kumar *et al.*, 2020).

En outre, l'optimisation de la composition du milieu vise à maintenir un équilibre entre les différents éléments qui le composent, afin de contrôler la quantité de composants non utilisés à la fin de la fermentation (Ire *et al.*, 2011). Enfin, les méthodologies statistiques d'optimisation des milieux sont généralement préférées à l'amélioration des souches pour accroître le rendement (Roy et Mukherjee., 2013).

### **2.2.1 OFAT (One Factor at a Time)**

L'approche conventionnelle OFAT (One Factor at a Time), consiste à modifier un facteur à la fois tout en maintenant les autres constantes, permet d'optimiser les facteurs nutritionnels et culturels (Vishwanatha *et al.*, 2009). Bien que cette méthode soit simple à mettre en œuvre et efficace pour identifier les paramètres influençant le rendement enzymatique, elle présente des limites. En effet, elle est chronophage et ne prend pas en compte les interactions potentielles entre les différents paramètres physiques et nutritionnels (Singh *et al.*, 2011). Cette stratégie a été mise en place pour optimiser la production de lipase à partir de *Lactobacillus fermentum* (Fathi *et al.*, 2022).

De plus, une méthode d'optimisation performante doit être utilisée pour obtenir une meilleure productivité de l'amylase, la stratégie OFAT est la méthode la plus fréquemment employée pour l'optimisation des paramètres de ce processus (Saha *et al.*, 2023).

### 2.2.2 Plan de Plackett-Burman

Les approches statistiques, comme le plan de Plackett-Burman (PBD), sont des outils efficaces pour le criblage des nutriments et l'optimisation des conditions de culture. Elles permettent d'évaluer l'impact significatif des nutriments sur le taux de croissance, facilitant ainsi la compréhension des interactions entre les paramètres du processus à différents niveaux (Padmavathi, 2015). Il s'agit d'un plan expérimental factoriel à deux niveaux, conçu pour identifier les paramètres physicochimiques critiques à partir de nombre  $N$  variables, en réalisant seulement  $N+1$  expériences (Ekpenyong *et al.*, 2017).

De plus, ce plan permet de concevoir des expériences en optimisant les facteurs étudiés, sans augmenter excessivement le nombre d'expériences. Ces plans permettent d'identifier rapidement les facteurs influents, tout en restant économiques et rapides, ce qui les rend précieux pour des études complexes (Gregor *et al.*, 2024).

Le plan de Plackett-Burman a démontré son efficacité pour identifier les facteurs significatifs avec un nombre réduit d'essais expérimentaux. Il a été utilisé avec succès pour optimiser statistiquement les conditions de production d'amylase extracellulaire par une souche fongique d'*A. tubingensis* (Yahia *et al.*, 2016). Ainsi, il a été appliqué afin d'identifier de manière efficace les composants clés du milieu influençant la production de lipase par *A. niger* (Salihu *et al.*, 2013).

### 2.2.3 Plans factoriels complets à deux niveaux

Les plans factoriels complets ont été introduits par Fisher dans la première édition (1935) de son ouvrage classique sur la conception des expériences (Gunst *et al.*, 2003). Cette méthode explore systématiquement toutes les combinaisons possibles entre les niveaux des facteurs pour analyser précisément les effets principaux et les interactions. Ce qui la rend adaptée à l'optimisation des systèmes complexes (Mee, 2009). Par ailleurs, cette approche est applicable aussi bien aux variables discrètes qu'aux variables continues, ce qui renforce sa souplesse d'utilisation dans différents contextes expérimentaux (Goupy, 2006).

### 2.2.4 Plans factoriels fractionnaires à deux niveaux

Les plans factoriels fractionnaires visent à réduire le nombre d'expériences nécessaires tout en conservant l'essentiel de l'information (Gunst *et al.*, 2003). Ce type de plan permet d'identifier les effets principaux ainsi que certaines interactions à deux facteurs (Jaynes *et al.*, 2013). Contrairement aux plans factoriels complets, ils nécessitent moins d'essais pour étudier plusieurs facteurs simultanément. Cependant, ces plans conduisent à un système d'équations

sous-déterminé, traité en combinant certains coefficients sous forme de contrastes appelés alias, ce qui entraîne un chevauchement des effets factoriels (aliasing) (Li et Mee, 2003 ; Goupy, 2006).

### **2.2.5 Plans de surfaces de réponses (RSM)**

Les plans de surfaces de réponse sont des méthodes statistiques visant à modéliser et optimiser une réponse d'intérêt influencée par plusieurs variables (Montgomery, 2017). Ces plans permettent d'élaborer des modèles mathématiques quadratiques, bien adaptés aux variables continues, et sont particulièrement efficaces pour identifier des points optimaux, tels qu'un maximum ou un minimum (Goupy, 2006). Parmi les différents types de plans de surfaces de réponse, on distingue notamment le plan composite central, plan de Box-Behnken et le plan de Doehlert (Namiq *et al.*, 2024).

#### **2.2.5.1 Plan composite central (CCD)**

Ce plan a été développé par Box et Wilson en 1951. Il s'agit d'une approche expérimentale visant à identifier les conditions optimales d'un système multivariable et constitue une technique efficace d'optimisation permettant de déterminer les valeurs optimales des facteurs et d'estimer la valeur maximale ou minimale attendue pour la variable dépendante concernée (Hassaine, 2022). Le CCD a prouvé son efficacité dans la création de modèles et d'expériences, c'est une méthode puissante permettant un gain de temps et une plus grande efficacité par rapport à d'autres approches expérimentales (Chen *et al.*, 2015). Il a notamment été appliqué à la production de lipase par *Ganoderma lucidum* (Amin *et al.*, 2011), et s'avère également efficace pour améliorer la biosynthèse de l' $\alpha$ -amylase, une enzyme aux multiples applications industrielles (Elyasi *et al.*, 2020).

#### **2.2.5.2 Plan de Box-Behnken (BBD)**

Il s'agit d'un plan factoriel incomplet à trois niveaux, dans lequel les points expérimentaux sont sélectionnés de manière stratégique afin de permettre une estimation efficace des coefficients d'un modèle du second ordre (Box *et al.*, 2005).

Ce plan présente l'avantage d'exclure les combinaisons où tous les facteurs sont simultanément à leurs niveaux extrêmes, ce qui permet de limiter les risques associés à des conditions expérimentales trop sévères. Cependant, cette particularité le rend moins approprié pour étudier les réponses aux valeurs extrêmes des facteurs (Ferreira *et al.*, 2007). Ce type de plan, applicable uniquement à partir de trois facteurs, repose sur l'évaluation de chaque variable indépendante à trois niveaux codés : -1 (minimum), 0 (niveau central) et +1

(maximum), ce qui favorise une modélisation efficace des réponses (Namiq *et al.*, 2024). L'optimisation de la production d'amylase a été effectuée en utilisant le plan de Box-Behnken (Khannous *et al.*, 2014). Ainsi, ce plan a été employé pour étudier les interactions entre les composants critiques du milieu et leur impact sur la production de lipase par *Penicillium* sp. (Abdullah *et al.*, 2018).

#### **2.2.5.3 Plan de Doehlert**

Le plan de Doehlert a été développé par David H. Doehlert et présenté dans un article publié en 1970 (Cerqueira *et al.*, 2021). Il comprend  $K(K + 1) + 1$  essais, où  $K$  représente le nombre de facteurs (Namiq *et al.*, 2024). Il est caractérisé par sa flexibilité, car il permet de faire varier le nombre de niveaux selon les variables, ce qui le distingue des plans CCD et BBD. Cette propriété est particulièrement avantageuse pour accorder plus de précision à une variable importante en l'étudiant sur un plus grand nombre de niveaux (Cerqueira *et al.*, 2021). Le plan expérimental de Doehlert a été appliqué dans l'optimisation de la production d' $\alpha$ -amylase en culture submergée (Hashemi, *et al.*, 2011).

# **CHAPITRE IV :**

## **Déchets agroalimentaires**

## 1 Ecorces de grenade

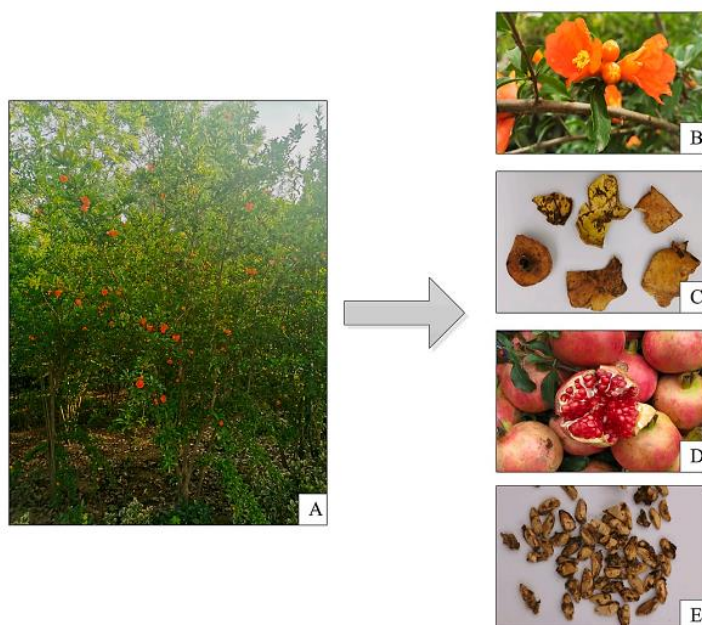
### 1.1 Généralité sur les grenades (*Punica granatum* L.)

Le *Punica granatum* L. aussi appelé « grenadier », est une plante très appréciée qui a une longue histoire. Son nom « grenade » vient du nom latin du fruit *Malum granatum*, qui signifie « pomme à grains ». Le terme générique *Punica* fait référence à Pheonicia (Carthage), suite à une hypothèse erronée concernant son origine. Depuis des siècles, la grenade et son utilisation sont profondément ancrées dans l'histoire de l'humanité, car elle a été retrouvée dans de nombreuses cultures anciennes, tant comme aliment que comme remède médical (Holland *et al.*, 2009). Il appartient à la famille des « *Punicaceae* », comprenant un seul genre « *Punica* » et deux espèces : *P. granatum* L et *P. protopunica* (Hussain *et al.*, 2021).

Il s'agit d'un arbuste qui atteint entre 3 et 8 mètres d'hauteur. Ses feuilles sont soit persistantes sous les tropiques, soit caduques dans les zones subtropicales et tempérées. Toutefois, il existe plusieurs variétés de grenades à feuilles persistantes en Inde. Ainsi, il existe également des cultivars nains qui ne dépassent pas 1,5 m. En général, le grenadier est épineux, il possède des petites feuilles étroites et oblongues, des feuilles caduques et des tiges courtes (Erkan et Kader, 2011).

Le grenadier se caractérise par des feuilles qui poussent réciproquement sur les branches fraîchement cultivées et sont incorporées aux spores, des fleurs qui sont de 1 à 5 fleurs, certaines étant terminales et d'autres marginales, courtes ou sans pédoncule, rouges et rarement jaunes ou blanches, inodores et bisexuées, des fruits de couleur rouge clair à jaune verdâtre et rarement pourpres foncés, des graines présentes dans l'arille produites en grande quantité de forme triangulaire et dépourvues d'albumine (figure 4) (Shaygannia *et al.*, 2015).

De plus, la culture du grenadier est largement répandue dans de nombreux pays tropicaux et subtropicaux, en particulier dans les régions méditerranéennes caractérisées par un climat modéré. Ainsi, les grenadiers sont très résistants aux conditions climatiques défavorables, comme les sols salins et la sécheresse (Varasteh *et al.*, 2009). En outre, la grenade a été ajoutée au catalogue « Homologie de la médecine et de l'alimentation en Chine ». Ses racines, ses fleurs, ses fruits, ses écorces, ses graines ainsi que d'autres parties de cette plante peuvent être utilisées pour leurs propriétés médicinales. Elle possède de nombreuses propriétés pharmacologiques, notamment des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antibactériennes et antivirales (Ge *et al.*, 2021).



**Figure 4 :** Diverses parties de la plante *Punica granatum* L (A : Arbre ; B : Fleur ; C : Écorce ; D : Fruit et E : Graines) (Ge *et al.*, 2021).

## 1.2 Composition des écorces de grenade

L'écorce de grenade (*P. granatum*) est un sous-produit abondamment disponible après la production de jus et d'arilles prêtes à consommer. Elle est reconnue pour sa richesse en nutriments et en antioxydants. La poudre issue de l'écorce fraîche a été analysée pour déterminer sa composition nutritionnelle présentée dans le tableau (Tableau 3) (Kushwaha *et al.*, 2013).

**Tableau 3 :** Profil chimique de la poudre d'écorce de grenade fraîche (Kushwaha *et al.*, 2013 ; Pathak *et al.*, 2016).

Composants	Unité	Teneur
Matière sèche	% p/p	30.57 ± 0.25
Extrait d'éther (graisse brute)	% p/p	2.4 ± 0.15
Protéines brutes	% p/p	3.95 ± 0.06
Extrait libre d'azote	% p/p	75.54 ± 0.32
Glucides totaux	(%)	30,5
Teneur totale en polyphénols	(mg/gm)	40.53 ± 0.26
Tannin	(%)	4,05
Cendres (matières inorganiques)	% p/p	5.49 ± 0.33
Sodium	(mg/kg)	763.66 ± 0.73
Potassium	(mg/kg)	16237.41 ± 0.96
Calcium	(mg/kg)	645.70 ± 0.88
Magnésium	(mg/kg)	1644.47 ± 0.86
Phosphore	(mg/kg)	33.96 ± 0.75
Fer	(µg/gm)	22.6 ± 0.75
Cuivre	(µg/gm)	6.2 ± 0.4
Zinc	(µg/gm)	8.03 ± 0.67
Sélénium	(µg/gm)	Non détecté
Fibre brute	% p/p	12.61 ± 0.23
Fibres neutres détergentes	% p/p	17.83 ± 0.15
Fibre détergente acide	% p/p	14.55 ± 0.07
Lignine	% p/p	4.29 ± 0.41
Vitamine A	(µg/gm)	14.06 ± 0.08

### 1.3 Valorisations des écorces de grenade

*P. granatum* L. est consommé sous forme de fruit frais ou transformée en jus. En raison d'une demande mondiale soutenue, sa production atteint environ 2 millions de tonnes. Toutefois, le rendement en jus reste relativement faible, représentant moins de la moitié du poids total du fruit. Par conséquent, l'extraction industrielle du jus de grenade génère d'importants volumes de résidus, principalement constitués de l'écorce (Roukas et Kotzekidou, 2020). Les écorces de ce fruit constituent une source riche en composés bioactifs (Pathak *et al.*, 2016), plusieurs études ont mis l'accent sur la valorisation des écorces de grenade pour produire des enzymes, des huiles essentielles, des produits alimentaires, médicaux et cosmétiques à valeur ajoutée (Barnossi *et al.*, 2020).

## 2 Pelures de mandarine

### 2.1 Généralité sur la mandarine (*Citrus reticulata blanco*)

La mandarine (Figure 5) est un arbuste à feuilles persistantes qui est considéré comme la principale culture commerciale de la famille des *Rutacées* (Musara *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2024). Elle est reconnue sous le nom systématique *Citrus reticulata blanco* (Lun *et al.*, 2018). Elles sont largement cultivées dans les régions tropicales et subtropicales à travers le monde (Musara *et al.*, 2020). Dans certains pays, elles sont appelées « tangerines », un terme désignant généralement des variétés à pigmentation plus prononcée (Mandal, 2016; Usman et Fatima, 2018). Morphologiquement, les fruits mesurent entre 5 et 8 cm de diamètre, ont une forme ronde à légèrement aplatie, une peau modérément épaisse, facilement détachable, en présentent des glandes huileuses visibles en surface (Mandal, 2016).



**Figure 5 :** Mandarine *Citrus reticula blanco* (Usman et Fatima, 2018).

### 2.2 Composition des pelures de mandarine

Les pelures de mandarine sont riches en composés bioactifs, avec plus de 150 constituants, dont des hydrocarbures terpéniques et divers composés volatils (Moussaoui, 2023). Leur composition, peut atteindre 160 composés volatils et varie selon les cultivars et l'origine géographique (Yu *et al.*, 2022). Ainsi, ces déchets constituent une source importante de métabolites secondaires bioactifs, tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes et les huiles essentielles (Li *et al.*, 2024) (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Composition chimique des pelures de citrus *reticulata blanco* selon différentes sources.

Constituants	Pourcentage	Références
Lipide	1,5%	(Dahmani <i>et al.</i> , 2020)
	7,73% - 13,58%	(Yun et Liu, 2024)
Protéine	2,16%	(Magda <i>et al.</i> , 2008)
	4,55%	(Ozlem, 2018)
	0,40%	(Dahmani <i>et al.</i> , 2020)
	4,17% - 7,90%	(Yun et Liu, 2024)
Glucide	17,71%	(Ozlem, 2018)
	7,21%	(Dahmani <i>et al.</i> , 2020)
Pectine	12,27% - 18,43%	(Yun et Liu, 2024)
Résidu minéral	4,06%	(Magda <i>et al.</i> , 2008)
	2,81% - 4,00%	(Yun et Liu, 2024)
Fibre brut	75,49%	(Magda <i>et al.</i> , 2008)
	3,32% - 5,00 %	(Yun et Liu, 2024)

### 2.3 Valorisation des pelures de mandarine

La transformation des mandarines génère d'importants déchets, qui constituent une source de pollution et leurs gestions inappropriées causent une perte économique (Yun et Liu, 2024). Pour limiter leur impact, l'industrie adopte des approches d'économie circulaire visant à valoriser ces résidus en produits à haute valeur ajoutée (Ferreira *et al.*, 2018; Kalompatsios *et al.*, 2024). En 2022, Hussien *et al.* ont démontré que ces résidus riches en composés bioactifs présentent un fort potentiel dans plusieurs secteurs. Les pelures d'agrumes possèdent en effet des propriétés antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, hypolipémiantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses et cardioprotectrices, ce qui en fait des candidates idéales pour la prévention et le traitement de nombreuses maladies (Yu *et al.*, 2022; Kalompatsios *et al.*, 2024).

Toutefois, des études ont montré que ces sous-produits, riches en composés bioactifs tels que les polysaccharides, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les enzymes, présentent un fort potentiel pour des applications biotechnologiques, notamment pour la production d'enzymes industrielles telles que les cellulases, les pectinases, les xylanases, les ligninases, les lipases et les protéases. Ainsi, des souches microbiennes ont montré leur aptitude à transformer ces déchets en enzymes de valeur par fermentation dans des milieux solides ou liquides (Lima *et al.*, 2025).

# **PARTIE II :**

## **Matériel et méthodes**

Cette étude porte sur l'évaluation de la capacité de deux souches fongiques *Aspergillus* sp. 12 et *Aspergillus* sp. 61 de produire deux enzymes d'intérêt industriel : la lipase et l' $\alpha$ -amylase. L'approche expérimentale a débuté par une évaluation qualitative de la production enzymatique. Par la suite, une quantification des activités enzymatiques a été réalisée en milieu synthétique pour identifier la souche la plus performante. Enfin, une phase d'optimisation des conditions de production a été entreprise afin d'améliorer le rendement enzymatique, en utilisant un substrat constitué d'un mélange de déchets de fruits. Un plan d'expériences de type CCD (Central Composite Design) a été appliqué afin d'approfondir l'optimisation de l' $\alpha$ -amylase. La partie expérimentale de cette étude a été réalisée dans le laboratoire de Biologie et Environnement, Bio-pôle au niveau de l'Université Constantine 1-Frères Mentouri.

## **1 Repiquage des souches**

Afin d'obtenir des cellules jeunes, les souches *Aspergillus* sp. 12 et *Aspergillus* sp. 61 ont été repiquées sur milieu PDA (Potato dextrose agar) (annexe 2). L'ensemencement a été effectué par touche centrale, suivi d'une incubation à 30 °C pendant 4 à 6 jours.

## **2 Mise en évidence qualitative de l'activité hydrolytique**

Afin d'évaluer la capacité de *Aspergillus* sp. 61 et *Aspergillus* sp. 12 de produire la lipase et l' $\alpha$  amylase, des tests sur milieux solide ont été réalisés (Annexe 2).

### **2.1 Production de la lipase**

Les deux souches ont été testées pour leur capacité à produire la lipase sur un milieu gélosé contenant l'huile d'olive et du rouge de phénol (Annexe 2), un indicateur de pH qui vire du rose au jaune lorsque l'acidification du milieu se produit, puis incubées à 30°C (Abdulmumini *et al.*, 2022). La présence d'une activité lipolytique est révélée par l'apparition d'une zone jaune autour de la colonie (Lanka *et al.*, 2015).

### **2.2 Production d' $\alpha$ -amylase**

La détection de l'activité amylolytique d'*Aspergillus* sp. 12 et *Aspergillus* sp. 61 a été réalisée sur un milieu YPSA (Yeast extract Peptone Soluble starch Agar) (annexe 2) contenant 2% d'amidon comme seule source de carbone (Lee *et al.*, 2011). Les boîtes ont été incubées à 30 °C avec un suivi quotidien. La zone d'éclaircissement révélant l'activité amylolytique a été mise en évidence après inondation des plaques avec une solution de lugol

(annexe 2) (Omemu *et al.*, 2015). Cette activité a été quantifiée par le calcul de l'indice enzymatique.

### 2.3 Indice enzymatique

L'indice d'activité enzymatique est un paramètre pratique permettant d'évaluer la capacité de production enzymatique des micro-organismes. Il est déterminé par le rapport entre le diamètre de la zone d'hydrolyse formée et celui de la colonie (Hankin et Anagnostakis, 1975). Il est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$L'indice\ enzymatique = \frac{Le\ diamètre\ de\ la\ zone\ d'hydrolyse\ (mm)}{Le\ diamètre\ de\ la\ colonie\ (mm)}$$

## 3 Confirmation de l'activité enzymatique en milieu synthétique

Pour sélectionner la souche la plus performante pour la production de la lipase et d'  $\alpha$ -amylase, des fermentations ont été réalisées en erlenmeyers contenant 50 ml d'un milieu synthétique riche en sels ( $MgSO_4$ ,  $NaNO_3$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $KCl$  et  $CaCl_2$ ) (Annexe 3) et en substrats spécifique ajoutés selon l'enzyme étudiée (l'huile d'olive pour la lipase et l'amidon pour l' $\alpha$ -amylase). Chaque erlenmeyer a été inoculé avec trois disques provenant de chaque souche fongique. Une incubation de 6 jours a été réalisée dans un incubateur agitateur à 30 °C, avec une agitation de 150 rpm conformément au protocole modifié de Bellaouchi *et al.* (2021). L'extraction de la lipase et d' $\alpha$ -amylase a été effectuée par centrifugation, suivie d'une filtration à l'aide de papier Whatman. Le surnageant obtenu a ensuite été utilisé pour les dosages enzymatiques.

## 4 Valorisation des déchets agroalimentaires pour la production de lipase et d' $\alpha$ -amylase en fermentation liquide

### 4.1 Préparation du substrat

Les écorces de mandarine et de grenade ont été collectées, séchées à l'air libre, puis broyées à l'aide d'un broyeur. La poudre obtenue a ensuite été tamisée à l'aide d'un tamis de diamètre inférieur à 1 mm, afin d'obtenir une poudre homogène.

### 4.2 Production de lipase et d' $\alpha$ -amylase par FML

Une fermentation liquide a été menée en utilisant deux types de déchets agro-alimentaires (pelures de mandarine et écorces de grenade) comme une source de carbone (annexe 3). Le milieu de culture a été préparé dans un erlenmeyer contenant 50 ml d'un

mélange composé de volumes égaux de filtrat de pelures de mandarine, filtrat d'écorces de grenade et d'eau distillée. Après la stérilisation par autoclavage, le milieu a étéensemencé avec trois disques de la souche d'*Aspergillus* sp. 61. L'incubation a été réalisée à 30 °C pendant 7 jours, sous agitation à 200 rpm. Après incubation, une centrifugation a été effectuée, suivi d'une filtration en utilisant le papier Whatman. Le surnageant ainsi obtenu a été considéré comme l'extrait brut pour le dosage enzymatique.

## 5 Optimisation des conditions de culture pour la production de l'enzyme

Les méthodes classiques d'optimisation, telles que les plans factoriels complets et la méthode « un facteur à la fois » (OFAT), nécessitent un grand nombre d'expériences, ce qui engendre des coûts élevés et allonge la durée d'analyse (Montgomery, 2017). La méthode Plackett-Burman a été retenue dans cette étude en raison de son faible coût expérimental et de sa capacité à réduire significativement le nombre d'expériences tout en identifiant efficacement les effets principaux (Plackett et Burman, 1946). Elle facilite la détection rapide des facteurs clés et l'évaluation de la stabilité des résultats face aux variations expérimentales, bien qu'elle ne permette pas d'analyser les interactions entre facteurs (Vanaja et Shobha, 2007 ; Comité des méthodes analytiques, 2013).

### 5.1 Conception expérimentale selon le plan de Plackett-Burman

Les plans PBD permettent l'étude de  $N - 1$  facteurs à l'aide de  $N$  expériences, où  $N$  est un multiple de 4 compris entre 4 et 100 (Plackett et Burman, 1946). Dans cette étude, un plan expérimental comportant 8 expériences et 7 facteurs (dont 5 facteurs réels et 2 facteurs fictifs servant à l'estimation de l'erreur expérimentale). Chaque facteur est testé à deux niveaux : un niveau supérieur (+) et un niveau inférieur (-). L'ensemble des facteurs étudiés ainsi que leurs niveaux respectifs sont présentés dans le Tableau 5. La matrice utilisée est présentée dans le Tableau 6, Chaque ligne de la matrice représente une expérience, tandis que chaque colonne correspond à un facteur. Les facteurs  $X_4$  et  $X_6$  ont été désignés comme facteurs d'erreur, utilisés pour évaluer l'erreur expérimentale. Les facteurs réels étudiés sont  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_5$  et  $X_7$ .

**Tableau 5 :** La relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs.

Facteurs	Niveau inférieur (-1)	Niveau supérieur (+1)
<b>X<sub>1</sub> : Huile d'olive (ml)</b>	2%	4%
<b>X<sub>2</sub> : Amidon (g)</b>	2%	4%
<b>X<sub>3</sub> : Extrait de levure (g)</b>	1%	2%
<b>X<sub>4</sub> : Erreur</b>	-	-
<b>X<sub>5</sub> : pH</b>	4,5	5,5
<b>X<sub>6</sub> : Erreur</b>	-	-
<b>X<sub>7</sub> : Sels (g)</b>	Absence	Présence

Dans un plan factoriel  $2^k$ , les résultats expérimentaux sont souvent mieux représentés par un modèle de régression, plus intuitif que ceux basés sur les effets ou les moyennes. Ce modèle relie la réponse à des variables codées, qui normalisent les niveaux naturels des facteurs en +1 pour le niveau haut et -1 pour le niveau bas. Les coefficients du modèle correspondent à la moitié des effets mesurés, car ils traduisent un changement unitaire sur cette échelle codée (Montgomery, 2017). Dans notre étude, chaque facteur a été codé selon ce principe : par exemple, l'huile d'olive ( $X_1$ ) correspond à -1 pour 2 % ml et +1 pour 4 % ml, l'amidon ( $X_2$ ) à -1 pour 2 % g et +1 pour 4 % g, le pH ( $X_5$ ) à -1 pour 4,5 et +1 pour 5,5, etc. Ce codage facilite l'intégration directe des facteurs dans le modèle de régression.

**Tableau 6 :** Plan d'expérience de PBD pour le criblage des variables de procédé significatives influençant la production enzymatique.

N° d'essai	Facteurs						
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

( $X_1$  : huile d'olive,  $X_2$  : amidon,  $X_3$  : extrait de levure,  $X_4$  : erreurs,  $X_5$  : pH,  $X_6$  : erreurs,  $X_7$  : les sels). (Niveau supérieur : +1 ; Niveau inférieur : -1).

Le logiciel d'analyse statistique Minitab a été utilisé pour traiter la matrice de Plackett-Burman afin d'identifier les variables exerçant un effet significatif, positif ou négatif, sur la production de lipase, d' $\alpha$ -amylase et de la biomasse.

La probabilité minimale de signification  $\geq 95\%$  pour la production d' $\alpha$ -amylase.

Pour la lipase, les facteurs étudiés n'ont pas montrés une influence sur la production enzymatique, ce qui signifie que le modèle n'a pas été représentatif pour cette enzyme.

## 5.2 Plan CCD (Central Composite Design)

Un plan CCD (Central Composite Design) a été mis en œuvre pour compléter l'analyse initiale portant sur la production d' $\alpha$ -amylase. Cette approche a permis d'optimiser la réponse et de déterminer avec précision les variables optimales influençant la production de cette enzyme.

Parmi les facteurs identifiés à l'aide du plan de PBD, deux variables significatives : l'extrait de levure ( $X_1$ ) et le pH ( $X_2$ ), ont été sélectionnées pour une étude approfondie à l'aide du plan CCD, avec cinq niveaux codés :  $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$  et  $+\alpha$ . La valeur ( $\alpha = 1,414$ ) a été choisie afin d'assurer une bonne qualité de distribution des points expérimentaux (Tableau 7).

**Tableau 7 :** Valeurs réelles des niveaux codés pour le plan composite central à 2 facteurs ( $X_1$  : extrait de levure,  $X_2$  : pH).

Facteurs	Niveau				
	$-\alpha$ (-1,414)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,414)
$X_1$ (%)	0,58	1	2	3	3,41
$X_2$	4,08	4,5	5,5	6,5	6,91

Au total, 11 essais ont été réalisés dans le but de déterminer les niveaux optimaux de ces deux facteurs en vue de maximiser la production d' $\alpha$ -amylase (Tableau 8).

**Tableau 8 :** Matrice expérimentale du plan CCD appliquée à deux variables.

N° d'essai	$X_1$	$X_2$
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	$-\alpha$	0
6	$+\alpha$	0
7	0	$-\alpha$
8	0	$+\alpha$
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Le CCD est un plan de surface de réponse qui en plus des facteurs à trois niveaux, intègre des points axiaux ou étoiles, généralement (notés  $\alpha$ ). L'ajout de ces points porte le nombre total de niveaux à cinq, ce qui confère au plan expérimental une plus grande

flexibilité et une meilleure capacité à modéliser des relations non linéaires entre les variables (Olawoye, 2016).

Pour déterminer la valeur des points axiaux, il faut d'abord calculer le paramètre  $\alpha$  (alpha), défini par la formule :

$$\alpha = 2^{\left(\frac{k}{4}\right)}$$

Où  $k$  : est le nombre de facteurs

Les points axiaux sont calculés à partir de la moyenne des niveaux supérieur et inférieur, en ajoutant ou en soustrayant  $\alpha$  fois la moitié de l'intervalle (la plage) entre ces niveaux. La formule générale est : Point axial = moyenne des niveaux supérieur et inférieur  $\pm \alpha \times$  (intervalle entre le niveau supérieur et le niveau inférieur divisé par 2)

$$\text{Point axial} = X \pm \alpha \times (\text{Intervalle} / 2)$$

X est la moyenne entre le niveau supérieur et le niveau inférieur,  $\alpha$  est le coefficient axial, Intervalle est la différence entre le niveau supérieur et le niveau inférieur.

Pour étudier l'influence des variables et modéliser la réponse sous forme d'équation, le logiciel Minitab version 19 a été utilisé pour réaliser une intégration matricielle. L'analyse statistique de la réponse Y a porté sur la recherche de valeurs optimales ou l'ajustement d'un paramètre spécifique. Ensuite, les données ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) afin d'extraire plusieurs indicateurs clés, tels que la valeur de F (reflétant la significativité globale du modèle), la valeur p, la valeur de F liée au manque d'ajustement, ainsi que le coefficient de détermination  $R^2$ , qui mesure la qualité de l'ajustement du modèle de régression

## 6 Détermination de la biomasse

Le poids sec de la biomasse est déterminé à la fin des fermentations, après centrifugation et filtration sur papier Whatman. La biomasse est ensuite séchée dans une étuve réglée à 40 °C jusqu'à poids constant.

## 7 Dosage de l'activité lipolytique

L'activité lipolytique a été déterminée selon la méthode décrite par Burkert *et al.* (2004), avec quelques modifications. Une émulsion stable a été préparée en homogénéisant un mélange de 25 ml d'huile d'olive et de 75 ml de solution de gomme arabique à 7 % (Annexe 4) par agitation à 500 rpm pendant 5 minutes. Cette émulsion a été utilisée comme substrat pour le dosage. Un volume de 5 ml de cette émulsion a été ajouté à un milieu réactionnel

constitué de 2 ml de tampon phosphate 0,01 N (pH 7) et de 1 ml d'extrait enzymatique. L'incubation a été réalisée à 37 °C pendant 30 minutes dans un agitateur-incubateur. La réaction enzymatique a été arrêtée par l'ajout de 15 ml d'un mélange éthanol/acétone, suivi de l'addition de quatre gouttes de phénolphtaléine à 1 % (Annexe 4) dans chaque erlenmeyer. Le dosage est effectué par titration en utilisant du NaOH 0,05 N (Annexe 4). Le point d'équivalence ( $V_{\text{NaOH}}$ ) est déterminé par la variation de couleur de l'indicateur permettant de calculer l'activité lipolytique.

## **8 Dosage de l'activité $\alpha$ -amylolytique**



L'activité  $\alpha$ -amylolytique a été déterminée selon la méthode de Bernfeld (1955), basée sur l'utilisation de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS). Un volume de 500  $\mu\text{L}$  d'extrait enzymatique a été incubé avec 500  $\mu\text{L}$  d'une solution d'amidon à 1%, dissoute dans un tampon phosphate 0,05 M (pH 5) (Annexe 4), à 40 °C pendant 30 minutes. La réaction enzymatique a été stoppée par l'ajout de 1 ml de réactif DNS, suivie d'un chauffage au bain-marie bouillant (100 °C) pendant 10 minutes. Le mélange a ensuite été rapidement refroidi dans un bain de glace, puis complété avec 10 ml d'eau distillée. L'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour calculer l'activité  $\alpha$ -amylolytique, une courbe d'étalonnage de maltose a été utilisée pour convertir les absorbances obtenues en concentration (Annexe 4).

# **PARTIE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

## 1 Echantillon biologique

Après une incubation à 30 °C pendant 4 jours, une colonie jeune a été obtenue pour chaque souche (Tableau 9).

**Tableau 9 :** Observation macroscopique d'*Aspergillus* sp. 12 et *Aspergillus* sp. 61

Souche	Observation	Description
<i>Aspergillus</i> sp. 61		Après l'incubation, la souche a montré un développement rapide, se manifestant par l'apparition d'une colonie poudreuse de couleur blanche.
<i>Aspergillus</i> sp. 12		Après l'incubation, la souche a montré une croissance rapide, caractérisée par l'apparition d'une colonie de texture poudreuse et d'un thalle blanc. Ainsi que des spores noires et denses ont progressivement commencé à se développer.

Dans le cadre de cette étude, les souches *Aspergillus* sp. 61 et *Aspergillus* sp. 12 sont testés pour leur potentiel en production de quelques hydrolases à savoir, l'amylase et la lipase.

## 2 Mise en évidence qualitative de l'activité hydrolytique

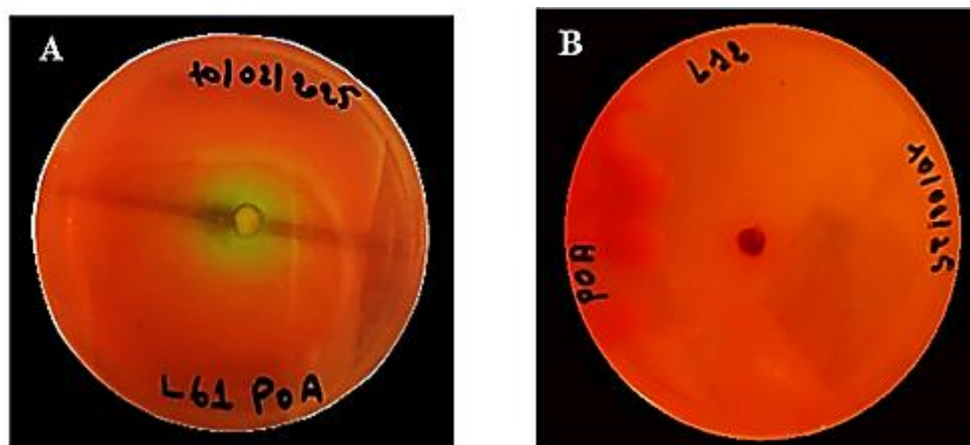
Le tableau suivant montre les indices enzymatiques calculés :

**Tableau 10 :** Tableau représentatif des indices enzymatiques calculés pour la souche *Aspergillus* sp. 61 et *Aspergillus* sp. 12

	<i>Aspergillus</i> sp. 61	<i>Aspergillus</i> sp. 12
Lipase	3,75	/
$\alpha$ -amylase	1,38	/

## 2.1 Production de la lipase

La mise en évidence de la présence de la lipase a été effectuée sur un milieu gélosé additionné de l'huile d'olive et en rouge de phénol comme indicateur de pH. L'observation sur boîte (figures 6) a révélé que la souche *Aspergillus* sp. 61 est capable d'hydrolyser les lipides, comme en témoigne l'apparition d'un halo jaune autour de la colonie, mesurant 30 mm de diamètre. Ainsi, l'indice lipolytique correspondant est estimé à 3,75 confirmant ainsi le potentiel de cette souche à produire la lipase. En revanche, *Aspergillus* sp. 12 n'a présenté aucune zone d'hydrolyse, ce qui reflète l'absence de l'activité lipolytique et donc l'incapacité de cette souche à produire la lipase.



**Figure 6 :** Évaluation de la production de lipase par *Aspergillus* sp. 61 (A) et *Aspergillus* sp. 12 (B) sur gélose enrichie en huile d'olive et au rouge de phénol.

Le milieu gélosé à l'huile d'olive et au rouge de phénol, permet la détection de l'activité lipolytique. Le rouge de phénol est un indicateur de pH dont la couleur est rose à un pH de 7,3 à 7,4. Lorsque le pH diminue progressivement vers 7,0-7,1, la couleur vire au jaune. Ce changement est provoqué par l'hydrolyse des lipides, libérant des acides gras qui entraînent une acidification locale du milieu. Ce phénomène, connu sous le nom de lipolyse, résulte de la dégradation des triacylglycérols. Ainsi, l'apparition d'une zone jaune autour des colonies, souvent accompagnée d'une clairance dans la gélose, constitue un indicateur visuel de la présence d'une activité lipolytique. L'intensité de cette activité est ensuite évaluée par la mesure du diamètre de la zone de dégradation formée autour des colonies (Lee *et al.*, 2015 ; Kareem *et al.*, 2017 ; Toon *et al.*, 2023).

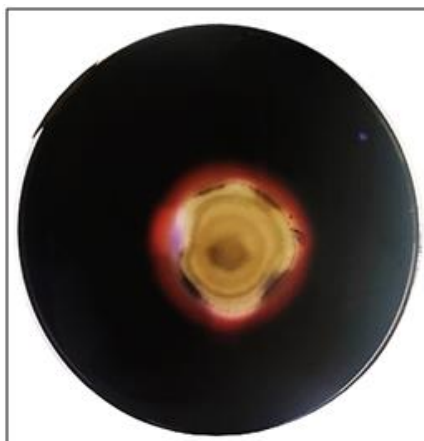
Un résultat similaire a été rapporté par Triyaswati et Ilmi. (2020) qui ont évalué la production de lipase chez *Aspergillus aculeatus* sur un milieu solide contenant du rouge de phénol et de l'huile d'olive. Le virage de la couleur du milieu, passant du rouge au jaune, indiquant une

activité enzymatique, avec un indice mesuré de  $1,44 \pm 0,007$ . Une autre étude, menée par Kulkarni *et al.* (2021), a permis d'isoler trente souches fongiques à partir d'un sol contaminé, pour évaluer leur capacité à produire la lipase sur un milieu gélosé à l'huile d'olive et au rouge de phénol. Vingt isolats ont montré une activité lipolytique positive. Parmi eux, les cinq souches les plus performantes ont été identifiées comme appartenant aux genres *Aspergillus*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Peciliomyces* et *Penicillium*.

Abdulummini *et al.* (2022), ont isolé six espèces fongiques, parmi lesquelles *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* et *Mucor* sp. qui ont montré une capacité variable à produire la lipase. L'activité enzymatique a été révélée par la formation de zones de clairance autour des colonies, accompagnées d'un précipité de cristaux de calcium. Parmi ces isolats, *A. niger* a présenté l'activité lipolytique la plus élevée.

## 2.2 Production d' $\alpha$ -amylase

Les résultats obtenus concernant la production amylolytique (figure 7) révèlent que la souche *Aspergillus* sp. 61 est capable de dégrader l'amidon, comme l'indique une zone claire autour de la colonie, avec un indice amylolytique de 1,38, cette souche s'est révélée apte à produire l' $\alpha$ -amylase. Contrairement à la souche *Aspergillus* sp. 12 qui n'a pas présenté de résultat significatif. Sur cette base, *Aspergillus* sp. 61 a été retenue pour la suite du travail.



**Figure 7 :** Mise en évidence de la production d'alpha amylase par la souche *Aspergillus* sp. 61

L'hydrolyse de l'amidon a été évaluée de manière qualitative par observation visuelle, après inondation des plaques de culture avec une solution d'iode. En présence d'amidon non hydrolysé, une coloration bleu-noir apparaît, due à la formation d'un complexe entre l'iode et l'amidon. En revanche, lorsque l' $\alpha$ -amylase produite par les isolats fongiques dégrade l'amidon, cette dernière ne peut plus interagir avec l'iode, ce qui empêche la formation de la couleur caractéristique. Ainsi, des zones claires (halos) apparaissent autour des colonies,

indiquant une hydrolyse effective de l'amidon. Ces zones ont été mesurées et corrélées à la quantité d' $\alpha$ -amylase produite (Abalaka et Adetunji, 2017 ; Hon *et al.*, 2024).

Une étude menée par Hon *et al.* (2024) a montré que trois espèces de champignons *Aspergillus flavus*, *A. niger* et *A. fumigatus* présentent une activité amylolytique positive, illustrée par l'apparition d'halo autour des colonies après l'application de la solution d'iode. Ces zones claires traduisent l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase produite par les souches, ce qui confirme leur capacité à synthétiser cette enzyme.

Usman *et al.* (2023) ont évalué la production d'amylase chez six isolats d'*A. niger* prélevés sur différents fruits. Les résultats ont montré une activité amylolytique positive pour l'ensemble des isolats. L'isolat provenant de la banane a présenté la plus grande zone d'hydrolyse, indiquant une capacité élevée à produire l'amylase sur gélose à l'amidon, et révélant ainsi son potentiel supérieur pour la production enzymatique. Olakusehin et Oyediji (2022) ont mené une étude au cours de laquelle six souches de champignons morphologiquement distinctes ont été criblées pour leur capacité à produire de l' $\alpha$ -amylase à l'aide du test d'hydrolyse sur gélose à l'amidon. Parmi elles, la souche *Aspergillus* sp. 1, qui a généré la plus grande zone de clairance, a été identifiée comme celle présentant la plus forte capacité de production enzymatique. En effet, ce résultat confirme d'avantage que beaucoup d'espèces appartenant à ce genre sont capable de produire une amylase sur une gélose à l'amidon comme c'est le cas dans notre étude.

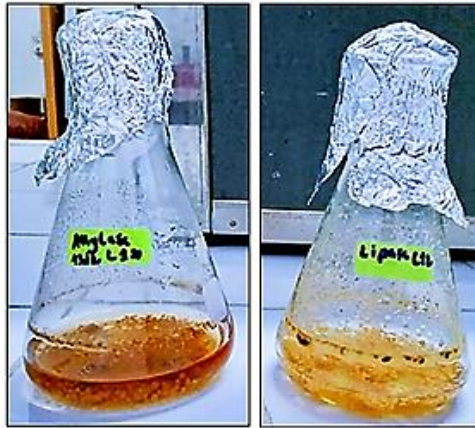
Ogbonna *et al.* (2014) ont évalué la production d'amylase chez trois isolats qui sont *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp et *Chrysosporium* sp en utilisant la méthode de la plaque d'amidon. Après traitement au mélange iodé (KI/I<sub>2</sub>), une zone claire d'hydrolyse de l'amidon est apparue dans les boîtes de Pétri. Cette analyse préliminaire a révélé que les trois isolats étaient capables de produire de l'amylase.

La comparaison de ces études avec nos résultats montre une concordance avec les observations faites pour la souche *Aspergillus* sp. 61, tandis qu'elle contraste avec les données obtenues pour la souche *Aspergillus* sp. 12.

### 3 Confirmation de l'activité enzymatique en milieu synthétique

Pour vérifier et évaluer la capacité oui ou non des deux souches à produire la lipase et l' $\alpha$ -amylase, une fermentation sur milieu synthétique a été réalisée dans des erlenmeyers contenant des milieux dont la composition est spécifique pour chaque enzyme. Après l'incubation une croissance a été observée :

- La formation de pellets, ainsi qu'une pigmentation du milieu chez la souche *Aspergillus sp. 12* (figure 8).



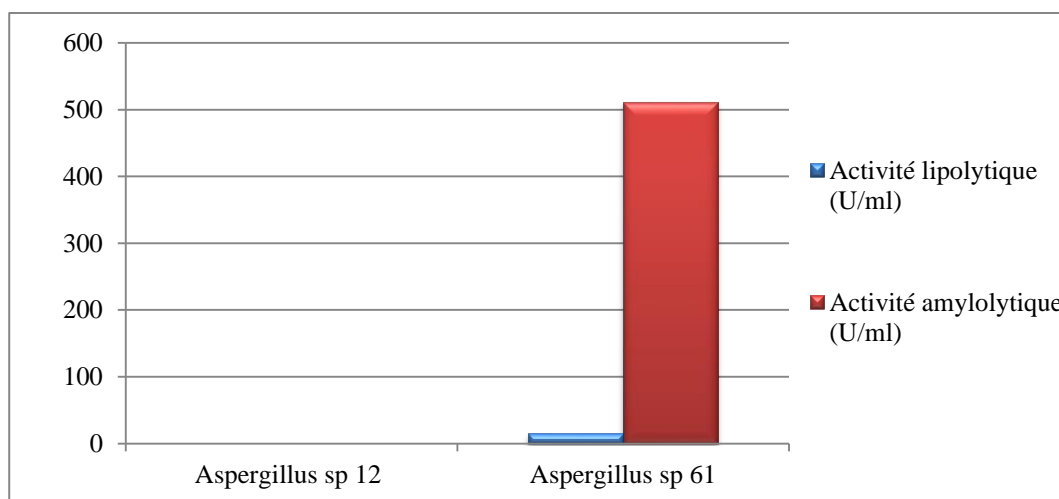
**Figure 8 :** Résultats de la fermentation réalisée dans un milieu synthétique pour la mise en évidence de la production des enzymes par la souche *Aspergillus sp. 12*

- Une agrégation du mycélium, formant une colonie compacte chez la souche *Aspergillus sp. 61* (figure 9).



**Figure 9 :** Résultats de la fermentation réalisée dans un milieu synthétique pour la mise en évidence de la production des enzymes par les souches *Aspergillus sp. 61*

- Ainsi, le contenu de chaque erlenmeyer a été filtré afin d'obtenir un filtrat susceptible de contenir l'enzyme. Par la suite, un dosage a été effectué et l'activité a été mesurée pour chaque enzyme, les résultats obtenus sont montrés dans le graphique ci-dessous :



**Figure 10 :** Histogramme représentatif des activités enzymatiques des souches *Aspergillus* sp. 61 et *Aspergillus* sp. 12

### ➤ Activité lipolytique

La mesure de l'activité lipolytique a été réalisée par la méthode de titration, où le changement de couleur et sa stabilité indique le point d'équivalence ( $V_{eq}$  NaOH). Les résultats obtenus montrent que la souche *Aspergillus* sp. 12 n'a pas produit de la lipase, tandis que la souche *Aspergillus* sp. 61 a révélé une activité lipolytique (15,58 U/ml) confirmant les résultats déjà observés sur boîtes.

Une étude réalisée par Mejía *et al.* (2024) a évalué la capacité de neuf souches fongiques à produire la lipase par fermentation submergée, en utilisant un milieu synthétique contenant du  $KH_2PO_4$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ , NaCl,  $CaCl_2$ , de l'extrait de levure, la peptone et de l'huile d'olive comme source d'induction (induction ou source de carbone). Parmi les souches testées, *Trichoderma koningiopsis* Th003, *Beauveria bassiana* Bv062 et Bv064, *Metarhizium anisopliae* Mt04, *M. robertsii* Mt015 et *M. brunneum* CA-3 se sont révélées incapables de produire des lipases dans les conditions expérimentales précédentes, ce qui est le cas pour la souche *Aspergillus* sp. 12 étudiée dans notre étude. Par contre, la souche *Trichoderma harzianum* Th180 a présenté la plus forte activité lipolytique parmi les souches testées, atteignant la valeur  $0,24 \pm 0,03$  U/ml. Cette valeur est inférieure à celle obtenue par notre souche *Aspergillus* sp. 61 qui a démontré une activité lipolytique élevée, mesurée de 15,58 U/ml.

L'étude établie par Abubakar *et al.* (2024) a évalué la production de lipase par *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* dans un milieu de culture contenant l'huile d'olive,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , NaCl,  $NH_4H_2PO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , la peptone ainsi que deux gouttes de Tween 80 utilisé comme agent émulsifiant. L'activité lipolytique a été déterminée dans le surnageant à l'aide d'une méthode titrimétrique. Les résultats ont mis en évidence la capacité des isolats

bactériens à produire la lipase avec une activité de  $3,08 \times 10^2 \pm 0,08$  U/ml pour *B. subtilis* et de  $3,37 \times 10^2 \pm 0,12$  U/ml pour *P. aeruginosa*. Ces valeurs sont supérieures à celle obtenue dans notre étude.

#### ➤ Activité amylolytique

La détection de la production d' $\alpha$ -amylase a été réalisée par la méthode DNSA. La mesure de l'absorbance effectuée à l'aide du spectrophotomètre, et le calcul de l'activité amylolytique pour chaque souche ont montré que la souche *Aspergillus sp.* 12 n'a pas la capacité à produire l' $\alpha$ -amylase. Alors que la souche *Aspergillus sp.* 61 a présenté une activité amylolytique mesurée de 512 U/ml, confirmant les résultats déjà observés sur boîtes.

Une étude menée par Bellaouchi *et al.* (2021) a porté sur l'évaluation quantitative de l'activité amylasique dans des flacons contenant un milieu de culture enrichi en sels minéraux ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{CaCl}_2$ ) avec 1% d'amidon comme substrat. L'activité amylolytique de la souche *Aspergillus niger* ASP2 a été quantifiée dans le surnageant à l'aide de la méthode DNS. Les résultats ont révélé une capacité notable de production d'amylase.

Une autre étude réalisée par Qureshi *et al.* (2004) concernant la production d'amylase par différentes espèces fongiques cultivées en fermentation submergée dans un milieu minéral contenant du glucose ainsi que divers sels minéraux :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Dans cette étude, les chercheurs ont comparé la production d'amylase dans ce milieu avec et sans supplémentation en sucres. Les résultats ont montré que, sans ajout de sucre, la production d'amylase était relativement faible : 1,36 U/ml pour *Aspergillus fumigatus*, 0,91 U/ml pour *A. niger* et 0,77 U/ml pour *Myrothecium geophilum*. En revanche, en présence de sucre, l'activité amylolytique augmentait significativement pour les mêmes souches, atteignant respectivement 34,4 U/ml, 25,6 U/ml et 17,4 U/ml. Ces résultats indiquent que ces champignons sont capables de produire de l'amylase, bien que leur rendement varie selon les conditions de culture.

En comparant notre résultat avec le résultat obtenu en présence de sucre dans le milieu, notre souche *Aspergillus sp.* 61 a présenté une activité amylolytique nettement supérieure, atteignant 512 U/ml.

De même, l'étude effectuée par Abubakar *et al.* (2024) qui vise à étudier la production d'amylase par des isolats fongiques utilisant l'amidon soluble comme substrat dans un milieu basal contenant du  $\text{NaNO}_3$ , du  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , du  $\text{FeSO}_4$ , ainsi que de l'amidon soluble. Les résultats ont révélé une activité amylolytique mesurée de 7,30 U/ml/min pour *Aspergillus*

*niger*, 7,45 U/ml/min pour *A. flavus* et 7,05 U/ml/min pour *Fusarium* spp. Ce qui confirme leur capacité à produire cette enzyme.

À titre comparatif, notre souche *Aspergillus* sp. 61 a montré une activité amylolytique supérieure.

#### **4 Valorisation des déchets agroalimentaire pour la production de lipase et d' $\alpha$ -amylase en fermentation liquide**

Pour déterminer la capacité d'*Aspergillus* sp. 61 à produire la lipase et l' $\alpha$ -amylase dans un milieu à base d'écorce de grenade et de pelures de mandarine une expérience a été réalisée.

Le dosage de l'activité amylolytique a montré une activité mesurée de 82,11 U/ml ce qui signifie que ces déchets sont utilisés comme substrat par cette souche pour son développement favorisant ainsi la production de cette enzyme, ce qui est en accord avec l'étude réalisée par Hadia *et al.* (2019) concernant la production d'amylase par *Aspergillus niger* FCC-ASQ-06 sur différents déchets de fruits (peau de banane, peau d'orange, citron) et de légumes (peau de pois). La production maximale d'amylase était de 4,43 U/g lorsque la peau de banane a été utilisée comme source de carbone.

Le dosage de l'activité lipolytique a montré une activité mesurée de 14,16 U/ml ce qui signifie que ces déchets répondent aux besoins nutritionnels de la moisissure ainsi ils favorisent la production de cette enzyme, c'est le cas de l'étude de Qureshi *et al.* (2017) sur la production de lipase par *Penicillium expansum* CMI 39671, où ils ont testé différents types de pelures de fruits (orange, banane, papaye, citron, pomme). Ils ont observé une meilleure activité lipolytique atteignant 1266 U/g dans le milieu à base de pelures d'orange.

### **5 Optimisation des conditions de culture pour la production de l'enzyme**

#### **5.1 Conception expérimentale selon le plan de Plackett-Burman**

Dans le but d'optimiser la production conjointe d' $\alpha$ -amylase et de lipase par la souche *Aspergillus* sp. 61, le plan de Plackett-Burman (PBD) a été utilisé comme une méthode statistique pour évaluer simultanément l'effet de plusieurs variables (huile d'olive, amidon, extrait de levure, pH et sels minéraux) afin d'identifier celles qui influencent positivement et de manière significative les trois réponses (biomasse,  $\alpha$ -amylase et lipase). Les résultats sont regroupés dans le tableau (11)

**Tableau 11 :** Quantification de la biomasse, de l' $\alpha$ -amylase et de la lipase produites selon le plan de Plackett-Burman.

Essais	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	Biomasse (g/l)	Activité amylolytique (U/ml)	Activité lipolytique (U/ml)
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	3,07320	188,02692	16,25
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	1,81616	182,80395	12,16
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	2,47670	248,091075	9,66
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	2,12547	89,95115	15,33
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	6,32330	168,2957	14
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	5,08994	126,51194	13,83
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	9,43750	87,0495	12,41
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1,95335	67,89861	14,16

**Les facteurs :** X<sub>1</sub> : Huile d'olive, X<sub>2</sub> : Amidon, X<sub>3</sub> : Extrait de levure, X<sub>4</sub> : Erreur, X<sub>5</sub> : pH, X<sub>6</sub> : Erreur, X<sub>7</sub> : Sels ; (+1) : Niveau supérieur, (-1) : Niveau inférieur.

### 5.1.1 Effet des facteurs testés sur la production de la biomasse

Dans cette étude, l'essai numéro sept a présenté une production de biomasse maximale de 9,43 g/L. Ce résultat peut s'expliquer par la présence de certains composants : l'huile d'olive, l'amidon et les sels qui ont montré un effet significatif positif lorsqu'ils sont utilisés à leur niveau supérieur. Ainsi, par la présence de l'extrait de levure qui a présenté un effet significatif négatif, et le pH qui n'a présenté aucun effet significatif à leur niveau inférieur. Cela montre que la souche *Aspergillus* sp. 61 utilise l'huile d'olive et l'amidon comme sources de carbone et les sels pour répondre à ses besoins nutritionnels essentiels à son développement. En revanche, l'essai numéro 2 a montré la production de biomasse la plus faible (1,81 g/L), en raison de la présence de l'huile d'olive et les sels à leur niveau inférieur.

Pour l'effet sur la biomasse, le coefficient de détermination ( $R^2 = 99,31\%$  ;  $R^2$ -ajusté =  $97,59\%$ ) atteste de la validité du modèle. L'ajustement du modèle polynomial a été évalué à l'aide des coefficients de détermination  $R^2$  et  $R^2$ -ajusté (Keharom *et al.*, 2016).

Les résultats statistiques présentés dans le tableau (12) valident la significativité du modèle. Une valeur de F de 57,63 indique sa pertinence, et une valeur de P de 0,017 confirme la significativité des termes du modèle.

**Tableau 12 :** Analyse statistique des facteurs étudiés selon le plan de Plackett-Burman (PBD) pour la production de biomasse par *Aspergillus* sp. 61.

Source	Coefficient	Valeur de T	Valeur de F	Valeur de P
Modèle	-	-	57,63	<b>0,017</b>
constante	4,037	27,03	-	<b>0,001</b>
Huile d'olive	0,895	5,99	35,87	<b>0,027</b>
Amidon	1,126	7,54	56,78	<b>0,017</b>
Extrait de levure	-0,923	-6,18	38,18	<b>0,025</b>
pH	-0,537	-3,60	12,94	0,069
Sels	1,795	12,02	144,39	<b>0,007</b>

**Valeur de T :** Valeur du test de Student ; **Valeur de P :** Valeur de probabilité (effet significatif pour ( $P < 0,05$ )).

Parmi les facteurs examinés, quatre facteurs ont exercé une influence significative sur la production de biomasse (figure 11). Les sels minéraux ( $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ , KCL et  $\text{CaCl}_2$ ) ont l'effet le plus significatif ( $P=0,007$ ). Pareil pour l'étude réalisée par Swetha *et al.* (2013) qui ont trouvé que l'utilisation d'une solution saline a un impact positif sur la croissance de *Piriformospora indica*.

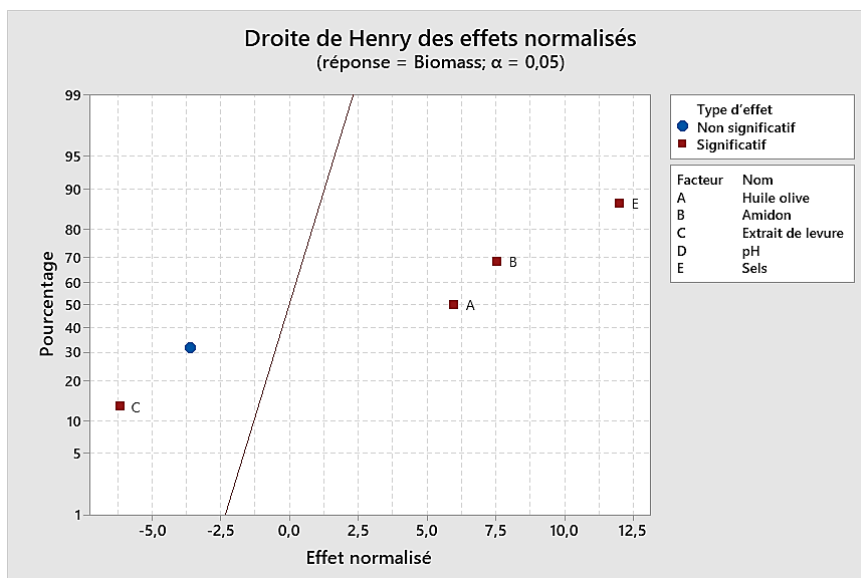
Au contraire, l'étude réalisée par Bennamoun *et al.* (2004) illustre que la présence d'éléments minéraux dans le milieu de culture ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$  et  $\text{ZnSO}_4$ ) n'a pas d'effet significatif sur la croissance d'*Aspergillus oryzae*.

L'amidon considéré comme une source de carbone a présenté un effet significatif ( $P=0,017$ ). Ceci est en accord avec l'étude effectuée par Calderon *et al.* (2003) qui ont utilisé l'amidon comme source d'énergie. De même, pour l'étude de Dercova *et al.* (1992) qui a montré que l'amidon utilisé comme source de carbone, favorisait le développement de la biomasse.

L'extrait de levure quant à lui a présenté un effet significatif mais négatif ( $P=0,025$ ). Bennamoun *et al.* (2003) ont montré que la présence de l'extrait de levure ne présente aucun effet sur la croissance de d'*Aspergillus oryzae*.

L'huile d'olive a montré un effet significatif positif ( $P=0,027$ ) sur la production de la biomasse par *Aspergillus* sp. 61. En effet, Elhussiny *et al.* (2023) trouvent également que l'huile d'olive influence de manière significative la croissance de *Rhizopus stolonifer* 1aNRC11.

À l'opposé, une autre étude réalisée par Elhussiny *et al.* (2023) concernant la souche *Aspergillus flavus* NDA04a où l'huile d'olive a eu une influence non significative sur la production de la biomasse.



**Figure 11 :** Droite de Henry illustrant l'effet de chacun des facteurs du plan de Plackett-Burman sur la production de la biomasse pour un niveau de test  $\alpha = 0,05$ .

La variation du pH de 4,5 à 5,5 a montré un effet négatif sur la biomasse mais qui est non significatif ( $P > 0,05$ ), effectivement, il est connu que les champignons filamenteux préfèrent les milieux tamponnés acide pour leur croissance. Selon l'étude de Djekrif-Dakhmouch *et al.* (2006), la variation du pH de 5 à 6 a présenté un effet négatif sur la production de biomasse chez la souche *Aspergillus niger* entraînant sa réduction.

Le diagramme du Pareto des effets normalisés (Annexe 5) illustrant l'effet de chacun des facteurs du plan de Plackett-Burman sur la production de la biomasse pour un niveau de test  $\alpha = 0,05$  (Les barres traversées par la ligne rouge (valeur de  $T = 4,30$ ) indiquent des effets significatifs).

Les données obtenues ont été soumises à une analyse de régression, permettant de générer une équation polynomiale du premier degré décrivant la production de la biomasse en fonction des variables indépendantes :

$$\text{Biomasse} = 4,037 + 0,895 X_1 + 1,126 X_2 - 0,923 X_3 + 1,795 X_7$$

### 5.1.2 Effet des facteurs testés sur la production de l' $\alpha$ -amylase

Dans notre étude, l'activité enzymatique la plus élevée a été observée lors de l'essai trois, avec une valeur de 248,09 U/ml. Ce résultat a été obtenu lorsque les sels, le pH et l'extrait de levure étaient à leur niveau maximal, tandis que l'huile d'olive et l'amidon étaient maintenus à des niveaux inférieurs.

À l'inverse, l'essai huit a présenté l'activité la plus faible, mesurée de 67,89 U/ml. Dans cet essai, l'huile d'olive, l'amidon, extrait de levure, pH et les sels sont maintenus à leur niveau minimal, sachant que l'extrait de levure et le pH sont les facteurs qui ont un effet significatif

positif sur la production enzymatique, ce qui a entraîné une diminution de la production d' $\alpha$ -amylase.

Dans cette étude, les valeurs de coefficient de détermination ( $R^2 = 98,24\%$  ;  $R^2$ -ajusté =  $93,84\%$ ) ont confirmé la validité du modèle.

Le tableau 13 présente les résultats de l'analyse statistique des réponses, permettant de confirmer la significativité du modèle. La valeur de F du modèle est 22,32 illustrant la pertinence du modèle et la valeur de P est 0,043 indiquant que le modèle est significativement fiable pour cette optimisation.

**Tableau 13** : Analyse statistique des facteurs étudiés selon le plan de Plackett-Burman (PBD) pour la production d' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus* sp. 61.

Source	Coefficient	Valeur de T	Valeur de F	Valeur de P
Modèle	-	-	22,32	<b>0,043</b>
constante	144,83	26,51	-	<b>0,001</b>
Huile d'olive	-21,94	-4,02	16,14	0,057
Amidon	11,72	2,14	4,60	0,165
Extrait de levure	41,53	7,66	57,79	<b>0,017</b>
pH	28,76	5,27	27,72	<b>0,034</b>
Sels	12,66	2,32	5,37	0,146

**Valeur de T** : Valeur du test de Student ; **Valeur de P** : Valeur de probabilité (effet significatif pour  $p \leq 0,05$ ).

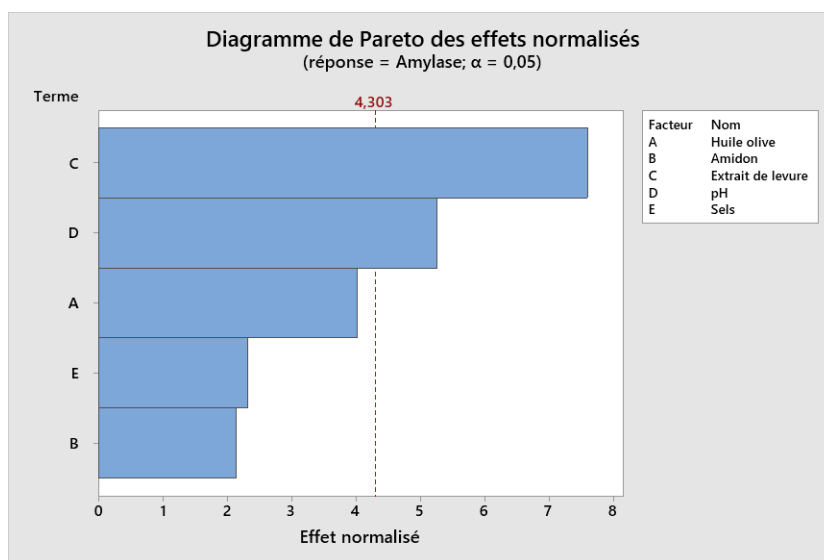
Parmi les facteurs testés, deux ont montré un effet significatif sur la production d'amylase : le pH et l'extrait de levure (figure 12). Ce dernier présente un effet significatif sur la production de l'amylase ( $P = 0,017$ ). En effet, l'extrait de levure est une excellente source d'azote et de facteurs de croissance. Ait Kaki *et al.* (2012) montrent par le biais de leurs travaux que l'ajout de l'extrait de levure favorise la synthèse de l' $\alpha$ -amylase. Bennamoun *et al.* (2004) indiquent que la source azotée représentée par l'extrait de levure exerce un effet positif et significatif sur la production de l' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohen 1042.72.

La variation du pH du milieu de 4,5 à 5,5 a présenté un effet significatif positif ( $P = 0,034$ ) ce qui illustre son influence sur la production d' $\alpha$ -amylase. Alors que Ait Kaki *et al.* (2017) trouvent que la variation du pH dans l'intervalle 5,0 et 6,0 n'a pas d'effet significatif sur la production de l' $\alpha$ -amylase par *Rhizopus oryzae* Strain FSIS4.

Dans leur étude sur la production de cette enzyme par *Aspergillus niger* ATCC 16404, Djekrif-Dakhmouche *et al.* (2006) ont rapporté que la variation du pH de 5 à 6 favorise la production de l' $\alpha$ -amylase neutre (pH 6), avec une augmentation de 21%. En revanche, cette variation a un effet négligeable sur l' $\alpha$ -amylase acide (pH 5) dont le pH optimal est de 5.

L'huile d'olive présente un effet négatif non significatif sur la production d' $\alpha$ -amylase par la souche *Aspergillus* sp 61.

L'amidon connu par son influence sur la production d' $\alpha$ -amylase semble avoir un effet non significatif dans ce cas d'étude ( $p > 0,05$ ). Cela suggère que l'enzyme n'est pas inductible et que la souche *Aspergillus* sp. 61 n'a pas exploité l'amidon efficacement, ce qui signifie que l'enzyme est produite indépendamment de la présence du substrat.



**Figure 12 :** Diagramme de Pareto des effets normalisés illustrant l'effet de chacun des facteurs du plan de Plackett-Burman sur la production d' $\alpha$ -amylase pour un niveau de test  $\alpha = 0,05$

De plus, les sels minéraux ( $MgSO_4$ ,  $NaNO_3$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $KCl$  et  $CaCl_2$ ) n'ont pas montré une influence significative sur la production d' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus* sp. 61 comme c'est illustré par Droite de Henry illustrant (Annexe 5). Ce résultat contraste avec celui rapporté par Djekrif-Dakhmouche *et al.* (2014), qui suggèrent que les sels ( $KH_2PO_4$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  et  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ) exercent un effet significativement positif sur la production d' $\alpha$ -amylase conduisant à une augmentation de l'activité enzymatique.

Parmi les variables testées, l'extrait de levure et le pH ont montré une influence significative ( $P < 0,05$ ) sur la production d' $\alpha$ -amylase par la souche *Aspergillus* sp. 61, avec des valeurs de  $P$  de 0,017 et 0,034 respectivement.

De ces résultats, l'équation de la production de l' $\alpha$ -amylase s'écrit :

$$Amylase = 144,83 - 41,53 X_3 + 28,76 X_5$$

### 5.1.3 Effet des facteurs testés sur la production de la lipase

L'étude de l'optimisation de la production de la lipase par la souche *Aspergillus* sp. 61 à l'aide du plan Plackett-Burman a révélé des coefficients de détermination faibles ( $R^2 = 64,14\%$  ;  $R^2$  ajusté = 0,00%), indiquant la non significativité du modèle.

Les résultats statistiques présentés dans le tableau 14 confirment que le modèle n'est pas significatif. En effet, une faible valeur de F (0,72) témoigne du manque de la pertinence de ce modèle, tandis qu'une valeur de  $P = 0,671$ , celle-ci est supérieure au seuil de 0,05 confirmant ainsi l'absence de significativité du modèle.

**Tableau 14** : Analyse statistique des facteurs étudiés selon le plan de Plackett-Burman (PBD) pour la production de lipase par *Aspergillus* sp. 61

Source	Coefficient	Valeur de T	Valeur de F	Valeur de P
Modèle	-	-	0,72	0,671
constante	8,125	15,92	-	0,004
Huile d'olive	0,650	1,27	1,62	0,331
Amidon	0,150	0,29	0,09	0,796
Extrait de levure	-0,275	-0,54	0,29	0,644
pH	0,225	0,44	0,19	0,702
Sels	-0,600	-1,18	1,38	0,361

**Valeur de T** : Valeur du test de Student ; **Valeur de P** : Valeur de probabilité (effet significatif pour  $P < 0,05$ ).

Les facteurs étudiés dans cette expérience : l'huile d'olive, l'amidon, l'extrait de levure, le pH et les sels présentent respectivement des valeurs de  $P$  égales à 0,331 ; 0,796 ; 0,644 ; 0,702 et 0,361, toutes supérieures au seuil de signification de 0,05. Cela n'indique qu'aucun de ces facteurs n'a un effet statistiquement significatif sur la production de la lipase. Cette absence d'effet est également illustrée dans le diagramme de Pareto des effets normalisés (Annexe 5).

De ces résultats, l'équation de la production de la lipase s'écrit :

$$\text{Activité lipolytique} = 8,125 + 0,650 X_1 + 0,150 X_2 - 0,275 X_3 + 0,225 X_5 - 0,600 X_7$$

## 5.2 Conception expérimentale selon le Plan Composite Central

La méthodologie des surfaces de réponse (RSM) est un ensemble de méthodes statistiques et mathématiques visant à ajuster des modèles empiriques aux données issues d'un plan expérimental (Bezerra *et al.*, 2008).

Dans le but de définir les optimums des deux paramètres préalablement sélectionnés (extrait de levure et pH) pour améliorer la production d' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus* sp. 16, la méthodologie de surface de réponse (RSM) a été appliquée par le biais du plan composite (CCD) afin d'analyser les interactions entre les deux variables expérimentales étudiées

(l'extrait de levure et le pH du milieu). Le plan CCD comprend onze essais, dont les détails et les activités amylolytiques correspondantes qui varient de 60,20924 à 692,7689 U/ml sont présentés dans le tableau 15.

L'optimisation des conditions expérimentales à l'aide du plan composite central a permis de multiplier par huit le rendement enzymatique de l' $\alpha$ -amylase.

**Tableau 15 :** Matrice du Plan CCD à deux facteurs comportant 11 essais, avec les activités amylolytiques mesurées et exprimées en U/ml.

Essais	Extrait de levure (X <sub>1</sub> )	pH (X <sub>2</sub> )	Activité enzymatique (U/ml)
1	-1	-1	181,3531
2	1	-1	523,7478
3	-1	1	60,20924
4	1	1	182,804
5	-1,414	0	87,0495
6	1,414	0	692,7689
7	0	-1,414	520,8462
8	0	1,414	77,61914
9	0	0	200,9393
10	0	0	231,4066
11	0	0	330,7881

Les résultats du plan CCD présentés dans le tableau 16, révèlent une valeur de F de 7,09 et une valeur de P égale à 0,025, elle est inférieure à 0,05 montrant que le modèle est statistiquement significatif (Van den Bergh *et al.*, 2020). La valeur de probabilité P détermine la signification (Kim, 2017), ces deux valeurs illustrent l'effet des termes du modèle sur la réponse.

Une valeur élevée de F et une faible valeur de P indique une signification statistique plus marquée (Mehmood *et al.*, 2018).

**Tableau 16 :** Coefficients de régression du modèle quadratique de surface de réponse généré à partir du plan CCD pour l'optimisation de la production d' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus* sp. 16

Terme	Coeff	Coeff ErT	Valeur de T	Valeur de P
constante	254,4	60,5	4,20	0,008
Extrait de levure	233,6	52,4	4,46	0,007
pH	-192,5	52,4	-3,67	0,014
Extrait de levure*Extrait de levure	81,7	88,2	0,93	0,397
pH*pH	-9,0	88,2	-0,10	0,923
Extrait de levure*pH	-110	105	-1,05	0,342

**Coeff** : coefficient ; **Coeff ErT**: erreur standard du coefficient ; **Valeur de T** : valeur du test de Student ; **Valeur de P** : valeur de probabilité (Effet significatif pour  $P < 0,05$ ).

Le modèle mathématique décrivant la relation entre l'activité amylolytique et les variables indépendantes (l'extrait de levure et le pH), est représenté par le polynôme du second degré proposé dans l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité amylolytique} = 254,4 + 233,6 X_1 - 192,5 X_2$$

L'analyse statistique a permis de déterminer une valeur du coefficient de détermination  $R^2$  de 87,65%, indiquant que le modèle utilisé est adéquat pour la production d' $\alpha$ -amylase par la souche *Aspergillus* sp. 16.

L'analyse de la variance (ANOVA) présentée dans le tableau 17 a permis d'évaluer l'effet des différents paramètres et l'effet de leurs interactions sur la production d' $\alpha$ -amylase. Les deux facteurs étudiés : l'extrait de levure et le pH du milieu, présentent un effet significatif sur la production de cette enzyme avec des valeurs de  $P$  égale à 0,007 et 0,014 respectivement. Elles sont inférieures à 0,05. En revanche, les interactions entre ces facteurs (Extrait de levure\*Extrait de levure ; pH\*pH ; Extrait de levure\*pH) n'ont aucun effet significatif et présentent des valeurs de  $P$  égale à 0,397 ; 0,923 et 0,342 respectivement. Ces valeurs sont supérieures à 0,05.

**Tableau 17** : Analyse de la variance (ANOVA) du modèle CCD appliqué à l'optimisation de la production d' $\alpha$ -amylase.

Source	DL	SomCar ajusté	CM ajusté	Valeur de F	Valeur de P
Modèle	5	389721	77944	7,09	<b>0,025</b>
Linéaires	2	366532	183266	16,68	0,006
Extrait de levure	1	218321	218321	19,87	<b>0,007</b>
pH	1	148211	148211	13,49	<b>0,014</b>
Carré	2	11112	5556	0,51	0,631
Extrait de levure*Extrait de levure	1	9431	9431	0,86	0,397
pH*pH	1	113	113	0,01	0,923
Interaction à deux facteurs	1	12078	12078	1,10	0,342
Extrait de levure*pH	1	12078	12078	1,10	0,342
Erreur	5	54934	10987	-	-
Inadéquation de l'ajustement	3	45712	15237	3,30	0,241
Erreur pure	2	9222	4611		
Total	10	444655			

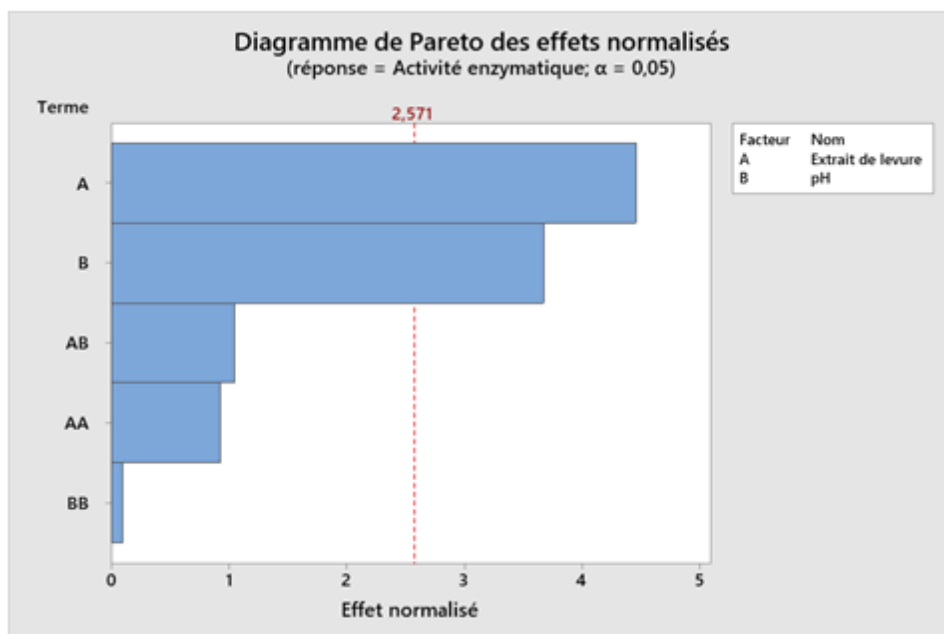
**DL** : degré de liberté ; **SomCar ajusté** : sommes des carrés ajustées ; **CM ajusté** : carré moyen ajusté ; **Valeur de F** : valeur du test de Student ; **Valeur de P** : valeur de probabilité.

Le diagramme de Pareto des effets normalisés (figure 13) montre l'effet des facteurs et des interactions sur la production d' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus* sp. 16. L'extrait de levure a

présenté l'effet le plus significatif avec une valeur de T égale à 4,46. Ce résultat est similaire à celui obtenu par d'Ait Kaki El-Hadef El-Okki *et al.* (2016) qui ont montré que l'extrait de levure exerce un effet significatif sur la production d' $\alpha$ -amylase, il augmente la production de cette enzyme par la souche *Rhizopus oryzae* Strain FSIS4.

Le pH du milieu a montré un effet significatif négatif mesuré de -3,67 ce qui est en accord avec l'étude menée par Tamilarasan *et al.* (2012) où la variation du pH (6-7) a présenté un effet significatif sur la production d'amylase par la souche *Aspergillus oryzae* MTCC 1847. Ils ont constaté une faible activité amylolytique à pH bas, avec une augmentation marquée aux pH élevés. Ainsi que l'étude de Mustafa *et al.* (2016) qui a montré que le pH exerce une influence significative sur la production d'amylase ( $p < 0,05$ ) par *Aspergillus flavus* NSH9. Ils ont montré que l'activité enzymatique maximale a été observée à un pH de 6,5. Au contraire, l'étude de Samuel *et al.* (2017) a montré que le pH n'a pas un effet significatif sur la production d'amylase par la souche *Aspergillus niger* (valeur de P égale à 0,9684 supérieur à 0,05).

Bien que le pH ait montré un effet positif sur la production enzymatique dans le plan de Plackett-Burman, cette approche se limite aux effets linéaires. En revanche, le plan composite central, qui prend en compte les effets quadratiques, a révélé une relation non linéaire. Le coefficient négatif observé suggère qu'au-delà d'un certain seuil, l'augmentation du pH entraîne une diminution de la production enzymatique, indiquant ainsi l'existence d'une valeur optimale à ne pas dépasser. Cela souligne l'intérêt des approches RSM pour affiner l'optimisation des conditions de culture.

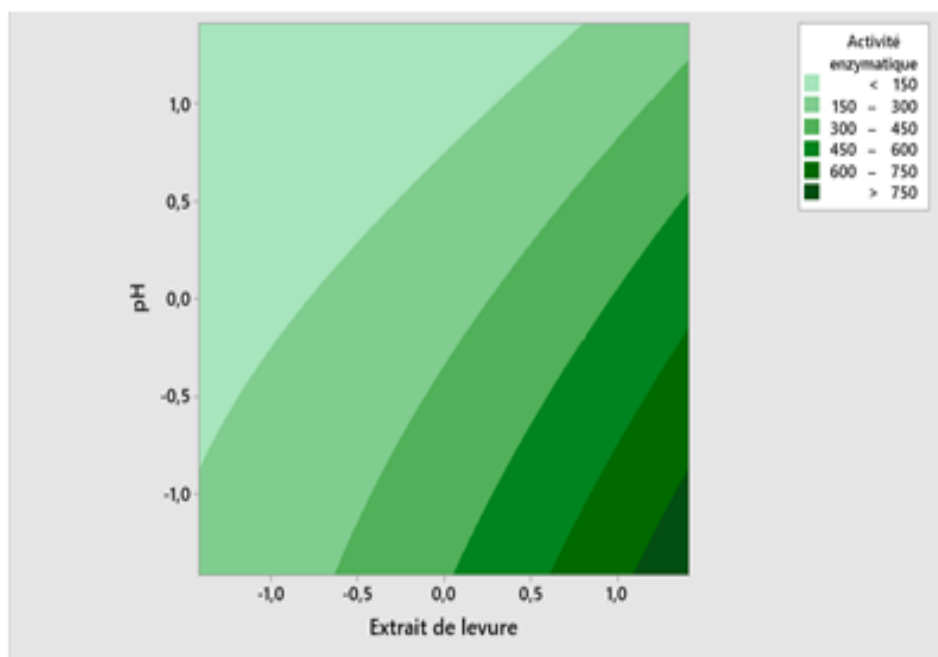


**Figure 13 :** Diagramme de Pareto des effets normalisés illustrant l'impact des facteurs combinés issus du plan CCD sur la production d' $\alpha$ -amylase, avec un niveau de signification de  $\alpha = 5\%$ .

L'analyse des surfaces de réponse et des graphiques de contours est considéré comme un outil efficace pour établir les paramètres opératoires idéaux et atteindre les niveaux de réponse recherchés (Alqadi *et al.*, 2012).

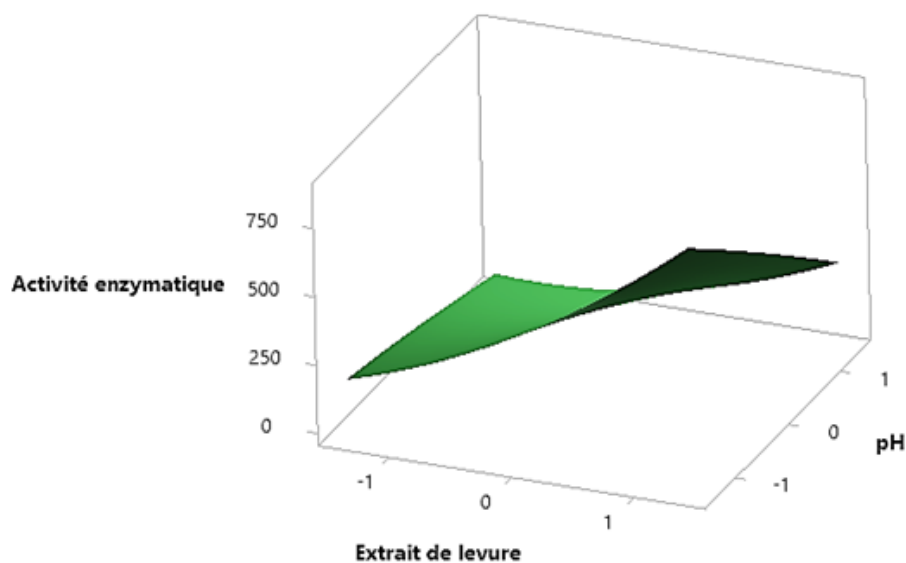
Le graphique de contour 2D de l'activité amylolytique (Figure 14) illustre l'effet quantitatif ainsi que les interactions entre les facteurs ayant le plus d'influence sur la production d' $\alpha$ -amylase. Ces facteurs ont été identifiés à partir du plan de Plackett-Burman (PBD) (Chaib *et al.*, 2025). Dans notre étude les deux facteurs ayant une influence sur la production d' $\alpha$ -amylase sont l'extrait de levure et le pH.

Ce graphique permet de déterminer les conditions optimales de l'expérience ainsi, il indique que la production d' $\alpha$ -amylase augmente lorsque le facteur extrait de levure est dans son niveau supérieur et le pH est dans son niveau inférieur. La zone vert foncé indique les conditions optimales de la production de cette enzyme.



**Figure 14 :** Graphique de contour 2D montrant l'effet des interactions entre l'extrait de levure et le pH

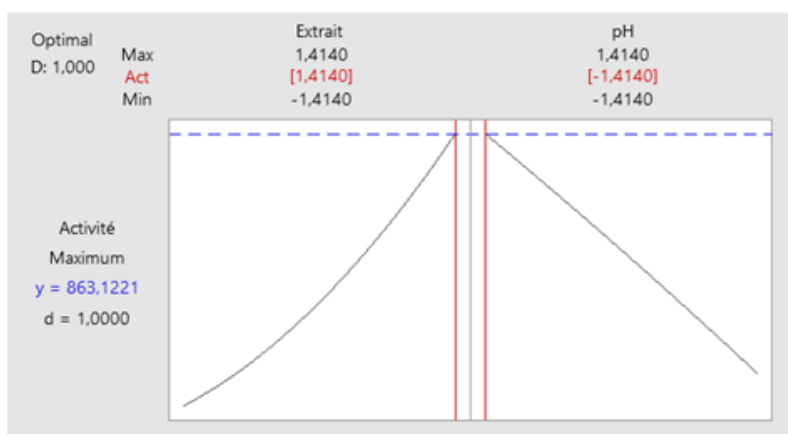
Le graphique de surface de réponse 3D permet de mieux visualiser et comprendre l'interaction entre les variables codées et les réponses (Saxena et Singh, 2014). Il constitue une représentation graphique de l'équation de régression relative au rendement en  $\alpha$ -amylase. Il met en évidence l'effet de l'interaction entre les paramètres (extrait de levure et le pH) sur la réponse qui est l'activité amylolytique, tout en permettant d'identifier leurs niveaux optimaux. D'après ce graphique (Figure 15) on constate que la valeur optimale de l'activité amylolytique est obtenue à une valeur minimale du pH et une valeur maximale d'extrait de levure.



**Figure 15 :** Graphiques 3D de surface de réponse représentant l'influence des interactions entre les trois facteurs significatifs ainsi que leurs niveaux optimaux sur la production d' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus* sp. 61

### 5.2.1 Optimisation de la réponse

L'analyse du graphique d'optimisation de la réponse (Figure 16) a permis d'identifier les conditions optimales pour la production d' $\alpha$ -amylase. Les valeurs optimales prédites des deux facteurs sont : un niveau élevé d'extrait de levure (+1,414), correspondant à 3,41%, et un niveau faible de pH (-1,414), ce qui implique de maintenir le pH du milieu à 4. Ces conditions permettent de prédire une activité amylolytique optimale de 863,1221 U/ml.



**Figure 16 :** Graphique d'optimisation de la réponse (les lignes rouges verticales représentent les niveaux actuels des facteurs ; la ligne bleue horizontale indique la valeur de la réponse associée à ces niveaux ; Y : valeur prédite de l'activité amylolytique maximale ; d : fonction de désirabilité individuelle).

# **CONCLUSION**

## **GÉNÉRALE**

## Conclusion générale

Dans cette étude, deux souches fongiques appartenant au genre *Aspergillus* ont été soumises à un criblage qualitatif et quantitatif afin d'évaluer leur capacité à produire simultanément deux enzymes clés : la lipase et l' $\alpha$ -amylase. Les résultats ont montré que la souche *Aspergillus* sp. 61 présentait une aptitude remarquable à produire simultanément ces deux enzymes. Elle a ainsi été identifiée comme la souche la plus performante.

Le plan (PBD) a permis d'identifier le pH et l'extrait de levure comme facteurs influençant significativement sur la production d' $\alpha$ -amylase. Aucun facteur n'a affecté la production de lipase, suggérant une inadéquation du modèle pour cette enzyme.

L'optimisation des conditions expérimentales à l'aide du plan composite central a permis de multiplier par huit le rendement enzymatique de l' $\alpha$ -amylase

Le plan (CCD) a permis de déterminer les conditions optimales de production de l' $\alpha$ -amylase avec un pH de 4 et une concentration d'extrait de levure de 3,41 %, ce qui peut prédire une valeur de l'activité amylolytique de 863,1221 U/ml.

L'utilisation des écorces de grenade et de mandarine constitue alternative intéressante en tant que source de carbone pour la production de l' $\alpha$ -amylase et de la lipase par *Aspergillus* sp. 61, contribuant à une valorisation biotechnologique à moindre coût.

Afin de consolider et approfondir ces résultats, les perspectives suivantes sont proposées:

- ❖ Une piste à envisager serait l'utilisation de modèles expérimentaux alternatifs ou de nouvelles conditions de culture pour mieux cerner les facteurs influençant la production de lipase.
- ❖ Tester différents substrats agro-industriels (ex.: son de blé, résidus de fruits) pour une production à moindre coût.
- ❖ Passer à une échelle pilote (bioréacteur) pour valider l'optimisation en conditions contrôlées.
- ❖ Évaluer la purification partielle ou totale des enzymes pour une meilleure caractérisation biochimique.
- ❖ Explorer les applications industrielles des enzymes produites (formulation de détergents, industrie alimentaire, etc.).

**RÉFÉRENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

**Références bibliographique**

- Abalaka M. E., et Adetunji C. O. (2017). Production and Optimization of Amylase and Glucoamylase from *Aspergillus Niger* under Solid State Fermentation for Effective Production of Glucose Syrup. *UMYU Journal of Microbiology Research (UJMR)*, 2(1), P : 135-146.
- Abdelaziz A., Amal M. A., Esraa S. E., et Lamiaa A. A. (2025). Microbial Lipases: Advances in Production, Purification, Biochemical Characterization, and Multifaceted Applications in Industry and Medicine. *Microbial Cell Factories*, 24, p : 40.
- Abdullah R., Qaiser H., Iftikhar T., Kaleem A., Iqtedar M., Saleem F., et Haq I. (2018). Application Of Response Surface Methodology For Statistical Optimization Of Lipase Production By *Penicillium sp.* Employing solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(3), p : 863-875.
- Abdulummini S. A., Yusuf-Saliu B. O., et AbdulSalam Z. B. (2022). Isolation, Identification and Screening of Lipase Producing Fungi from the Soil Environment of Ilorin Metropolis. *Journal of Advances in Microbiology*, 22(9), p: 25-30.
- Abubakar A., None Bilkisu A., et None Shamsuddeen U. (2024). Production of Amylase Enzyme by *Aspergillus* and *Fusarium* Species using Sugar Cane Bagasse. *UMYU Journal of Microbiology Research (UJMR)*, 9(1), P : 202-213.
- Agatonovic-Kustrin S., et Beresford R. (2000). Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22(5), p : 717-727.
- Ahmad M.A., Bilkisu A., Shamsuddeen U. (2024). Production of amylase enzyme by *Aspergillus* and *Fusarium* species using sugar cane bagasse. *UMYU Journal of Microbiology Research*, 9(1), p : 202 -213.
- Ait Kaki A., El-Hadef El-Okki M., Bennamoun L., Djekrif-Dakhmouche S., Meraihi Z. (2012). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de l'  $\alpha$ -amylase par *Rhizopus oryzae*. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*, 6(1), P : 1-17.
- Ait Kaki A., Gagaoua M., Bennamoun L., Djekrif S., Hafid K., El-Hadef El-Okki M., et Meraihi Z. (2016). Statistical Optimization of Thermostable  $\alpha$ -Amylase Production by a Newly Isolated *Rhizopus oryzae* Strain FSIS4 Using Decommissioned Dates. *Waste and Biomass Valorization*, 8(6), P : 1-12.
- Ajita S., et Murthy K. (2014).  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), p : 166-175.

- Al-Bedak O. A., Moharram A. M., Ameen F., Stephenson S. L., Idres M. M., et Yasser, M. M. (2025). Optimizing conditions for augmented production of amylase by *Talaromyces islandicus* AUMC 11391. *Electronic Journal of Biotechnology*, 75.
- Ali S., Sumera A. K., Muhammad H., et In-Jung L. (2023). The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. *Microorganisms*, 11, p : 510.
- Al-Khattaf F. S., Punitha A. M., Hatamleh A. A., et Nandhakumari P. (2024). Lipase-producing *Aspergillus niger* LP4 isolated from banana plantations: Lipase production optimization via central composite design and environmental applications. *BioResources*, 20(1), p : 1413-1430.
- Al-Manhel A. J. A. (2018). Application of Microbial Enzymes in Dairy Products: A Review. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 31(1), p : 20-30.
- Alqadi A. N. S., Bin Mustapha K. N., Naganathan S., et Al-Kadi Q. N. S. (2012). Uses of central composite design and surface response to evaluate the influence of constituent materials on fresh and hardened properties of self-compacting concrete. *KSCE Journal of Civil Engineering*, 16(3), P : 407-416.
- Amaike S., et Keller N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, (49) (1), p: 107-133.
- Amin F., Bhatti H. N., et Rehman S. (2011). Optimization of growth parameters for lipase
- Ancuceanu R., Marilena V. H., Maria C., et Adriana I. A. (2022). Potential Antifungal Targets for *Aspergillus Sp.* From the Calcineurin and Heat Shock Protein Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, (23), p : 12-43.
- Angajala G., Pavan P., et Subashini R. (2016). Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, p : 257-270.
- Annette M., et Claude C. (1985). Hydrolases et dépolymérase : enzymes d'intérêt industriel. Paris : Gauthier-Villars, 359 p (Biochimie appliquée).
- Arbige M. V., Shetty J. K., et Chotani G. K. (2019). Industrial Enzymology: The Next Chapter. *Trends in Biotechnology*, 37(12), p : 1355-1366.
- Ashok A., et Kumar D. S. (2017). Different methodologies for sustainability of optimization techniques used in submerged and solid state fermentation. *3 Biotech*, 7(5), P : 1-12.
- Ashwini S, et Raghavendra M.P. (2016). High Yield Production of Industrially Important Multi Enzymes by *Aspergillus Foetidus* using Solid State Fermentation. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 5(1), p : 71-77.

- Bárbara F.V., Ludmila C. G. B., Leonardo D. F., Fernando M., Ariela V. P., Grazielle S. S. A.** (2025). A novel pre-treatment of brewery spent grains using mycelium-bound cellulase from *Aspergillus oryzae* for biogas production. *Biomass and Bioenergy*, 194.
- Barnossi A. E., Moussaid F., et Housseini A. I.** (2020). Tangerine, banana and pomegranate peels valorisation for sustainable environment: A review. *Biotechnology Reports*, p :1-44.
- Barriuso J., María E. V., Alicia P., et Margarita L. M.** (2016). Structural Traits and Catalytic Versatility of the Lipases from the Candida Rugosa-like Family: A Review. *Biotechnology Advances*, (34), p : 874-885.
- Barros M., Fleuri L. F., et Macedo G. A.** (2010). Seed lipases: sources, applications and properties - a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(1), p : 15-29.
- Bellaouchi R., Abouloifa H., Rokni Y., Hasnaoui A., Ghabbour N., Hakkou A., Bechchari A., et Asehraou A.** (2021). Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), p : 1-8.
- Benkahoul M., mechakra A., et boukhalfa H.** (2012). caracteristiques de la metalloprotease produite par *Aspergillus oryzae* sur dechets d'oranges. *Sciences & Technologie. C Biotechnologies*, (35), p : 50-54.
- Bennamoun L., Meraihi Z., et Dakhmouche S.** (2004). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. *Journal of Food Engineering*, 64(2), P : 257-264.
- Bezerra M. A., Santelli R. E., Oliveira E. P., Villar L. S., et Escalera L. A.** (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), P : 965-977.
- Bhargav S., Panda B. P., Ali M., et Javed S.** (2008). Solid-State Fermentation: An Overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22(1), P : 49-70.
- Bhatia S., Singh A., Batra N., et Singh J.** (2020). Microbial production and biotechnological applications of  $\alpha$ -galactosidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, p : 1294-1313.
- Bouldjedj R., Beghriche H., et Makhelfi K.** (2022). Modélisation des conditions de culture pour la production de l'enzyme alpha-amylase par *Aspergillus niger* en fermentation solide. Mémoire Master Recherche : Mycologie et Biotechnologie Fongique, 52 p.
- Box G. E. P., Hunter J. S., et Hunter W. G.** (2005). Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery (2nd ed.). Wiley. P : 620.

- Calderon M., Loiseau G., et Guyot J. P. (2003). Fermentation by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of different combinations of carbohydrates occurring naturally in cereals : consequences on growth energetics and  $\alpha$ -amylase production. *International Journal of Food Microbiology*, 80(2), P : 161-169.
- Casas L., Duquesne S., Bordes F., Sandoval G., et Marty A. (2012). Lipases and Phospholipases. *Lipases: An Overview*, 861, p: 3-30.
- Cerqueira U. M. F. M., Bezerra M. A., Ferreira S. L. C., de Jesus Araújo R., da Silva B. N., et Novaes C. G. (2021). Doehlert design in the optimization of procedures aiming food analysis a review. *Food Chemistry*, 364, 130429.
- Chabasse D., Dufresne P., et Sibley A. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Paris : Formation biologie médicale. 161 p. – (Cahier de formation Bioforma – Biologie médicale).
- Chai W. Y., Tze K., Tan M., et Tham H. J. (2022). Fermentation Process Control and Optimization. *Chemical Engineering & Technology*, 45(10), P : 1731-1747.
- Chaib I., Dakhmouche-Djekrif S., et Nouadri T. (2025). Optimization and kinetics study of  $\alpha$ -amylase production by the newly isolated thermophilic yeast strain *Geotrichum candidum* PO27 using olive pomace waste under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, p : 1-14.
- Chancharoonpong C., Hsieh P.C., et Sheu S.C. (2012). Enzyme Production and Growth of *Aspergillus oryzae* S. on Soybean Koji Fermentation. *APCBEE Procedia*, 2, p : 57-61.
- Chandra P., Enespa., Ranjan S. et Pankaj Kumar A. (2020). Microbial Lipases and Their Industrial Applications: A Comprehensive Review. *Microbial Cell Factories*, 19, p : 169.
- Chen M., Zhao Y., et Yu S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, 172, p : 543-550.
- Chi M. H., et Craven K. D. (2013). Oxygen and an Extracellular Phase Transition Independently Control Central Regulatory Genes and Conidiogenesis in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE*, 8(9), p: 74-80.
- Choi J. M., Han S. S., et Kim H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7), p : 1443-1454.
- Comité des méthodes analytiques. (2013). Conception expérimentale et optimisation (4): modèles Plackett-Burman [Note technique AMC]. *Analytical Methods*, 5(8), p: 1901-1903.
- Cordova L. (1998). Isolement, identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide. Thèse de Doctorat :

biochimie et biologie moléculaire. Université des Sciences et Techniques du Languedoc Montpellier-II, p : 248.

Debashrita M., Ankita D., Srimanta R., Debasmita B., Moupriya N., et Dibyajit L. (2024). Use of Genomics & Proteomics in Studying Lipase Producing Microorganisms & Its Application. *Food Chemistry Molecular Sciences*, 9, p : 12.

Dercová K., Augustín J., et Krajčová D. (1992). Cell growth and  $\alpha$ -amylase production characteristics of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiologica*, 37(1), P : 17-23.

Dhayalan A., Jayanthi K. P. D., Manoharan S., Nadeem A., Govindasamy B., Pachiappan P., et Vasudhevan P. (2025). Fish gut symbiotic bacterium *Bacillus thuringiensis*: RSM optimization for its extracellular lipase enzyme production, lipase-protein purification, characterization, and docking analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 301, p : 140-428.

Dhevagi P., Ramya A., Priyatharshini S., Geetha T. K., Ambreetha S., et Nivetha A. (2021). Industrially Important Fungal Enzymes: Productions and Applications. *Fungal Biology*, p : 263-309.

Djekrif D. S., Gillmann L., Bennamoun L., Ait-Kaki A., Labbani K., Nouadri T., et Meraihi Z. V. (2014). Amylolytic Yeasts: Producers of  $\alpha$ -amylase and Pullulanase. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 2(4), P : 559-569.

Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z., et Bennamoun L. (2006). Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*, 73(2), P : 190-197.

Dongare A. D., Kharde R. R., et Kachare A. D. (2012). Introduction to Artificial Neural Network. *International Journal of Engineering and Innovative Technology (IJEIT)*, 2(1), p : 189-194.

Doriya K., Jose N., Gowda M., et Kumar D. S. (2016). Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of l-Asparaginase. *Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications*, 78, P : 115-135.

Ekpenyong M. G., Antai S. P., Asitok A. D., et Ekpo B. O. (2017). Plackett-Burman Design and Response Surface Optimization of Medium Trace Nutrients for Glycolipopeptide Biosurfactant Production. *Iranian Biomedical Journal*, 21(4), p : 249-260.

El-Gendi H., Saleh A. K., Badierah R., Redwan E. M., El-Maradny Y. A., et El-Fakharany E. M. (2022). A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. *Journal of Fungi*, 8(1), p : 1-26.

- Elhussieny N. I., El-Refai H. A., Mohamed S. S., Shetaia Y. M., Amin H. A., et Gerd Klöck. (2023). *Rhizopus stolonifer* biomass catalytic transesterification capability: optimization of cultivation conditions. *Microbial Cell Factories*, 22(1), P: 1-12.
- Elhussiny N. I., El-Refai H. A., Mohamed S. S., Shetaia Y. M., Amin H. A., et Gerd Klöck. (2023). *Aspergillus flavus* biomass catalytic lipid modification: optimization of cultivation conditions. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14, P : 22633-22645.
- Elyasi F. B., Ahmadi Y., Yari Khosroshahi A., et Dilmaghani A. (2020). Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(3), p : 350-358.
- Erkan M., et Kader A. A. (2011). Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, p : 287-311.
- Fan Y., Xu Y., Han Q.G., Shen L.L., Xu H., Wu Z. B., Xu X., Ying M., He Z.D., et Hu Z. (2018). Exploring inhibition mechanism and nature of lipase by Ligupurpuroside A extracted from Ku-Ding tea. *Medicinal Chemistry Research*, 27, p : 1822-1833.
- Farooq M. A., Ali S., Hassan A., Tahir H. M., Mumtaz S., et Mumtaz S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of  $\alpha$ -amylase: a review. *Archives of Microbiology*, 203(4), p : 1281-1292.
- Fathi F., Mobarak Q. E., Kasra Kermanshahi R., Moosavi-Nejad Z., et Ghashghaei T. (2022). Optimization of Lipase Production by a Newly Isolate of *Lactobacillus Fermentum*. *Iranian Journal of Science and Technology*, 46(4), p: 1103-1113.
- Ferreira S. L. C., Bruns R. E., Ferreira H. S., Matos G. D., David J. M., Brandão G. C., da Silva E. G. P., Portugal L. A., dos Reis P. S., Souza A. S., et dos Santos W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), p : 179-186.
- Ferreira S. S., Silva A. M., et Nunes F. M. (2018). *Citrus reticulata* Blanco peels as a source of antioxidant and anti-proliferative phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 111(9), p : 141-148.
- Fickers P., Jacqueline D., et Philippe T. (2008). Les Lipases Sont Des Hydrolases Atypiques : Principales Caractéristiques et Applications. *BASE*, 12, p : 119-130.
- Fischer M., et Jürgen P. (2003). The Lipase Engineering Database: A Navigation and Analysis Tool for Protein Families. *Nucleic Acids Research*, 31, p : 319-321.
- Gayathri V M, et Preetha S. (2025). Review on Scaling up  $\alpha$ -Amylase Production by Bacterial Strains through Solid State Fermentation. *International Journal on Science and Technology*, 16(1), p : 1-12.

- Ge S., Duo L., Wang J., Zhula G., Yang J., Li Z., et Tu Y. (2021). A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research status. *Journal of Ethnopharmacology*, 271, p : 1-14.
- Gnanadoss J. J., et Devi S. K. (2015). Optimization of nutritional and culture conditions for improved protease production by *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4(6), p : 518-523.
- Goff S. A., et Goldberg A. L. (1988). High-level expression and efficient recovery of ubiquitin fusion proteins in *Escherichia coli*. *AIChE Journal*, 34(8), p : 1233–1245.
- Gopinath S. C. B., Anbu P., Arshad M. K. M., Lakshmipriya T., Voon C. H., Hashim U., et Chinni S. V. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed Research International*, 2017(1), p: 1-9.
- Goupy J. (2006). Les plans d'expériences. *Revue Modulad*, 34, P : 74-116.
- Gregor M., Grznar P., Mozol S., et Mozolova L. (2024). Plackett-Burman design. *Acta Simulatio*, 10(1), p : 5-9.
- Guerrand D. (2017). Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *OCL*, 24(4), p : 1-7.
- Gunst R. F. (2003). Fractional factorial design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 15(4), p: 1-15.
- Gupta R., Apoorva S., et Manpreet K. (2023). Lipases and Their Applications in Biomedical Field. *Current Biotechnology*, (12), p : 25-36.
- Gupta R., Kumari A., Syal P., et Singh Y. (2015). Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research*, 57(1), p : 40-54.
- Hadia A. S., Jagarwanti M., Imrana K. C., Haider A., Abdul Nabi M., Qureshi A. S. (2019). Coproduction of protease, amylase and lipase from fruit and vegetable waste using *Aspergillus niger* fcc-asq-06. *Journal of Animal Science*, 3(1), 32-46.
- Hamoudi Z. (2021). Les champignons entomopathogènes et leur utilisation en lutte biologique. *Memoire master Recherche : Mycologie et biotechnologie fongique*. Université des Frères Mentouri Constantine, p : 39.
- Hankin L., et Anagnostakis S. L. (1975). The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycologia*, 67(3), p: 597-607.
- Hanson K. R. (1972). Enzyme Symmetry and Enzyme Stereospecificity. *Annual Review of Plant Physiology*, 23(1), p : 335-366.

- Hashemi M., Razavi S. H., Shojaosadati S. A., et Mousavi S. M. (2011). The potential of brewer's spent grain to improve the production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation system. *New Biotechnology*, 28(2), p: 165-172.
- Hassaine O. (2022). application of Box-Wilson central composite experimental design to optimize the proteolytic activity in milk by *Lactococcus lactis* lcl strain. *Bacterial Empire*, 5(1), p : 1-7.
- Hawar S. N. (2022). Extracellular Enzyme of Endophytic Fungi Isolated from Ziziphus spina Leaves as Medicinal Plant. *International Journal of Biomaterials*, 2022, p : 1-9.
- Holland D., Hatib K., et Bar-Yaakov I. (2009). Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. *Horticultural Reviews*, 35, p : 127-191.
- Hon K. J. Y., Mohd Amran N. A. A., Abdullah A. N., Ngieng N. S., et Roslan H. (2024). Comparative Analysis of  $\alpha$ -Amylase Sequences in Selected *Aspergillus* Species and Analysis of Amylase Activity in Three Locally Isolated *Aspergillus* Species. *Science & Technology Asia*, 29(3), P : 224-243.
- Houde A., Kademi A., et Leblanc D. (2004). Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1-3), p : 155-170.
- Hussain S. Z., Naseer B., Qadri T., Fatima T., Bhat T.A. (2021). Fruits Grown in Highland Regions of the Himalayas : Nutritional and Health Benefits. Switzerland. Springer. P : 1-338.
- Ire F. S., Okolo B. N., Moneke A. N., et Odibo F. J. C. (2011). Influence of cultivation conditions on the production of a protease from *Aspergillus carbonarius* using submerged fermentation. *African Journal of Food Science*, 5(6), p : 353-365.
- Ismael A. et Radhi M. M. (2023). Current Topics on Chemistry and Biochemistry. India. United Kingdom : Charbell Miguel Haddad Kury. 177 P.
- Jarrar H. (2011). Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles. Thèse de doctorat : Chimie des matériaux. Ecole nationale supérieure de chimie (Montpellier)., 163 p.
- Jasarat A., Sharma D. C., Bano A., Gupta A., Sharma S., Bajpai P., et Pathak N. (2019). Exploiting Microbial Enzymes for Augmenting Crop Production. *Enzymes in Food Biotechnology*, p : 503-519.
- Jaynes J., Ding X., Xu H., Wong W. K., et Ho, C.-M. (2013). Application of fractional factorial designs to study drug combinations. *Statistics in Medicine*, 32(2), p : 307-318.
- John G. S. M., et Satoru T. (2008). Understanding Structural Features of Microbial Lipases an Overview. *Analytical Chemistry Insights*, 3, p: 9-19.

- Kadam V., Dhanorkar M., Patil S., et Singh P. (2024). Advances in the co-production of biosurfactant and other biomolecules: statistical approaches for process optimization. *Journal of Applied Microbiology*, 135(2), p : 2-13.
- Kalompatsios D., Ionescu A. I., Athanasiadis V., Chatzimitakos T., Mantiniotou M., Kotsou K., Bozinou E., et Lalas S. I. (2024). Maximizing Bioactive Compound Extraction from Mandarin (*Citrus reticulata*) Peels through Green Pretreatment Techniques. *Oxygen*, 4(3), p : 307-324.
- Kango N., Jana U. K., et Choukade R. (2019). Fungal Enzymes: Sources and Biotechnological Applications. *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology*, p : 515-538.
- Kareem S. O., Adebayo, O. S., Balogun S. A.1., Adeogun A. I., And Akinde S. B. (2017). Purification and Characterization of Lipase from *Aspergillus flavus* PW2961 using Magnetic Nanoparticles. *Nig. J. Biotech*, 32, P : 77- 82.
- Kaul K., Rajauria G., et Singh R. (2024). Valorization of Agro-industrial Waste for Pectinase Production and its Influence on Circular Economy. *Food and Bioproducts Processing*, 148, p : 141-153.
- Kaur G., Kaur P., Kaur J., Singla D., et Monica Sachdeva Taggar. (2024). Xylanase, xylooligosaccharide and xylitol production from lignocellulosic biomass: Exploring biovalorization of xylan from a sustainable biorefinery perspective. *Industrial Crops and Products*, 215, 118-610.
- Keharom S., Mahachai R., et Chanthai S. (2016). The optimization study of  $\alpha$ -amylase activity based on central composite design-response surface methodology by dinitrosalicylic acid method. *International Food Research Journal*, 23(1), p : 10-17.
- Ketudat Cairns J. R., et Esen A. (2010).  $\beta$ -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(20), 3389-3405.
- Khannous L., Jrad M., Dammak M., Miladi R., Chaaben N., Khemakhem B., Gharsallah N., et Fendri I. (2014). Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions. *Lipids in Health and Disease*, 13(1), p : 1-9.
- Kim T. K. (2017). Understanding one-way ANOVA using conceptual figures. *Korean Journal of Anesthesiology*, 70(1), P : 22-26.
- Klaus M. (2024). Optimization of fermentation processes for industrial enzyme production. *J Micro Bio Curr Res 2024*, 8(2), p : 1-2.

- Konsoula Z., et Liakopouloukyriakides M. (2007). Co-production of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98(1), p : 150-157.
- Krenke R., et Grabczak E. M. (2011). Tracheobronchial Manifestations of *Aspergillus* Infections. *The Scientific World Journal*, (11), p : 2311-2324.
- Krijgsheld P., Bleichrodt R., van V. G. J., Wang F., Müller W. H., Dijksterhuis J., et Wösten H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 74(1), p: 1-29.
- Kuddus M., Roohi N., Bano N., Sheik G. B., Joseph B., Hamid B., Sindhu R., et Madhavan A. (2024). Cold-active microbial enzymes and their biotechnological applications. *Microbial Biotechnology*, 17(4), p : 1-18.
- Kulkarni P., Harkut N., Nikam P., et Savita K. (2021). Screening of lipase producing fungi and its application. *International Journal of Research and Analytical Reviews*, 6(2), P : 649-655.
- Kumar A., Verma V., Dubey V. K., Srivastava A., Garg S. K., Singh V. P., et Arora P. K. (2023). Industrial applications of fungal lipases: a review. *Industrial Applications of Fungal Lipases: A Review*, 14, p : 1-18.
- Kumar D., Savitri N., Thakur., Verma R et Bhalla T. C., (2008). Microbial Proteases and Application as Laundry Detergent Additive. *Research Journal of Microbiology*, 3(12), p : 661-672.
- Kumar N. A., Jitendra M., et Vaibhav M. (2020). Microbial enzymes : roles and applications in industries. Singapore : Springer. 329 p.- (116-125).
- Kushwaha S. C., Bera M. B., Kumar P. (2013). Nutritional Composition of Detanninated and Fresh Pomegranate Peel Powder. *Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*, 7(1), p : 38-42.
- Kwon N. J., Shin K. S., et Yu J. H. (2010). Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(12), p: 981-993.
- Lahouel Z. (2015). Etude diagnostique de la filière pomme de terre dans la région de tlemcen, Cas de deux fermes pilotes : Hamadouche et Belaidouni. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en : Agronomie option : amélioration végétale. Université Aboubekr Belkaïd – Tlemcen, p : 105.
- Lanka S., et Latha J. (2015). A Short review on various screening methods to isolate potential lipase producers: lipases-the present and future enzymes of biotech industry. *Int J Biol Chem*, (9), p: 207-219.

- Laronha H., et Caldeira J. (2020). Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells*, 9(5), p : 1076.
- Lecellier A. (2013). Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Thèse de doctorat en Biologie-Biophysique. Université de Reims Champagne -Ardenne, p : 196.
- Lee L. P., Karbul H. M., Citartan M., Gopinath S. C. B., Lakshmipriya T., et Tang T. H. (2015). Lipase Secreting *Bacillus* Species in an Oil-Contaminated Habitat: Promising Strains to Alleviate Oil Pollution. *BioMed Research International*, 2015, P : 1-9.
- Lee Y. J., Choi Y. R., Lee S. Y., Kim Y. H., Kim S. H., Kim K. H., Lee H. Y. (2011) Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. *Mycobiology*, 39(1), p: 33-39.
- Li H., et Mee R. W. (2003). Optimal foldover plans for two-level fractional factorial designs. *Journal of Quality Technology*, 35(4), p : 409-418.
- Li Q., Ray C. S., Callow N. V., Loman A. A., Islam S. M. M., et Ju L.K. (2020). *Aspergillus niger* production of pectinase and  $\alpha$ -galactosidase for enzymatic soy processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 134, p : 109-476.
- Li Q., Zhang C., Li J., Du G., Li Z., Zhou J., et Zhang G. (2025). Characterization of *Aspergillus oryzae* mutant and its application in heterologous lipase expression. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 10(2), p : 365-372.
- Li X., Chen J., Yin Y., Xiao S., Zhang R., Yang Y., Li L., Xu H., Zhang X., et Hu P. (2024). Chemical structure elucidation and functional activities comparison of two polysaccharides purified from *Citrus reticulata* Blanco peels. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 11(1), p : 16.
- Lima C. A., Contato A. G., Oliveira F. Silva S.S., Hidalgo, V. B., Irfan M., Gambarato B. C., et Bento S. (2025). Trends in Enzyme Production from *Citrus* By-Products. *Processes*, 13(3), p : 1-18.
- Lima L. G. R., Márcia M. M. G., Sônia C., Verônica F. M., Gizele C. F. S. et Antônio C. A. d. C. (2019). Lipase Production by *Aspergillus Niger* c by Submerged Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62, p: 11.
- Lun., wang., yue., huang., et shuizhi Y. (2018). Genome of Wild Mandarin and Domestication History of Mandarin. *Molecular Plant*, 11(8), p : 1024-1037.
- Magda R. A., Awad A. M., et Selim K. A. (2008). Evaluation of mandarin and navel orange peels as natural sources of antioxidants in biscuits. *Food Science and Technology*, Special Volume, p : 75-82.

- Mahmoud G. A., Koutb M. M., Morsy F. M., et Bagy M. M. (2015). Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus *Aspergillus terreus*. *European Journal of Biological Research*, 5(3), p : 70-77.
- Mandal S., Mandal M. (2016). Tangerine (*Citrus reticulata* L. var.) Oils. Dans : Preedy V.R. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Londres : Academic Press, p: 803-811.
- Maurice N. (2019). Role of Solid-State Fermentation to Enhance Cellulase Production. *Elsevier*, P : 127-153.
- Mee R. (2009). A Comprehensive Guide to Factorial Two-Level Experimentation. *Springer*, p : 383.
- Mehmood T., Ahmed A., Ahmad A., Ahmad M. S., et Sandhu M. A. (2018). Optimization of mixed surfactants-based  $\beta$ -carotene nanoemulsions using response surface methodology: An ultrasonic homogenization approach. *Food Chemistry*, 253, P : 179–184.
- Mehta A., Sharma R., et Gupta R. (2019). Statistical optimization by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus fumigatus*. *The Open Microbiology Journal*, 13, p: 86-93.
- Mejía C., Bautista E. J., García L., Barrios Murcia J. C., et Barrera G. (2024). Assessment of Fungal Lytic Enzymatic Extracts Produced Under Submerged Fermentation as Enhancers of Entomopathogens' Biological Activity. *Current Microbiology*, 81(7), p : 1-13.
- Merlin Christy P., Gopinath L. R., et Divya D. (2014). A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, p : 167-173.
- Mobini-Dehkordi M., et Afzal Javan F. (2012). Application of alpha-amylase biotechnology. *Journal of Biology and Today's World*, 1(1), p : 39-50.
- Mojsov K. D. (2016). *Aspergillus* Enzymes for Food Industries. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, p : 215-222.
- Montgomery D. C. (2017). Design and analysis of experiments. *John Wiley et Sons*. (9e éd) p : 656.
- Moore G. L., Maranas C. D., Gutshall K. R., et Brenchley J. E. (2000). Modeling and optimization of DNA recombination. *Computers and Chemical Engineering*, 24(7-8), p: 693-699.
- Moussaoui M. (2023). Valorisation des déchets d'agrumes par la production de bio-arômes et de la pectine. Mémoire Master Recherche: Biotechnologie et Biothérapie. Université frère mentouri constantine 1, 66 p.

- Moussi K., Azzouz Z., Benhoula M. Enhanced protease production by *Aspergillus candidus* strain MKA05 using response surface methodology. *Biomass Conv. Bioref.* 15, p : 4819-4834 (2025).
- Musara C., Aladejana E. B., et Mudyiwa S. M. (2020). Review of the nutritional composition, medicinal, phytochemical and pharmacological properties of *Citrus reticulata* Blanco (*Rutaceae*). *F1000Research*, 9(1), p : 13-87.
- Mustafa S. R., Husaini A., Hipolito C. N., Hussain H., Suhaili N., et Roslan H. A. (2016). Application of Response Surface Methodology for Optimizing Process Parameters in the Production of Amylase by *Aspergillus flavus* NSH9 under Solid State Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59, P : 2-10.
- Namiq F. Z., Zanan N., et Amla, C. (2024). Généralités sur les plans de surfaces de réponse (Plan de Doehlert). Mastère Spécialisé : Génie des Procédés Industriels. Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Département de Chimie, p : 1-18.
- Naraian R., et Gautam R. L. (2018). *Penicillium* Enzymes for the Saccharification of Lignocellulosic Feedstocks. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, p : 121–136.
- Nehal F. (2017). Caractérisation de lipases isolées à partir de souches microbiennes locales. THÈSE Présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat en sciences. Spécialité : Sciences Alimentaires. Université Hassiba Benbouali de Chlef, p : 84.
- Nielsen J. E., Beier L., Otzen D., Borchert T. V., Frantzen H. B., Andersen K. V., et Svendsen A. (1999). Electrostatics in the active site of an alpha-amylase. *European Journal of Biochemistry*, 264(3), p : 816-824.
- Nielsen P. K., Bønsager B. C., Fukuda K., et Svensson B. (2004). Barley  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor: structure, biophysics and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1696(2), p : 157-164.
- Nieuwenhuis B. P. S., et James T. Y. (2016). The frequency of sex in fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*, (371), p: 9.
- Niyonzima F. N., Veena S. M., et More S. S. (2020). Industrial Production and Optimization of Microbial Enzymes. Dans : kumar N., Mishra J., et Mishra V., *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*. India. Springer. p : 115-135.
- Ochiai A., Sugai H., Harada K., Tanaka S., Ishiyama Y., Ito K., Tanaka T., Uchiumi T., Taniguchi M., et Mitsui T. (2014). Crystal structure of  $\alpha$ -amylase from *Oryza sativa*: molecular insights into enzyme activity and thermostability. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(6), p : 989-997.

- Ogbonna C. N., Okpokwu N. M., Okafor C. U., et Onyia C. E. (2014). Isolation and screening of amylase producing fungi obtained from garri processing site. *International Journal of Biotechnology and Food Science*, 2(5), P : 88-93.
- Ojeda L. M., Chen W., Eagle C. E., Gutiérrez G., Jia W. L., Swilaiman S. S., Huang Z., Park H. S. ., Yu J. H. ., Cánovas D., et Dyer P. S. (2018). Evolution of asexual and sexual reproduction in the *aspergilli*. *Studies in Mycology*, 91(002), p: 37-59.
- Olakusehin V. O., et Oyedéji O. (2022). Production of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus flavus* S2-OY using solid substrate fermentation of potato (*Solanum tuberosum* L.) peel. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(5), P : 1950-1967.
- Omemu A., Bamigbade G., Obadina A., et Obuotor T. (2015). Isolation and Screening of Amylase from Moulds Associated with the Spoilage of Some Fermented Cereal Foods. *British Microbiology Research Journal*, 5(4), p: 359-367.
- Ozlem T. (2018). Mandarin peel effervescent: Antioxidative value-added product. *Food Health and Technology Innovations*, 1(3), p : 85-94.
- Padmavathi, T. (2015). Optimization of phosphate solubilization by *Aspergillus niger* using plackett-burman and response surface methodology. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(3), p : 781-798.
- Pandey A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 27(2), P : 109-117.
- Pandey A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), P : 81-84.
- Papaneophytou C. (2019). Design of Experiments As a Tool for Optimization in Recombinant Protein Biotechnology: From Constructs to Crystals. *Molecular Biotechnology*, 61(12), p : 873-891.
- Park H. S., et Yu J. H. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 15 (6), p : 669-677.
- Pathak P. D., Mandavgane S. A., et Kulkarni B. D. (2016). Valorization of Pomegranate Peels: A Biorefinery Approach. *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), p : 1127–1137.
- Pathak P. D., Mandavgane S. A., Puranik N. M., Jambhulkar S. J., et Kulkarni B. D. (2017). Valorization of potato peel: a biorefinery approach. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), p : 218-230.
- Plackett R. L., et Burman J. P. (1946). The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*, 33(4), p: 305-325.

- Pontecorvo G. (1953). The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, (5), p: 141-238.
- Prajapati V. S., Trivedi U. B., et Patel K. C. (2014). A statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 under solid-state fermentation. *3 Biotech*, 5(2), p : 211-220.
- Pratibha S. C. (2022). Isolation, characterization and fermentative production of amylase enzyme from *aspergillus niger*. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 29(4), p : 4633-4640.
- production by *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 10(28), p : 5514-5523.
- Qureshi A. S., Dahot M. U., et Rehman A. U. (2004). Production of amylase by fungi through submerged fermentation. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 1(1), P : 35-42.
- Qureshi A. S., Khushk I., Naqvi S. R., Simiar A. A., Ali C. H., Naqvi M., Danish M., Ahmed A., Majeed H., Mir Jatt A. N., Rehan M., et Nizami A. S. (2017). Fruit Waste to Energy through Open Fermentation. *Energy Procedia*, 142, 904–909.
- Rajendran A. et Thangavelu V. (2007). Optimization of medium composition for lipase production by *Candida rugosa* NCIM 3462 using response surface methodology. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(5), p : 643-655.
- Rao M. A., Scelza R., Acevedo F., Diez M. C., et Gianfreda L. (2014). Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*, 107, p : 145-162.
- Ravindran R., et Jaiswal A. (2016). Microbial Enzyme Production Using Lignocellulosic Food Industry Wastes as Feedstock: A Review. *Bioengineering*, 3(4), p : 1-22.
- Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M. E., et Miller R. (2009). Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, p : 237-250.
- Remonato D., Miotti Jr., R H., Monti R., Bassan J. C., et de Paula A. V. (2022). Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. *Process Biochemistry*, 114, p : 1-20.
- Ritu S, Harnek S. S., et Anjali D., (2017). Amylases: Characteristics and industrial applications. *J Pharmacogn Phytochem*, 6(4), p : 1865-1871.
- Robinson P. (2015). Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays in Biochemistry*, 59(1), p : 1-41.
- Roukas T., et Kotzekidou P. (2020). Pomegranate peel waste: a new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation under non-aseptic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, p : 13105–13113.

- Roy J. K., et Mukherjee A. K. (2013). Applications of a high maltose forming, thermo-stable  $\alpha$ -amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. *Biochemical Engineering Journal*, 77, p : 220-230.
- Salihu A., Bala M., et Bala S. M. (2013). Application of Plackett-Burman Experimental Design for Lipase Production by *Aspergillus niger* Using Shea Butter Cake. *ISRN Biotechnology*, p : 1-5.
- Salwan R., et Sharma V. (2019). Trends in extracellular serine proteases of bacteria as detergent bioadditive: alternate and environmental friendly tool for detergent industry. *Archives of Microbiology*.
- Samson R. A., Visagie C. M., Houbaken J., Hong S. B. ., Hubka V., Klaassen C. H. W., Perrone G., Seifert K. A., Susca A., Tanney J. B., Varga J., Kocsubé S., Szigeti G., Yaguchi T., et Frisvad J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, (78) (1), p: 141-173.
- Samuel K., Victoria, P. D., et Isaac, W. O. (2017). Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* cultivated on yam peels in solid state fermentation using response surface methodology. *African Journal of Biochemistry Research*, 11(7), P : 34-42.
- Saroj P., P M., et Narasimhulu K. (2020). Assessment and evaluation of cellulase production using ragi (*Eleusine coracana*) husk as a substrate from thermo-acidophilic *Aspergillus fumigatus* JCM 10253. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(1), p : 113-126.
- Saroj P., P M., et Narasimhulu K. (2022). Biochemical Characterization of Thermostable Carboxymethyl Cellulase and  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus fumigatus* JCM 10253. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194, p : 2503-2527.
- Saxena R., et Singh R. (2014). Contemporaneous Production of Amylase and Protease through CCD Response Surface Methodology by Newly Isolated *Bacillus megaterium* Strain B69. *Enzyme Research*, 2014, P : 1-12.
- Schoch C., Ciufo S., Domrachev M., Hotton C., Kannan S., Khovanskaya R., Leipe D., McVeigh R., O'Neill K., Robbertse B., Sharma S., Soussov V., Sullivan JP., Sun L., Turner S., et Karsch-Mizrachi I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database* (Oxford) [en ligne]. (consulté le 14 mai 2025).
- Shad M., Akhtar M. W., et Sajjad M. (2025). Investigating the structural and functional snapshots of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase through protein engineering strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 307(3), p : 142-243.
- Sharma A., Gupta G., Ahmad T., Mansoor S., et Kaur B. (2019). Enzyme Engineering: Current Trends and Future Perspectives. *Food Reviews International*, 37(2), p : 121-154.

- Sharma H. et Upadhyay S. K. (2020). Enzymes and their production strategies. *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, p : 31-48.
- Sharma R., Kocher G. S., Bhogal R. S., et Oberoi H. S. (2014). Cellulolytic and xylanolytic enzymes from thermophilic *Aspergillus terreus* RWY. *Journal of Basic Microbiology*, 54(12), p : 1367–1377.
- Sharma R., Yadav R. S., et Upadhyay S. (2001). Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnology Advances*, 19, p : 627-662.
- Shaygannia E., Bahmani M., Zamanzad B., et Rafieian-Kopaei M. (2015). A Review Study on *Punica granatum* L. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 21(3), p : 221-227.
- Singh R., Kumar M., Mittal A., et Mehta P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), p : 1-15.
- Singh R., Singh A., et Sachan S. (2019). Enzymes Used in the Food Industry: Friends or Foes? *Enzymes in Food Biotechnology*, p : 827-843.
- Singh S. K., Singh S. K., Tripathi V. R., Khare S. K., et Garg S. K. (2011). Comparative one-factor-at-a-time, response surface (statistical) and bench-scale bioreactor level optimization of thermoalkaline protease production from a psychrotrophic *Pseudomonas putida* SKG-1 isolate. *Microbial Cell Factories*, 10(1), p : 1-13.
- Singh V., Haque S., Niwas R., Srivastava A., Pasupuleti M., et Tripathi C. K. M. (2017). Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in Microbiology*, 7. P : 1-16.
- Singhanian R. R., Sukumaran R. K., Patel A. K., Larroche C., et Pandey A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), P : 541-549.
- Solanki P., Putatunda C., Kumar A., Bhatia R., et Walia A. (2021). Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech*, 11(10), p : 1-25.
- Somadder P. D., Trzcinski A., Chen G., Chow Y., et 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, p : 1-22.
- St G. G., et Dufresne P. (2021). Identification des champignons d'importance médicale : Stage de laboratoire. *Institut national de santé publique du Québec (INSPQ)*, p : 49.

- Subramaniam R. et Vimala R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International journal of science and nature*, 3(3), P : 480-486.
- Sun Z., Wu Y., Long S., Feng S., Jia X., Hu Y., Ma M., Liu J., et Zeng B. (2024). *Aspergillus oryzae* as a Cell Factory: Research and Applications in Industrial Production. *Journal of Fungi*, 10(4), p : 248.
- Sundarram A., et Murthy K. (2014).  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), p : 166-175.
- Suryawanshi H. k, et Pandya N. (2017). Screening, Identification of Alkaline Proteases Producing Fungi from Soil of Different Habitats of Amalner Tahsil [Maharashtra] and Their Applications. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 5(3), p : 397-402.
- Swetha S., Varma A., et Padmavathi T. (2013). Statistical evaluation of the medium components for the production of high biomass,  $\alpha$ -amylase and protease enzymes by *Piriformospora indica* using Plackett–Burman experimental design. *3 Biotech*, 4(4), P : 439-445.
- Tamilarasan K., Muthukumaran C., et Kumar M. (2012). Application of response surface methodology to the optimization of amylase production by *Aspergillus oryzae* MTCC 1847. *African Journal of Biotechnology*, 11(18), P : 4242-4247.
- Tauseef S., Erum Asgher A., Ajaz M., Tauseef F., Siddiqui K., et Kiran T., (2025). Bacterial Amylase Production and its Application as a Detergent Additive: Significance of Industrial Enzyme. *Biological Sciences - PJSIR*, 68(1), p : 71-77.
- Thom C., et Raper K. B. (1945). A Manual of the *Aspergilli*. The williams and Wilkins company. Baltimore, Maryland, États-Unis: The Williams and Wilkins Company. P: 373 (Non spécifiée).
- Tiwari S.P., Srivastava R., Singh C.S., Shukla K., Singh R.K., Singh P., Singh R., Singh N.L., et Sharma R. (2015). Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *Journal of Global Biosciences*, 4(1), p : 1886-1901.
- Toon C., Pieter V. G., et Smets I. (2023). Quantification of hydrolysis activity in a biological wastewater treatment context. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(7-8), P : 1-11.
- Treichel H., de Oliveira D., Mazutti M. A., Di Luccio M., et Oliveira J. V. (2009). A Review on Microbial Lipases Production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), p : 182-196.
- Triyaswati D., et Ilmi M. (2020). Lipase-producing Filamentous Fungi from Non-dairy Creamer Industrial Waste. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 48(2), P : 167-178.

- Troncoso D. F., Alberto Sánchez D., et Luján Ferreira M. (2022). Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review. *ChemistryOpen*, 11(3), p : 1-38.
- Ünal A. T., Navruz F. Z., Korcan S. E., İnce S., et Göçer E. U. (2025). Research on Genotoxicity Evaluation of the Fungal Alpha-Amylase Enzyme on *Drosophila melanogaster*. *Biology*, 14(3), p : 219.
- Usman M., Bukar A., Jauro A. H., Mubarak A. M., Abdullahi T.U., Bayawa M. A., Mansur I., et Kazeem M. O. (2023). Isolation and Screening of Amylase-producing Fungi from Spoiled Fruits. *Journal of Environmental Bioremediation and Toxicology*, 6(1), P : 30-33.
- Usman M., et Fatima B. (2018). Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) breeding. In M. K. Mandal et R. L. Sawant (Eds), Fruit crops: Breeding of horticultural crops. New Delhi, India: Springer India, p : 465-533 (Breeding of Horticultural Crops series).
- Van den Bergh D., van Doorn J., Marsman M., Draws T., van Kesteren E.J., Derks K., Dablander F., Gronau Q. F., Kucharský Š., Gupta A. R. K. N., Sarafoglou A., Voelkel J. G., Stefan A., Ly A., Hinne M., Matzke D., et Wagenmakers E.J. (2020). A Tutorial on Conducting and Interpreting a Bayesian ANOVA in JASP. *L'Année Psychologique*, 120(1), P : 73-96.
- Vanaja K., et Shobha R. H. (2007). Concept and applications of Plackett Burman design. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 24(1), p: 1-41.
- Varasteh F., Arzani K., Zamani Z., et Mohseni et A. (2009). Evaluation of the most important fruit characteristics of some commercial pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in iran. *Acta Horticulturae*, 818, p : 103-108.
- Verma S., Gautam K. M., et Rajender K. (2021). Current Perspectives for Microbial Lipases from Extremophiles and Metagenomics. *Biochimie*, (182), p : 23-36.
- Victorino S. A. I., Gonsales R. N., Antônio O S. F., Santiago F., Pereira S. L. N., Raspante M. J., et Cabral H. (2021). Enzyme engineering and its industrial applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(2), p : 389-409.
- Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar C. N., Romero-Gomez S. J., Díaz-Godínez G., et Augur C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), P : 157-167.
- Vishwanatha K. S., Rao A. G. A., et Singh S. A. (2009). Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(2), p : 129-138.

- Visvanathan R., Qader M., Jayathilake C., Jayawardana B. C., Liyanage R., et Sivakanesan R. (2020). Critical review on conventional spectroscopic  $\alpha$ -amylase activity detection methods: merits, demerits and future prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, p : 2836-2847.
- Williams J. A. (2017). Amylase. *American Pancreatic Association*, p : 1-8.
- Xu B. (2023). Fungal Biotechnology and Applications. *Journal of Fungi*, 9(9), p : 1-4.
- Yahya S., Jahangir S., Shaukat S. S., Sohail M., et Khan S. A. (2016). Production optimization by using Plackett-Burman design and partial characterization of amylase from *Aspergillus tubingensis* SY 1. *Pakistan Journal of Botany*, 48(6), p : 2557-2561.
- Yandri Y., Hendri R., Tati S., Bambang I., Sutopo H. (2023). Immobilization of *Aspergillus fumigatus*  $\alpha$ -Amylase via Adsorption onto Bentonite/Chitosan for Stability Enhancement. *Emerging Science Journal*. 7(5), p : 1811-1826.
- Yu J. H. (2010). Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*, (38) (4), p: 229.
- Yu X., Chen X., Li Y., et Li L. (2022). Effect of Drying Methods on Volatile Compounds of *Citrus reticulata* Ponkan and Chachi Peels as Characterized by GC-MS and GC-IMS. *Foods*, 11(17), p : 26-62.
- Yun D., et Liu J. (2024). Preparation, Characterization and Application of Active Food Packaging Films Based on Sodium Alginate and Twelve Varieties of Mandarin Peel Powder. *Foods*, 13(8), p : 11-74.
- Zhao H., et Arnold F. H. (1997). Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Research*, 25(6), p: 1307-1308.
- Zheng F., Basit A., Zhuang H., Chen J., Zhang J., et Chen W. (2022). Biochemical characterization of a novel acidophilic  $\beta$ -xylanase from *Trichoderma asperellum* ND-1 and its synergistic hydrolysis of beechwood xylan. *Frontiers in Microbiology*, 13, p : 1-13.
- Zou J., Han Y., et So, S.-S. (2008). Overview of Artificial Neural Networks. *Methods in Molecular Biology*TM, 458, p: 14-22.
- Zupan J. (1994). Introduction to artificial neural network (ANN) methods: What they are and how to use them. *Acta Chimica Slovenica*, 41(3), p : 327-352.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Réactifs

Réactif	Formule chimique
Sulfate de magnésium	MgSO <sub>4</sub>
Nitrate de sodium	NaNO <sub>3</sub>
Dihydrogénophosphate de potassium	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Sulfate ferreux	FeSO <sub>4</sub>
Chlorure de potassium	KCL
Chlorure de calcium	CaCl <sub>2</sub>
Acide 3,5-Dinitrosalicylique (DNSA)	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
Amidon	(C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>
Acide citrique	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>
Phosphate de sodium dibasique	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Huile d'olive	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O
Acétone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O
Phénolphtaléine	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
Hydroxyde de sodium	NaOH
Rouge de phénol	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> S
Tartrate double K <sup>+</sup> Na <sup>+</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> KNa.4H <sub>2</sub> O
Maltose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>
Carbonate de sodium	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Iodure de potassium	KI
Diode	I <sub>2</sub>

---

## Annexe 2 : Préparation des milieux de culture

### ➤ **YPSA (yeast extract peptone soluble starch agar)**

Dissoudre dans 1 litre d'eau distillée :

Amidon soluble : 20 g

Peptone : 10 g

Extrait de levure : 5 g

Agar : 20 g

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

### ➤ **Solution de Lugol**

Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée :

Iode (I<sub>2</sub>) : 1 g

Iodure de potassium (KI) : 2 g

### ➤ **Milieu à base d'huile d'olive**

Dissoudre dans 1 litre d'eau distillée :

Huile d'olive : 10 ml

Rouge de phénol : 0,1 g

Chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) : 5 g

Agar : 20 g

Ajuster le pH à 7,3–7,4 avec une solution de NaOH 0,1 N

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

### ➤ **PDA (Potato Dextrose Agar)**

200 g de pommes de terre (non pelées) ont été bouillies dans de l'eau pendant 30 minutes à 1 heure, puis le bouillon obtenu a été filtré. Ensuite, de l'eau a été ajoutée au filtrat jusqu'à obtenir un volume total de 1000 ml. Par la suite, 20 g de dextrose (D-glucose) et 20 g d'agar-agar ont été incorporés, et l'ensemble a été homogénéisé. Enfin, un autoclavage a été réalisé.

---

### **Annexe 3 : Milieux de fermentation pour la production enzymatique**

#### **➤ Milieu synthétique**

Dissoudre dans 300 ml d'eau distillée :

MgSO<sub>4</sub> : 0,15 g.

NaNO<sub>3</sub> : 0,9 g.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,3 g.

FeSO<sub>4</sub> : 0,003 g.

KCl : 1,5 g.

CaCl<sub>2</sub> : 0,03 g.

Répartir 50 ml par erlenmeyer.

Ajouter : 2,5 ml d'huile d'olive Pour la lipase, 1 g d'amidon Pour l' $\alpha$ -amylase.

Autoclaver à 121°C pendant 15 min.

#### **➤ Milieu de fermentation à base de déchets agroalimentaires pour la production d' $\alpha$ -amylase et de la lipase**

Un milieu de culture à base de déchets de fruits a été préparé en mélangeant 50 ml du filtrat de pelures de grenade avec 50 ml de filtrat d'écorces de mandarine, complétés par 50 ml d'eau distillée. Le mélange obtenu a été homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique. Par la suite, 50 ml de ce mélange est transféré vers des erlenmeyers. Ensuite, les milieux ont subi un autoclavage.

## Annexe 4 : Méthodes analytiques

Détermination de l'activité de l' $\alpha$ -amylase (Méthode de Bernfeld, 1955)

### ➤ Principe

L'activité de l' $\alpha$ -amylase est évaluée par sa capacité à hydrolyser l'amidon, entraînant la libération de maltose. Ce dernier est quantifié par une méthode colorimétrique basée sur l'utilisation de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA), qui réagit avec les sucres réducteurs pour produire une coloration mesurable. L'intensité de la couleur obtenue est directement proportionnelle à la concentration de maltose formée.

### ➤ Préparation du substrat

Dissoudre 1 g d'amidon de pomme de terre dans 100 ml de tampon phosphate (pH 5).

### ➤ Préparation du réactif DNSA

Dissoudre dans 50 ml d'eau distillée :

DNSA : 0,5 g

NaOH (2N) : 10 ml

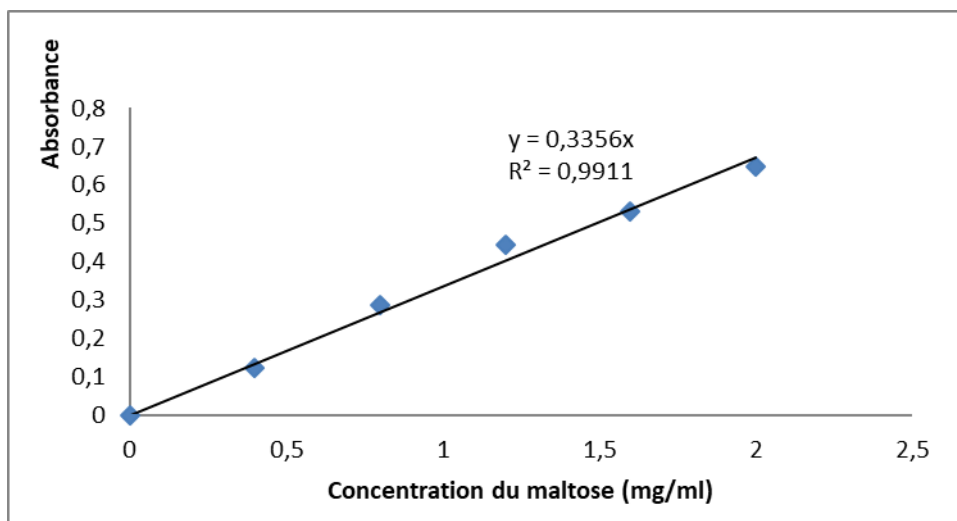
Tartrate double de potassium et de sodium : 15 g

Homogénéiser et ajuster à 50 ml avec de l'eau distillée.

### ➤ Courbe d'étalonnage

Préparer une courbe d'étalonnage en utilisant des solutions standards de maltose.

L'absorbance est mesurée à 540 nm.



**Figure 1** : Courbe d'étalonnage de maltose

### Détermination de l'activité de la lipase

#### ➤ Principe

L'activité enzymatique de la lipase est estimée par sa capacité à hydrolyser les lipides, conduisant à la libération d'acides gras libres. La quantification de ces acides gras est réalisée par titration à l'aide d'une solution de NaOH 0,05 N. Le point d'équivalence est identifié par un virage de couleur de l'indicateur utilisé.

#### ➤ Préparation de substrat

Préparation d'une émulsion stable par homogénéisation de 25 ml d'huile d'olive avec 75 ml de solution de gomme arabique à 7 %.

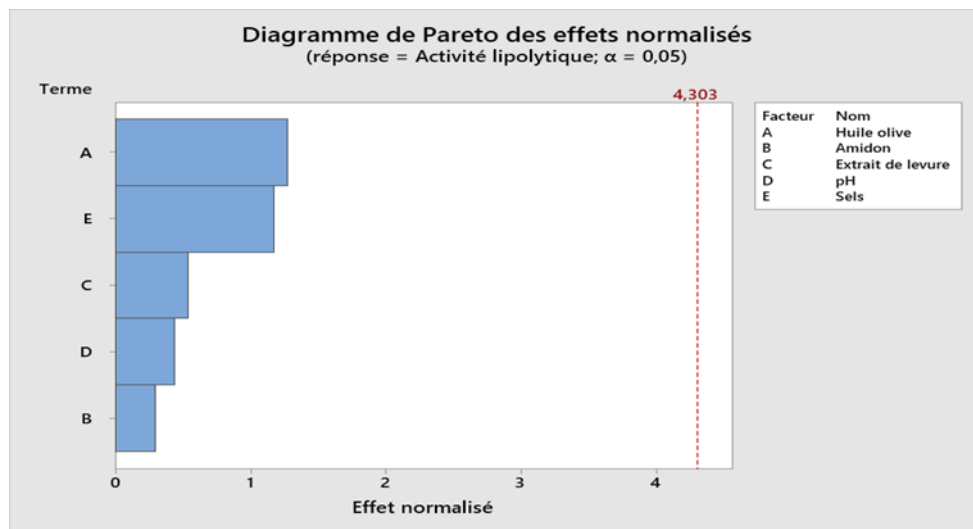
#### ➤ Préparation de phénolphtaléine 1%

Dissoudre 0,2 g de la phénolphthaléine dans 20 ml éthanol.

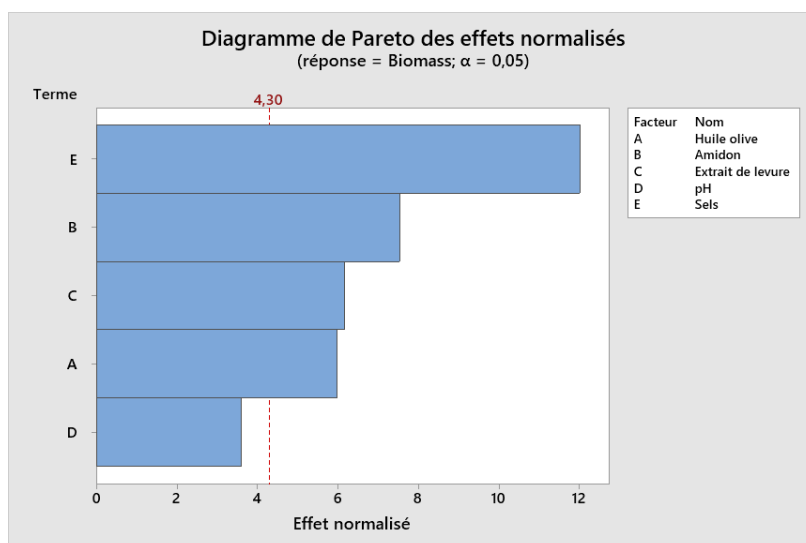
#### ➤ Préparation d'NaOH (0,05N)

Dissoudre 0,5 g d' NaOH dans 250 ml d'eau distillée.

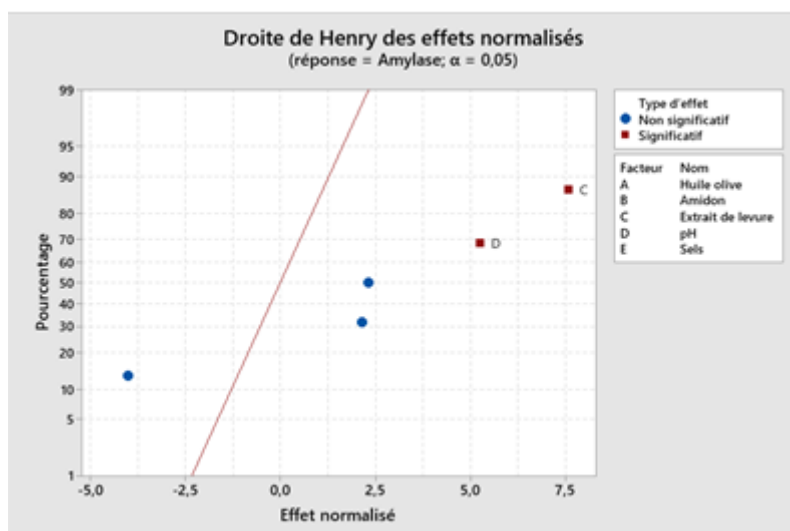
## Annexe 5 : Résultats statistiques



**Figure 2 :** Diagramme de Pareto des effets normalisés illustrant l'effet de chacun des facteurs du plan de Plackett-Burman sur la production de lipase pour un niveau de test  $\alpha = 0,05$ .



**Figure 3 :** Pareto des effets normalisés sur la production de la biomasse



**Figure 4 :** Droite de Henry illustrant l'effet de chacun des facteurs du plan de Plackett-Burman sur la production d' $\alpha$ -amylase pour un niveau de test  $\alpha = 0,05$ .

# RÉSUMÉ

## Résumé

Les enzymes sont des biocatalyseurs largement utilisés pour leurs nombreuses applications biotechnologiques et industrielles. Les micro-organismes, en particulier les champignons filamenteux, constituent une source principale de production enzymatique en raison de leur rendement élevé et de la facilité de leur culture. Cette étude vise la production et l'optimisation de deux enzymes d'intérêt industriel : la lipase et l' $\alpha$ -amylase, à partir de deux souches du genre *Aspergillus*. Un criblage qualitatif, suivi d'une analyse quantitative en milieu liquide, a permis d'identifier la souche *Aspergillus* sp. 61 comme la plus performante. Une fermentation en milieu submergé a été réalisée, utilisant des déchets agroalimentaires (pelures de grenade et de mandarine) comme substrat. La souche sélectionnée a montré une production enzymatique significative, atteignant environ 14,16 U/ml pour la lipase et 82,11 U/ml pour l' $\alpha$ -amylase. L'optimisation a été conduite selon les plans Plackett-Burman (PBD) et composite central (CCD) dans le cadre de la méthodologie de surface de réponse (RSM). Cinq facteurs incluaient l'huile d'olive, l'extrait de levure, l'amidon, le pH et les sels ont été criblés. L'analyse statistique du plan Plackett-Burman a permis de sélectionner l'extrait de levure et le pH comme facteurs significatifs pour la production d' $\alpha$ -amylase. Aucun effet significatif n'a été observé concernant la production de lipase. L'optimisation des conditions expérimentales à l'aide du plan composite central a permis de multiplier par huit le rendement enzymatique de l' $\alpha$ -amylase. Le plan CCD a permis de détecter les conditions optimales (extrait de levure : 3,41%, pH : 4) pour une production maximale d' $\alpha$ -amylase ce qui peut prédire une valeur de l'activité amylolytique de 863,1221 U/ml. La stratégie proposée conduit à une récupération enzymatique performante, facile à réaliser et peu coûteuse.

**Mots clés :**  $\alpha$ -Amylase, Lipase, *Aspergillus* sp. 61, PBD, CCD.

**Abstract**

Enzymes are biocatalysts that are widely used for their many biotechnological and industrial applications. Microorganisms, in particular filamentous fungi, are a major source of enzyme production due to their high yield and ease of cultivation. The aim of this study is to produce and optimise two enzymes of industrial interest: lipase and  $\alpha$ -amylase, from two strains of the genus *Aspergillus*. Qualitative screening, followed by quantitative analysis in liquid medium, identified the *Aspergillus* sp. 61 strain as the most efficient. Submerged fermentation was carried out using agri-food waste (pomegranate and mandarin peel) as a substrate. The selected strain showed significant enzyme production, reaching around 14,16 U/ml for lipase and 82,11 U/ml for  $\alpha$ -amylase. Optimisation was conducted according to Plackett-Burman (PBD) and Central Composite Design (CCD) within the framework of Response Surface Methodology (RSM). Five factors including olive oil, yeast extract, starch, pH and salts were screened. Plackett-Burman design statistical analysis selected yeast extract and pH as significant factors for  $\alpha$ -amylase production. No significant effect was observed for lipase production. The optimization of experimental conditions using the Central Composite Design (CCD) led to an eightfold increase in the enzymatic yield of  $\alpha$ -amylase. The CCD design made it possible to identify the optimal conditions (yeast extract: 3,41%, pH: 4) for maximum  $\alpha$ -amylase production, which could predict an amylolytic activity value of 863,1221 U/ml. The proposed strategy leads to efficient enzymatic recovery that is easy to carry out and cost-effective.

**Keywords:** Biomass, lipase,  $\alpha$ -amylase, *Aspergillus* sp. 61, PBD, CCD.

## ملخص

تُعتبر الإنزيمات عوامل محفزة حيوية تُستخدم على نطاق واسع بفضل تطبيقاتها المتعددة في المجالات البيوتكنولوجية والصناعية. وتُعدّ الكائنات الدقيقة، وخاصة الفطريات الخيطية، من المصادر الرئيسية لإنتاج الإنزيمات، نظرًا لمردودها العالي وسهولة زراعتها. تهدف هذه الدراسة إلى إنتاج وتحسين إنزيمين ذوي أهمية صناعية: الليباز والألفا-أميلاز، انطلاقًا من سلالتين تنتميان إلى جنس *Aspergillus*. تم إجراء غربلة نوعية تلتها تحاليل كمية في وسط سائل، مما أتاح تحديد السلالة *Aspergillus* sp. 61 كالأكثر كفاءة. تم تنفيذ عملية التخمير في وسط مغمور باستخدام نفايات زراعية غذائية (قشور الرمان واليوسفي) كركيزة. وقد أظهرت السلالة المنتقاة قدرة إنزيمية ملحوظة، حيث بلغت حوالي 14,16 وحدة/مل لليباز و1182 وحدة/مل للألفا-أميلاز. تم إجراء تحسين الإنتاج باستخدام تصميم Plackett-Burman و Central Composite Design (CCD) في إطار منهجية استجابة السطح (RSM) تمت غربلة خمسة عوامل تشمل زيت الزيتون، مستخلص الخميرة، النشاء، درجة الحموضة (pH)، والأملاح. وقد أظهرت التحليلات الإحصائية لتصميم Plackett-Burman أن مستخلص الخميرة ودرجة الحموضة هما العاملان الأكثر تأثيرًا على إنتاج الألفا-أميلاز، في حين لم يُلاحظ أي تأثير معنوي على إنتاج الليباز. أدى تحسين الظروف التجريبية باستخدام تصميم المركب المركزي (CCD) إلى زيادة مردود إنزيم الألفا-أميلاز بمقدار ثمانية أضعاف. لقد مكّن تصميم CCD من تحديد الظروف المثلى (مستخلص الخميرة بنسبة 41,3%، ودرجة الحموضة 4) للإنتاج الأقصى للإنزيم  $\alpha$ -أميلاز، مما يُمكن أن يتنبأ بقيمة للنشاط الأميلازي تبلغ 863,1221 وحدة/مل. تؤدي الاستراتيجية المقترحة إلى استرجاع إنزيمي فعال، سهل التنفيذ ومنخفض التكلفة.

**الكلمات المفتاحية:** الكتلة الحيوية ، الليباز ، الألفا-أميلاز ، *Aspergillus* sp. 61، تصميم Plackett-Burman ، التصميم المركب المركزي (CCD)

Année universitaire : 2024-2025	Présenté par : Bensalhia Ayat Errahmane Boukhedenna Amani
<b>Intitulé : Amélioration de la production conjointe d’<math>\alpha</math>-amylase et de lipase par <i>Aspergillus</i> sp. 61 à partir de déchets de fruits: Optimisation statistique par RSM</b>	
<b>Mémoire pour l’obtention du diplôme de Master en Microbiologie Appliquée</b>	
<b>Résumé :</b> <p>Les enzymes sont des biocatalyseurs largement utilisés pour leurs nombreuses applications biotechnologiques et industrielles. Les micro-organismes, en particulier les champignons filamenteux, constituent une source principale de production enzymatique en raison de leur rendement élevé et de la facilité de leur culture. Cette étude vise la production et l’optimisation de deux enzymes d’intérêt industriel : la lipase et l’<math>\alpha</math>-amylase, à partir de deux souches du genre <i>Aspergillus</i>. Un criblage qualitatif, suivi d’une analyse quantitative en milieu liquide, a permis d’identifier la souche <i>Aspergillus</i> sp. 61 comme la plus performante. Une fermentation en milieu submergé a été réalisée, utilisant des déchets agroalimentaires (pelures de grenade et de mandarine) comme substrat. La souche sélectionnée a montré une production enzymatique significative, atteignant environ 14,16 U/ml pour la lipase et 82,11 U/ml pour l’<math>\alpha</math>-amylase. L’optimisation a été conduite selon les plans Plackett-Burman (PBD) et composite central (CCD) dans le cadre de la méthodologie de surface de réponse (RSM). Cinq facteurs incluaient l’huile d’olive, l’extrait de levure, l’amidon, le pH et les sels ont été criblés. L’analyse statistique du plan Plackett-Burman a permis de sélectionner l’extrait de levure et le pH comme facteurs significatifs pour la production d’<math>\alpha</math>-amylase. Aucun effet significatif n’a été observé concernant la production de lipase. L’optimisation des conditions expérimentales à l’aide du plan central composite (CCD) a permis de multiplier par huit le rendement enzymatique de l’<math>\alpha</math>-amylase. Le plan CCD a permis de détecter les conditions optimales (extrait de levure : 3,41%, pH : 4) pour une production maximale d’<math>\alpha</math>-amylase ce qui peut prédire une valeur de l’activité amylolytique de 863,12 U/ml. La stratégie proposée conduit à une récupération enzymatique performante, facile à réaliser et peu coûteuse.</p>	
<b>Mots clés :</b> Biomasse, lipase, $\alpha$ -amylase, <i>Aspergillus</i> sp. 61, PBD, CCD.	
<b>Laboratoires de recherche :</b> Laboratoire de Biologie et Environnement Bio-pôle (U Constantine 1 Frères Mentouri).	
<b>Présidente de jury :</b> Mme Abdelaziz Wided (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).	
<b>Encadrante :</b> Mme Benkahoul Malika (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).	
<b>Examinatrice:</b> Mme Boucherit Zeyneb (MAA - U Constantine 1 Frères Mentouri).	

