

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI- CONSTANTINE
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire et Moléculaire



N° d'ordre : 13/DS/2015
N° de série : 01/BIOC/2015

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES
SPÉCIALITÉ : BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUÉES

PRÉPARÉE PAR

HAYET BOUKHALFA-LEZZAR

THÈME

**ÉTUDE DE LA PRODUCTION DE LA PROTÉASE PAR
ASPERGILLUS ORYZAE SUR MILIEU SOLIDE EN FERMENTEUR
FUJIWARA. UTILISATION DES DÉCHETS DE TOMATE COMME
SUBSTRAT DE FERMENTATION.**

Soutenue le : 23/02 /2015

Devant le jury :

Mr A. Benguedouar	Prof. Université Mentouri, Constantine	Président
Mme A. Mechakra-Maza	Prof. Université Mentouri, Constantine	Encadreur
Mr F. Duchiron	Prof. Université de Reims	Co-Encadreur
Mr A. Touzi	Prof. DGRSDT, MESRS, Alger	Examineur
Mr S. Benallaoua	Prof. Université Abderahmane Mira, Béjaia	Examineur
Mme F. Fazouane-Naimi	Prof. Université M'Hamed Bouguera, Boumerdès	Examinatrice

Année universitaire 2014-2015

« L'esprit s'il est en bonne santé, ne prend plaisir que dans la science »

Emir Abd el-Kader (1808-1883)

« ... tard, très tard, j'ai découvert la véritable nature de la science, de sa démarche, des hommes qui la produisent.

J'ai trouvé là un monde de jeu et d'imagination, de manies et d'idées fixes. A ma surprise, ceux qui atteignaient l'inattendu et inventaient le possible, ce n'étaient pas simplement des hommes de savoir et de méthode. C'était surtout des esprits insolites, des amateurs de difficultés, des êtres à vision saugrenue... »

François Jacob, Prix Nobel 1965 (1920-2013)

A la mémoire de ma très chère mère

Kheïra bent M'Hammed BOUDARENE

Symbole de la gentillesse, la patience et le sacrifice

Que DIEU l'accueille dans son vaste paradis

A mon cher père

Abdallah ben Messaoud Boukhalifa

Tu as su m'apprendre la persévérance, l'amour du travail bien fait,

Et que l'effort est toujours payant...

Que ce travail soit une modeste récompense pour tous ce que tu m'as donnés.

A ma belle mère

Khedidja bent Ahmed Lezzar

Avec toute mon affection

À mon époux

A mes enfants

Vous avez été très patients pendant mon absence et même après...

Je vous ai privé de beaucoup de choses pour réaliser ce travail mais vous m'avez assuré

le soutien au quotidien.

Je vous demande pardon pour tous ces manquements.

A mes chères sœurs

Vos sacrifices et votre dévouement m'ont permis d'embrasser cette carrière

Je ne pourrai assez bien exprimer ma gratitude, ma reconnaissance et ma grande affection

Merci pour tous ce que vous avez fait pour moi

que ce travail soit une réalisation de vos vœux.

A mes frères

Vous m'avez appris à aimer la science

Vous m'avez toujours encouragée et soutenue

Merci pour tous ce que vous m'avez donné de puis ma jeune enfance.

A mes belles sœurs

A mes beaux frères

A mes nièces et mes neveux

A toutes les familles BOUKHALFA et LEZZAR

A tous ceux que j'aime, je dédie ce travail.

Remerciements

Ce travail a été réalisé, dans le cadre du Programme Franco-Algérien de Formation Supérieure (PROFAS), conjointement entre le Laboratoire de Biologie et Environnement (LBE) de l'Université des frères Mentouri, Constantine (UFMC) et le Laboratoire de Microbiologie Industrielle (LMI) INRA, de l'Université de Reims, Champagne-Ardenne (URCA).

Il a été encadré, du côté algérien par le Professeur Aïcha Mechakra-Maza, du côté français par le Professeur Francis Duchiron.

J'exprime mes remerciements et ma profonde reconnaissance à mon encadreur, Mme **Aïcha MECHAKRA-MAZA**, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, UFMC. Merci pour la confiance, la liberté et le soutien permanent que vous m'avez témoignés malgré toutes vos responsabilités et les problèmes de santé. Merci pour les précieux conseils et aides qui ont fait aboutir cette thèse. Vous trouverez ici l'expression de ma profonde gratitude et toute ma considération.

J'exprime toute ma reconnaissance et toute ma gratitude au Professeur **Francis DUCHIRON**, directeur du LMI, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour la grande confiance qu'il m'a accordée. Malgré toutes vos responsabilités, vous avez été disponible et à l'écoute de mes préoccupations. Je ne saurais vous remercier pour tous les précieux conseils, les bonnes orientations, la bonne humeur au quotidien et surtout pour les nuits passées au laboratoire pour le suivi du fermenteur. Vous trouverez ici le témoignage de ma profonde admiration.

Je remercie Mr **Ammar BENQUEDOUAR**, Professeur au département de Microbiologie, UFMC, qui me fait l'honneur de présider le jury de thèse. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mes travaux

De même, je remercie très sincèrement Mr **Abdelkader TOUZI**, Directeur des études au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, pour avoir accepté de juger ce travail. Je suis très honorée par votre participation dans l'évaluation de cette thèse.

Je suis également très honorée par la présence dans ce jury de Mr **Saïd BENALLAOUA**, Professeur à l'Université de Béjaïa et de Mme **Fathia FAZOUANE-NAIMI**, Professeur à l'Université de Boumerdès. Je vous remercie très sincèrement pour l'intérêt et le regard très lucide que vous avez porté à ce modeste travail.

A Reims, je tiens à remercier tout particulièrement Mme **Estelle COPINET**, Maître de conférences et Melle **Véronique GAILLET**, Assistante ingénieur au LMI. Je les remercie pour leurs aides et collaboration au cours de la réalisation de ce travail. Merci d'avoir prêté

main forte au cours des manipulations sans laquelle ce travail ne serait pas achevé aujourd'hui.

Une place particulière à **Martine** qui m'a accueillie chez elle et m'a aidée avec beaucoup de sympathie, de modestie et de simplicité. Vous avez été très gentille et très aimable. Je vous remercie pour tout.

Je remercie Mme **Hanane ZAIDI**, la constantinoise de Reims, doctorante au bâtiment 6, qui m'a beaucoup aidée à m'installer. Et aussi Mme **Hind LEGHLIMI**, pour les inoubliables moments passés au laboratoire et à Reims, ta présence à mes côtés m'a souvent réconfortée.

Je n'oublie pas de citer tous les membres du LMI, à savoir Mmes **Harivony RAKOTOARIVONINA**, **Angélique GAINVORS-CLAISSE**, **Parissa ALIMARDANTHEUIL** et le Gentleman Mr **Vincent PREVOT**, Maîtres de conférences. Je vous remercie pour les agréables moments que j'ai passés avec vous, pour la sympathie et l'amitié que vous m'avez témoignées et dont j'avais besoin tout au long de mon détachement.

Mes pensées vont également aux stagiaires qui m'ont accompagné dans ce travail : Melles **Ibtissam MOUSTATIR**, **Aouatef TAOU** et Mrs **Valentin PETIT** et **Johann PRUDENCE**.

Je remercie tout le personnel de l'Europol'Agro, qui ont toujours été accueillants et serviables.

Enfin, j'exprime toute ma reconnaissance au Laboratoire « INZO » à Château-Thierry, France, pour leur aide dans l'analyse des composants des déchets de tomate.

A Constantine, je remercie très sincèrement tout le personnel du LBE en particulier Mme le Professeur **Oualida RACHED** et aussi le Professeur **Yacine Benhizia**, qui n'ont pas manqué de m'encourager.

Je présente mes plus vifs remerciements à Mme **Zoubida GHERIBI-OULMI** et Melle **Kounouz RACHEDI** pour leur aide dans l'analyse statistique des résultats ; à Mme le Docteur **Karima BOUBEKRI** et Mme le Professeur **Sakina ZERIZER** pour leur aide et soutien.

Je voudrais aussi remercier mes amies de la promotion en particulier, Mmes **Hayet Goudjil**, **Malika BENKAHOUL**, **Leïla BENNAMOUN**, **Scheherazed DAKHMOUCHE**, **Nassira RIAH** et aussi **Naïma BOUTHAGHANE** pour leurs soutiens et encouragements.

Je tiens à remercier Mrs **Islem Boucheloukh** et **Ilyes Taleb Hacine** pour la réussite de la visio.

Enfin, un grand **MERCI** à tous les Professeurs et collègues à la Faculté SNV, et tout le personnel du Biopôle qui n'ont pas cessés de m'encourager.

Hayet BOUKHALFA-LEZZAR

Le 20/04/2014

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma des différentes couches mycéliennes au cours de la croissance fongique en FMS.

Figure 2 : Constitution et développement fonctionnel des différents compartiments de l'hyphé.

Figure 3 : Les spores fongiques et bactériennes : (a) *Aspergillus* (b) *Penicillium*, (c) *Acremonium*, (d) *Beauveria bassiana* (e) *Bacillus thuringiensis*.

Figure 4 : Exemples de champignons supérieurs cultivés par FMS (de gauche à droite: *Agaricus*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus augustus*).

Figure 5: Réacteur colonnes de laboratoire.

Figure 6: Schéma d'un réacteur de laboratoire pour FMS en condition stérile.

Figure 7: Schéma d'un réacteur à plateaux statique avec aération passive.

Figure 8 : Réacteur statique avec aération forcée, photographie de Zymotis.

Figure 9 : Photographie et schéma d'un réacteur rotatif à agitation alternée, sans aération forcée.

Figure 10 : Fermenteur à tambour perforé rotatif.

Figure 11: Réacteur pilote en cuve profonde INRA Dijon

Figure 12 : Photographie et schéma du réacteur de type Koji.

Figure 13: Distribution des différentes classes d'enzymes industrielles.

Figure 14: Distribution des organismes sources d'enzymes industrielles.

Figure 15 : Répartition du marché mondial des enzymes.

Figure 16: Les couleurs des biotechnologies.

Figure 17: Principales caractéristiques d'une bioraffinerie basée sur le traitement biologique des déchets agro-alimentaires.

Figure 18: Production mondiale de la tomate en 2010.

Figure 19: Principales régions productrice de tomate industrielle en Algérie.

Figure 20: Composition des sous produits de la tomate transformée.

Figure 21: Le fermenteur Fujiwara : (A) armoire de contrôle, (B) fermenteur *Koji* avec sa cuve de culture à l'intérieur.

Figure 22: La partie arrière du fermenteur Fujiwara : de l'unité de refroidissement (A), le réservoir d'eau (B).

Figure 23: Le système d'aération du fermenteur Fujiwara : (A) humidificateur, (B) arrivée d'air humidifié, (C) conduite d'échappement d'air ayant traversé la cuve.

Figure 24: L'intérieur du fermenteur Fujiwara : la cuve du fermenteur (A) la sonde de température, (B) les vis sans fin.

Figure 25: Evolution cinétique de la production de la protéase par les cinq souches fongiques en FMS (cultures réalisées à 30°C, durant 144h avec un taux d'humidité initiale de 50%).

Figure 26: Effet du pH initial sur la synthèse de la protéase neutre à 50% d'humidité initiale, FMS de 5 jours pour *A. oryzae* 5777 et 3 jours pour *A. oryzae* 2220.

Figure 27: Effet de la taille de l'inoculum sur la production de la protéase neutre (50% d'humidité initiale et à pH 6).

Figure 28: Effet de l'âge des spores sur la production de la protéase neutre (50% d'humidité initiale, pH 6 et 10^6 spores/g de substrat).

Figure 29 : Effet de la taille des particules des déchets de tomate sur la production de la protéase neutre.

Figure 30 : Effet de l'addition de la caséine sur la production de la protéase neutre.

Figure 31 : Effet de l'addition de la farine de soja sur la production de la protéase neutre.

Figure 32 : L'aspect du substrat au cours de la culture: Erlenmeyers inoculum, cuve du fermenteur Fujiwara avec les déchets de tomates inoculés, substrat fermenté après 13 heures de culture, substrat après 20 heures de culture, substrat à la fin de la fermentation.

Figure 33 : Evolution de l'activité protéasique et du pH au cours du temps. FMS réalisée par *A. oryzae* 2220 sur déchets de tomate enrichie en farine de soja (humidité 50%, et température 30°C).

Figure 34 : Evolution de l'activité protéasique et du pH au cours du temps. FMS réalisée par *A. oryzae* 2220 sur déchets de tomate sans enrichissement (humidité 50%, et température 30°C).

Figure 35 : Evolution de l'activité protéasique au cours du temps pour les deux types de culture avec et sans enrichissement.

Figure 36 : L'activité de la protéase neutre produite par *A. oryzae* 2220, après extraction par les différentes solutions et centrifugation à 10 000g durant 5 min (résultats exprimés en valeurs moyennes \pm les écarts-types).

Figure 37 : L'activité de la protéase neutre produite par *A. oryzae* 2220, après extraction par les différentes solutions et centrifugation pendant 10 min à 4°C (résultats exprimés en valeurs moyennes \pm les écarts-types).

Figure 38 : Cinétique de l'extraction de la protéase neutre par l'eau osmosée, à partir de déchets de tomate fermenté par *A. oryzae* 2220 (résultats exprimés en valeurs moyennes \pm les écarts-types).

Figure 39 : Cinétique de l'extraction de la protéase neutre par la solution de NaCl à 3% à partir de déchets de tomate fermenté par *A. oryzae* 2220 (résultats exprimés en valeurs moyennes \pm les écarts-types).

Figure 40 : Effet du pH sur l'activité de la protéase neutre produite en fermenteur par *A. oryzae* 2220 en FMS sur déchets de tomate (résultats exprimés en valeurs moyennes \pm les écarts-types).

Figure 41 : Effet de la température sur l'activité de la protéase neutre produite en fermenteur par *A. oryzae* 2220 en FMS sur déchets de tomate (résultats exprimés en valeurs moyennes \pm les écarts-types).

Figure 42 : La stabilité thermique de la protéase neutre d'*Aspergillus oryzae* 2220 produite par FMS sur déchets de tomate.

Figure 43 : Effets du zinc, du cuivre et de l'EDTA sur la protéase neutre d'*A. oryzae* 2220 produite par FMS sur déchets de tomate.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Historique et développement des fermentations solides.

Tableau 2: Exemples de cocultures fongiques pour la production d'enzymes par fermentation en milieu solide.

Tableau 3: Comparaison de la production d'enzymes issues d'une culture d'*Aspergillus niger* par fermentation en milieu liquide et en milieu solide.

Tableau 4: Principaux aliments d'origine africaine ou asiatique, produits par FMS.

Tableau 5: Les enzymes produites par fermentation solide.

Tableau 6 : Production des acides organiques par fermentation solide à partir de divers substrats.

Tableau 7 : Les spores des microorganismes produites par fermentation solide.

Tableau 8 : Les applications de spores produites par FMS. (A) Dans le contrôle biologique. (B) Dans la biocatalyse.

Tableau 9: Champignons et substrats utilisés pour leur production.

Tableau 10: Les métabolites secondaires produits par fermentation solide.

Tableau 11: Les différentes souches fongiques productrices de colorants par FMS.

Tableau 12: Liste des classes d'enzymes selon le profil catalytique et les enzymes industrielles correspondantes.

Tableau 13: Les exopeptidases et leur mode d'action.

Tableau 14: Liste des protéases fongiques.

Tableau 15 : Exemples des protéases des détergents disponibles dans le commerce.

Tableau 16: Les protéases produites par FMS avec les substrats et microorganismes utilisés.

Tableau 17: Résultats de la composition des déchets de tomate.

Tableau 18: Composition comparée des déchets de tomate et du son de blé traditionnel (en % de la matière sèche).

Tableau 19: Activité protéolytique produite par les cinq souches d'*Aspergillus* au cours de la FMS des déchets de tomate en (U/gms).

Tableau 20: Evolution du pH au cours de la FMS par rapport aux différentes souches étudiées.

Tableau 21 : Effet de l'humidité initiale sur la production de la protéase par les deux souches d'*Aspergillus oryzae* par FMS sur déchets de tomate. L'activité en (U/gms).

Tableau 22 : Evolution du pH à la fin de la FMS sur déchets de tomate (humidité initiale de 50%).

Tableau 23 : Bilan de la précipitation au sulfate d'ammonium.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMFEP: *Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products*

AOAC: *Association of Official Analytical Chemistry*

AVC : Accident vasculaire cérébral

Aw : *Activity of Water*

CA : Chiffre d'affaire

CEE : Communauté Economique Européenne

EC: Enzyme commission

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FDA: *Food and Drug Administration*

FML: Fermentation en milieu liquide

FMS: Fermentation en milieu solide

GA3: Acide gibberellique

gds: *gram of dry substrate*

gms: gramme de matière sèche

GRAS: *Generally Recognized as Safe*

HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance

LBE : Laboratoire de Biologie et Environnement

LMI : Laboratoire de Microbiologie Industrielle

NF : Norme Française

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

PDA: *Potato Dextrose Agar*

pI : point isoelectrique

ppCO₂ : Pression partielle de CO₂

SSF: *Solid-State Fermentation*

TCA: Acide trichloroacétique

URCA : Université de Reims en Champagne Ardenne

UV : Ultra violet

SOMMAIRE

Avant propos	i
Dédicaces	ii
Remerciements	v
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations	xii
Introduction générale	1
Partie I. Synthèse bibliographique	4
1. La fermentation en milieu solide	4
1.1. Définition des procédés en FMS	4
1.2. Historique des FMS	5
1.3. Microorganismes utilisés en FMS	6
1.4. Avantages et inconvénients des procédés en FMS	7
1.5. FMS versus FML	7
2. Applications des fermentations en milieu solide	7
2.1. Préparation d'aliments	7
2.1.1. Pain	8
2.1.2. Fromage	8
2.1.3. Aliments fermentés	8
2.2. Production d'enzymes	9
2.3. Production des acides organiques	9
2.4. Production des spores	10
2.5. Production des champignons supérieurs	11
2.6. Production de métabolites secondaires	12
2.6.1. L'acide gibbéréllique	12
2.6.2. Les pigments	13
2.6.3. Les composés aromatiques	13
2.6.4. Le xanthane	13
2.7. L'ensilage	14
2.8. Le compostage	14
3. Facteurs affectant les cultures en FMS	14
3.1. Substrat et rapport C/N	15
3.2. Taille des particules de substrat	15
3.3. Humidité et activité de l'eau	16
3.4. Le pH	16
3.5. Température et accumulation de la chaleur métabolique	17
3.6. Aération et agitation	18
3.7. Oxygène et dioxyde de carbone	19
3.8. Type de l'inoculum	19
3.9. Stérilité	20
3.10. La biomasse	20
4. Les bioréacteurs de la FMS et les répercussions de ces procédés	21
4.1. Classification des fermenteurs en FMS	21
4.1.1. Réacteurs de laboratoire	21
4.1.2. Fermenteurs pré-pilotes et pilotes	22

4.2. Répercussions des FMS	23
5. Les protéases	24
5.1. Généralités sur les enzymes	24
5.2. Définition et rôles des protéases	25
5.3. Classification et mécanisme d'action des protéases	25
5.4. Rôles physiologiques des protéases	27
5.5. Sources potentielles des protéases	27
5.5.1. Protéases végétales	27
5.5.2. Protéases animales	28
5.5.3. Protéases microbiennes	28
5.6. Les applications industrielles des protéases	29
5.6.1. Industrie des détergents	29
5.6.2. Industrie du cuir	30
5.6.3. Industrie alimentaire	30
5.6.4. Industrie pharmaceutique	31
5.6.5. Industrie cosmétique	31
5.6.6. Synthèse d'hydrolysats de protéines	31
5.7. Les protéases produites par FMS	32
6. Les déchets de tomates comme ressource végétale	34
6.1. Définition des agroressources	34
6.2. Valorisation de la biomasse végétale par FMS	34
6.3. Production mondiale de la tomate	35
6.4. Tomate industrielle en Algérie	35
6.5. Les sous-produits de la tomate transformée	36
6.6. Fermentation des déchets de tomate	37
Partie II. Matériel et méthodes	38
1. Les souches fongiques	38
1.1. Production et conservation des spores	38
1.2. Dénombrement des spores à la cellule de Thoma	39
1.3. Viabilité des spores	39
2. Substrat de fermentation	39
3. Conduite des FMS en Erlenmeyers	40
4. Extraction de l'enzyme	40
5. Détermination de l'activité enzymatique	40
6. Dosage des protéines	42
7. Détermination de la teneur en eau	43
8. Optimisation des différents facteurs	43
8.1. Le taux d'humidité	43
8.2. Le pH initial	43
8.3. Le taux d'inoculum	43
8.4. L'âge de l'inoculum	43
8.5. La taille des particules	44
8.6. Les sources azotées	44
9. Culture en fermenteur Koji (Fujiwara)	44
9.1. Présentation du fermenteur	44
9.2. Conditions de culture dans le fermenteur	47
	48

10. Optimisation de l'extraction	48
10.1. Solutions d'extraction	48
10.2. Cinétique de l'extraction	48
11. Caractérisation de l'enzyme	48
11.1. Effet du pH sur l'activité de la protéase neutre	49
11.2. Effet de la température sur l'activité enzymatique	49
11.3. Stabilité thermique de l'enzyme	49
11.4. Effet de l'EDTA, du zinc et du cuivre	49
12. Précipitation par le sulfate d'ammonium	50
13. Analyse statistique	51
Partie III. Résultats et discussions	51
1. Etude biochimique du substrat de fermentation	53
2. Profil de production de la protéase neutre par différentes souches d'<i>Aspergillus</i>	57
3. Etude des conditions de la fermentation solide sur déchets de tomate	57
3.1. Effet de l'humidité	59
3.2. Effet du pH	62
3.3. Effet de l'inoculum	62
3.3.1. Effet de la taille de l'inoculum	63
3.3.2. Effet de l'âge de l'inoculum	64
3.4. Effet de la taille des particules de substrat	66
3.5. Effet de l'addition des protéines sur la production de la protéase	66
3.5.1. Effet de la caséine	68
3.5.2. Effet de la farine de soja	70
3.6. Conclusion partielle	71
4. Production de la protéase neutre en réacteur Fujiwara	71
4.1. Culture avec le substrat enrichi par la farine de soja	71
4.2. Culture avec déchets de tomate sans enrichissement	75
5. Optimisation de l'extraction de l'enzyme	75
5.1. Effet de la solution utilisée pour l'extraction	78
5.1. Effet de la durée de solubilisation du substrat fermenté	78
5.1.1. Avec de l'eau	78
5.1.2. Avec la solution de NaCl à 3%	80
5.2. Conclusion partielle	81
6. Caractérisation de la protéase neutre d'<i>Aspergillus oryzae</i> 2220	81
6.1. Effet du pH	83
6.2. Effet de la température	84
6.3. Stabilité thermique	85
6.4. Effet de l'EDTA, du zinc et du cuivre	86
7. Précipitation par le sulfate d'ammonium	
Conclusion générale et perspectives	87
Résumés	91
Références bibliographiques	94
Annexes	

INTRODUCTION

Introduction

Les ressources végétales présentent l'avantage d'être renouvelables et très largement présentes sur l'ensemble des terres à l'échelle planétaire. Cela génère des quantités importantes de déchets qui constituent une nuisance certaine pour l'environnement. Ces déchets, riches en matières organiques, peuvent être recyclés et transformés par les procédés biotechnologiques. Ces derniers constituent une solution de choix pour remédier aux problèmes de pollution et permettent la production d'une nouvelle génération de molécules à haute valeur ajoutée, souvent importées. Parmi ces molécules, les enzymes sont les catalyseurs les plus efficaces et les plus recherchées dans des domaines extrêmement variés tels que l'agro-alimentaire, le chimique, le pharmaceutique, etc.

Au moment où le marché de la biocatalyse est en pleine expansion, l'industrie des enzymes est totalement absente en Algérie. En effet, leur chiffre d'affaires (CA) passe de 600 millions de Dollars en 1995 (Cuvellier *et al.*, 1999) à 4,9 milliards de Dollars pour l'année 2013 (BCC Research, 2013). Parmi ces enzymes, les protéases occupent une position centrale ; elles représentent environ 60 % du marché global des enzymes (Mahajan et Badgujar, 2010) et offrent de nombreuses possibilités d'utilisation en thérapie (plusieurs études cliniques rapportent leur application en oncologie), en industries alimentaires (panification, brasserie, fromagerie, tendérisation de la viande, ...), en tannerie, en cosmétique, dans les détergents, etc (Vishwanatha *et al.*, 2010).

Les premières enzymes préparées industriellement provenaient de fermentations en milieux solides (FMS) (brevet Jokichi Takamine, 1894), celles-ci sont des cultures dans lesquelles les substrats sont seulement humidifiés. La faible teneur en eau favorise la croissance de champignons filamenteux. Ces fermentations sont très avantageuses car elles sont simples, peu coûteuses, moins polluantes et très rentables. Ces systèmes dotés d'une longue tradition, sont économes d'énergie, très répandus en industrie alimentaire et de production d'enzymes. La production des enzymes ramenée au volume des réacteurs est près de cent fois plus importante en culture solide comparée à celle des cultures submergées (Duchiron et Copinet, 2011). Actuellement, les procédés en phase solide connaissent un regain d'intérêt à travers le monde, particulièrement avec la valorisation des coproduits agricoles pour la production de divers produits et substances.

D'après Van Dyk *et al.* (2013), les sous-produits de la tomate transformée peuvent atteindre plus de 10 millions de tonnes à l'échelle mondiale. En Algérie, il n'y a pas de statistique officielle sur le volume de ces déchets, mais d'après nos estimations, ils peuvent dépasser 160 000 tonnes par an. Une partie est utilisée dans l'alimentation animale et le reste est mis à la décharge malgré leur richesse en nutriments comme les protéines, les sucres, les fibres insolubles, les huiles, les caroténoïdes, etc. Ces nutriments rendent ces déchets très appropriés pour leur exploitation en tant que matière première dans la production de substances à intérêt industriel par fermentation. Ainsi nous sommes intéressés à la valorisation des déchets de tomates industrielles par FMS car ce produit est particulièrement abondant dans la région Nord-Est de l'Algérie.

Ce travail fait suite à une étude antérieure où la protéase neutre a été produite sur milieu à base de déchets de tomate par des fermentations en milieux liquides (FML) en Erlenmeyers par *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohen 1042.72. Les résultats nous ont permis de découvrir un substrat convenable pour la croissance de la souche fongique et aussi pour la production d'enzymes protéolytiques.

Cependant ce type de culture ne permet pas d'utiliser les composants insolubles de ce substrat. Ainsi, l'objectif de cette thèse est la valorisation des déchets de tomate par FMS afin d'exploiter toute la matière organique, soluble et insoluble, et qui doit servir à la fois de support et de nutriments pour le champignon producteur de la protéase. Sa richesse en protéines peut aussi répondre en besoin d'inducteurs pour la production de protéase. En effet, dans la biosynthèse des enzymes, on doit souvent exploiter certains mécanismes de régulation. Ainsi, on peut multiplier par 1000 la production d'une enzyme en ajoutant un composé inducteur particulier dans la cuve de fermentation. Cet inducteur peut être le substrat ou son analogue. On peut aussi éviter la répression catabolique en remplaçant les sources de carbone et d'azote rapidement métabolisables comme le glucose et l'ammoniaque, par des substances nutritives consommées plus lentement telles que les déchets de tomate.

Dans le cadre du présent travail, l'étude de la composition biochimique du substrat a été réalisée en première étape. Des cultures en Erlenmeyers ont été effectuées pour la mise au point du milieu de culture. La sélection des souches les plus productrices de la protéase neutre en FMS sur déchets de tomate, parmi cinq souches de collection d'*Aspergillus* a été effectuée. Plusieurs facteurs importants dans les procédés en FMS ont été testés pour mesurer leur effet sur la production de la protéase. Ces facteurs sont : la teneur en eau, le pH, le taux de

l'inoculum, l'âge des spores, la taille des particules du substrat et la source d'azote. Des cultures en fermenteur *Koji* sont réalisées par la suite, en conditions contrôlées d'aération et d'humidité. Une optimisation de l'extraction de l'enzyme par différentes solutions d'extraction a été effectuée. Une étude de quelques caractéristiques de la protéase neutre ainsi que sa purification partielle ont été réalisées en dernière étape.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I. Synthèse bibliographique

1. La fermentation en milieu solide

1.1. Définition des procédés en FMS

La fermentation en milieu solide (FMS), est définie comme une technique de culture de microorganismes, essentiellement des champignons filamenteux, sur et/ou à l'intérieur de particules solides.

Dans les milieux naturels, les fermentations solides se produisent partout, dans les sols cultivés ou non, dans le compost ou l'ensilage, etc. Le contenu en eau, liée à ces particules, doit se situer à une activité de l'eau (A_w) permettant l'expression du métabolisme des microorganismes mais ne doit pas excéder la capacité maximale de rétention en eau de ces particules solides (Lonsane *et al.*, 1985 ; Krishna, 2005)

Les fermentations sont associées aux biotechnologies et sont essentiellement des procédés en milieu liquide. Actuellement, les procédés en phase solide connaissent un regain d'intérêt en occident, avec la valorisation des coproduits agricoles pour la production d'enzymes, de nourriture animale et pour la production de produits organiques (Singhanian *et al.*, 2009 ; Thomas *et al.*, 2013). Ce procédé est très convenable pour les pays dont l'économie est basée sur l'agriculture. En effet, les résidus agricoles peuvent être hautement valorisés par ce type de transformation (Singh *et al.*, 2008).

1.2. Historique des FMS

Les fermentations solides sont utilisées depuis des millénaires avant JC. La fabrication du pain et des fromages remonte à 4000 ans (Demain et Solomon, 1981 ; Rose, 1981), celle du *Shoyu* date probablement à trois mille ans en Chine et à plus de mille ans avant JC au Japon. Elles se sont ensuite développées dans le secteur alimentaire partout dans le monde selon le procédé «*Koji*» ; celui-ci est réalisé avec du riz cuit inoculé avec la moisissure *Aspergillus oryzae* puis adapté à d'autres végétaux pour la production d'autres préparations fermentées.

Le procédé a été transféré en occident par le japonais Takamine, à la fin du 19^e siècle, pour la production d'enzymes. A la fin de la seconde guerre mondiale, les procédés traditionnels en FMS ont été remplacés par les fermentations en profondeur pour la production des antibiotiques. En parallèle, les FMS ont été développées et automatisées en

Tableau 1: Historique et développement des fermentations solides (Demain et Solomon, 1981; Couto et Sanromán, 2005 ; Pandey *et al.*, 2008).

Période	Développement
4000 avant JC.	Fabrication du pain par les Egyptiens
En Asie 1000 avant JC. (1000 BP)	Fabrication de fromage par <i>Penicillium roquefortii</i>
2500 BP (Before Present)	Fermentation de poisson/conservation avec le sucre, amidon, sel, etc., procédé Koji
V^{ème} siècle	Transfert du procédé Koji de la Chine au Japon
XVIII^{ème} siècle	Utilisation de l'acide gallique en tannerie, imprimerie ; fabrication du vinaigre
1860-1900	
1900-1920	Traitement des eaux d'égouts
1920-1940	Production d'enzymes fongique et d'acide kojique
1940-1950	Production d'enzymes fongique, acide gluconique, acide citrique, développement de « drum-type » fermenteur
1950-1960	Développement de l'industrie fermentaire, production de pénicillines
1960-1980	Transformation des stéroïdes
1960-1980	Production des mycotoxines, aliments enrichies en protéine
1980-1990	Production de métabolites primaire et secondaire, développement des fermenteurs en colonne, travaux sur la cinétique et « <i>modelling aspects</i> » des SSF
1990-présent	Développement des aspects fondamentaux des SSF, bioprocédés/développement des produits :
Bioprocédés	« Bioremediation » et biodégradation des composés dangereux, détoxification biologique des résidus agro-industriels, biotransformations, « <i>biopulping</i> », etc
Produits	Substances bioactives : aflatoxine, ochratoxine, acide gibbérellique, ergot alcaloïdes, divers antibiotiques, antifongiques volatiles, acide clavulanique, acide mycophénolique Enzymes : cellulases, protéases, lipases, glucosidases, amylases, etc Acides organiques : acide citrique, acide fumarique, acide lactique, etc Autres produits : acide L-glutamique, pigments, vitamines, éthanol, acide gamma-linoléique, biosurfactants, biopesticides/bioherbicides

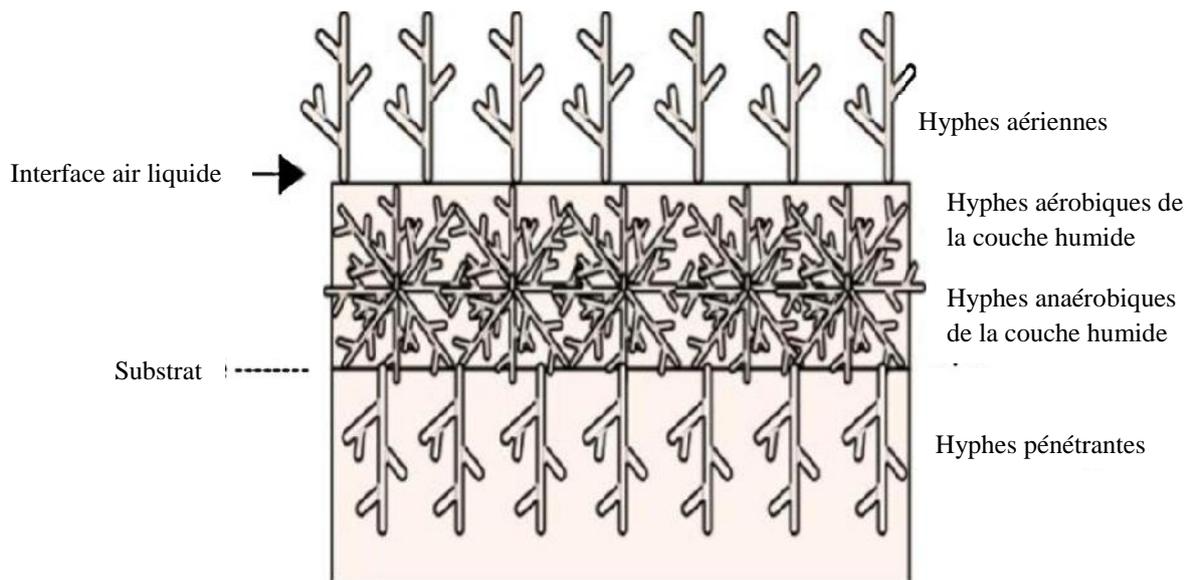


Figure 1 : Schéma des différentes couches mycéliennes au cours de la croissance fongique en FMS (Barrios-González, 2012).

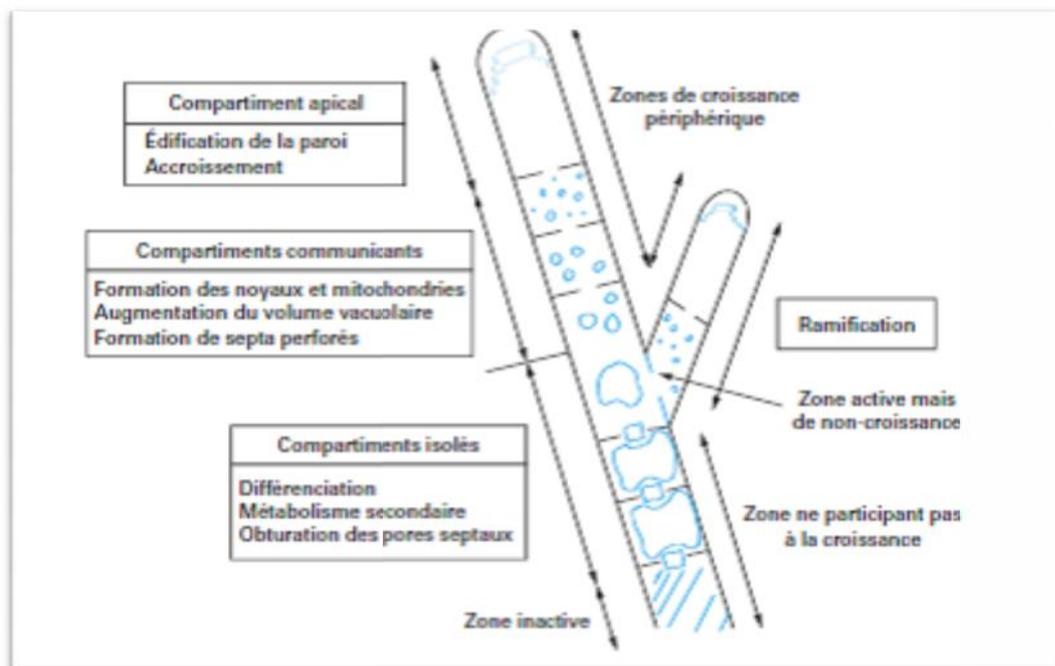


Figure 2 : Constitution et développement fonctionnel des différents compartiments de l'hyphes (Duchiron et Copinet, 2011).

Extrême-Orient (Singh *et al.*, 2008). Ces dernières années, elles se sont étendues à l'échelle industrielle dans plusieurs pays tels que le Brésil, l'Inde, les USA et la France. Le succès des compagnies de Biotechnologie est dû à l'utilisation de ces procédés qui permettent la production des enzymes, de substances pharmaceutiques et de divers métabolites secondaires (Duchiron et Copinet, 2011). Le **tableau 1** résume l'évolution historique de ces systèmes.

1.3. Microorganismes utilisés en FMS

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

Les champignons filamenteux sont caractérisés par la croissance végétative et apicale des hyphes, la tolérance à des faibles activités de l'eau et des conditions de haute pression osmotique. En effet, ce type de culture reproduit en quelque sorte les phénomènes naturels, c'est-à-dire le développement de moisissures à la surface de nombreux produits solides (Durand, 1998 ; Krishna, 2005 ; Duchiron et Copinet, 2011). Il faut noter que la croissance fongique ne se déroule pas seulement en surface du milieu de culture, mais également en profondeur et en hauteur. La pénétration des hyphes dans le substrat facilite l'accès aux éléments nutritifs, tandis que la production de filaments aériens permet l'accès à de nouveaux substrats non immédiatement en contact avec le milieu de culture déjà colonisé (Boiron, 1996).

La colonisation du substrat par un champignon filamenteux se fait par extension et ramification de filaments appelés « hyphes » qui forment le mycélium. Grâce à une solide structure des parois cellulaires aux extrémités et aux points de ramification, ces filaments pénètrent la plupart des substrats solides à la recherche des nutriments. L'accroissement des hyphes s'effectue par les extrémités « apex » où s'effectuent l'essentiel des réactions de synthèses et de dégradation nécessaires à la construction de la cellule fongique (**figure 1 et 2**) (Duchiron et Copinet, 2011 ; Barrios-González, 2012).

Par ailleurs, les bactéries sont utilisées pour des fermentations naturelles comme c'est le cas du compostage, de l'ensilage et des procédés alimentaires. Plusieurs bactéries ont été testées avec succès pour la production de quelques enzymes comme *Staphylococcus sp.* et *Brevibacterium sp.* (Krishna, 2005). Singhanian *et al.* (2009) rapportent l'utilisation de plusieurs bactéries en FMS pour la production de l'alpha amylase par *Bacillus*

Tableau 2: Exemples de cocultures fongiques pour la production d'enzymes par fermentation en milieu solide (Duchiron et Copinet, 2011).

Micro-organismes	Produit	Substrat
<i>Aspergillus ellipticus</i> et <i>A. fumigatus</i>	Cellulases	Bagasse
<i>Trichoderma reesei</i> et <i>A. phoenicis</i>	Xylanases	
<i>Trichoderma reesei</i> LM- UC4 et <i>A. niger</i>	Cellulases	Bagasse
<i>Thermoascus aurantiacus</i> et <i>A. niger</i>	-glucosidases, laccases, pectinases et amylases	Paille d'avoine
<i>A.niger</i> et <i>Fusarium monoliforme</i> <i>Trametes versicolor</i> et <i>A.niger</i>	laccases, pectinases et amylases	
<i>Trichoderma reesei</i> et <i>A.oryzae</i>	cellulases et xylanases	Coque de graine de soya et son de blé
<i>Penicillium oxalicum</i> SAUE-3.510 et <i>Pleurotus ostreatus</i> MTCC 1804	xylanases et laccases	Bagasse et autre coproduit végétal

amyloliquefaciens ATCC 23842, de l'iturine A (un antifongique) par *B. subtilis*, de la poudre de *B. thuringensis*, de l'acide lactique par *Lactobacillus delbrueckii*, de la tannase de *Lactobacillus sp.*, et de l'hydrogène biologique par *Clostridium tyrobutyricum* JM1. D'autre part, Mahanta *et al.* (2008) ont réalisé la production de protéase et de lipase par *Pseudomonas aeruginosa* PseA, alors que Dutt *et al.* (2009) ont produit une protéase à activité présure par *B. subtilis* avec le son de riz et la farine de soja comme substrat. Lazim *et al.* (2009) et Anisha *et al.* (2010) ont effectué des FMS par les bactéries filamenteuses *Streptomyces sp.* CN902 et *S. griseoloalbus* pour la production de la protéase alcaline et l'alpha- galactosidase respectivement.

Les levures sont aussi utilisées en FMS pour la production d'éthanol et l'alimentation humaine et animale. Des procédés de fermentation en milieu solide utilisant des cocultures de champignons sont décrits dans le **tableau 2**.

1.3. Avantages et inconvénients des procédés en FMS

Les procédés en FMS présentent plusieurs avantages mais aussi quelques inconvénients. Parmi les avantages du système en phase solide, on peut citer : une productivité volumétrique élevée, une simplicité de la technique, un volume limité et les investissements réduits, une faible exigence en énergie, une inoculation directe possible, un apport d'eau limité, des conditions proches de celles observées dans la nature pour la croissance des champignons, une absence de formation de mousse et une utilisation directe du produit.

Le système FMS présente des désavantages tels que : un contrôle difficile de la fermentation, un échauffement éventuel, une énergie importante exigée pour les systèmes avec mélangeur, un inoculum sporogène important, des difficultés de passer à des volumes très grands et un risque de contamination bactérienne (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992).

Tableau 3: Comparaison de la production d'enzymes issues d'une culture d'*Aspergillus niger* par fermentation en milieu liquide et en milieu solide (Duchiron et Copinet, 2011).

Activité enzymatique	FMS (UI/Litre)	FML (UI/Litre)
Endocellulase	7900	108
Exocellulase	1560	16
Cellulase(s)	970	6
Xylanase	27 900	330
Pectinase	56 000	472
Amylase	3 000	21

1.3. FMS versus FML

La production des différents métabolites est beaucoup plus importantes dans les procédés en FMS comparée à celle des cultures submergées (Thomas *et al.*, 2013). Celle des enzymes ramenée au volume des réacteurs est près de cent fois plus importante en culture solide (Duchiron et Copinet, 2011). Les premières applications non alimentaires des FMS ont porté sur la production d'enzymes, en particulier les hydrolases qui agissent sur les polymères végétaux. En effet, ces enzymes ne sont produites que par un système inductible par un polymère naturel. Ces polymères sont très peu solubles en phase aqueuse. En phase solide, le substrat de base est lui-même l'inducteur et se trouve à une concentration bien élevée. Le **tableau 3** indique les différences entre les deux procédés au cours de la production de quelques enzymes.

2. Applications des fermentations en milieu solide

Les FMS sont traditionnellement utilisées en Asie pour la fabrication d'aliments comme le *Miso*, le *Tempeh*, le *Sufu* et le *Saké*, avant qu'il ne soit mis en œuvre pour la fabrication d'enzymes, d'acides organiques et d'autres métabolites ainsi que des spores et des champignons supérieurs (Krishna, 2005 ; Pandey *et al.*, 2008 ; Duchiron et Copinet, 2011).

2.1. Préparation d'aliments

Selon Durand (1998), de nombreux aliments traditionnels sont obtenus par FMS dans les pays orientaux et en Afrique.

2.1.1. Pain

Le pain est l'aliment de base de nombreuses sociétés. Il est le résultat d'une fermentation alcoolique provoquée par diverses levures, essentiellement *Saccharomyces cerevisiae* qui est utilisée comme levain. Les espèces suivantes sont également présentes : *Candida holmii*, *Pichia saitoi* et *Candida krusei*. Une fermentation lactique est également impliquée avec certains lactobacilles (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis var lindneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. fructivorans*) et *leuconostoc mesenteroides* (Larpen-Gourgand et Sanglier, 1992).

Synthèse bibliographique

Tableau 4: Principaux aliments d'origine africaine ou asiatique, produits par FMS (Rose, 1981 ; Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Panda *et al.*, 2010).

Aliment fermenté	Substrat(s)	Microorganisme(s)
<i>Ang-kak</i>	Riz, maïs	<i>Monascus purpureus</i>
<i>Banku</i>	Maïs, manioc	Bactéries lactiques, levures
<i>Bonkrek</i>	Coco	<i>Rhizopus oligosporus</i>
<i>Burukutu</i>	Sorgho, manioc	<i>Candida</i> , <i>S.cerevisiae</i> , bactéries lactiques
<i>Gari</i>	Manioc	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Corynebacterium manihotis</i> Bactéries lactiques
<i>Hamanatto</i>	Soja, riz, blé	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pediococcus</i>
<i>Ingera</i>	Maïs, blé, sorgho	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>Lao-chao</i>	Riz	<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Rh. Chinesis</i> , <i>Chlamydomucor oryzae</i> , <i>Saccharomycopsis</i>
<i>Miso</i>	Riz, soja et orge	<i>Aspergillus sojae</i> <i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Ogi</i>	Maïs	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> <i>Cephalosporium</i> , <i>Penicillium</i> , bactéries lactiques, <i>Candida vini</i>
<i>Shoyu</i>	Soja, blé	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i>
<i>Thumba</i>	Millet	<i>Endomycopsis fibuliger</i>

2.1.2. Fromage

Le fromage est préparé depuis l'antiquité pour conserver les constituants du lait. L'affinage des fromages avec des moisissures représente une part importante des fermentations solides dans le domaine des aliments fermentés traditionnels. Les fromages persillés comme le roquefort ou les fromages présentant un développement mycélien de surface tel que le camembert sont parmi les plus connus. Le roquefort est connu depuis un millénaire dans le Causse Aveyronnais (entre Montpellier et Albi). Les levains sont des streptocoques mésophiles, des lactobacilles et une suspension des moisissures (*Penicillium camemberti* et *P. roquefortii*) (Larpen-Gourgau et Sanglier, 1992 ; Labeille, 1997).

2.1.3. Aliments fermentés

Diverses préparations alimentaires asiatiques ou africaines sont obtenues par fermentations à partir des végétaux tels que le riz, le blé, le soja, le maïs, le sorgho, l'orge, le millet, le manioc, le coco et autres. Dans ce type de fermentation, interviennent souvent des moisissures pour l'hydrolyse de l'amidon et des protéines. Par la suite, les bactéries lactiques et les levures agissent par une double fermentation lactique et alcoolique.

Plusieurs de ces produits tels que le *Miso*, le *Shoyu*, le *Koji* et la choucroute sont bien connues et d'autres sont moins réputés, tels que le *Ang-kak*, le *Banku*, le *Burukutu*, le *Hamanatto* et le *Lao-chao* (voir **tableau 4**) (Panda *et al.*, 2010). Les graines de café, les fèves de cacao et les feuilles de thé sont fermentées après récolte sur lesquelles les bactéries et les levures développent les arômes caractéristiques et influencent ainsi la qualité et le goût du produit fini (Rose, 1981 ; Larpen-Gourgau et Sanglier, 1992).

2.2. Production d'enzymes

À l'origine, les premières enzymes préparées industriellement provenaient de fermentations en milieux solides. C'est le cas du procédé *Koji* qui est une tradition plus que millénaire dans les pays d'Orient. Celui-ci a été introduit en Occident par le japonais Takamine qui a développé aux Etats-Unies, la production de la « Takadiastase », un mélange d'amylase et de protéase d'*Aspergillus oryzae*, par fermentation solide de son de blé (Joyeaux, 1982). Cette préparation enzymatique a été destinée pour remplacer le malt dans les distilleries (Labeille, 1997).

Plusieurs travaux ont été réalisés en FMS pour la production d'enzymes à importance industrielle telles que les protéases, les cellulases, les ligninases, les xylanases, les pectinases, les amylases, la glucoamylase, polygalacturonase, etc (Ellaiah *et al.*, 2002 ; Abidi *et al.*,

Tableau 5: Les enzymes produites par fermentation solide (Singh *et al.*, 2008).

Enzyme	Organisme	Substrat(s)
-amylase	<i>Aspergillus</i> sp.	Son de blé
	<i>A.oryzae</i>	COC+amidon+peptone Son de blé+GOC
	<i>Bacillus subtilis</i>	Son de blé
	<i>Bacillus</i> sp. PS-7	Son de blé+glycérol+farine de soja
Cellulase	<i>Aspergillus niger</i> KK2	paille de riz+son de blé
	<i>Penicillium decumbens</i>	paille et son de blé
Chitinase	<i>Aspergillus</i> sp. S1-13	coquilles de crabe
	<i>Trichoderma harzianum</i>	son de blé+chitine+extrait de levure
	<i>Penicillium aculeatum</i> NRRL 2129	son de blé
Glucoamylase	<i>Aspergillus</i> sp. HA-2	son de blé+saccharose
Lipase	<i>Aspergillus niger</i>	son de blé+huile d'olive
	<i>Penicillium simplicissimum</i>	tourteaux de soja
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	farine d'amande
	<i>Aspergillus awamori</i>	déchets de raisin
Pectinase	<i>Penicillium viridicatum</i> RFC3	Son de blé+bagasse d'orange (1 :1)
	<i>Bacillus</i> sp.	Son de blé+ Acide polygalacturonique
	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé+farine de soja
Phytase	<i>Mucor racemosus</i> NRRL 1994	Son de blé+tourteaux de sésame
	<i>P.</i> sp.	son de blé+ protéine de soja
	<i>Bacillus</i> sp.	écorce verte
Protéase alcaline	<i>Bacillus</i> sp. P-2	son de blé
	<i>A. oryzae</i> NRRL 2217	tourteaux de noix de coco+son de blé (1 :3)
	<i>A. oryzae</i> NRRL 1808	son de blé
	<i>Aspergillus niger</i> Aa-20	poudre de <i>Larrea tridentata</i> Cov. Epis de maïs
Tannase	<i>Aspergillus foetidus</i>	Son de blé
Xylanase	<i>A.versicolor</i>	Farine de sorgho
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Son de riz
	<i>Bacillus</i> sp. JB-99	

2008 ; Mamma *et al.*, 2008 ; Shankar et Mulimani, 2007 ; Sukumaran *et al.*, 2009 ; Ustok *et al.*, 2007). Des études de procédés FMS pour la production d'autres enzymes (inulinases, phytases, tannase, acide phénolique estérase, présure microbienne, aryl-alcool oxidase, oligosaccharide oxidase, tannin acyl hydrolase, a-L arabinofuranosidase) sont en réalisation (Xiong *et al.*, 2007). D'après Singh *et al.* (2008), la production d'enzymes par fermentation solide aura un rôle important dans l'avenir de la biotechnologie ; le **tableau 5** présente la liste de ces enzymes.

2.3. Production des acides organiques

De nombreux acides organiques, résultant du métabolisme des oses, peuvent s'accumuler dans le milieu de culture. Ce sont des produits terminaux de la glycolyse (acide lactique et propionique), ou résultant de l'oxydation incomplète des oses (acide citrique, itaconique, gluconique). On peut citer aussi l'acide acétique qui provient de la déhydrogénation de l'alcool en présence d'oxygène (Rivière, 1975).

Selon Soccol *et al.* (2008a), les acides organiques sont des ingrédients les plus utilisés dans la préparation des aliments et boissons. Parmi ces acides organiques, les acides (citrique, acétique, lactique, tartarique, malique, gluconique, propionique et fumarique) sont utilisés dans divers secteurs industriels. Les acides organiques issus du cycle de Krebs peuvent être produits par fermentation.

La production par FMS permet d'obtenir des rendements de production élevés, comparée aux fermentations liquides. L'utilisation des résidus agro-industriels réduit les coûts de production et s'avère écologique. L'acide citrique est obtenu par la levure *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 (Imandi *et al.*, 2008), et par *Aspergillus niger* (Roukas, 2005). L'acide kojique est produit par *Aspergillus oryzae* en FMS, l'acide itaconique est obtenu par l'*A. terreus* ou *A. itaconicus* (Larpen-Gourgand et Sanglier, 1992). Les autres acides organiques, dont l'acide citrique et l'acide acétique représentent les trois-quarts des acidulants alimentaires, sont présentés dans le **tableau 6**.

2.4. Production des spores

La spore est une forme de vie la plus résistante à la chaleur, aux UV, à la dessiccation et aux produits chimiques. Certaines bactéries telles que les *Bacillus* et les *Clostridium* (bactéries à Gram positif) et les champignons ont la capacité de former des spores lorsque les conditions de croissance sont défavorables. Ces spores retournent à l'état fonctionnel par la germination si elles retrouvent des conditions convenables à la croissance (**figure 3**).

Tableau 6: Production des acides organiques par fermentation solide à partir de divers substrats (Soccol *et al.*, 2008).

Acide organique	Microorganisme	Substrat	Rendement (g/kg)
Acide citrique	<i>A.niger</i> LPB 21	Bagasse de manioc	269
	<i>A.niger</i> DS 1	Bagasse de canne à sucre	198
	<i>A.niger</i> NRRL 328	Pulpe de pomme	816
	<i>A.niger</i> NRRL 567		771
	<i>A.niger</i> ATCC 9142	Caroube	264
	<i>A.niger</i> NRRL 328	Bagasse de canne à sucre	523
	<i>A.niger</i>	Déchets d'ananas	300
Acide lactique	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Bagasse de canne à sucre	249
Acide oxalique	<i>A.niger</i> SL1	Patate douce	26.4
Acide gluconique	<i>A.niger</i> ATCC10577	Figue	490

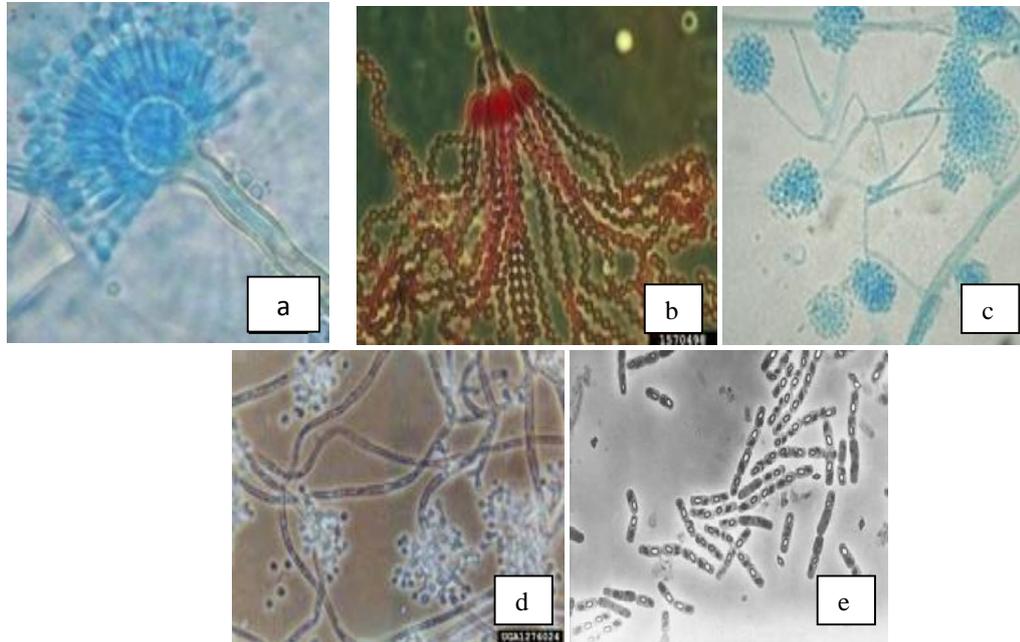


Figure 3 : Les spores fongiques et bactériennes : (a) *Aspergillus* (www.moldbacteria.com), (b) *Penicillium* (www.invasive.org), (c) *Acremonium* (www.moldbacteria.com), (d) *Beauveria bassiana* (www.invasive.org), (e) *Bacillus thuringiensis* (www.futura-sciences.com).

Tableau 7: Les spores des microorganismes produites par fermentation solide
(Ramachandran *et al.*, 2008b ; Bhanu Prakash *et al.*, 2008).

Spores	Substrat de production
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Mélange de son et d'enveloppe de riz Mélange de riz, orge et sorgho
<i>Coiothyrium minitans</i>	Avoine, blé et son de blé
<i>Verticillium lecanii</i>	Riz, son et enveloppe de riz
<i>Beauveria bassiana</i>	Bagasse de canne à sucre, son de blé, pomme de terre déclassée
<i>Mucor bacilliformis</i>	Mousse de polyuréthane
<i>Penicillium roquefortii</i>	Graines de sarrasin
<i>Penicillium nalgoviensis</i>	Pain
<i>Trichoderma harzianum</i>	Bagasse
<i>Aspergillus niger</i>	Graines de sarrasin
<i>Clonostachys rosea</i>	Riz
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Son de blé, riz, soja moulu, poudre de citron, enveloppe de riz
<i>B. sphaericus</i>	Graine de coton, graine de lin, son de blé, graine de sésame

Tableau 8: Les applications des spores produites par FMS
(Ramachandran *et al.*, 2008b).

(A) Dans le contrôle biologique

Spores	Organisme cible	Culture protégée
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Diatraea saccharalis</i> Le perce-canne à sucre	Maïs
	<i>Ostrinia nubilalis</i> La pyrale du maïs	Maïs
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Larve de castor semilooper	Graine de ricin
<i>Verticillium lecanii</i>	Aleurodes (mouches blanches)	Diverses cultures
<i>Coniothyrium minitans</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Laitue
<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Sesbania exaltana</i>	Soja
<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Fraises

(B) Dans la biocatalyse

Spores	Réaction de bioconversion
<i>Penicillium roquefortii</i>	Acide octanoïque → 2-heptanone
<i>Aspergillus niger</i>	Glucose → acide gluconique
<i>Penicillium digitatum</i>	Géraniol, nerol, citral et l'acide gérannique → méthylheptenone

La production des spores par FMS ne peut être remplacé ni rivalisé par FML. En effet, le premier procédé permet d'obtenir des spores en quantité et qualité répondant à la demande du marché mondiale (Ramachandran *et al.*, 2008b). Divers résidus agroindustriels ont été utilisés pour la production des spores mais aussi des supports inertes tels que les particules de pouzzolane (**tableau 7**) (Larroche *et al.*, 1986).

Les procédés de FMS permettent de produire des quantités considérables de spores ayant de meilleure qualité, par exemple la résistance aux UV ou à une dessiccation. Elles sont viables et maintiennent les activités enzymatiques même après une longue période de conservation, comme c'est le cas pour la glucose oxydase de l'*A.niger* (Ramachandran *et al.*, 2007 ; Ramachandran *et al.*, 2008 a et b).

Les applications des spores sont bien nombreuses et intéressantes (voir **tableau 8 A et B**). Selon Boiron (1996), *Beauveria bassiana* agit comme insecticide (entomopathogène) contre le doryphore et le nématode *Globodira pallida* et les larves de *Galleria mellonella*, *Metarhizium anisopliae* inhibe *Naharnava pesticata* (parasite de canne à sucre) ainsi que de nombreux insectes parasites des feuilles de céréales et des plantes horticoles. Le champignon *Verticillium lecanii* est un parasite d'un grand nombre d'insectes, de coléoptères et d'acariens. Les spores de ces champignons insecticides se développent et envahissent le corps de l'insecte en libérant des toxines.

Certaines espèces fongiques sont capables d'inhiber d'autres champignons phytopathogènes. C'est le cas de *Verticillium lecanii* qui inhibe le développement d'*Uromyces dianthii* et certaines rouilles telles que *Puccinia horiana*. D'autres sont des mycoherbicides, tel que *Colletotrichum* qui agit sur les espèces végétales *Aeschynomena virginica* et *Jussiaea decurrens* pour le traitement des champs de soja et de riz (Botton *et al.*, 1990).

Selon Larpent-Gourgau et Sanglier (1992), le principal insecticide biologique commercialisé à grande échelle est *Bacillus thuringiensis*. Cette bactérie au moment de la sporulation produit une protéine soluble dans la cavité digestive des insectes. Des protéases transforment cette protoxine en molécule toxique active.

2.5.Production des champignons supérieurs

La culture de champignons comestibles comme *Agaricus bisporus*, le champignon de Paris (**figure 4**) est aussi un procédé de FMS. En effet, avant qu'apparaisse, par fructification, la partie aérienne qui sera consommée (le carpophore), le champignon se développe d'abord sous forme mycélienne à l'intérieur du compost, le substrat solide (Durand, 1998).

Tableau 9 : Champignons et substrats utilisés pour leur production (Fan *et al.*, 2008).

Espèces	Substrat de production
<i>Agaricus, Pleurotus, Volvariella.</i>	Paille de riz
<i>Pleurotus, Agaricus, Stropharia, Volvarielle</i>	Paille de blé
<i>Pleurotus, Lentinula</i>	Pulpe de café
<i>Lentinus, Pleurotus, Hericium, Auricularis, Ganoderma, Grifola, Flammulina</i>	Sciure
<i>Pleurotus, Volvariella</i>	Déchets de coton issue de l'industrie du textile
<i>Pleurotus, Lentinus</i>	Ecorce des graines de coton
<i>Pholiota, Lentinula, Tremella</i>	Buches
<i>Pholiota, Auricularis, Coprinus, Flammulina, Lentinula</i>	Sciure, son de riz
<i>Pleurotus, Hericium, Lentinula</i>	Maïs
<i>Pleurotus, Stropharia</i>	Papier
<i>Agaricus</i>	Fumier du cheval (frais ou composté)
<i>Pleurotus</i>	Déchets de sucrerie (bagasse et molasse), paille d'haricot, paille de coton, coques de cacao
<i>Volvariella</i>	Feuilles de bananier



Figure 4 : Exemples de champignons supérieurs cultivés par FMS
(De gauche à droite : *Agaricus*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus augustus*)

www.invasive.org

La production mondiale des macrochampignons se mesure en centaines de milliers de tonnes. Diverses espèces sont ainsi cultivées, *Volvariella volvacea*, *Agaricus bisporus*, *Pholiota nameko*, *Auricularia auricularia*, *A. polytricha*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Coprinus fimetarius*, etc. Les substrats utilisés sont également très diversifiés : fumiers de chevaux, paille, effluents liquides, lactoserum, ensilages, liqueurs sulfiteuses, marcs, etc (Boiron, 1996) et les déchets de tomate pour la culture de *Pleurotus ostreatus* (Assi et King, 2007).

La production est réalisée à travers le monde, en particulier aux Etats-Unis, en Chine, aux Pays-Bas, en France, au Japon, à Taiwan, en Corée, etc. La compétence des champignons à transformer divers substrats en protéines est plus efficace que celle des plantes et des animaux. La consommation de ces champignons est bénéfique. En effet, le carpophore est peu calorique, à teneur faible en lipides et cholestérol mais riche en protéines, carbohydrates, fibres, vitamines et minéraux (Fan *et al.*, 2008) (voir **tableau 9**).

2.6. Production de métabolites secondaires

Au cours de ces dernières années, de nombreux métabolites secondaires ont été découverts. Ce sont des molécules ayant des activités nouvelles dans divers champs d'applications : pharmacie, cosmétique, alimentation et agriculture. Ils sont utilisés en tant qu'anti-inflammatoires, hypotenseurs, anti tumoraux, anticholestérolémiques, insecticides, régulateurs de la croissance végétale ainsi en tant qu'herbicide et pesticide écologiques. Ils comprennent les acides, les alcaloïdes, les antibiotiques, les immunodépresseurs, les immunostimulants, les arômes et les enzymes (Boiron, 1996). Le **tableau 10** regroupe les différents métabolites secondaires produits par FMS.

Les métabolites secondaires se caractérisent par le fait que leur production n'est pas indispensable à la croissance du micro-organisme, qu'ils sont de structure et d'activité biologique des plus diverses, qu'ils possèdent des voies de synthèse qui leur sont propres à partir de produits du métabolisme primaire et qu'ils sont généralement produits en faible quantité (Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992).

Les métabolites secondaires sont généralement produits par fermentation par un nombre limité d'organismes principalement par les actinomycètes et les champignons, à la fin de leurs cycles de croissance, souvent pendant la phase stationnaire (Barrios-González et Mejía, 2008).

Synthèse bibliographique

Tableau 10 : Les métabolites secondaires produits par fermentation solide (Botton *et al.*, 1990 ; Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Krishna, 2005 ; Barrios-González et Mejía, 2008).

Métabolite secondaire	Microorganismes	Activité biologique	Substrat de culture
Lovastatine ou Monacoline K	<i>Aspergillus terreus</i> <i>A. flavipes</i> <i>Monascus</i> sp	Hypocholestérolemique Anti tumorale	Support inerte Son de blé Riz
Cyclosporine A	<i>Tolypocladium inflatum</i>	Immunodépresseur (administré après transplantation d'organe), anti-inflammatoire, antifongique et antiparasite	Son de blé
Acide mycophenolique	<i>Penicillium brevicompactum</i> <i>P. sp</i>	Immunodépresseur	Son de blé
Nigerloxine	<i>Aspergillus niger</i>	Antioxydant par inhibition de lipoxygénases, anti-inflammatoire, anti allergique, anticancéreux	Son de blé
Penicilline G	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Antibiotique	Bagasse de canne à sucre
Cephalosporine C	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Antibiotique	Blé grossièrement moulu (BGM)
Griséofulvine	<i>P. griseofulvum</i>	Antibiotique	Son de riz
Rifamycine SV	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Antibiotique	Son de blé
Neomycine	<i>Streptomyces mainensis</i>	Antibiotique	Blé grossièrement moulu
Cephamycine	<i>S. clavuligerus</i>	Antibiotique	BGM/tourteaux des graines de coton
Tetracycline	<i>Streptomyces</i> sp. <i>Streptomyces viridefaciens</i> ATCC 11989	Antibiotique	Cosse de cacahuètes, résidus de patate douce
Iturine	<i>Bacillus subtilis</i>	Antifongique (champignons phytopathogènes)	Son de blé
Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i>	Biosurfactant, inhibiteur de coagulation de la fibrine et agent de lyse des : érythrocytes, spheroplastes et de protoplastes de quelques bactéries	Résidus de soja (Okara)

2.6.1. *l'acide gibbérellique*

Les gibberellines sont des hormones régulatrices de la croissance des plantes supérieures. Parmi ces molécules l'acide gibbérellique ou (GA3), est le plus important. Il peut être obtenu par synthèse chimique ou par fermentation (Botton *et al.*, 1990 ; Machado et Soccol, 2008).

Les gibberellines sont produits par certaines souches fongiques et bactériennes. L'organisme producteur par fermentation industrielle, est *Fusarium moniliforme* forme imparfaite de *Gibberella fujikuroi* qui produit 25 gibberellines (Barrios-González et Mejía, 2008). Des investigations de FMS ont été réalisées pour augmenter le taux de production et réduire les coûts de production et de l'extraction. Pour cela plusieurs substrats naturels et synthétiques ont été étudiés (Machado et Soccol, 2008).

2.6.2. *Les pigments*

Les colorants étaient connus et utilisés depuis la plus haute Antiquité, notamment comme teintures et produits cosmétiques. Les pigments naturels sont préférables par rapport aux colorants synthétiques. Ils peuvent être métabolisés et représentent des propriétés anti-oxidantes. Ceci a augmenté la demande pour les colorants naturels, notamment ceux obtenus par fermentation (Carvalho *et al.*, 2008).

Selon Larpent-Gourgaud et Sanglier (1992) et Carvalho *et al.* (2008), les principaux pigments d'origine microbienne commercialisés sont:

- la riboflavine (vitamine B2), pigment jaune produit par *Eremothecium ashbyii* et *Ashbya gossypi*,
- le pigment rouge produit par *Monascus purpureus* et *M. ruber* et obtenu par fermentation solide du riz,
- la caroténoïde, pigment jaune précurseur de la vitamine A tel que la β -carotène, produite par la moisissure *Blakeslea trispora* (Botton *et al.*, 1990) et par les micro-algues halotolérantes *Dunaliella salina* et *D. bardawil*.

Les souches fongiques potentielles pour la production des colorants en FMS sont regroupées dans le **tableau 11**.

2.6.3. *Les composés aromatiques*

Feron *et al.* (1996), estiment qu'environ 100 composés aromatiques peuvent être produits par des microorganismes. Ainsi, divers arômes et senteurs tels que l'anis, le miel,

Tableau 11: Les différentes souches fongiques productrices de colorants par FMS
(Carvalho *et al.*, 2008)

Souches fongiques	Pigments
<i>Blakeslea trispora</i> DSM 2387, DSM 2388, ATCC 14271	-carotène
<i>Sphingomonas echinoids</i> DSM 1805 <i>Acremonium diospyri</i> DSM 2939, ATCC 9066 <i>Dacrymices deliquescens</i> ATCC 13293, ATCC 13295, ATCC 13292 <i>Mucor azygosporus</i> ATCC 15087 <i>Neurospora crassa</i> ATCC 10816, ATCC 26187	autres caroténoïdes
<i>Monascus sp.</i> DSM 1604, ATCC 16360, ATCC 16362, ATCC 16365, ATCC 16427	Pigments rouge
<i>Acremonium diospyri</i> DSM 2939, ATCC 9066 <i>Candida sp.</i> DSM 70109, ATCC 10539, ATCC 9058 <i>Eremothecium ashbyii</i> ATCC 26614, ATCC 36179 <i>Pichia guilliermondii</i> DSM 70051	Riboflavine (vitamine B2)

l'amande, le fruité, la banane, la rose, la lavande, le jasmin et l'herbe, peuvent être obtenus par fermentation.

Les champignons producteurs d'arômes appartiennent à tous les groupes systématiques à l'exception possible des myxomycètes. Plusieurs *Aspergillus* (*A. niger*, *A. oryzae*), des *Penicillium*, *Alternaria*, *Cephalosporium* et *Fusarium* libèrent sur milieu solide, des composés volatils dont les six principaux sont les suivants : 3-méthyl-butanol, 3-octanone, 3-octanol, 1-octène-3-ol, 1-octanol et 2-octène-1-ol (Larpen-Gourgau et Sanglier, 1992). Bramorski *et al.* (1998 a et b) ont étudié la production de substances aromatiques chez les moisissures *Ceratocystis fimbriata* et de *Rhizopus oryzae* cultivées en milieu solide sur divers résidus agro-industriels.

Certaines bactéries synthétisent également des composés aromatiques. C'est le cas de *Lactococcus lactis* var *diacetylactis* produit du diacétyle (Larpen-Gourgau et Sanglier, 1992 ; Couto et Sanromán, 2006).

La levure *Kluyveromyces marxianus* produit également en FMS des composés aromatiques tels que les alcools, les esters et les aldéhydes (Soccol *et al.*, 2008b).

2.6.4. Le xanthane

Le xanthane est un polymère de β -1,4 D-glucoside avec des chaînes latérales de 3 unités d'acétyl D-mannose en β -1,2, d'acide D-glucuronique et de D-mannose-4,6-pyruvate.

Les polysaccharides microbiens possèdent de nombreuses applications industrielles. Par sa viscosité, le xanthane permet de solidifier les boues de forage, même en milieu marin (Rivière, 1975). Cet hétéro-polysaccharide a été produit par la bactérie *Xanthomonas campestris* en FMS à partir de plusieurs sous-produits agro-alimentaires (Stredansky *et al.*, 1999 ; Soccol et Vandenberghe, 2003 ; Couto et Sanromán, 2006).

2.6. L'ensilage

L'ensilage est une méthode de conservation du fourrage sous forme humide, avec le minimum de perte de matières sèches et de valeur nutritive. Il est réalisé à partir de différentes espèces végétales récoltées à des stades variables de leur croissance. L'ensilage suppose une anaérobiose pour arrêter la respiration du végétal et empêcher le développement de la flore aérobie putréfiante (moisissures). Les streptocoques se développent après les coliformes, puis cèdent la place aux lactobacilles, principalement *Lactobacillus plantarum*. Divers additifs

peuvent être ajoutés pour contrôler la fermentation, tels que l'héxaméthylène-tétramine, l'acide formique ou propionique et les glucides. L'acidification de l'ensilage bloque les enzymes végétales et inhibe le développement de *Clostridium butyricum* (Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Weinberg, 2008).

2.7. Le compostage

C'est une bioconversion de la matière organique par des microorganismes hétérotrophes (bactéries, champignons, actinomycètes et protozoaire) en compost. Pour cela, plusieurs bactéries et moisissures interviennent dans le processus, exemple *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Streptococcus* sp., *Altermaria* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Monilia* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Phanerochaete chrysosporium* et *Trichoderma* sp (Couto et Sanromán, 2006).

Le processus se déroule naturellement lorsque les conditions physico-chimiques (humidité, oxygène, température, matière biodégradable) sont réunies. Il débute par une dégradation aérobie intense des sucres et amidon. Cette décomposition provoque une augmentation de la température qui peut atteindre 70 °C. Par la suite, les composés humiques sont formés suite à l'action des champignons. Les déchets solides sont ainsi convertis en fertilisants (Garg *et al.*, 2008).

3. Facteurs affectant les cultures en FMS

Les facteurs majeurs qui affectent la croissance et l'activité microbienne au cours d'une fermentation solide se résument comme suivant : la nature du substrat et de son prétraitement, la taille des particules de substrat, l'humidité et l'activité d'eau du substrat, le type et la taille de l'inoculum, la température, le temps de culture et l'aération (Pandey *et al.*, 2008).

3.1. Substrat et rapport C/N

Les substrats peuvent être classés en trois grandes catégories. La première correspond aux matériaux organiques naturels, polymères lignocellulosiques ou amyliques insolubles dans l'eau, jouant en même temps le rôle de support de culture et de substrat. C'est le cas de tous les substrats solides issus de l'industrie agricole, composés essentiellement d'amidon, de cellulose, de lignocellulose, de pectine et d'autres polymères.

Les cultures réalisées en FMS sur substrats naturels sont mentionnées comme « *cultivation on natural substrate* » (Krishna, 2005). La deuxième comprend les matériaux minéraux tels que les granulés d'argile, la perlite, la pouzzolane, etc. Enfin, les matériaux synthétiques de type mousses de polyuréthane constituent la troisième catégorie de matrice solide utilisable par la FMS. Dans ces cas, les matériaux doivent être imprégnés de solutions nutritives pour assurer la croissance des microorganismes (Durand, 1998, Thomas *et al.*, 2013).

Au cours de la formulation d'un milieu de culture, il est important de tenir compte de la composition de la biomasse. En effet, cette dernière se compose de 40-50 % de carbone, 30-50 % d'oxygène, 6-8 % d'hydrogène et 3-12 % d'azote, en plus du phosphore, soufre et métaux qui sont aussi importants mais en petite quantité. Le carbone est l'élément le plus important, suivi par l'azote. Les deux autres éléments sont fournis par la source de carbone organique (Rodriguez-Leon *et al.*, 2008).

Le rapport C/N est crucial pour la production des métabolites non associés et partiellement associés à la croissance. Lors de la réalisation des cultures fongiques, il est important de connaître le rapport C/N qui pourrait inciter ou retarder la sporulation. Un rapport de 16 s'est avéré convenable pour les fermentations. La nature et le type de la source carbonée et azotée représentent les plus importants facteurs des procédés des fermentations (Rodriguez-Leon *et al.*, 2008). La sélection d'un substrat de fermentation solide dépend de plusieurs facteurs, principalement, en relation avec le coût et la disponibilité (Krishna, 2005).

3.2. Taille des particules de substrat

La taille des particules est importante pour la croissance des microorganismes car elle détermine la surface d'échange et le volume d'air interparticulaire qui correspond à l'oxygène nécessaire à la respiration microbienne. Ce facteur caractérise le substrat et sa capacité d'échange avec la croissance du microorganisme ainsi que le transfert de chaleur et de masse au cours de la fermentation. Il s'agit de la fraction du substrat qui sera accessible à la souche microbienne (Krishna, 2005).

Généralement, les particules de substrat de taille petite présentent une large surface d'attaque microbienne. Ceci est également avantageux pour le transfert de chaleur et les échanges gazeux (O_2/CO_2) entre l'air et la surface solide du substrat. Cependant, une taille très petite provoque une agglomération du substrat et donc une mauvaise aération. Ceci affecte la respiration et se traduit par une faible croissance. Au même temps, les particules

larges permettent une meilleure aération et par conséquent une bonne respiration, mais moins de surface d'attaques pour le microorganisme (Rodriguez-Leon *et al.*, 2008).

3.3. Humidité et activité de l'eau

L'eau joue un rôle essentiel dans le déroulement d'une FMS car elle est nécessaire à la constitution du mycélium, au métabolisme de la croissance, à la mobilité des enzymes et des nutriments ainsi qu'à la solubilisation de l'oxygène. Dans ces conditions, le développement des microorganismes dépend de la teneur en eau du milieu de culture ainsi qu'à sa disponibilité mesurée par l'activité de l'eau (A_w). A_w d'un produit rend compte de sa disponibilité de l'eau libre par rapport à l'eau liée aux molécules. L'échelle de mesure de l' A_w est comprise entre 0 et 1 et l'eau pure a une A_w de 1 (Durand, 1998).

L'influence de ce paramètre est caractérisée par une A_w optimale et une A_w limite propres à chaque microorganisme (Labeille, 1997). Au cours d'une FMS, l'activité de l'eau peut diminuer suite à une déshydratation du substrat et à l'accumulation des solutés. De même, le taux d'humidité doit être optimisé et contrôlé. En effet, un taux faible de l'humidité réduit la diffusion des nutriments, la croissance, la stabilité des enzymes et le gonflement du substrat. Par contre, un taux élevé de l'humidité provoque une agglomération des particules, une limitation de transfert des gaz et favorise les contaminations bactériennes (Duchiron et Copinet, 2011).

Vue l'importance de ce paramètre, il est nécessaire de connaître sa valeur optimale avant de lancer une FMS. Selon Krishna (2005), le taux d'humidité dans les procédés en FMS est en général compris entre 30 et 85 %. Pour les cultures de moisissures, il peut varier de 20 à 70 % ; pour les levures de 60 à 72 %, alors que pour les bactéries il doit être supérieur à 70 %. Une cellule vivante est caractérisée par un taux d'humidité de 70 – 80 %. Lorsque le taux d'humidité utilisé est faible, ceci présente une barrière naturelle vis-à-vis des contaminations (Rodriguez-Leon *et al.*, 2008).

3.4. Le pH

Le pH est un autre facteur important dans une fermentation ; il change en réponse à l'activité métabolique du microorganisme utilisé. La sécrétion des acides organiques conduit à sa baisse, alors que l'assimilation de ces acides ainsi que l'hydrolyse de l'urée provoquent son augmentation. Cependant, à chaque microorganisme correspond une valeur optimale de pH convenable à sa croissance. Les champignons filamenteux peuvent se développer dans un domaine de pH de 2 à 9 avec un optimum compris entre 3 et 6 (Duchiron et Copinet, 2011).

Les levures peuvent pousser dans l'intervalle de pH de 2,5-8,5 mais l'optimum de croissance est obtenu à 4-5 (Krishna, 2005). Pour la majorité des bactéries, c'est un peu plus au voisinage de la neutralité (6,5-7,5) (Rodriguez-Leon *et al.*, 2008).

La polyvalence des champignons permet de lutter contre les contaminations bactériennes, particulièrement par l'utilisation des milieux de cultures à pH faible. Cependant, à l'inverse des FML, le contrôle du pH au cours d'une FMS fongique est pratiquement impossible. Ceci est dû à l'hétérogénéité du procédé et au manque d'électrodes adaptées à des mesures de pH sur des matériaux solides (Krishna, 2005).

Les variations de pH dépendent de la nature de la source azotée et des caractéristiques de la croissance. Le problème du changement du pH, peut être résolu par l'utilisation de substrats capables de tamponner le milieu ou par l'utilisation de tampon n'ayant pas d'effet sur l'activité biologique de la souche utilisée (Krishna, 2005). le milieu de culture peut être tamponné également par l'addition des sels de calcium ou d'une solution alcaline (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

3.5. Température et accumulation de la chaleur métabolique

La température est un paramètre important pour le contrôle de la croissance et de la production des différents métabolites en FMS, dont les enzymes. La chaleur s'accumule facilement dans ces cultures, car les échanges thermiques sont difficiles dans un milieu peu hydraté. Ceci peut avoir des effets importants tels que la dénaturation des protéines, l'inhibition des enzymes, l'augmentation ou l'inhibition de la production des métabolites et la mort des cellules (Krishna, 2005).

Chaque microorganisme exige une température déterminée pour sa croissance optimale, proche de la température limite. Ceci a permis de classer les microorganismes selon la température de croissance en différents groupes : extrême-thermophiles ; thermophiles ; mésophiles et psychrophiles (Rodriguez-Leon *et al.*, 2008).

Connaitre la souche utilisée permet de savoir son adéquation au procédé. La régulation de la température reste un des problèmes majeurs à surmonter en FMS. En effet, au cours de sa croissance, un microorganisme produit notamment de la chaleur métabolique qu'il faut éliminer. Si, en FML, il est trivial de réguler la température du fait que l'eau conduit bien les calories, il n'en est pas de même en FMS, ces calories ne peuvent être éliminées que par ventilation de la couche du substrat en fermentation (Durand, 1998 ; Krishna, 2005 ; Rodriguez-Leon *et al.*, 2008).

Les systèmes utilisés habituellement pour évacuer la chaleur par conduction ou convection se révèlent généralement insuffisants pour réguler correctement la température en FMS. Dans un réacteur aéré, l'évaporation permet de refroidir efficacement le milieu. Au cours d'une fermentation fongique de son de blé dans un réacteur-colonne équipé d'un système d'aération, 64,7 % de la chaleur est éliminée par évaporation, 26,5 % par convection et 8,65 % par conduction. Le taux d'évaporation peut être contrôlé par une régulation du débit et du taux d'humidité de l'air qui circule à travers le milieu de fermentation (Labeille, 1997). Dans le rapport de Krishna (2005), l'évaporation peut éliminer jusqu'à 80 % de la chaleur.

3.6. Aération et agitation

Ces deux paramètres influencent de façon significative une FMS. L'aération fournit l'oxygène nécessaire aux procédés aérobies ; selon Rodriguez-Leon *et al.* (2008), la demande d'O₂ peut être satisfaite par une faible aération ce qui n'est pas le cas en FML qui nécessite des mécanismes pour la dissolution de l'O₂ dans le milieu liquide. En FMS, elle permet d'éliminer la chaleur, le CO₂ et les métabolites volatiles produits au cours de la fermentation.

Le taux d'aération dépend des exigences de la souche microbienne, de son métabolisme et de l'évolution de la chaleur. Le transfert de l'oxygène dépend des paramètres opératoires et des caractéristiques du substrat utilisé. Parmi ces paramètres : la pression et la quantité de l'air, la porosité du substrat humide ainsi que son épaisseur, le niveau de perforation des cuves utilisées, le taux d'humidité et la géométrie du réacteur. Le flux d'air et sa qualité peut améliorer le contrôle de la température (Krishna, 2005). En pratique, l'utilisation de l'air saturé en humidité permet d'éviter le séchage du substrat, de maintenir le taux d'humidité adéquat et le contrôle de la température (Rodriguez-Leon *et al.*, 2008).

L'agitation permet d'assurer l'homogénéité du procédé, d'améliorer le transfert de masse et de chaleur, de bien répartir l'eau additionnée pour compenser la perte provoquée par son évaporation (Durand, 2003). Par conséquent, les substrats solides ayant une faible capacité d'absorption, peuvent être utilisés dans les réacteurs avec agitation. Les substrats de culture formant des agrégats rendent l'aération et l'agitation difficiles. Le support solide doit conserver sa structure et supporter les forces d'agitation. Tout ceci doit être pris en compte lors du choix du substrat. Le microorganisme mis en culture doit également tolérer l'agitation. L'activité microbienne peut être affectée lors du mixage pour certains substrats et pas pour d'autres (Couto et Sanromán, 2006).

L'agitation augmente la production de certains métabolites mais peut aussi réduire la croissance, particulièrement lorsqu'il s'agit de culture fongique. Les mycéliums peuvent être

endommagés ainsi que l'adhérence des cellules aux particules de substrat par les effets des cisaillements. Ceci peut être remédié par l'application d'une agitation intermittente. Cependant, plusieurs procédés FMS se déroulent en condition statique, c'est le cas des fermenteurs à plateaux (Krishna, 2005).

3.7. Oxygène et dioxyde de carbone

L'environnement gazeux affecte d'une façon significative la croissance et la production des enzymes. La FMS permet un accès libre de l'O₂ jusqu'au substrat, aucune limitation en cet élément n'a été observée. En effet, la surface de contact est importante entre la phase gazeuse, les particules de substrat et le mycélium aérien lors d'une culture sur milieu solide (Raghavaro *et al.*, 2003).

Le contrôle de la phase gazeuse et du flux de l'air est une approche simple et pratique qui permet de réguler le transfert des gaz. Le quotient respiratoire théorique des microorganismes aérobies est égal à 1 ; au dessous de cette valeur il y'a un transfert insuffisant de l'O₂, ce qui se traduit par une faible croissance. Au cours d'une FMS, le rapport entre l'oxygène consommé et le dioxyde de carbone produit est utilisé pour l'évaluation de la croissance car ceci est étroitement lié au métabolisme du microorganisme (Krishna, 2005).

Narahara *et al.* (1982) rapportent qu'une pression de 5 % de CO₂ stimule la production de protéases par *A. oryzae* pendant la phase de latence tandis qu'une pression partielle *pp*CO₂ de 10 % la limite. Par ailleurs, Labeille (1997) a trouvé que l'utilisation de réacteur en colonne aéré stimule la production de glucoamylase d'*A. niger*.

3.8. Type de l'inoculum

Les spores représentent un moyen d'inoculation plus avantageux que les cellules végétatives. En effet, elles facilitent la préparation de l'inoculum. Elles sont stables après une longue conservation ou lors d'une mauvaise manipulation. Cependant, elles présentent quelques inconvénients : phase de latence plus longue, conditions de germination différentes de celles nécessaires à la croissance et exigence de quantité importante de l'inoculum.

Les spores sont métaboliquement dormantes, la synthèse des systèmes enzymatiques appropriés débute après l'induction de l'activité métabolique. Elles permettent alors aux champignons d'utiliser le substrat pour se développer.

Par ailleurs, certains microorganismes nécessitent un inoculum végétatif riche en enzymes. Ce type d'inoculum permet de produire plus de protéines lors de la fermentation du

son de blé par *Chaetomium cellulolyticum* (Abdullah *et al.*, 1985). Il a été démontré que lors de l'utilisation de cellules végétatives de *Aspergillus niger*, comme inoculum, le rendement de la production de la phytase et la formation de la biomasse sont fortement corrélés à l'âge de l'inoculum sans oublier l'importance de la densité de l'inoculum dans une fermentation (Krishna et Nokes, 2001).

3.9. Stérilité

La mise en place d'un procédé de fermentation nécessite la stérilisation du milieu de culture avant l'apport du microorganisme choisi. Néanmoins, il existe de nombreux cas en FMS où l'élimination de la flore autochtone n'est pas nécessaire comme c'est le cas des levains de boulangerie, de l'ensilage et le compostage. Pour les autres procédés, lorsque le champignon filamenteux a suffisamment colonisé le substrat, il n'est plus nécessaire de travailler en condition stérile (Duchiron et Copinet, 2011).

3.10. La biomasse

La mesure de la biomasse est un paramètre fondamental lors du suivi d'une culture microbienne. En FML, elle peut être estimée par des méthodes directes, alors qu'en FMS, sa mesure est peu accessible et ce, à cause des problèmes de séparation entre le microorganisme et le substrat d'une part, et de l'hétérogénéité du procédé d'autre part. Pour cela, des méthodes indirectes sont donc utilisées (Auria *et al.*, 1993), notamment par le dosage de certains produits de la fermentation.

Les déterminations qui peuvent être utilisées en FMS concernent la glucosamine, l'ergostérol, l'ADN, les protéines et l'oxygène/dioxyde de carbone (Cahagnier et Richard-Molard, 1998 ; Rodriguez-Leon *et al.*, 2008). Ce dernier paramètre semble le plus prometteur pour l'estimation de la biomasse au cours d'une FMS aérobie (Krishna, 2005). Cependant, d'après Bellon-Maurel *et al.* (2003), la mesure des protéines et des acides nucléiques peut interférer avec les substrats riches en ces composés, quand à la mesure de la chitine et de l'ergostérol, elle ne convient que pour les cultures fongiques.

L'étude de la croissance de *A. niger* en FMS par Favela-Torres *et al.* (1998) a été réalisée par les mesures de protéines, alors que celle de *Aspergillus oryzae* a été évaluée par Hoogschagen *et al.* (2001) en mesurant la respiration et celle de la levure *S.cerevisiae* a été suivie par Neves *et al.* (2006) par des mesures de l'ATP.

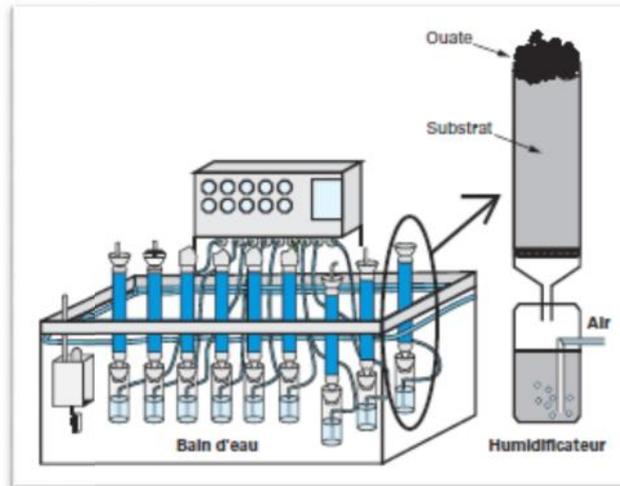


Figure 5: Réacteur colonnes de laboratoire (Duchiron et Copinet, 2011).

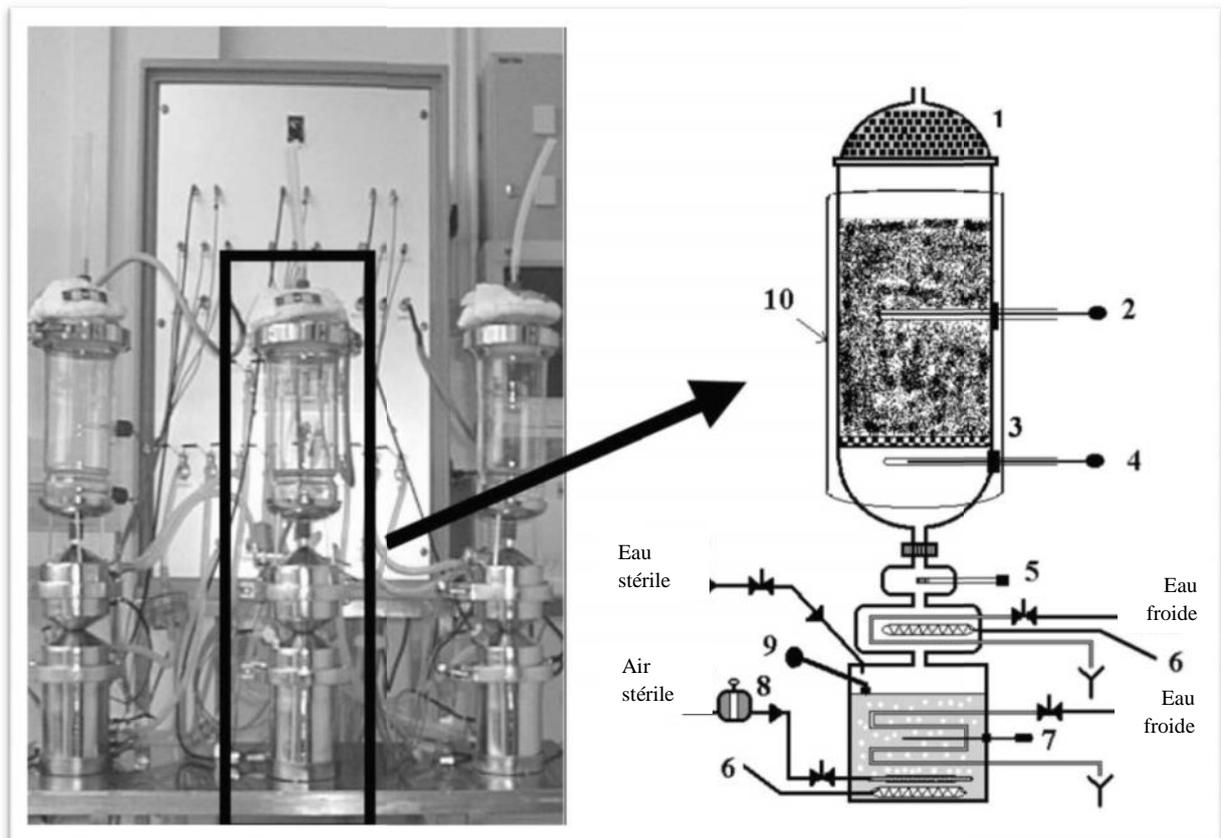


Figure 6: Schéma d'un réacteur de laboratoire pour FMS en condition stérile. (1) couvercle, (2) sonde de température, (3) tamis en acier inoxydable, (4) sonde de température de l'air entrant, (5) sonde d'humidité relative, (6) résistance de chauffage, (7) sonde de température de l'eau, (8) compteur du débit d'air, (9) sonde de niveau d'eau, (10) enveloppe isolante (Durand, 2003).

4. Les bioréacteurs de la FMS et les répercussions de ces procédés

Le bioréacteur assure quatre rôles essentiels : le stockage, la stérilisation, l'aération et l'agitation. Il doit permettre également le contrôle des paramètres physiques et chimiques de la fermentation (Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992).

La conception d'un fermenteur pour cultures solides tient compte des paramètres suivants : le milieu de culture, la stérilisation des équipements et la prévention des contaminations, la technique d'inoculation, le contrôle de l'aération, l'intérêt et la nature du système d'agitation, le contrôle et la mesure des divers paramètres, la possibilité de développer les équipements à l'échelle industrielle et les coûts d'investissement et d'entretien (Raghavarao *et al.*, 2003). L'installation d'un bioréacteur en FMS est plus respectueuse de l'environnement qu'une installation en FML (Krishna, 2005).

4.1. Classification des fermenteurs en FMS

Différents types de bioréacteurs en FMS sont utilisés en fonction des applications recherchées, à l'échelle du laboratoire ou à l'échelle industrielle. Plusieurs auteurs ont décrit ces modèles (Durand, 2003 ; Couto et Sanromán, 2006 ; Giovannozzi-Sermanni et Tiso, 2008 ; Duchiron et Copinet, 2011).

4.1.1. Réacteurs de laboratoire

Les études préliminaires de la FMS en laboratoire sont réalisées avec différents équipements à température constante, sans aération, ni agitation. Ces cultures sont réalisées dans des boîtes de Pétri, des jars, des Erlenmeyers, des fioles ou des réacteurs à lit fixe. Le réacteur à lit fixe se compose d'une ou de plusieurs colonnes. Ces dernières contiennent le substrat inoculé. Chaque colonne est traversée par un courant d'air humide de bas en haut.

Le réacteur à colonnes comprend un bain-marie thermostaté pour le contrôle de la température et un dispositif de chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse de la respiration microbienne. Le suivi de la culture s'effectue par sacrifice d'une colonne. Ce type de fermenteur permet de travailler en conditions stériles (**figure 5**).

Ce dispositif est idéal pour l'étude au laboratoire ; il a permis l'étude de la croissance de *A. niger* dans un réacteur contenant la résine d'amberlite (Favela-Torres *et al.*, 1998), la production de la xylanase par *A. niger* avec des tourteaux de noyau de palmier (Abdeshahian *et al.*, 2009) et la production de α -galactosidase par *Streptomyces griseoalbus* avec la farine de soja (Anisha *et al.*, 2010).

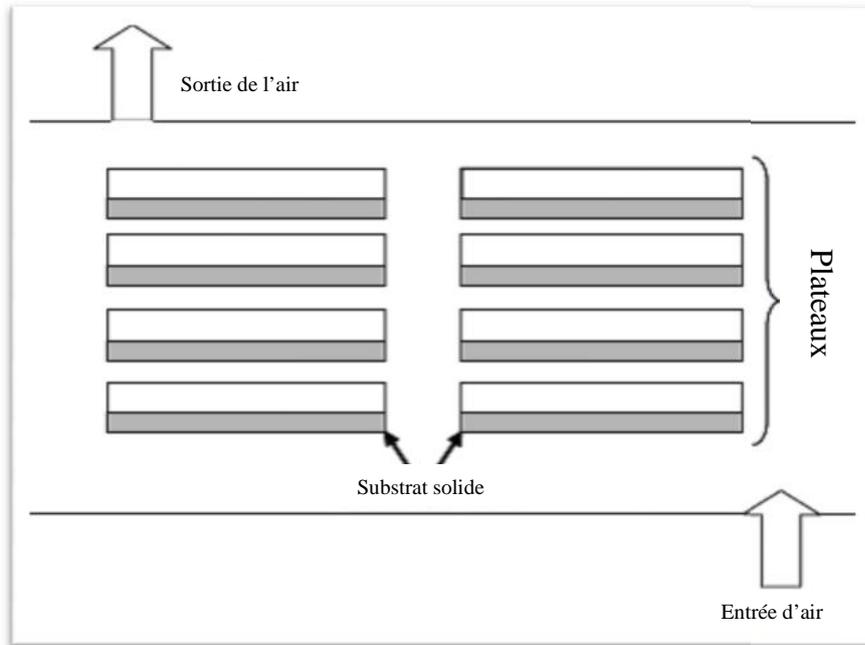


Figure 7: Schéma d'un réacteur à plateaux statique avec aération passive (Couto et Sanromán, 2006).

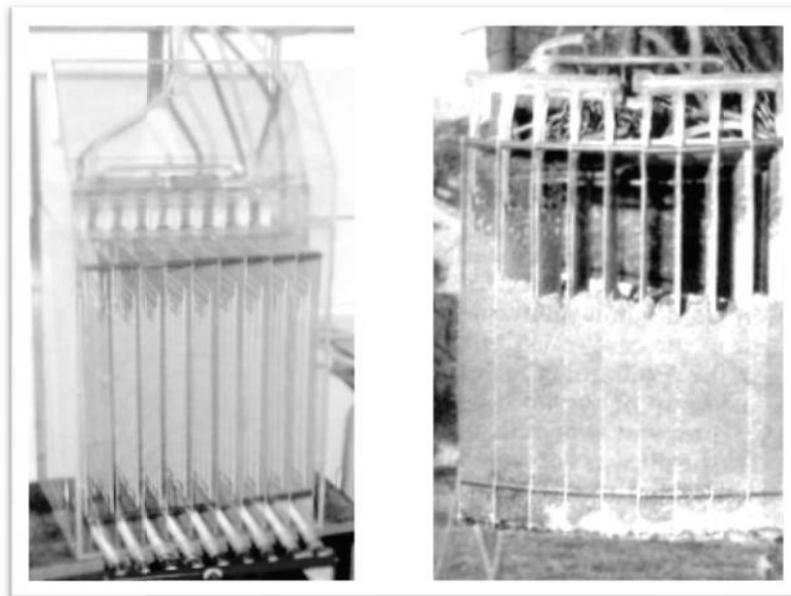


Figure 8 : Réacteur statique avec aération forcée, photographie de Zymotis : Plaques pour la circulation de l'eau thermostatée (à gauche), au cours de la culture (à droite) (Durand, 2003).

Une nouvelle génération de fermenteurs à une colonne a été développée par l'équipe de l'Inra-Dijon avec un volume de travail de 1 l (**figure 6**). Ces nouveaux réacteurs sont équipés d'accessoires supplémentaires par rapport au premier modèle ; à savoir une sonde de l'humidité relative, une jaquette de refroidissement et un couvercle de chauffage pour la colonne. Les prélèvements peuvent être effectués au cours de la culture (Durand, 2003).

4.1.2. Fermenteurs pré-pilotes et pilotes

L'échelle pilote est une étape importante dans le développement d'un procédé ; elle permet de valider les travaux réalisés en laboratoire en vue d'une application industrielle.

Les bioréacteurs peuvent être classés en plusieurs catégories selon le mode d'aération et d'agitation adopté (Labeille, 1997). On distingue au moins 6 types.

➤ Réacteur statique sans aération (réacteurs à plateaux) : c'est le plus simple et le plus anciens des fermenteurs. Il permet la production de tempeh, fromages et d'enzymes (Smits *et al.*, 1998). Voir **figure 7**.

➤ Réacteur statique avec aération forcée : il est aéré par de l'air conditionné passant à travers le tamis portant le substrat. La régulation de la température a lieu durant la culture microbienne. Ce type de réacteur est utilisé pour la production de substances cytotoxiques telles que l'acide mycophenolique et la lovastatine (Raghavarao *et al.*, 2003 ; Durand, 2003). Voir **figure 8**.

➤ Réacteur à agitation alternée sans aération forcée : il s'agit d'une cuve cylindrique avec un mode d'agitation intermittente. Ceci évite l'agglomération du milieu de culture et provoque moins de cisaillements pour le mycélium que l'agitation continue. Tout l'équipement peut être géré manuellement et automatiquement (Krishna, 2005 ; Giovannozzi-Sermanni et Tiso, 2008). Voir **figure 9**.

➤ Réacteur à agitation continue sans aération forcée : le fermenteur rotatif est essentiellement sous forme de cuves tournantes autour d'un axe horizontale. La performance de ce genre de réacteur est améliorée par l'étude de la vitesse de rotation et des paramètres d'agitation. L'étude cinétique de *Rhizopus* cultivé sur son de blé est un exemple de fermentation réalisée sur ce matériel (Durand, 2003 ; Giovannozzi-Sermanni et Tiso, 2008). Voir **figure 10**.

➤ Réacteur à agitation continue avec aération forcée : ce type se caractérise par l'agitation en continue, une addition d'eau par pulvérisation ou par égouttement qui permet un bon rafraichissement du substrat. Ce système est convenable pour les fermentations à grande

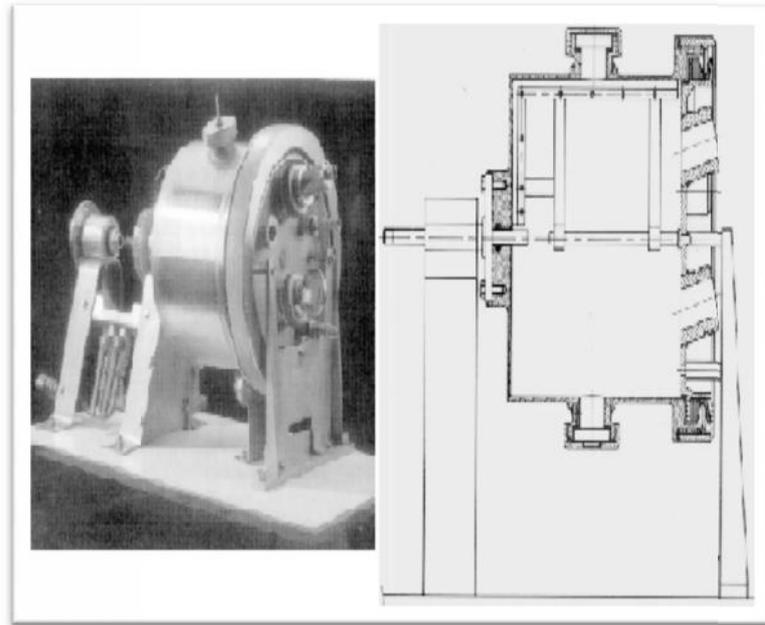


Figure 9 : Photographie et schéma d'un réacteur rotatif à agitation alternée, sans aération forcée (Durand, 2003).

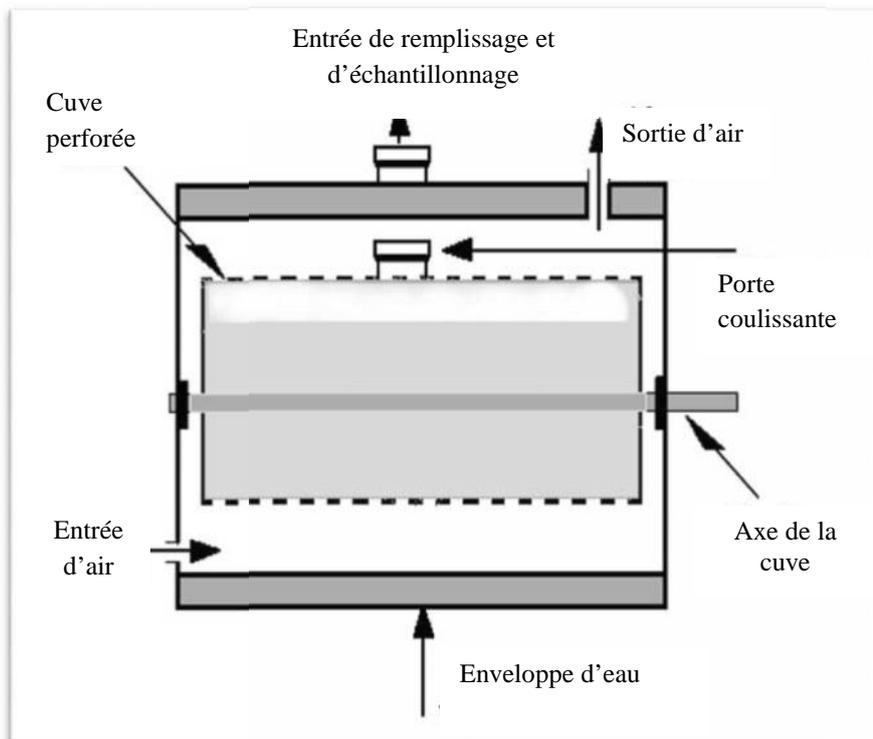


Figure 10: Fermenteur à tambour perforé rotatif (Durand, 2003).

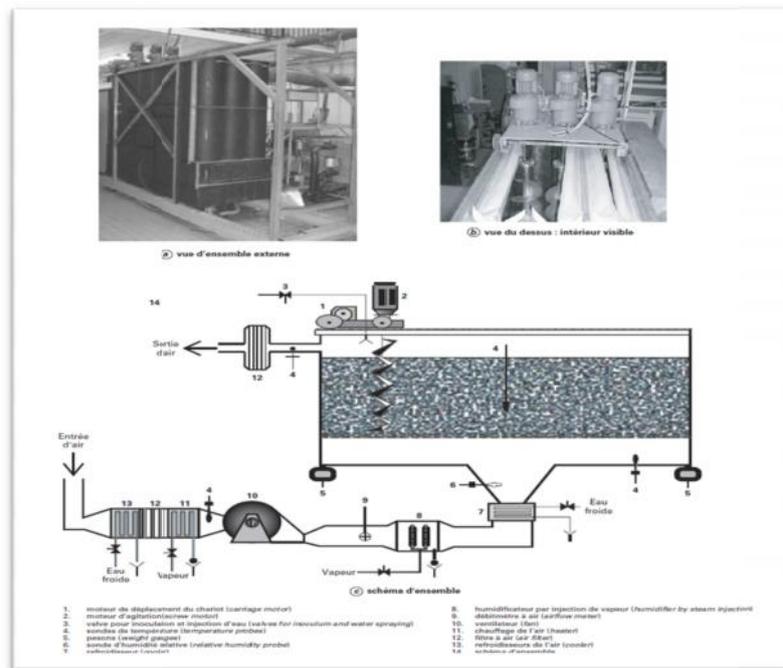


Figure 11 : Réacteur pilote en cuve profonde INRA Dijon (Duchiron et Copinet, 2011).

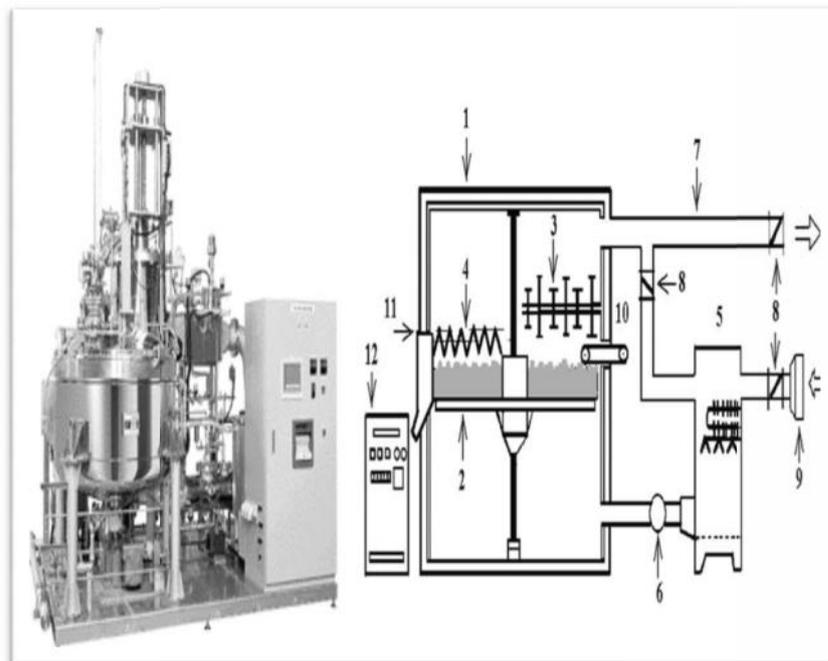


Figure 12 : Photographie et schéma du réacteur de type Koji: (1) chambre de Koji, (2) table perforée rotative, (3) dispositif de mélange rotatif, (4,11) vis et dispositif de déchargement, (5) air conditionné, (6) ventilateur, (7) sortie d'air, (8) amortisseur, (9) filtre à air, (10) dispositif de remplissage, (12) tableau de contrôle (Durand, 2003).

échelle (Krishna, 2005; Couto et Sanromán, 2006; Giovannozzi-Sermanni et Tiso, 2008). Voir **figure 11**.

➤ Réacteur à agitation alternée avec aération forcée : l'application d'une agitation de manière discontinue avec le passage d'un flux d'air forcé permettent d'assurer l'homogénéité et le contrôle des paramètres de culture (taux d'humidité, la température), ainsi que l'élimination des composés volatiles et du dioxyde de carbone au cours de la fermentation. Ce système est similaire au *Packed-bed*. Il contient des vis sans fin pour mélanger le substrat durant la culture. Sur cette base plusieurs bioréacteurs ont été développés jusqu'au stade industriel (capacité de plusieurs tonnes), pour des cultures non stérile (Durand, 2003 ; Giovannozzi-Sermanni et Tiso, 2008). Ce modèle est commercialisé par la marque japonaise Fujiwara qui permet de réaliser des cultures par le procédé traditionnel *koji*, comme c'est le cas du fermenteur utilisé dans ce travail (Voir **figure 12**).

4.2. Répercussions des FMS

Les FMS permettent la production d'aliments riches en protéines, d'enzymes, d'acides organiques, de spores, ... tout en valorisant des sous-produits agricoles. De nombreux secteurs tels que l'agriculture et l'environnement pourraient exploiter utilement ce procédé. Le premier pour la production des biopesticides destinés à la lutte biologique ou des hormones végétales et le deuxième pour la dépollution par bioremediation ou biodégradation (Roy *et al.*, 2006).

Pour les pays industrialisés, l'utilisation de la FMS a des répercussions essentiellement économiques et environnementales. Elle peut générer des molécules à haute valeur ajoutée tout en étant plus économe en énergie que les procédés en phase liquide, et en recyclant certains sous-produits solides polluants.

Pour les pays du Sud, l'enjeu de la FMS est encore plus important. Ses répercussions sont cette fois socio-économiques comme l'indique le rapport de Durand (1998). En effet, la FMS pourrait faciliter la valorisation de tonnages importants de résidus agricoles et agro-industriels. Ces derniers peuvent être une source nouvelle de produits de première nécessité, tels que les aliments riches en protéines destinés à l'alimentation animale ou humaine.

Tableau 12: Liste des classes d'enzymes selon le profil catalytique et les enzymes industrielles correspondantes (Østergaard et Olsen, 2010).

Classes	Profil catalytique	Enzymes industrielles
EC 1 : Oxydoréductases	Réactions de transfert d'électrons	Catalase, glucose oxidase, laccase, peroxidase
EC 2 : Transférases	Transfert de groupements	Fructosyltransferase, glucosyltransferase, transglutaminase
EC 3 : Hydrolases	Réactions d'hydrolyse	Amylase, cellulase, -glucanase, lactase, lipase, mannanase, pectin methyl esterase, pectinase, phospholipase, phytase, protéase, pullulanase, xylanase
EC 4 : Lyases	Elimination ou addition de groupements sur double liaison	Pectate lyase, -acétolactatedécarboxy-lase
EC 5 : Isomérases	Réactions d'isomérisation	Glucose isomérase
EC 6 : Ligases	Formation de liaison entre deux groupements avec dégradation simultanée d'ATP	Pas encore utilisée

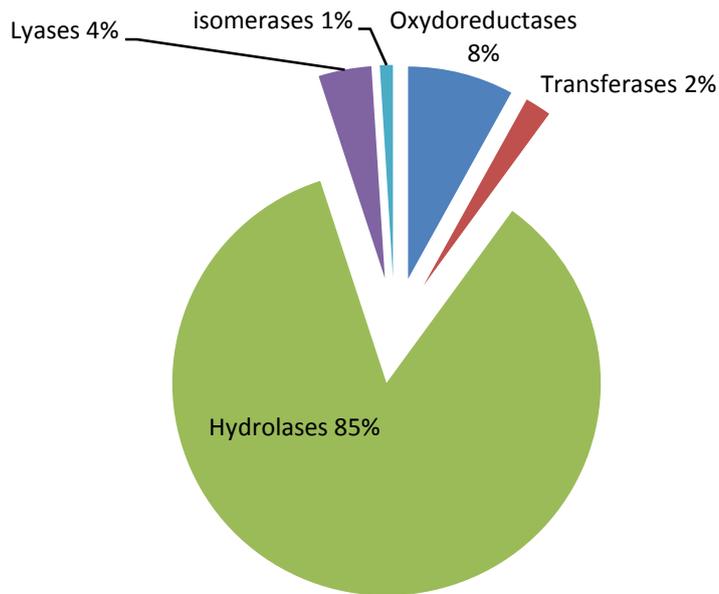


Figure 13: Distribution des différentes classes d'enzymes industrielles (Østergaard et Olsen, 2010 ; AMFEP, 2013).

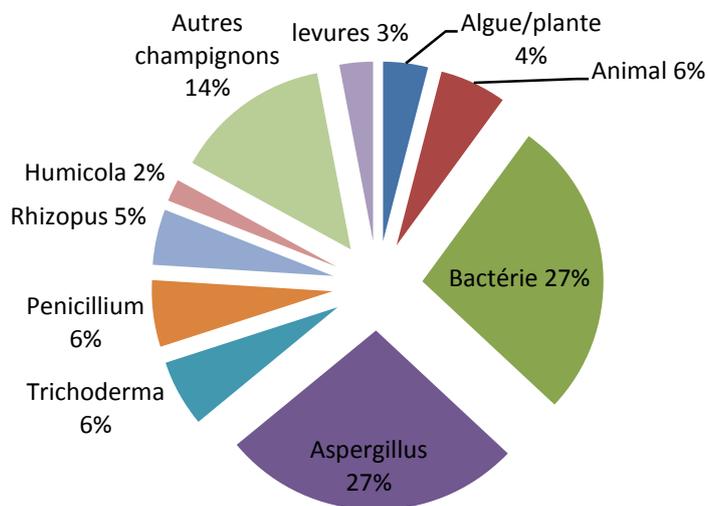


Figure 14 : Distribution des organismes sources d'enzymes industrielles (Østergaard et Olsen, 2010).

5. Les protéases

5.1 Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont les catalyseurs biologiques ; elles assurent le déroulement de toutes les réactions métaboliques de l'être vivant. Leur nombre élevé a conduit à leur classification en six grandes classes. Chaque classe se caractérise par un profil catalytique et chaque enzyme porte un numéro qui lui est spécifique (Pelmont, 1995).

Les enzymes industrielles appartiennent à toutes les classes sauf celle des ligases, mais en majorité à la 3^e, celle des hydrolases (**figure 13**) (**tableau 12**). En effet, celles-ci représentent 85 % des enzymes (Østergaard et Olsen, 2010).

Les enzymes industrielles peuvent être extraites de tissus végétaux ou animaux, ou produites par fermentation par certains microorganismes. Elles sont appréciées pour leur grande efficacité et spécificité ainsi que pour une contribution à la mise en œuvre de procédés plus respectueux de l'environnement. Les enzymes microbiennes sont dominantes car elles offrent plusieurs avantages, en particulier une facilité d'obtention, une possibilité d'améliorer le rendement et l'éventualité de l'utilisation de matières premières bon marché comme milieu de culture (Bouix et Leveau, 1999).

Les enzymes fongiques sont largement majoritaires (**figure 14**); elles représentent 60 % des enzymes commercialisées (Østergaard et Olsen, 2010).

Aujourd'hui le marché des enzymes industrielles a beaucoup évolué, il est passé de 600 millions de \$ de CA en 1995 (Cuvellier *et al.*, 1999) à 4,9 milliards de \$ en 2013, marché supérieur à celui des antibiotiques qui est estimé à environ 2,3 milliards de \$ (BCC Research, 2013). On estime que ce marché pourrait doubler d'ici 2020, selon le PDG de Danisco (www.Techniques-ingenieur.fr/actualite/environnement-thematique_191/).

Les enzymes occupent une place grandissante dans de nombreux secteurs. Cela s'explique par les nombreuses applications (Sicard, 1982), en particulier en industries alimentaires qui utilisent 57 %, contre 27 % pour les industries chimiques (Østergaard et Olsen, 2010). Plusieurs études rapportent également leurs applications dans le domaine médical (en oncologie et dans de nombreuses autres pathologies) (Mahajan et Badgujar, 2010) et dans le secteur des biotechnologiques (Vishwanatha *et al.*, 2009). Actuellement de nouveaux débouchés prennent de l'ampleur, la chimie fine, la nutrition animale et l'environnement. L'exemple le plus frappant est la production des biocarburants lancée par plusieurs industriels des enzymes, tel que Novozymes qui s'est lancé dans la production de bioéthanol en 2012.

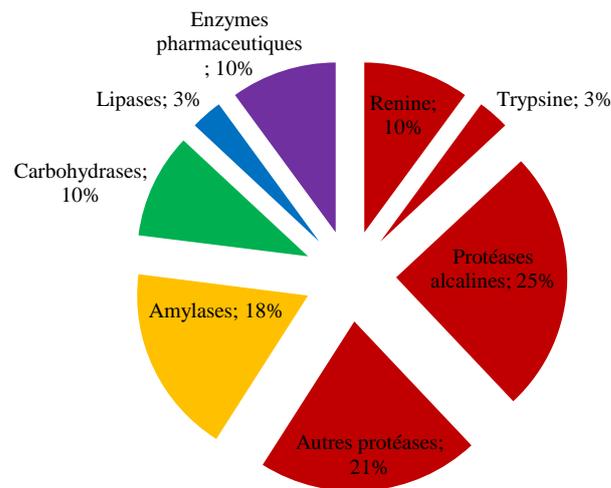


Figure 15: Répartition du marché mondial des enzymes, protéases en rouge (Mahajan et Badgujar, 2010).

Tableau 13: Les exopeptidases et leur mode d'action (Mahajan et Badgujar, 2010).

Protéase	Mode d'action	Code E.C.
Aminopeptidases	●-○-○-○-○-○-○ ↓	3.4.11
Dipeptidyl peptidase	●-●-○-○-○-○-○-○ ↓	3.4.14
Tripeptidyl peptidase	●-●-●-○-○-○-○-○ ↓	3.4.14
Carboxypeptidase	○-○-○-○-○-○-○-● ↓	3.4.16-3.4.18
Peptidyl dipeptidase	○-○-○-○-○-○-●-● ↓	3.4.15
Dipeptidases	●-● ↓	3.4.13

http://www.techniques-ingenieur.fr/actualite/environnement-thematique_191/novozymes-roi-des-enzymes-futur-major-des-biocarburants-article_6503/

Parmi les enzymes industrielles, les protéases occupent une position centrale. Elles représentent environ 60 % du marché global des enzymes (**figure 15**) (Mahajan et Badgujar, 2010).

5.2 Définition et rôle des protéases

Les protéases appelées aussi protéinases ou enzymes protéolytiques, représentent un important groupe de la classe des hydrolases, sous classe des peptidases (EC. 3.4.). Elles catalysent le clivage des liaisons peptidiques des protéines. Ce sont les enzymes responsables de la digestion des protéines présentes dans nos aliments et interviennent dans de nombreux processus physiologiques comme la digestion des nutriments, la maturation des protéines cellulaires, l'activation des formes zymogènes des enzymes digestives, l'inactivation d'hormones, le transport transmembranaire, la régulation du métabolisme, etc.

Elles sont également très utilisées tant au niveau industriel, qu'au niveau pharmacologique, médical et analytique.

5.3 Classification et mécanisme d'action des protéases

Les protéases peuvent être classées selon trois types de classifications, soit en fonction du pH, soit selon le mode d'action ou selon la nature des résidus impliqués dans le site actif. Dans le premier type on distingue : (i) les protéases acides, actives à partir du pH 2 ; (ii) les protéases neutres à pH 6,5 et 7,5 et (iii) les protéases alcalines qui agissent à des valeurs de pH supérieures à 7,5 jusqu'à 11 (Larpen-Gourgand et Sanglier, 1992 ; Mahajan et Badgujar, 2010).

En fonction du mode d'action, les protéases sont classées en deux groupes, les exopeptidases et les endopeptidases. Les premières agissent au niveau des extrémités N terminales pour les aminopeptidases ou C terminales pour les carboxypeptidases (voir **tableau 13**). Les secondes agissent à l'intérieur de la chaîne peptidique.

Le troisième type classe les protéases sur la base de la nature des résidus impliqués dans le site actif. Ainsi, on distingue quatre groupes : (i) sérinyl-protéases, (ii) cystéinyl-protéases, (iii) aspartinyl-protéases et (iiii) métallo-protéases.

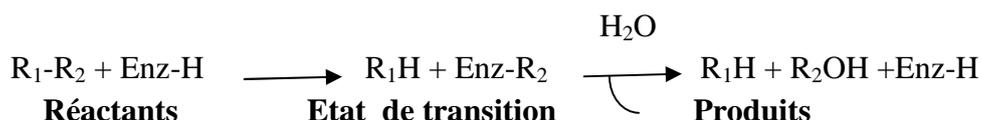
Les séryl-protéases (E.C.3.4.21) possèdent au niveau du site actif une triade de résidus, sérine, aspartate et histidine. Les enzymes digestives appartiennent à ce groupe (Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Garrett et Grisham, 2000).

Les cystéyl-protéases (E.C.3.4.22) sont les protéases à thiol, leur site actif contient la cystéine, l'histidine et l'aspartate. L'ordre des deux premiers résidus varie selon le type de famille de protéase (cys-his ou his-cys). La papaïne est la plus connue de cette classe où l'on retrouve également l'actidine et les cathepsines B et L (Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Mahajan et Badgujar, 2010).

Les aspartyl-protéases (E.C.3.4.23) sont les protéases acides, anciennement appelées carboxyl-protéases. Elles contiennent l'acide aspartique dans leur site actif. Ce groupe comprend la pepsine, la renine, la cathepsine D et beaucoup de protéases fongiques (Mahajan et Badgujar, 2010). Il comprend également la protéase de VIH qui est une imitation des aspartate-protéases de mammifères (Garrett et Grisham, 2000).

Les métallo-protéases (E.C.3.4.24) se caractérisent quant à elles par la présence d'un cation métallique divalent au niveau du site actif. Le plus souvent, il s'agit de l'ion de zinc. Les métallo-protéases bactérienne exigent du calcium pour leur stabilité (Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992). Elles sont inhibées par les agents chélatants tels que l'acide éthylène diamine tetra acetique (EDTA). Parmi ce groupe on retrouve la thermolysine, la collagenase, la kératinase, la gelatinase et des protéases fongiques et bactériennes (Mahajan et Badgujar, 2010).

Le mécanisme d'action des hydrolases le plus répandu est le suivant :



Il ne fait intervenir l'eau qu'après une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et le substrat (Mouranche, 1985 ; Cuvellier, 1999). Dans ce cas un agent nucléophile de l'enzyme transfère un doublet d'électrons à un atome de la liaison à hydrolyser dont la charge positive est stabilisée par un autre groupement de l'enzyme. Il forme alors un intermédiaire réactionnel (Enzyme-R₂) par rupture de la liaison à hydrolyser, le fragment de substrat R₁ étant simultanément déplacé et libéré, en captant un proton cédé par un résidu de l'enzyme. L'intermédiaire formé avec l'enzyme, est ensuite hydrolysé par une molécule d'eau qui régénère les résidus du site actif de l'enzyme dans leur forme initiale et libère le produit de la réaction (Mouranche, 1985).

5.4 Rôles physiologiques des protéases

Les protéases agissent dans le métabolisme et la régulation de chaque cellule vivante. Les protéases extracellulaires hydrolysent les protéines en petites molécules qui peuvent être absorbées par les cellules alors que les protéases intracellulaires jouent un rôle dans la régulation du métabolisme. Elles jouent des rôles physiologiques et pathologiques parmi lesquels le catabolisme des protéines, la coagulation du sang, la croissance et la migration cellulaire, l'activation des zymogènes, l'inflammation, la croissance tumorale et métastase et le transport des protéines secrétées à travers les membranes (Mahajan et Badgujar, 2010).

Une autre fonction importante des protéases est la régulation de l'expression des gènes où le répresseur peut subir une protéolyse par une protéase à ATP. En effet, les modifications des protéines ribosomales par l'action des protéases sont responsables de la régulation de la traduction (Mahajan et Badgujar, 2010),

Récemment, de nouvelles fonctions physiologiques ont été attribuées aux protéases dépendantes de l'ATP chez les bactéries et les eucaryotes. Elles servent comme intermédiaires dans les réactions de protéolyse, d'insertion des protéines dans les membranes et aussi d'oligomérisation ou de désassemblage des complexes protéiniques.

Les protéases jouent également un rôle dans la formation des spores bactériennes, des ascospores des levures, des fructifications ainsi que la libération des conidies fongiques. C'est le cas par exemple de la sérine protéase du champignon *Conidiobolus coronatus*, nécessaire à la libération des conidies (Mahajan et Badgujar, 2010).

5.5 Sources potentielles des protéases

Les protéases comme le reste des enzymes, proviennent de diverses sources : végétales, animales et microbiennes.

5.5.1 Protéases végétales

Ces protéases végétales exigent la présence du groupe –SH- libre dans leur site actif (cystéyl-protéase). Les plus connues pour leur intérêt technologique sont la papaïne, la broméline, la ficine. La première, extraite du papayer (*Carica papaya*) est une enzyme thermostable active de pH 5 à 9. La broméline est obtenue à partir des tiges et jus d'ananas (*Ananas comosus*) ; elle remplace parfois la papaïne dans l'industrie de la viande. La ficine pour sa part est extraite du latex du figuier (*Ficus carica*) (Cuvellier *et al.*, 1999 ; Mahajan et Badgujar, 2010).

De nombreuses autres protéases végétales sont actuellement utilisées dans divers secteurs telles que la brofasine extraite des fruits de *Bromelia fastuosa*, utilisée comme substitut de la protéinase K lors de l'extraction de l'ADN ou la cystéyl-protéase, obtenue à partir des germes de blé tendre (*Triticum aestivum*) et la protéase extraite du kiwi (*Actinida chinensis*) qui ont des activités coagulantes du lait (Mahajan et Badgujar, 2010 ; AMFEP, 2013).

5.5.2 Protéases animales

Les protéases animales les plus connues sont la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine. Ce sont des enzymes digestives, produites sous forme de précurseurs. La conversion du pepsinogène en pepsine résulte principalement d'une protéolyse intramoléculaire par rupture d'une liaison Leu-Ile (Gripon, 1985).

Les pepsines bovines et porcines (E.C.3.4.23.1,2,3) présentent un intérêt industriel pour la préparation des fromages, dans les *soft drinks* et en brasserie (Cuvellier *et al.*, 1999), alors que la chymotrypsine (E.C.3.4.21.1) est utilisée pour des applications analytiques et de diagnostic (Mahajan et Badgujar, 2010).

La chymosine (E.C.3.4.23.4) est une aspartyl-protéase constituant la « présure » avec la pepsine en proportions variables. Elle est l'enzyme idéale, déclenchant la coagulation du lait par une seule action protéolytique.

Actuellement, une alternative intéressante à l'utilisation de protéases d'origine animale est leur production par les microorganismes génétiquement modifiés tels que *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger* et *Escherichia coli* k 12. La source d'ADN varie selon l'enzyme produite (Goursaud et Cuvellier, 1999 ; Volontè *et al.*, 2011 ; AMFEP, 2013).

5.5.3 Protéases microbiennes

Les protéases microbiennes ont dominé le marché mondial des enzymes où elles représentent une part de 40 % (Mahajan et Badgujar, 2010) car elles possèdent toutes les caractéristiques recherchées dans les applications biotechnologiques, tout en répondant à la demande toujours croissante des protéases qui ne peut être assurée par la source végétale ni la source animale.

Parmi les bactéries, *Bacillus subtilis* est la souche productrice de la protéase la plus utilisée industriellement; cette enzyme sert d'additif dans les détergents (Ellouz *et al.*, 2001). Des protéases appartenant à d'autres genres bactériens sont également disponibles sur le marché de la biocatalyse, tels que *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Enterococcus*, *Listeria*,

Tableau 14: Liste des protéases fongiques (AMFEP, 2013).

Protéase	Souche fongique	Domaine(s) d'application
Aminopeptidase (3.4.11.xx)	<i>Aspergillus niger</i> <i>A.oryzae</i>	Alimentaire, technique
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Alimentaire
	<i>Trichoderma reisei</i> (<i>Aspergillus</i> organisme donneur)	Alimentation humaine et animale, technique
Carboxypeptidase (3.4.16.x)	<i>A.niger</i>	Alimentaire
Protéase (dont les coagulantes du lait) (3.4.2x.xx)	<i>A.melleus</i>	Alimentaire
	<i>A.niger</i> (ADN de l'estomac de veau et de chameau)	
	<i>A.oryzae</i> (sans et avec ADN de <i>Rhizomucor</i> sp.)	Alimentation humaine et animale et technique
	<i>A.sojae</i>	Alimentation humaine et animale et technique
	<i>Endothia parasitica</i> (sans et avec ADN de <i>Cryphonectria</i> sp.)	Alimentaire
	<i>Fusarium venenatum</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> (avec ADN de l'estomac de veau)	Alimentaire et technique Alimentaire
	<i>Rhizomucor miehei</i> <i>Rhizopus niveus</i>	Alimentaire et technique Alimentaire
	<i>Trichoderma reesei</i>	Alimentaire et technique

Thermus, *Oenococcus*, *Chrysobacterium*, *Microbacterium* (Adesh *et al.*, 2002 ; Anisha *et al.*, 2008 ; Mahajan et Badgajar, 2010 ; AMFEP, 2013).

Les champignons représentent des sources plus variées. Comparés aux bactéries, ils élaborent une plus large variété d'enzymes. Les enzymes fongiques peuvent être produites par FMS. La production de la présure microbienne et autres protéases, est réalisée par de nombreuses espèces : *Mucor pussilus*, *M. miehei*, *Aspergillus parasiticus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *Rhizopus microsporus*, *Trichoderma koningii*, *Pleurotus ostreatus* (Chakraborty *et al.*, 1995 ; Fazouane-Naimi *et al.*, 2010). Elles peuvent aussi être produites en FML par *Penicillium citrinum*, *P.expansum*, *Candida albicans*, *A.fumigatus*, *Sarocladium oryzae* (Mahajan et Badgajar, 2010). La liste des enzymes actuellement commercialisées est représentée dans le **tableau 14**. (AMFEP, 2013).

5.6. Les applications industrielles des protéases

Toutes les protéases possèdent des propriétés caractéristiques par rapport à la température, le pH, la présence des ions, la spécificité, l'activité et la stabilité. Ces paramètres biochimiques déterminent l'application industrielle correspondante, en plus du coût de la production et de son développement à l'échelle industriel et sa demande sur le marché.

Les protéases, comme d'autres enzymes, sont introduites dans plusieurs produits et procédés industriels grâce à l'efficacité de leurs propriétés catalytiques favorisées par l'introduction de nouveaux développements de la biotechnologie. En effet, l'ingénierie des protéines et l'évolution dirigée par exemple, ont permis un développement efficace de nouvelles enzymes ayant des propriétés améliorées et la production de nouvelles sur mesure pour des domaines d'application non encore exploités (Kirk *et al.*, 2002).

Les applications industrielles des protéases englobent plusieurs domaines, elles évoluent aussi rapidement que les récents progrès technologiques, ce qui permet la production d'enzymes ayant de nouvelles propriétés et des spécificités de substrat. Une description de l'application générale des protéases est décrite par Li *et al.* (2013) dans les détergents à lessive, la transformation des aliments et l'industrie du cuir. Les auteurs examinent également le développement croissant des protéases comme une classe d'agents thérapeutiques et les progrès récents dans le domaine de l'ingénierie de la protéase. Seuls quelques exemples des applications industrielles des protéases sont décrits ci-dessous.

5.6.1. *Industrie des détergents*

L'utilisation des protéases dans l'industrie des détergents correspond à 25 % du marché mondial des enzymes (Larpen-Gourgand et Sanglier, 1992). La protéase de lessive idéale doit être stable à pH et température élevés et compatible avec les agents chélatants et oxydants. Ce qui est le cas des protéases ayant un pI proche du pH du détergent en solution. Les protéases actives à basses températures sont actuellement recherchées en raison de la crise d'énergie et la prise de conscience pour sa conservation. La majorité des protéases commerciales sont produites par des bactéries du genre *Bacillus* (Aehle, 2007) (voir **tableau 15**). Les protéases alcalines fongiques sont avantageuses puisque ce sont des enzymes extracellulaires (Mahajan et Badgujar, 2010).

5.6.2. *Industrie du cuir*

Cette industrie est l'une des principales causes de la pollution causée par ses effluents très polluants (sulfure de sodium, sel, solvants et chaux). L'utilisation des enzymes comme alternative aux produits chimiques a permis l'amélioration de la qualité du cuir et la réduction de la pollution environnementale (Aehle, 2007).

Les principaux éléments constitutifs de la matière première sont de nature protéique. Les protéases servent pour l'hydrolyse sélective des constituants noncollagèneux des peaux et pour l'élimination des protéines non fibrillaires telles que l'albumine et les globulines, dans le prêtannage du cuir. Elles sont utilisées dans toutes les étapes de traitement du cuir (des protéases alcalines microbiennes pendant le trempage et l'épilage, la trypsine pancréatique combinée avec autres protéases de *Bacillus* et *Aspergillus* pour le confitage (Mahajan et Badgujar, 2010 ; Østergaard et Olsen, 2010).

5.6.3. *Industrie alimentaire*

L'utilisation des protéases dans les préparations alimentaires remonte à l'antiquité, à des fins diverses : la production du fromage, du pain, des hydrolysats de soja et l'attendrissement de la viande. Actuellement, le nombre de secteurs utilisateurs englobe diverses industries, les plus importants concernent l'industrie laitière et la brasserie.

En industrie laitière, leur application majeure concerne la production du fromage aux deux principales étapes à savoir la coagulation du lait et l'affinage. Les enzymes coagulantes appartiennent à quatre catégories : (i) présure animale (un mélange de pepsine et de chymosine) ; (ii) coagulant d'origine microbienne (ceux de *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus* et *Cryphonectria parasitica* sont les plus utilisées) ; (iii) présure végétale (de chardons et de

Solanum dohium); (iiii) chymosine recombinante (Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Aehle, 2007 ; Mahajan et Badgujar, 2010).

La brasserie est également le secteur majeur d'utilisation des protéases. L'hydrolyse des protéines de l'orge donne des peptides et des acides aminés qui vont assurer l'apport en azote pour les levures responsables de la fermentation des sucres en alcool et gaz carbonique. C'est le cas de la protéase de *Bacillus subtilis*. En post fermentation, ces enzymes éliminent les précipités et agrégats qui peuvent se former au cours du stockage (Mahajan et Badgujar, 2010).

5.6.4. Industrie pharmaceutique

Les protéases sont des agents thérapeutiques efficaces. Il s'agit des protéases pancréatique, gastrique, plasmatique, facteurs de coagulation, activateurs de plasminogène, du venin de serpents et aussi de protéases végétales et microbiennes. Ces enzymes sont utilisées comme aide digestive, anti-inflammatoire, antalgique, colle chirurgicale. Elles servent pour le débridement et la cicatrisation des plaies, et le traitement des ulcères cutanés et gastriques. Elles améliorent la rhéologie du sang. Ainsi, elles sont administrées dans les cas d'hémophilie, des maladies coronariennes, les cas d'infarctus du myocarde, d'obstruction des artères, d'AVC ischémique et d'embolie pulmonaire pour leur action fibrinolytique (Aehle, 2007 ; Li *et al.*, 2013)

En combinaison avec d'autres thérapies, les protéases permettent d'éliminer les substances indésirables dans le sang et les tissus de l'organisme. Elles sont utilisées dans les cas de bronchite chronique, pneumonie aiguë, sinusite, leucémie lymphoblastique et lymphosarcome (Aehle, 2007).

5.6.5. Industrie cosmétique

Les occidentaux introduisent les protéases végétales (papaine et broméline) dans les produits de soins de la peau, en s'inspirant du traditionnel bain d'enzymes japonais. La protéase bactérienne, la subtilisine, est utilisée pour avoir le même effet que les acides de fruits. Les protéases rentrent dans la composition des crèmes de gommage, de certains dentifrices et bains de bouche (Aehle, 2007).

5.6.6. Synthèse d'hydrolysats de protéines

Les protéases sont utilisées pour la production d'hydrolysats de protéines susceptibles de contenir des peptides bioactifs. Un large spectre d'activités biologiques est attribué aux peptides (de 2 à 12 acides aminés): activités anti-hypertensives, hypocholestérolémiantes, immunomodulantes, antimicrobiennes, anti-oxydantes et antistress. Les peptides bioactifs résisteraient à l'action des enzymes digestives et franchiraient la barrière intestinale pour être véhiculés par le sang. L'hydrolyse de thon par la thermolysine donne un oligopeptide antihypertenseur, commercialisé au Japon, aux USA et au Canada. Un peptide de cabillaud, Nutripeptin, réduit le glucose sanguin, est disponible sur le marché américain (Guérard, 2009). Ils ont aussi des applications en biotechnologie, en effet, ce sont une source d'azote nécessaire pour les cultures cellulaires (Pasupuleti et Braun, 2010).

5.7. Protéases produites par FMS

Selon Krishna (2005), les protéases sont les enzymes fongiques majeures produites par FMS avec les amylases. Différentes protéases ont été produites par ces procédés sont reportées dans les revues bibliographiques de Pandey *et al.* (1998), Rodriguez Couto (2008), Thomas *et al.* (2013) et d'autres articles (voir **tableau 16**).

Parmi plusieurs substrats utilisés pour la production des protéases en FMS, le son de blé s'est avéré le plus convenable, pour cela il est le substrat le plus utilisé. Ses propriétés physico-chimiques sont particulièrement bien adaptées aux FMS. Sa structure très poreuse facilite les transferts de masse et de chaleur dans le milieu de fermentation humidifié (Labeille, 1997).

D'autres substrats ont fait l'objet d'études récentes, c'est le cas des tourteaux de *Jatropha* délipidés, une plante tropicale utilisée pour la production des agrocarburants notamment en Inde, la farine de poisson, les noyaux de dattes, la bouse de vache et les plumes de poules.

D'après Krishna (2005), la synthèse des protéases est inhibée par la source de carbone. Ceci indique l'effet de la répression catabolique dans la biosynthèse.

Tableau 16: Les protéases produites par FMS avec les substrats et microorganismes utilisés.

Protéase	Micro-organisme	Substrat	Références
Protéase acide	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus oligosporus</i> <i>Penicillium chrysosporium</i>	Son de blé, résidus de patate douce Son de riz bois	Pandey <i>et al.</i> (1998b)
Protéase neutre + -amylase	<i>Bacillus licheniformis</i>	son de blé	
Protéase alcaline	<i>B. amyloliquefaciens</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>A.oryzae</i> <i>Trichoderma koningii</i> <i>A.flavus</i>	farine de soja son de blé mousse de polyurethane son de blé et de riz son de blé	
protéase	<i>P.citrinum</i> <i>R.oligosporus</i> <i>A.oryzae</i> <i>Actinomycetes sp.</i> <i>Streptomyces sp.</i>	farine de soja, de tournesol, écorce de café son de blé, de soja, riz et son de riz son de blé, de riz, de maïs son de blé déchets de cheveux	
Protéase compatible avec détergents commercialisés	<i>Penicillium sp.</i>	Tourteaux de soja délipidés	Rodriguez Couto (2008)
Alcaline serine protéase stable dans détergents, garde 85 % de son activité	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Son de blé	
Protéase alcaline	<i>Bacillus sp.</i>	Son de blé et cosse de lentille	
Protéase neutre	<i>Aspergillus oryzae</i>	Son de blé	
Protéase alcaline	<i>Bacillus sp.</i>	Ecorce verte	
Protéase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Pse A	Tourteaux de Jatropha délipidés	
Protéase	<i>A.oryzae</i>	Farine de poisson	García-Gómez <i>et al.</i> (2009)
Protéase alcaline thermostable	<i>Streptomyces sp.</i> CN902	Son de blé et noyau de datte	Lazim <i>et al.</i> (2009)
Protéase alcaline thermostable	<i>B.subtilis</i> NCIM 2724	Son de blé et son de riz	Naga <i>et al.</i> (2010)
Protéase alcaline	<i>Myceliophthora sp.</i>	Son de blé et caséine	Zanphorlin <i>et al.</i> (2010)

Protéase	<i>A.oryzae</i>	Résidus de <i>Jatropha curcas</i>	Thanapimmetha <i>et al.</i> (2012)
Protéase alcaline halotolérante	<i>Halomonas</i> sp. PV1	Bouse de vache	Vijayaraghavan <i>et al.</i> (2012)
Protéase	<i>B.cereus</i> AT	Bouse de vache	Vijayaraghavan <i>et al.</i> (2013)
Protéase acide	<i>A.oryzae</i> MTCC 5341	Son de blé	Thomas <i>et al.</i> (2013)
Kératinase	<i>Streptomyces</i> sp. NRC 13S	Plumes de poules	
Protéase alcaline	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Son de blé	Meena <i>et al.</i> (2013)

6. Les déchets de tomate comme ressource végétale

6.1 Définition des agroressources

Les ressources végétales sont toutes les matières premières issues de l'agriculture. Elles présentent l'avantage d'être renouvelables et très largement présentes sur l'ensemble des terres à l'échelle planétaire, à la différence des ressources fossiles et minérales. Actuellement, de nombreux pôles de compétitivité et organismes de recherche se consacrent au développement de nouvelles technologies pour la production et l'innovation en matière de valorisation des agroressources. Ces dernières, sont constituées de molécules aux structures complexes (protéines, polysaccharides, lipides, etc).

Le terme « agroressource » est souvent utilisé pour évoquer les produits non alimentaires issus des systèmes agricoles. Parmi celles-ci, les cultures lignocellulosiques (luzerne, phalaris, miscanthus, etc.) destinées à l'élaboration de biocarburants et bioproduits, les cultures d'agroressources comestibles (colza, tournesol ou jatropha) peuvent également être transformées en produits non alimentaires (biocarburants de première génération), et les produits agricoles destinés à l'alimentation humaine et animale (Blanc et Goma, 2006).

L'apport de la biomasse produite à la surface du globe terrestre est considérable : 12.10^{11} tonnes /an. Mais, seulement 6.10^9 tonnes sont utilisés par l'homme (Guillou, 2006). L'agriculture mondiale produit 3.10^9 tonnes pour l'alimentaire et 2.10^9 tonnes pour le non

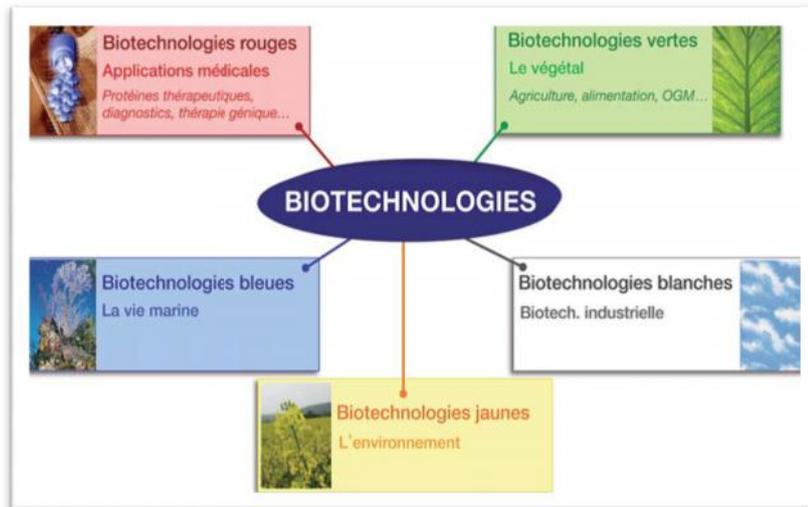


Figure 16: Les couleurs des biotechnologies (Monsan, 2012).

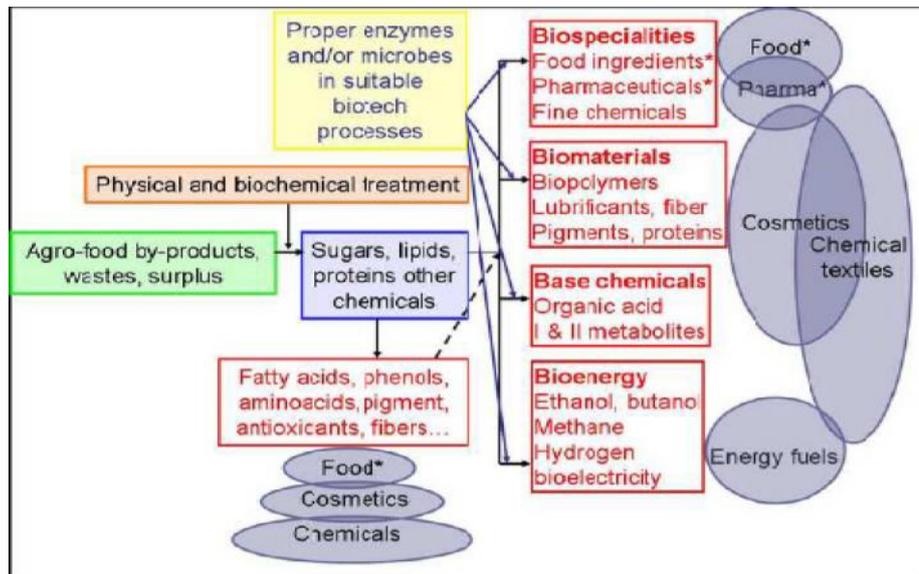


Figure 17: Principales caractéristiques d'une bioraffinerie basée sur le traitement biologique des déchets agro-alimentaires (Fava *et al.*, 2013).

alimentaire. L'industrie agroalimentaire utilise la partie comestible et s'intéresse moins à la partie non digestible (Blanc et Goma, 2006).

6.2 Valorisation de la biomasse végétale par FMS

Les biotechnologies microbiennes et enzymatiques représentent une des voies prometteuses dans la valorisation non alimentaire des agroressources, c'est la biotechnologie industrielle dénommé « *white biotechnology* ». Les biotechnologies blanches ont pour objet la fabrication de produits chimiques de matériaux et de bioénergie à l'échelle industrielle par l'utilisation de la biomasse comme matière première renouvelable. Les biotechnologies regroupent plusieurs domaines, que l'on a distingués par des couleurs, ainsi les biotechnologies médicales sont dites biotechnologies rouges, celles concernant le végétal (par exemple les recherches sur les OGM) sont dites biotechnologies vertes, en bleu correspond le milieu de la mer, et en jaune l'environnement (voir **figure 16**) (Monsan, 2012).

Au concept de biotechnologie, s'ajoute celui de bioraffinerie très utilisé ces dernières années. Celui-ci suppose la concentration sur le même site de différentes unités de transformation des agroressources. Il doit s'insérer dans le cadre d'une exploitation d'un système d'agroproductions et d'agrotransformations ayant une entrée d'agroressources mais aussi plusieurs sorties multisectorielles tels que les aliments, les produits pharmaceutiques et autres intermédiaires à applications multiples. Tous cela est basé sur le principe de l'utilisation confinée de microorganismes et/ ou d'enzymes (voir **figure 17**) (Monsan, 2012 ; Fava *et al.*, 2013).

6.3 Production mondiale de la tomate

La tomate (*Solanum lycopersicum* L.) est originaire de la région Andéenne, en Amérique latine, a été importée en Europe au 16^{ème} siècle. Puis s'est répandue à travers tous les continents. Elle représente l'une des importantes cultures de légumes à l'échelle mondiale donnant le légume-fruit le plus consommé après la pomme de terre. Ses fruits sont destinés à la consommation en frais ou à la transformation en différents produits. C'est une source de lycopène, -carotène et vitamine C, qui sont importants pour la santé humaine et protègent du cancer et des maladies cardiovasculaires. Sa production et sa consommation augmente avec la croissance démographique. La plus importante consommation est entre 40 et 100 kg/habitant/an dans le bassin méditerranéen et dans les pays arabes. La production mondiale de la tomate a atteint la quantité de 160 millions de tonnes en 2011 sur une surface de 4,5

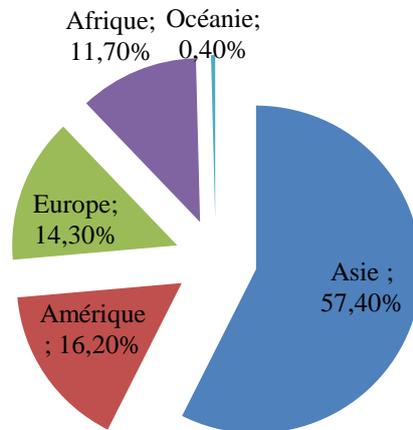


Figure 18: Production mondiale de la tomate en 2010 (Bergougnoux, 2013).

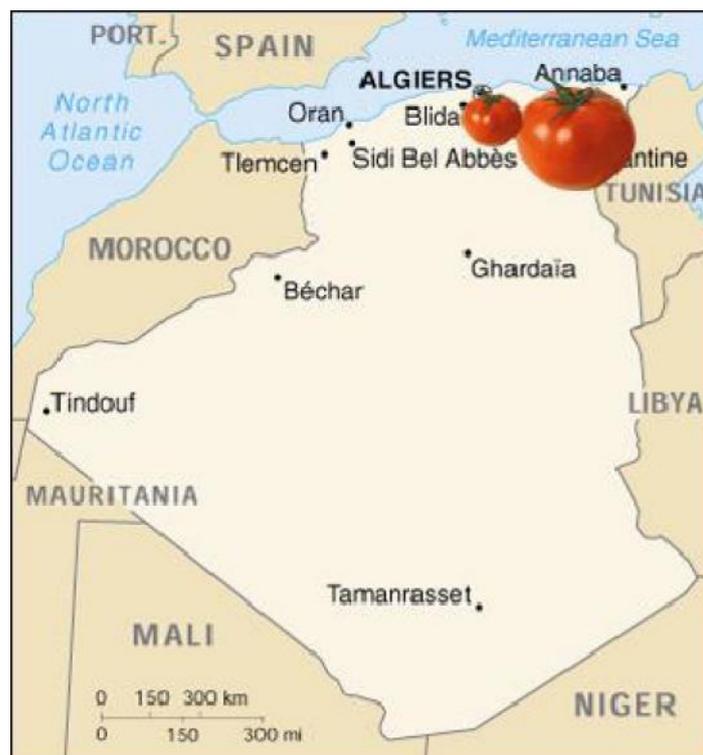


Figure 19: Principales régions productrice de tomate industrielle en Algérie (Tomatonews, 2013).

millions d'hectares. La région asiatique produit plus de 57 % de la production mondiale en particulier la Chine, le plus grand producteur avec environ 49 millions de tonnes, suivie de l'Inde. Puis, viennent les USA, la Turquie, l'Égypte, l'Iran, l'Italie, le Brésil et l'Espagne (voir **figure 18**) (Bergougnoux, 2013).

6.4 Tomate industrielle en Algérie

Les tomates d'industrie sont principalement cultivées au Nord-Est du pays Les wilayates d'El Tarf, d'Annaba, de Guelma, de Skikda et de Jijel où elles représentent 85 % de la superficie totale consacrée à cette culture. Le reste est réparti entre la région du Centre avec 7% et l'Ouest 3% (Voir **figure 19**).

Une augmentation de la production est constatée au cours de ces dernières années. Selon les statistiques du ministère algérien de l'agriculture la production a atteint 900 000 tonnes en 2012, soit plus que le double de ce qui était produit en 2009 (380 000 tonnes). Ce qui permet de répondre à 50 % des besoins nationaux, avec 40 220 tonnes de double concentré de tomate obtenu après transformation depuis 2010 (Djama, 2013). Selon le président du groupe Benamor, pleinement investi dans ce secteur, l'Algérie pourra arriver à l'autosuffisance et même envisager l'exportation en 2018. Ce qui indique que la production progressera d'avantage dans les prochaines années.

6.5 Les sous-produits de la tomate transformée

La filière de la tomate industrielle, génère un volume important de déchets, évalué entre 10 et 30 % selon Benakmoun *et al.* (2008) et entre 3 et 7% de la matière première selon Van Dyk *et al.* (2013). D'après ces derniers, les déchets de tomate peuvent atteindre plus de 10 millions de tonnes à l'échelle mondiale. En Algérie, il n'y a pas de statistique officielle sur le volume de ces déchets, mais d'après nos estimations, ils peuvent dépasser la quantité de 160 000 tonnes par an. Ils sont mis en décharge et ne sont pas exploités sauf en alimentation animale. Ils sont une excellente source de caroténoïdes. La majorité des travaux réalisés avec ce sous-produit, sont focalisés sur ces pro-vitamines (lycopène et β -carotène) et sur les composés phénoliques (Kaur *et al.*, 2008). Ces substances sont susceptibles de réduire le risque d'apparition de certains cancers ainsi que des maladies cardiovasculaires et autres maladies chroniques dont celles liées au vieillissement (Chiu *et al.*, 2007 ; Vági *et al.*, 2007 ; Choudhari et Ananthanarayan, 2007 ; Kaur *et al.*, 2008 ; Zuurro *et al.*, 2013).

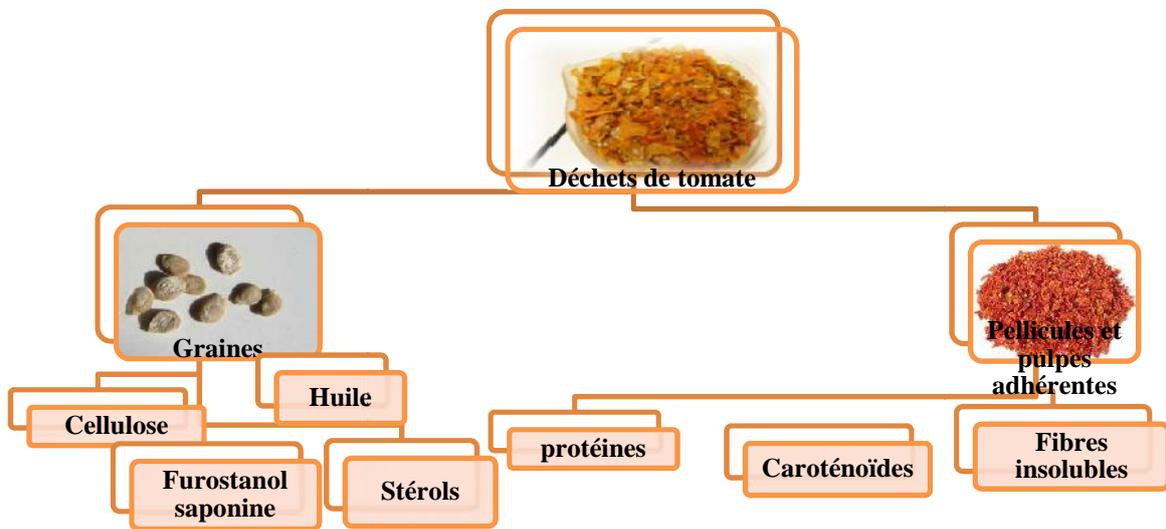


Figure 20 : Composition des sous produits de la tomate transformée (Sogi *et al.*, 2002 ; Boukhalfa-lezzar, 2010 ; Mirabella *et al.*, 2013).

Les déchets de tomate sont composés principalement de graines, 33 % selon Kaur *et al.* (2008) et 60 % selon Shao *et al.* (2013), de peaux et de pulpe adhérente (voir **figure 20**). Les graines constituent une excellente source de substances riches en nutriments, les caroténoïdes, les protéines, les sucres, les fibres et les huiles. La pelure est principalement composée de carbohydrates (80 %), sous la forme de fibres insolubles (Mirabella *et al.*, 2014). L'huile de pépins de tomate est très intéressante du fait qu'elle soit riche en acides gras insaturés, en particulier linoléique, oléique. Elle représente 20 à 37,9 % de la composition des graines. La farine délipidée des graines renferme entre 22 et 33,9 % de protéines. La composition en acides aminés de la farine des graines de tomate est comparable à celle de la farine de soja et même de la viande. Elle est particulièrement riche en lysine (Sogi *et al.*, 2002 ; Sogi *et al.*, 2005 ; Shao *et al.*, 2013). La peau avec la pulpe adhérente contient aussi les protéines avec une bonne proportion en lysine, valine et leucine (Al-Wandawi *et al.*, 1985). Toutes les matières premières contenant plus de 15 % de protéines sont considérées comme matières riches en protéines (Sebillotte, 2002). Ce qui rend ces déchets très approprié pour une exploitation en tant que matière première dans la production de substances à intérêt industriel par fermentation.

6.6. Fermentation des déchets de tomate

Peu de travaux ont été publiés sur l'utilisation de cette matière première en fermentation. Carvalheiro *et al.* (1994) ont réalisé la bioconversion des déchets de tomate par des cultures mixtes de *Trichoderma reesei* et *Sporotrichum sp.* en FMS. Avelino *et al.* (1997) ont effectué une saccharification de ce substrat par des cellulases commerciales pour la production de la biomasse de la levure *Geotrichum candidum* en FMS. Rawashdeh *et al.* (2005) ont réalisé la production de xylanase par *Streptomyces sp.* Do Rosário Freixo *et al.* (2008 a et b) ont produit la polygalacturonase, la laccase et la xylanase sur milieu à base de déchets de tomate (20 g/l) par des cultures du champignon *Coriolus versicolor*. Fakas *et al.* (2008) ont effectué la synthèse de l'acide γ -linoléique sur l'hydrolysate de déchets de tomate en culture submergée par la moisissure *Cunninghamella echinulata*. Iandolo *et al.* (2011) ont étudié la production des enzymes : laccase, xylanase et protéase sur les mêmes déchets par les champignons *Pleurotus ostreatus* et *Trametes versicolor* en FMS.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Partie II. Matériel et méthodes

1. Les souches fongiques

Les souches d'*Aspergillus oryzae* utilisées dans ce travail pour la production de la protéase sont :

- *A.oryzae* (Ahlburg) Cohn var.*oryzae* : provient de l'*American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, Etats-Unis) 22788. Elle est employée dans la réalisation du *koji* de riz ; elle produit des alpha-amylases et des protéases.
- *A.oryzae* var.*viridis* Murakami : répertoriée sous le code 42149 par l'ATCC, cette souche a servi pour le clonage et le séquençage de la takaamylase A. (Labeille, 1997).
- *A. oryzae* NRRL A_5777= 35890
- *A.oryzae* NRRL 2220 var. *oryzae*: provient de l'ATCC, sous le code IMI 52145. Elle est isolée de la sauce de soja (Chine). Elle produit les protéases.
- *A.sojae* NRRL 1988, répertoriée sous le code ATCC 9362. Elle est utilisée pour la préparation de la sauce de soja. Elle est productrice de protéases et de tannase.

Les deux premières souches sont disponibles au LMI, les trois dernières souches ont été fournies par *National Center for Agricultural Utilization Research*, Illinois, USA.

1.1. Production et conservation des spores

Pour l'obtention des spores fongiques, nous avons utilisé un milieu gélosé : le PDA (*Potato Dextrose Agar*), fourni par Biokar Diagnostics. Le milieu de sporulation est composé en g/l de : extrait de pomme de terre : 4, glucose : 20, agar agar bactériologique : 15. Il est préparé avec 39 g de la poudre de PDA par litre d'eau distillée. Le milieu est autoclavé pendant 20 min à 121 °C. Il est ensuite réparti dans des boîtes de Pétri à raison de 20 ml par boîte. Après refroidissement, les milieux gélosés sont inoculés avec 0,2 ml de la suspension de spores. Ils sont ensuite incubés dans une étuve à 30 °C pendant une semaine.

L'eau osmosée, mélangée au Tween 80 (0,1%), stérile sert à récupérer les spores (eau tweenée). Un volume de 10 ml est additionnée dans la boîte de Pétri. La surface de la culture est grattée et les spores sont récupérées dans des tubes. La suspension va servir d'inoculum pour les cultures en Erlenmeyers. La conservation des souches est réalisée par addition de

20% de glycérol comme agent cryoprotecteur à l'eau tweenée stérile qui sert à la récupération des spores. Cette dernière solution est congelée par aliquotes de 2 ml.

1.2. Dénombrement des spores à la cellule de Thoma

Les dénombrements sont effectués par comptage direct sur cellule de Thoma au grossissement X400 à l'aide d'un microscope optique E600 (Nikon). Les dilutions, quand elles ont été nécessaires, sont réalisées avec de l'eau tweenée stérile.

1.3. Viabilité des spores

La viabilité des spores fongiques dans l'inoculum est évaluée par des dilutions de la suspension de spores (100 à 1000 fois) qui permettent d'obtenir 30 spores/ml. Celles-ci serviront à inoculer des boîtes de Petri. Après incubation à 30 °C pendant 48 heures, un comptage sur cellule de Thoma est réalisé. En rapportant cette valeur au nombre de spores total, le pourcentage de spores viables d'un inoculum donné est alors calculé.

2. Substrat de fermentation

Les fermentations sont réalisées avec les déchets de tomates industriels. Ils sont obtenus de la conserverie « La Maison Latina » de Chelghoum Laid (wilaya de Mila), compagnes été 2007 et 2008. Le substrat récupéré humide est essoré puis séché à l'air libre. Il est composé de graines et de peaux auxquelles est resté fixée un peu de pulpe.

Les principaux composants des déchets de tomates ont été déterminés par le laboratoire « Inzo » de Château-Thierry, France. Le dosage des protéines par la méthode Kjeldhal selon la norme iso 5983 et CEE 93/28. L'amidon Ewers par polarimétrie selon la norme CEE 72/199. L'humidité par dessiccation selon la norme NF V18-109. La matière grasse par extraction directe selon la norme NF V18-117. Les fibres sont déterminées selon la norme AOAC 1997.

3. Conduite des FMS en Erlenmeyers

Au cours de l'étape de l'optimisation de la production de la protéase, les cultures sont réalisées en Erlenmeyers. Une capacité de 500 ml de ces récipients, permet d'avoir un volume gazeux satisfaisant. Le milieu de fermentation est préparé avec 20 g de déchet de tomate et un volume d'eau distillée ou de tampon selon le taux d'humidité désiré. Les Erlenmeyers sont ensuite bouchés avec du coton cardé, recouverts de papier aluminium et autoclavés 20 min à 121 °C. Les flacons sont inoculés stérilement avec la solution de spores préparée précédemment, puis placés dans une étuve à 30 °C. L'essai initial est réalisé avec 10^6 spores/g de substrat et un taux d'humidité de 50%. Chaque Erlenmeyer correspond à un prélèvement et à une durée de culture de 24 à 144 heures ; il permet de déterminer le meilleur temps de culture qui donne la plus grande activité de la protéase.

4. Extraction de l'enzyme

A la fin de la période d'incubation, le produit fermenté est mixé avec 100 ml d'eau distillée au *Waring-blender* pendant 40 secondes. La suspension obtenue, est filtré sur un Büchner actionné par une pompe à vide électrique. La solution est par la suite centrifugée (centrifugeuse Jouan MR 1812) à 10 000 x g pendant 10 min à 4 °C, pour éliminer les spores et les particules du substrat. Le surnageant correspond à l'extrait enzymatique brut sur lequel le pH est mesuré. Il est congelé à -20 °C pour les dosages ultérieurs.

5. Détermination de l'activité enzymatique

L'activité de la protéase neutre est déterminée par le dosage colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu (MERCK), selon la méthode d'Anson (1938). Ces groupements donnent une couleur bleue mesurée au spectrophotomètre (Uvikon 931-Kontron Instruments) à 750 nm. Le protocole adapté par Mechakra *et al.* (1999) avec la caséine (ALFA AESAR) comme substrat est réalisé comme suivant :

- Extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage et convenablement dilué : 1 ml,
- Tampon citrate/phosphate (0,1 M/0,2 M), pH 6,8 : 1,5 ml,
- Solution de caséine 2,5%(w/v) dans le citrate de sodium 0.02M à pH 7 : 2,5 ml.

La réaction se déroule au bain-marie à 40 °C. Après 60 min, elle est stoppée par addition de 5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 4% (w/v). Le mélange est centrifugé à 10 000 x g pendant 5 min (centrifugeuse EPPENDORF-Centrifuge 5417C), pour faire précipiter les particules du substrat coagulées par l'acide.

Le dosage de la tyrosine est effectué sur le surnageant par le mélange suivant :

- Surnageant : 1 ml,
- Solution de carbonate de sodium à 15% : 2 ml,
- Réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au 1/3) : 0,5 ml.

Une deuxième incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 5 heures, est nécessaire pour le développement de la coloration. L'absorbance est mesurée à 750 nm.

L'activité protéolytique est exprimée en μmol de tyrosine libéré par minute, est rapportée à la quantité de matière sèche initiale (MSI), par référence à une courbe étalon de tyrosine à des concentrations de 0 à 100 $\mu\text{g/ml}$ (voir **figure (a) en annexe**).

6. Dosage des protéines

Les protéines sont mesurées par la méthode de Lowry *et al.* (1951). Les solutions nécessaires sont :

- Solution A : carbonate de sodium à 2% dans le NaOH 0,1N,
- Solution B : tartrate double de sodium et de potassium à 2% (w/v) dans l'eau distillée,
- Solution C : sulfate de cuivre, 5 H₂O à 1% (w/v) dans l'eau distillée,
- Solution D : 0,5 ml de C + 0,5 ml de B + 50 ml de A. Ce mélange doit être préparé juste avant utilisation.
- Solution E : réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3.

Le milieu réactionnel est préparé comme suit:

- Solution de l'échantillon convenablement dilué : 1 ml,
- Solution D : 5 ml.

Après une agitation et un repos de 10 minutes sur la paillasse, 0,5 ml de la solution E sont rajoutés. Après une deuxième agitation, le développement de la coloration est obtenu après une incubation de 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture de l'absorbance est réalisée à 650 nm. La quantité de protéines est déterminée par comparaison avec une gamme de *Bovin Serum Albumin* (BSA) à des concentrations de 0 à 500 µg/ml (voir **figure (b) en annexe**).

7. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau du milieu de fermentation est obtenue par la balance à halogène (OHAUS MB45). Une quantité équivalente de 1 g du substrat est placée dans la balance qui, après séchage de l'échantillon par la lampe infrarouge, donne le taux de l'humidité exprimé en pourcentage par rapport à la masse de produit. Ceci permet de déterminer également la matière sèche.

8. Optimisation des différents facteurs

Plusieurs facteurs ont été testés pour mesurer leur effet sur la production de la protéase par les deux souches d'*Aspergillus oryzae*. Le meilleur résultat obtenu est appliqué dans l'expérience qui suit. Ces facteurs sont : la teneur en eau, le pH, le taux de l'inoculum, l'âge des spores, la taille des particules du substrat et la source d'azote.

- 8.1. Le taux d'humidité** du substrat est le premier facteur étudié. Des variations de la teneur en eau des déchets de tomate de 40, 45, 50, 55, 60, 65 et 70%, ont été réalisées. Des volumes croissants d'eau distillée, nécessaires pour chaque valeur d'humidité, sont rajoutés au substrat avant stérilisation.
- 8.2. Le pH initial** est le paramètre étudié en second. Les différents pH testés sont 3, 4, 5, 6 par le tampon citrate-phosphate (0,2 M); pH 7 et 8 par le tampon phosphate (0,2 M). Le volume des différents tampons correspond au meilleur taux d'humidité, résultat du test précédent. Il sert à humidifier le substrat avant autoclavage.
- 8.3. Le taux d'inoculum** est étudié après l'effet du pH. Différents volumes d'inoculum sont testés : 0,05 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 2 ml de la suspension de spores contenant 2×10^7 spores/ml.
- 8.4. L'âge de l'inoculum** est réalisé sur plusieurs jours. Nous avons préparé l'inoculum de 3, 4, 5 et 6 jours.

8.5. La taille des particules du substrat correspond au traitement mécanique qui peut permettre à la moisissure d'attaquer plus facilement le substrat au cours de la fermentation. Les déchets de tomate sont moulus au *Waring-blender* puis passés aux tamis de différentes tailles, ce qui a permis d'obtenir les granulométries suivantes : 450, 500, 630 et 800 μm .

8.6. Les sources azotées additionnelles ont été les derniers facteurs testés. Pour cela, nous avons choisi d'étudier l'effet de la caséine et de la farine de soja aux concentrations suivantes : 5, 15, 25 et 35 mg/g de substrat de base.

9. Culture en fermenteur *Koji* (Fujiwara)

9.1. Présentation du fermenteur

Le fermenteur utilisé dans ce travail est semi-pilote à plateau de type *Koji*, disponible dans le LMI, conçu par la société japonaise Fujiwara. Il a servi pour le développement d'un complexe enzymatique solide en partenariat avec la société Soufflet (Duchiron et Copinet, 2011). Il peut contenir de 5 à 20 kg de matière. Le lit du substrat peut atteindre une hauteur de 20 cm. Ce bioréacteur est composé d'un système de régulation de la chaleur grâce à un dispositif de conditionnement d'air, et d'un système de circulation d'eau froide qui permet de créer une atmosphère humide au cours de la FMS. La culture peut être mélangée par des vis sans fin au cours de la fermentation (Voir **figures 21, 22, 23, 24**).



Figure 21: Le fermenteur Fujiwara : (A) armoire de contrôle, (B) fermenteur *Koji* avec sa cuve de culture à l'intérieur.

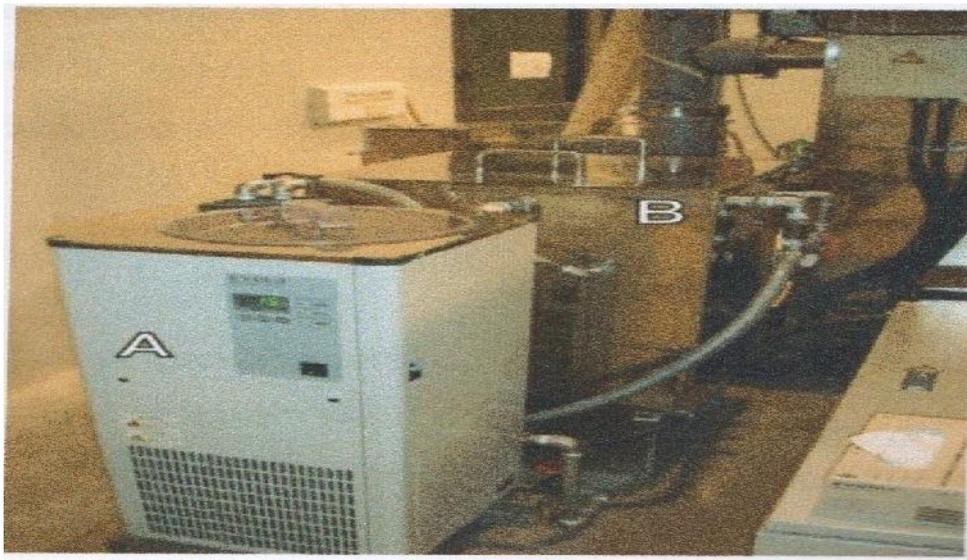


Figure 22: La partie arrière du fermenteur Fujiwara : l'unité de refroidissement (A), le réservoir d'eau (B).

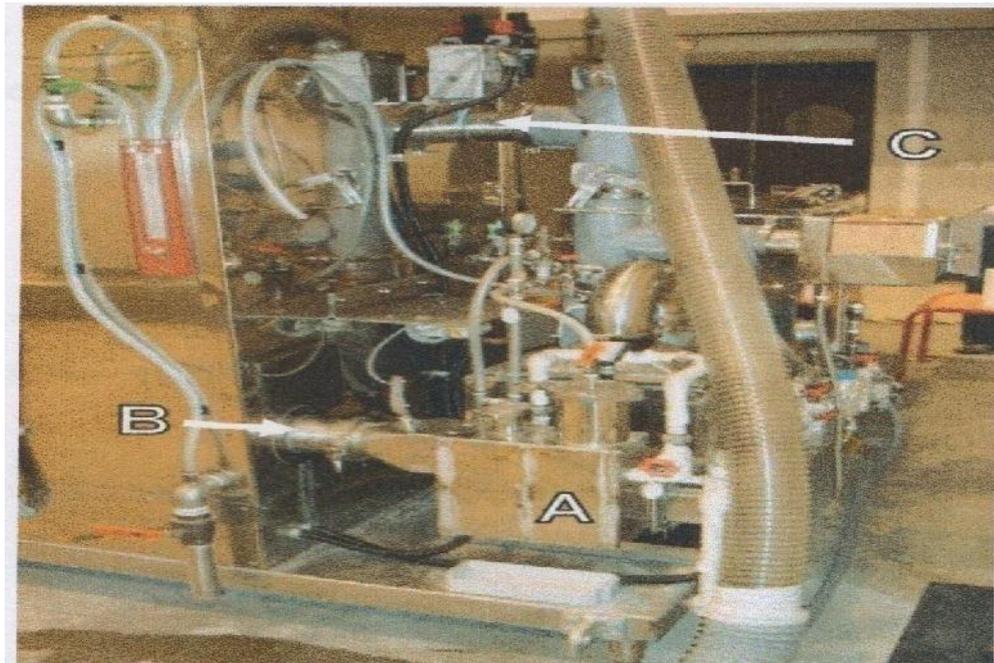


Figure 23 : Le système d'aération du fermenteur Fujiwara : (A) humidificateur, (B) arrivée d'air humidifié, (C) conduite d'échappement d'air ayant traversé la cuve.

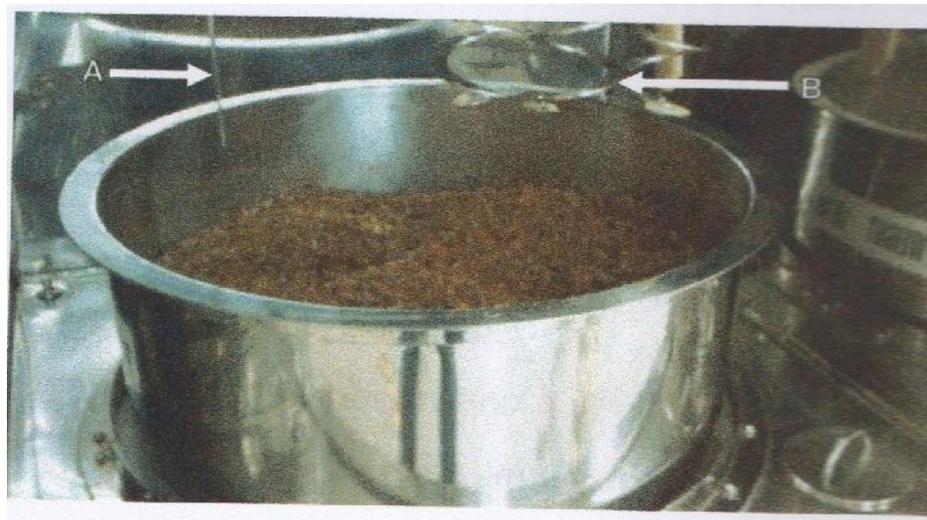


Figure 24 : L'intérieur du fermenteur Fujiwara : la cuve avec (A) la sonde de température, (B) les vis sans fin.

9.2. Conditions de culture dans le fermenteur

Après l'optimisation de l'effet des différents facteurs étudiés lors des cultures en Erlenmeyers. Nous avons choisi la souche *Aspergillus oryzae* NRRL 2220 pour les cultures en fermenteur. En effet, cette souche a donné le maximum de l'activité protéolytique en trois jours de culture ; à l'inverse de la souche *A. oryzae* NRRL A-5777 qui a nécessité une durée de cinq jours. Nous avons testées deux conditions : absence et présence de la farine de soja comme source azotée additionnelle à raison de 0 et 15 mg/g de substrat. L'inoculum est préparé en Erlenmeyers, à raison d'un flacon par kilogramme de substrat. Pour cela, 20 g de déchet de tomate sont humidifiés par 30 ml d'eau distillée.

Après stérilisation, ils sont inoculés par 2×10^7 spores/fiole (10^6 spores/g de substrat) et incubés à 30 °C pendant 5 jours. Le substrat de fermentation est préparé dans des sacs en plastique autoclavables pouvant contenir deux kilogrammes par sac. Le substrat est mélangé avec 80% de l'eau totale puis autoclavé 20 min à 120 °C. Après refroidissement, il est mélangé avec l'inoculum contenant les 20% d'eau restants, puis placé dans la cuve du fermenteur préalablement flambée par l'éthanol à 90°. Cette inoculation correspond au début de la fermentation qui va se dérouler pendant 44 heures. Cette culture doit se faire à 30 °C, mais en pratique il se produit des variations de température qui peuvent être rectifiées par le réglage de la température de l'air pulsé et par un brassage du milieu de culture sans abus pour ne pas fractionner le champignon.

Après 12 heures, la culture est suivie par des prélèvements toutes les deux heures. Les mesures du pourcentage de l'humidité sont nécessaires, celui-ci doit être maintenu à 50% par addition d'eau distillée stérile. L'aération est assurée par un ventilateur dont la puissance est de 15 hertz muni de vannes permettant un réglage de 0 à 100% selon le besoin et l'état de la culture.

Le prélèvement, effectué sur plusieurs endroits dans la cuve pour avoir un échantillon représentatif, sert à préparer l'extrait enzymatique selon le protocole décrit précédemment. Après mesure du pH, il est conservé au congélateur pour le dosage de l'activité protéasique.

A la fin de la période de la fermentation, la moitié du substrat est conservée à -20 °C dans des sacs en plastique ; ceci correspond au « substrat humide ». L'autre moitié est séchée dans le fermenteur puis est également conditionnée dans des sacs en plastique et gardée à température ambiante, c'est le « substrat sec ».

10. Optimisation de l'extraction

10.1. Solutions d'extraction

Plusieurs solutions ont été testées pour la préparation de l'extrait enzymatique pour voir celle qui permet d'avoir la plus grande activité protéasique. Ces solutions sont : Tween 80 (0,1%), tampon citrate/phosphate à pH 6 et 6,8, Tween 80 (0,1%) dans le tampon à pH 6,8, NaCl à 1% dans le tampon à pH 6,8 ainsi qu'à différents pourcentages de NaCl (0,5, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5).

Chaque solution est mélangée au produit fermenté (humide et sec), à raison de (1 : 5 w : v) le mélange est mixé au *Waring-blender* pendant 40 secondes. La suspension obtenue, est par la suite centrifugée à 10 000 x g dans deux conditions différentes: à 4 °C (centrifugeuse Jouan MR 1812) pendant 10 min et par la centrifugeuse non réfrigérée pendant 5 min (centrifugeuse Eppendorf-Centrifuge 5417C) pour éliminer spores et particules du substrat. Les dosages de l'activité enzymatique sont réalisés sur le surnageant.

10.2. Cinétique de l'extraction

L'étude de l'effet du temps de contact avec l'eau et la solution de NaCl à 3% a été réalisée pour les deux formes de substrat, humide et sec. Après le mixage du substrat avec les deux solutions, un volume de 5 ml est centrifugé à 4 °C et 10 000 x g pendant 10 min, ce qui correspond à l'extrait au temps zéro. Le reste des mélanges mixés est gardé dans un bain de glace sous agitation. Des prélèvements sont effectués chaque heure de 1 à 7 heures.

11. Caractérisation de l'enzyme

11.1. Effet du pH sur l'activité de la protéase neutre

Le mélange réactionnel est tamponné à divers pH (4 ; 4,6 ; 5 ; 5,6 ; 6 ; 6,8 ; 7 ; 7,6 ; 8 ; 8,6 ; 9) à l'aide de deux tampons : citrate/phosphate (0,1 M/0,2 M) du pH 4 à 7 et Tris/HCl (0,2 M/0,2 M) du pH 7,6 à 9.

11.2. Effet de la température sur l'activité enzymatique

L'effet de la température d'incubation du mélange réactionnel a été étudié de 30 à 90°C, avec des intervalles de 5°C, à pH optimal durant une heure.

11.3. Stabilité thermique de l'enzyme

L'étude de la stabilité thermique de la protéase est déterminée par incubation du mélange réactionnel à des températures élevées allant de 60 à 90°C avec différents temps de réaction de 15 à 60 min, avec des intervalles de 15 min. l'activité enzymatique résiduelle est calculée.

11.4. Effet de l'EDTA, du zinc et du cuivre

L'activité protéasique est mesurée en présence de l'Ethylène Diamine Tetra Acetate (EDTA) à la concentration 1 mM. Elle est aussi évaluée avec les ions divalents du zinc et du cuivre à différentes concentrations 5, 10 et 20 mM.

12. Précipitation par le sulfate d'ammonium

Le fractionnement des protéines est souvent réalisé par le sulfate d'ammonium (SA), en première étape de séparation. En effet, ce sel présente plusieurs avantages un pouvoir précipitant élevé, un faible effet dénaturant vis-à-vis des protéines, une grande solubilité en plus de son faible coût (Laurent, 1982).

Ce sel à forte concentration entre en compétition pour l'eau avec les protéines en mélange, ce qui entraîne leur précipitation « *salting out* ». La concentration en sel précipitante dépend de la nature de la protéine et de ses propriétés moléculaire.

L'échantillon enzymatique est soumis à une précipitation fractionnée par le SA à des saturations croissantes de 20 à 80 %. Cette étape est réalisée sous agitation pendant 1 heure, sur bain de glace. Ensuite, une centrifugation à 10 000 x g pendant 30 minutes à 4 °C, est effectuée (Centrifugeuse Jouan KR 22i).

Chaque précipité est récupéré dans le tampon phosphate citrate à 50 mM à pH 6,8. Chaque surnageant est reconcentré en SA.

13. Analyse statistique

Les données résultantes des différents essais sont soumises à une analyse de la variance afin d'évaluer les effets des différents facteurs étudiés.

Tous les tests de l'ANOVA ont été effectués avec le logiciel STATISTICA version 5. Le niveau de confiance accepté est de 95%, comme c'est le cas dans les travaux de Hajji *et al.* (2008) et Vishwanatha *et al.* (2010).

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Partie III. Résultats et discussions

1. Etude biochimique du substrat de fermentation

La production d'enzymes par FMS est affectée par la composition du substrat (Castro et Sato, 2013). Les principaux composants des déchets de tomate sont résumés dans le **tableau 17**. L'ensemble de la matière organique est de 86,51 %, avec une proportion de plus de 52% de fibres totales insolubles constituées principalement de lignine (24 %) et de cellulose (19,5 %). Cette composition est liée à la nature de ces déchets, composés essentiellement de constituants rigides que sont la peau et les graines. Celle-ci donne au substrat une structure qui se maintient même après la stérilisation dans l'autoclave. De ce fait, ce substrat peut être bien adapté à la réalisation de culture microbienne à l'état solide (Rodríguez Couto, 2008) ; il correspond donc à la fois comme support et comme source de nutriments pour les cellules des microorganismes.

Dans les déchets de tomate, les protéines représentent un taux de plus de 20%. Ceci est en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature (24,5 % dans les graines selon Tsatsaronis et Boskou, 1975 ; 20- 22 % d'après Kramer et Kwee, 1977a ; plus de 21 % selon Elliott *et al.*, 1981 ; et 22,9 % d'après Assi et King, 2007). De ce fait, ces déchets sont considérés comme une matière riche en protéines, ce qui favorise la synthèse d'enzymes. En effet, la présence d'une source de protéines dans le substrat induit la production des protéases (Castro et Sato, 2013).

Comparativement au son de blé, substrat de choix pour les procédés en FMS, et en particulier pour la production des protéases (Sandhya *et al.*, 2005 ; Vishwanatha *et al.*, 2009 ; Castro et Sato, 2013), les déchets de tomate sont plus riches en protéines. En effet, le son de blé ne contient que 14,2% selon Labeille (1997) et 14,74% selon Castro et Sato (2013), soit une différence de plus de 5%. Voir la composition comparée dans le **tableau 18**.

Les cendres, avec un taux de 6,52% sont aussi importantes dans les déchets de tomate que celui reporté pour le son de blé. Dans leur étude sur la composition des déchets de tomate, Tsatsaronis et Boskou (1975) ont trouvé un taux de 5,4% dans les graines et 2,7% dans la peau. Ils citent une prédominance des minéraux suivants : K, P, Mg, Ca, Na et Cl. Cela correspond aux oligo-éléments nécessaires à toute culture microbienne.

L'analyse de la composition chimique de ce substrat, montre qu'il est très convenable pour une utilisation comme milieu de culture, en particulier en FMS. Les matières premières

comptent pour 60 à 80 % du prix de revient dans une production d'enzymes par fermentation (Cuvellier *et al.*, 1999)

Tableau 17 : Résultats de la composition des déchets de tomate.

Déterminations	Substrat brut (g/100g)	Substrat sec (g/100g)
Humidité	6,97	
Cendres	12,73	6,52
Protéines (N x 6,25)	18,70	20,10
Matière grasse	10,70	11,51
Amidon Ewers	2,3	2,5
Fibres totales insolubles	48,6	52,4
Cellulose	18	19,5
Hemicellulose	8,3	8,9
Lignine	22,3	24

Tableau 18 : Composition comparée des déchets de tomate et du son de blé traditionnel (en % de la matière sèche)

Composants	Déchets de tomate secs	Son de blé traditionnel*
Cendres	6,52	4,3
Protéines	20,10	14,2
Matière grasse	11,51	5,9
Amidon	2,5	29,4
Cellulose	19,5	7,2
Lignine	24	3,0

* Valeurs rapportées par Labeille (1997).

2. Profil de production de la protéase neutre par différentes souches d'*Aspergillus*

Dans l'objectif de sélectionner les souches fongiques qui seront utilisées pour la production de la protéase neutre par FMS avec les déchets de tomate, les premiers essais ont été réalisés avec les cinq souches d'*Aspergillus* *A. oryzae* 22788, *A. oryzae* 42149, *A. oryzae* 5777, *A. oryzae* 2220 et *A. sojae* 1988. L'observation de leur développement et de la production de la protéase neutre au cours du temps montre une bonne multiplication des souches dès le premier jour de la fermentation.

La croissance des moisissures apparaît avec l'envahissement du substrat par un mycélium blanchâtre. Ceci permet leur dissémination et leur pénétration dans le substrat solide. En effet, la croissance fongique ne se déroule pas uniquement en surface, mais aussi en profondeur et en hauteur. La pénétration des hyphes dans le substrat facilite l'accès aux éléments nutritifs (Boiron, 1996). Au deuxième jour de culture, les premières spores sont visibles. L'apparition de structure de couleur vert-jaunâtre indique l'étape de la formation des spores qui apparaissent après 48 heures.

Le suivi de la cinétique de synthèse de la protéase neutre par les différentes souches en culture solide sur déchets de tomate est représenté dans la **figure 25**. La production de l'enzyme est détectable à partir de 24 heures de culture pour les cinq souches fongiques étudiées à des valeurs très faibles (de 0,52 à 1,032 U/gms) comme cela a été décrit par Chancharonpong *et al.* (2012). Par la suite, on constate des variations dans la production de l'enzyme selon la souche utilisée. Les plus importantes activités protéasiques sont obtenues par *A. oryzae* 5777 avec 6,75 U/gms ; *A. sojae* 1988 avec 6,02 U/gms après 120 heures de fermentation ; *A. oryzae* 2220 avec 6,21 U/gms, après un temps plus court, 72 heures. Les deux autres souches *A. oryzae* 42149 et 22788, montrent des activités protéasiques plus faibles avec 5,52 U/gms et 4,94 U/gms obtenues respectivement après 144 et 96 heures de culture (voir **tableau 19**). En effet, elles sont connues pour la production d'amylase (Labeille, 1997).

Ces variations dans la durée de la culture dépendent de la souche ainsi que la composition et la nature du substrat de culture, comme le montre la littérature. En effet, Sandhya *et al.* (2005) ont obtenu le maximum de protéase neutre par *A. oryzae* 1808, cultivé sur le son de blé, après 72 heures. Sumantha *et al.* (2005) ont réalisé une FMS par *A. oryzae* 2217, par une combinaison de tourteaux de noix de coco et le son de blé. Ils ont obtenu le pic de l'activité enzymatique en 48 heures de fermentation. Plus tard, en 2009, García-Gómez *et*

al. ont également étudié la production de la même enzyme en FMS, sur farine de poisson par la souche *A. oryzae* 2095. L'activité maximale est produite après 44 heures. Une durée de culture plus longue, de 120 heures, a été nécessaire pour la production de la protéase acide de l'*A. oryzae* 5341, cultivé en FMS d'un mélange de son de blé avec 4 % de farine de soja délipidée ; et ce dans les travaux de Vishwanatha *et al.* (2010). Récemment, Chancharoonpong *et al.* (2012), ont obtenu le maximum d'activité de la protéase neutre après 48 heures de FMS, réalisée avec *A. oryzae* S. cultivée sur un mélange de soja et de son de blé à 30°C. De même, Castro et Sato (2013), ont observé le maximum d'activité protéasique après 48 et 72 heures, lorsqu'ils ont réalisé des FMS de son de blé, farine de soja et farine des graines de coton, par l'*A. oryzae* LBA 01.

Le suivi du pH au cours de la culture (**tableau 20**) indique une similitude pour les deux souches *A. oryzae* 22788 et 42149. Les variations ne sont pas très importantes ; le pH atteint en fin de culture des valeurs proches de la neutralité (6,55 et 6,86 pour les deux champignons respectivement). En ce qui concerne les trois autres souches *A. oryzae* 5777 et 2220, et *A. sojae* 1988, on a relevé des augmentations des valeurs de pH en fin de culture (8,25 ; 7,4 et 8,14 respectivement). Ceci indique que le métabolisme des protéines est plus important, résultat confirmé par le taux de production de protéase neutre des trois souches fongiques avec des valeurs de l'activité enzymatique qui dépasse les 6 U/gms. Cependant, le métabolisme des deux autres souches, n'a pas modifié le pH du milieu, ce qui peut être expliqué par une production équivalente en acides organiques et en ammoniac.

La production des protéases est importante pour les champignons. Ces enzymes dégradent les composants protéiques du milieu de culture et fournissent les acides aminés et l'azote. La croissance des hyphes nécessite la synthèse de composants pariétaux, dont la chitine. Ce dernier est formé par l'enzyme chitine synthétase, dont la forme active est obtenue grâce à l'action d'une enzyme protéolytique (Boiron, 1996).

D'après ces résultats nous avons choisi de continuer le reste des essais avec les deux souches *A. oryzae* 5777 et *A. oryzae* 2220, pour mesurer l'effet des différents paramètres pouvant affecter la production de l'enzyme.

Tableau 19 : Activité protéolytique produite par les cinq souches d'*Aspergillus* au cours de la FMS des déchets de tomate en (U/gms).

Temps(h)	<i>A.oryzae</i> 22788	Ecart- type	<i>A.oryzae</i> 42149	Ecart- type	<i>A.oryzae</i> 5777	Ecart- type	<i>A.oryzae</i> 2220	Ecart- type	<i>A.sojae</i> 1988	Ecart- type
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	1,032	0,02	0,52	0,01	0,65	0,02	0,8	0,01	0,7	0,03
48	2,31	0,014	2,01	0,07	4,53	0,02	3,86	0,14	3,11	0,15
72	4,66	0,07	3,82	0,02	5,53	0,05	6,21	0,1	4,76	0,05
96	4,94	0,06	4,87	0,65	6,03	0,65	5,57	0,06	5,5	0,08
120	2,7	0,18	3,11	0,15	6,75	0,81	3,18	0,15	6,02	0,2
144	2,87	0,65	5,52	0,2	6,13	0,7	3,45	0,2	5,98	0,3

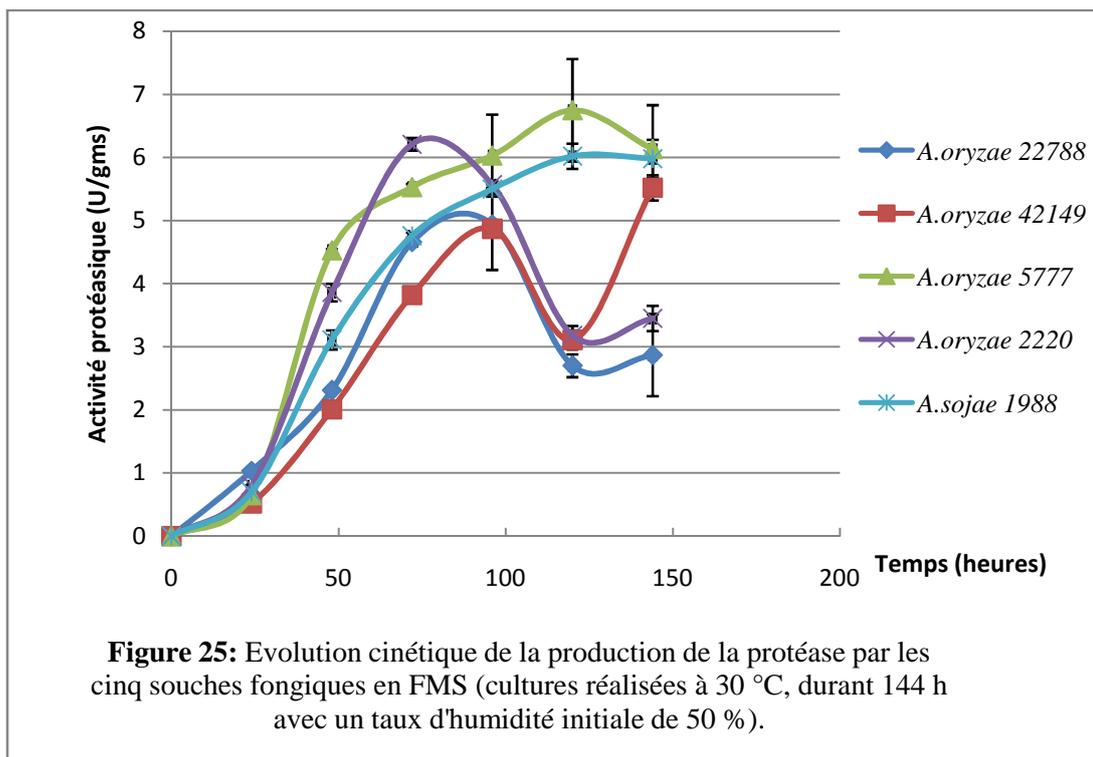


Tableau 20 : Evolution du pH au cours de la FMS par rapport aux différentes souches étudiées.

Temps(h)	<i>A.oryzae</i> 22788	<i>A.oryzae</i> 42149	<i>A.oryzae</i> 5777	<i>A.oryzae</i> 2220	<i>A.sojae</i> 1988
0	5,17	5,17	5,17	5,17	5,17
24	6,01	5,79	5,8	5,84	5,94
48	6,27	6,48	6,28	6,37	7,1
72	5,95	6,2	6,88	6,67	7,45
96	5,43	5,94	7,38	6,61	7,76
120	6,18	6,07	7,8	7,08	7,94
144	6,55	6,86	8,25	7,4	8,14

3. Etude des conditions de la fermentation solide sur déchets de tomate

3.1. Effet de l'humidité

La teneur en eau initiale du substrat de fermentation, a été étudiée dans l'intervalle de 40 à 70 % avec des variations de 5 %. Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 21**.

La souche *A. oryzae* 5777 a donné plus d'activité protéasique à des taux d'humidité de 40 à 50 % ; avec un maximum de 6,5 U/gms. Une augmentation de la teneur en eau jusqu'à 70 %, conduit à une diminution de 25 % de l'activité enzymatique étudiée avec un effet très significatif ($p < 0,04$). Cette diminution pourrait s'expliquer par une modification de la structure du milieu. En effet, un taux élevé de l'humidité provoque une agglomération des particules, une limitation de transfert des gaz et favorise les contaminations bactériennes (Duchiron et Copinet, 2011). Ces résultats sont similaires à ceux de Sandhya *et al.* (2005) qui ont obtenu un maximum d'activité de la protéase neutre à 43,6 % d'humidité de son de blé ; de Sumantha *et al.* (2005) avec 60 % du même substrat et de Chutmanop *et al.* (2008) qui ont trouvé une teneur d'eau optimale de 50 % pour la production de protéase sur un mélange de son de blé et son de riz.

Cependant, pour la souche *A. oryzae* 2220, on a observé une similitude des résultats de l'activité de la protéase par rapport au taux d'humidité; avec une activité minimale de 6,5 U/gms et maximale de 6,8 U/gms, soit une variation de 0,3. Les changements de l'humidité n'affectent pas la production de la protéase neutre, du moins dans l'intervalle étudié. Par ailleurs, Belmessikh (2011) signale un niveau optimal de la teneur d'eau entre 50 et 60%, avec l'utilisation des déchets de tomate moulus en particules de 1 mm de diamètre. On peut conclure que le niveau de l'humidité optimal pour la production d'une enzyme dépend non seulement de la souche mais aussi de la taille des particules du substrat.

L'analyse de la variance permet de confirmer les effets significatifs du facteur souche ($F = 46,30$ et $p = 0$) ainsi que du facteur humidité ($F = 2,27$ et $p = 0,03$) sur la production de la protéase.

Tableau 21 : Effet de l'humidité initiale sur la production de la protéase par les deux souches d'*Aspergillus oryzae* par FMS sur déchets de tomate. L'activité en (U/gms).

Taux d'humidité (%)	<i>A.oryzae</i> 5777*	Ecart-type	<i>A.oryzae</i> 2220**	Ecart-type
40	6,3	0,1	6,7	0,2
45	6,5	0,4	6,6	0,3
50	6,4	0,2	6,7	0,2
55	5,3	0,1	6,6	0,1
60	5,2	0,3	6,8	0,2
65	5,1	0,1	6,8	0,1
70	4,9	0,2	6,5	0,3

* : FMS de 5 jours ; ** : FMS de 3jours.

Plusieurs auteurs ont étudié ce paramètre : Labeille (1997) rapporte un taux d'humidité de 55 % du son de blé pour la production de glucoamylase par *Aspergillus niger* ATCC 76061 ; Agrawal *et al.* (2005) ont trouvé un taux d'humidité initial de 120 % pour la production de la protéase alcaline par *Beauveria felina* mais de seulement 60 % pour *A. oryzae* NCIM 649 lorsqu'ils sont cultivé sur son de blé ; Mahanta *et al.* (2008) ont trouvé un taux de 50 % pour la production de protéase et de lipase par *Pseudomonas aeruginosa* cultivé sur les tourteaux de la plante *Jatropha curcas* ; Prakasham *et al.* (2006) ont trouvé un taux de 140 % pour la production de protéase alcaline par *Bacillus* sp. cultivé sur écorce verte; Bhanu Prakash *et al.* (2008) ont obtenu lors de la production des spores de *Metarhizium anisopliae* en FMS, un taux d'humidité qui varie selon la nature du substrat utilisé : 75,68 % pour sorgho, 73,21 % pour l'orge et 22,34 % pour le riz ; Mukherjee *et al.* (2008) ont obtenu un taux de 100 % pour la production de protéase alcaline de *Bacillus subtilis* cultivé sur les deux substrats qu'ils ont étudiés : peaux de pomme de terre et la plante herbacée *Imperata cylindrica* ; Lazim *et al.* (2009) ont trouvé un taux de 60 % pour la production de la protéase alcaline par *Streptomyces* sp. CN902 cultivé sur un mélange de son de blé et de noyaux de dattes coupés aux proportions 5 :5. Le taux d'humidité est optimal lorsque le substrat est saturé en eau. D'une manière générale, ce taux varie selon la nature du substrat entre 30 – 85 % (Bellon-Maurel *et al.*, 2003), pour les cultures bactériennes il peut atteindre 140 % (Prakasham *et al.*, 2006.)

Par conséquent, nous avons décidé de continuer les essais avec un taux d'humidité initiale de 50 % qui est favorable pour les deux souches.

3.2. Effet du pH

Le pH influence la croissance des champignons par action directe sur la membrane cellulaire, ou indirecte sur la disponibilité des éléments nutritifs tels que le fer qui reste sous forme d'ions ferreux assimilables à pH acide (Boiron, 1996).

Les résultats de l'effet du pH initial sur la production de la protéase neutre sont regroupés dans la **figure 26**. Pour la souche *A. oryzae* 5777, on constate une activité protéasique diminuée lorsque le milieu est acidifié (pH 3 à 5). Le maximum de l'activité est atteint à pH 6 avec 6,11 U/gms et reste pratiquement stable jusqu'à pH 8. En ce qui concerne la souche *A. oryzae* 2220, c'est l'inverse. En effet, une activité protéasique de plus de 95 % est obtenue à pH 3. Le maximum de l'activité enzymatique (7,35 U/gms) est produit, également à pH 6. Au-delà de cette valeur, on constate une diminution de la protéase neutre. Par ailleurs, on remarque que le taux de production de l'enzyme est plus important pour cette dernière souche. Ceci est en accord avec la revue de Duchiron et Copinet (2011), où ils indiquent que la gamme optimale de pH pour les champignons filamenteux se situe entre 3 et 6. Par ailleurs, Agrawal *et al.* (2005) ont trouvé un pH initial optimal de 7 pour la production de la protéase alcaline de *Beauveria felina* et de *A. oryzae* NCIM 649, Sandhya *et al.* (2005) et Chutmanop *et al.* (2008) ont obtenu le maximum d'activité à pH 7,5. Mukherjee *et al.* (2008) indiquent que la production de la protéase alcaline est maximale après humidification du substrat de culture par l'eau distillée à pH 8, Mahanta *et al.* (2008) ont obtenu le plus de protéase et de lipase à pH 6 et 7 respectivement par *Pseudomonas aeruginosa* PseA, alors que Vishwanatha *et al.* (2010) ont obtenu le maximum de la protéase acide à pH 5. Il est clair, que chaque type de protéase nécessite un pH correspondant du milieu de fermentation. Celle de la protéase neutre doit être neutre ou proche de la neutralité.

Par ailleurs, le pH initial varie aussi selon le substrat de culture utilisé. Bhanu Prakash *et al.* (2008) ont trouvé pour la production des spores de *Metarhizium anisopliae* en FMS les valeurs de pH 7,01 pour le riz, 7,06 pour le sorgho et 6,76 pour l'orge.

L'analyse de la variance indique l'effet significatif du facteur souche avec $F = 117,18$ et $p = 0$; et aussi pour le pH qui exerce un effet significatif sur la production de la protéase neutre ($F = 6,13$; $p = 0,0008$).

Les activités métaboliques des deux souches d'*Aspergillus oryzae* cultivées en FMS sur déchets de tomate, ont induit des modifications du pH (**tableau 22**). En fin de culture, les

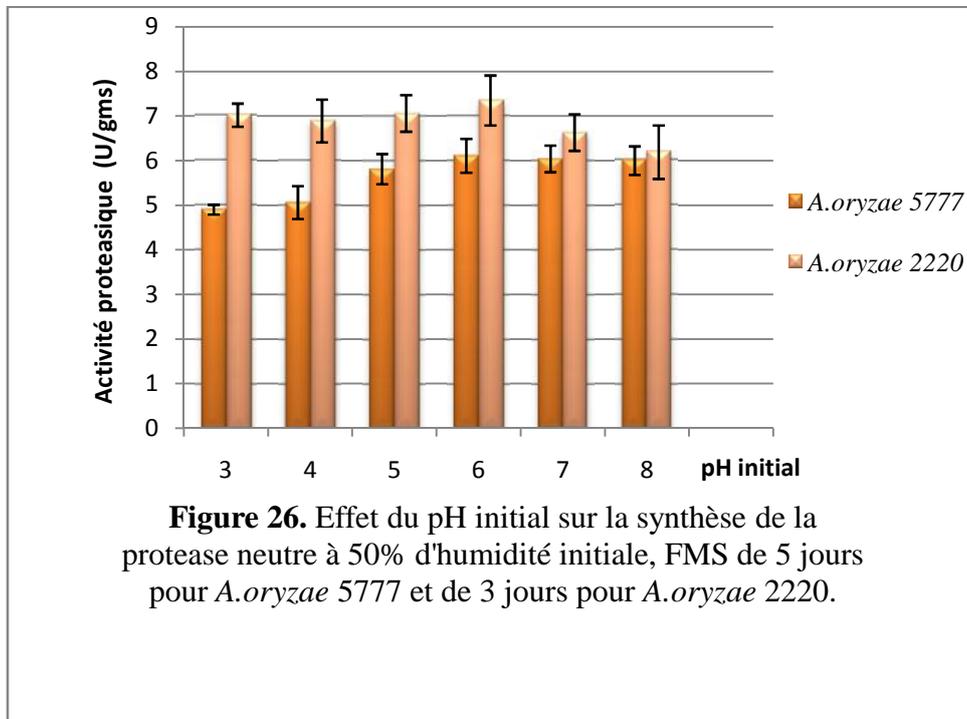
valeurs de pH ont augmenté pour les milieux à pH initial 3 à 6. Cela s'explique par le métabolisme des protéines qui produit de l'ammoniac (Sparringa et Owens, 1999 ; Garcia-Gómez *et al.*, 2009). Pour les milieux à pH initial 7 et 8, ils sont amenés à 7,66 et 7,43 pour *A. oryzae* 5777 ; et à 6,57 et 6,47 pour *A. oryzae* 2220. La production en acides est équivalente à celle de l'ammoniac. De ce fait, le pH proche à la neutralité est favorable à la croissance et à la production de la protéase neutre.

La suite du travail, a été réalisée par le substrat humidifié avec le tampon phosphate-citrate (0,2 M/ 0,1 M) à pH 6.

Tableau 22 : Evolution du pH à la fin de la FMS sur déchets de tomate (Humidité initiale de 50 %).

pH initial	pH de fin de culture	
	<i>A.oryzae</i> 5777*	<i>A.oryzae</i> 2220**
3	8,01±0,2	6,51±0,1
4	7,80±0,1	6,40±00
5	7,63±00	6,44±0,1
6	7,54±0,1	6,38±00
7	7,59±0,1	6,47±0,1
8	7,44±0,1	6,49±00

Valeur moyenne ± l'écart-type, * : FMS de 5 jours, ** : FMS de 3 jours.

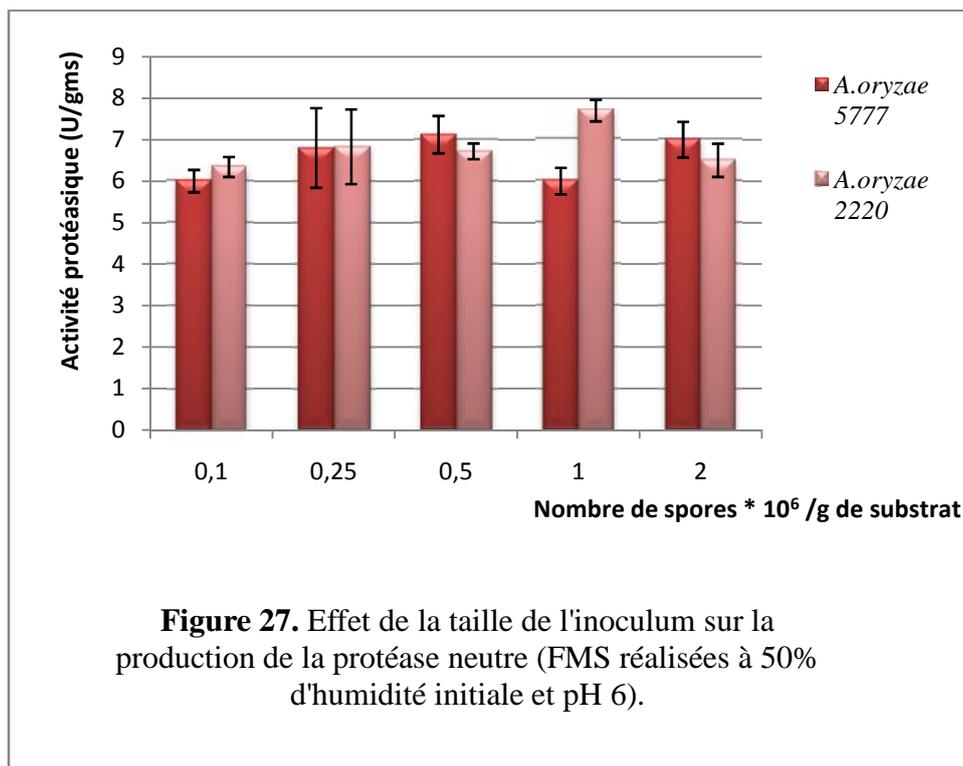


3.3. Effet de l'inoculum

3.3.1. Effet de la taille de l'inoculum

Les résultats de la production de la protéase en fonction du nombre de spores pour les deux souches sont présentés sur la **figure 27**. Le maximum de l'activité enzymatique est obtenu par la souche *A. oryzae* 2220 (7,7 U/gms) lorsque le milieu de culture estensemencé par un inoculum sporal de 10^6 spores/g de substrat. En ce qui concerne la souche *A. oryzae* 5777, on constate des variations dans la réponse en production de l'enzyme ciblée par rapport aux différents taux de spores étudiés. Sandhya *et al.* (2005) ont trouvé le maximum de l'activité protéasique avec un inoculum de 8×10^7 spores/g de substrat, alors que Agrawal *et al.* (2005) n'ont pas pu déterminer ce taux dans leur travaux sur la production de la protéase alcaline par *A. oryzae* NCIM 649, cultivé sur son de blé, dans l'intervalle $10^5 - 10^{10}$ spores/g de substrat. Aussi les travaux de Bhatnagar *et al.* (2010) ont montré un effet non significatif du taux de l'inoculum sur la production de la protéase acide par *A. niger* en FMS, pour les deux taux de spores étudiés (2×10^5 et 4×10^6 spores/g de substrat). Ainsi, nos résultats sont conformes à ces travaux ; l'analyse de la variance indique que ce facteur n'a pas d'effet significatif sur la production de la protéase neutre ($F = 1,7484$, $p = 0,179$) dans l'intervalle choisi.

Le taux de 10^6 spores/g de déchets de tomate a été retenu pour la suite du travail.



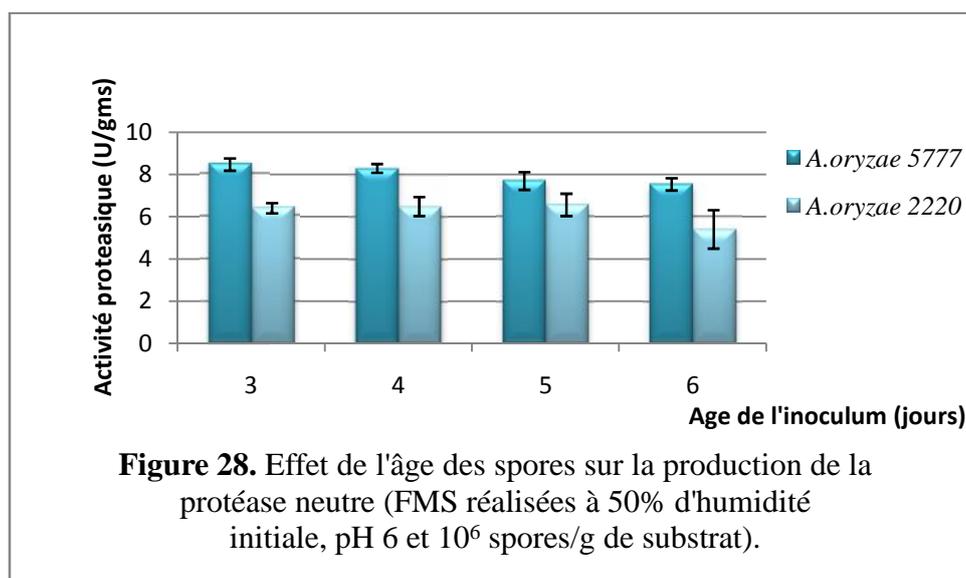
3.3.2. Effet de l'âge de l'inoculum

L'étude de ce facteur nous a permis d'obtenir les résultats résumés dans la **figure 28**. Pour la souche d'*A. oryzae* 5777, le maximum de l'activité protéasique est obtenu avec un inoculum de 3 jours (8,48 U/gms) ; des spores plus âgées, donnent une activité enzymatique de plus en plus faible. En ce qui concerne la souche *A. oryzae* 2220, l'âge optimal de l'inoculum est de 5 jours ; il permet d'obtenir 6,57 (U/gms) ; l'utilisation d'un inoculum plus âgé d'un jour, conduit à une perte de 19 % de l'activité protéasique. En effet, des spores trop jeunes sont immatures, et ceux qui sont trop âgées sont incapables de germer et de produire les différents métabolites dont les enzymes.

Différents auteurs ont mis en évidence l'influence de l'âge des spores sur la production des enzymes. Aikat et Bhattacharyya (2000) ont trouvé meilleur l'inoculum de 7 jours pour la production de protéase par *Rhizopus oryzae* cultivé en FMS sur son de blé. Irfan *et al.* (2011) ont également étudié l'effet de ce facteur sur la production de la protéase acide. Ils indiquent que l'âge de 7 et 8 jours pour *R. oligosporus* et *R. arrhizus* respectivement, sont les meilleurs. Porcel *et al.* (2006) ont obtenu la meilleure production de lovastatine par un inoculum de 9 jours d'*A. terreus*.

L'analyse de la variance indique l'effet significatif de ce facteur sur la production de la protéase neutre ($F = 23,404$; $p = 0,00004$).

Les essais qui suivent sont donc réalisés avec des inocula de 3 jours pour *A. oryzae* 5777 et de 5 jours pour *A. oryzae* 2220.



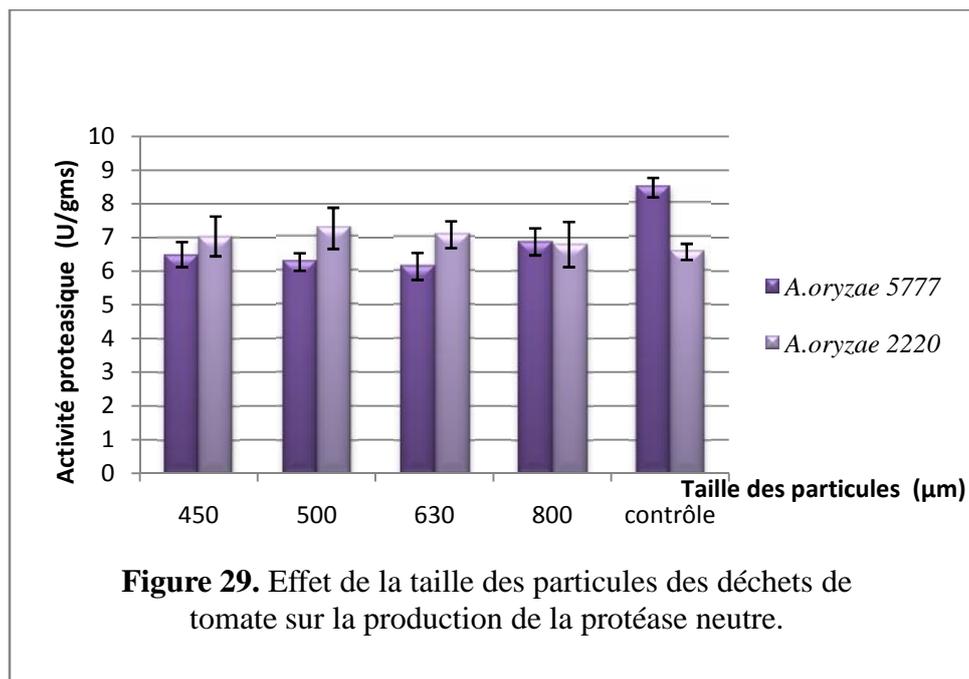
3.4. Effet de la taille des particules de substrat

L'évaluation de la production de la protéase en fonction de quatre différentes tailles des déchets de tomate a permis d'obtenir les résultats présentés dans la **figure 29**. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus dans le test précédent avec le substrat en taille originale (contrôle). Pour la souche *A. oryzae* 5777, la production de la protéase de 8,48 U/gms, la plus élevée, est atteinte avec le substrat non broyé (taille des particules originale) ; soit une différence de plus de 30% par rapport au substrat broyé. Pour *A. oryzae* 2220, une faible augmentation de l'activité enzymatique est observée lorsque le substrat a une taille des particules de 500 μ m. L'analyse de la variance a donné une probabilité supérieure à 0,05 ($F = 1,488$; $p = 0,243$), ce qui indique l'effet non significatif de ce paramètre sur la production de l'enzyme.

Parmi les auteurs ayant étudié ce paramètre, plusieurs ont observé une meilleure production de la protéase avec une grande taille des particules de substrat. C'est ainsi que Elibol et Moreira (2005) ont trouvé que la meilleure production de la protéase alcaline par la bactérie *Teredinobacter turnirae* est obtenue avec des particules de soja de 2 mm. Les travaux de Prakasham et al. (2006) sur la production de la protéase alcaline par *Bacillus* sp., ont montré que les particules de taille 1,4-1 mm permettent d'obtenir le maximum d'activité enzymatique. Castro et Sato (2013) ont trouvé la meilleure production de protéase d'*A. oryzae* LBA 01, cultivé sur son de blé de taille 0,258 à 1,68 mm et sur farine de soja et farine de graines de coton de taille 1,68 mm. A l'inverse, Chellappan *et al.* (2006) ont trouvé que l'utilisation de particules de son de blé de petite taille (425 μ m) par la moisissure marine *Engyodontium album* a permis d'obtenir une bonne production de protéase alcaline.

Tous ces travaux indiquent l'importance d'utiliser un substrat de taille adapté pour une meilleure production des protéases. De ce fait, la granulométrie du milieu de culture est d'un grand intérêt. En effet, dans les procédés en FMS, les surfaces des substrats disponibles ont un effet vital pour les microorganismes. Le transfert et la disponibilité des nutriments affectent directement la croissance microbienne et ainsi la production des enzymes et autres métabolites. Ainsi, il est préférable d'utiliser des substrats avec des tailles des particules différentes comme cela a été montré par Pandey (1991) avec le son de blé. C'est le cas des déchets de tomate utilisés dans cette étude. Ce substrat est composé de graines en petite taille présentant une large surface d'attaque microbienne ainsi que de pellicules de tailles variables permettant une meilleure aération et par conséquent une bonne respiration. Pour cela, et pour

des raisons économiques, il est inutile de broyer les déchets de tomate avant leur utilisation comme substrat de la FMS.



3.5. Effet de l'addition des protéines sur la production de la protéase

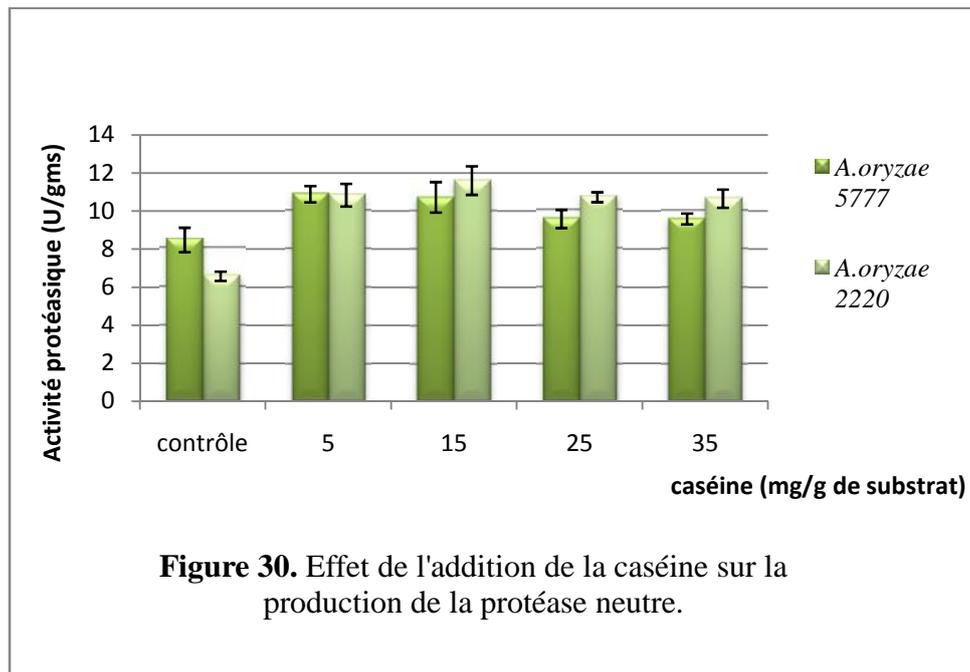
Les protéines sont les inducteurs de la synthèse des protéases par les microorganismes. Pour cela nous avons effectué des essais avec des milieux enrichis en caséine et en farine de soja.

3.5.1. Effet de la caséine

Les résultats de l'effet de l'addition de la caséine au milieu, comparés à ceux obtenus en son absence, sont présentés dans la **figure 30**. Bien que les déchets de tomate soient assez riches en protéines, l'addition de la caséine dans le substrat de culture a donné de meilleurs résultats pour les deux souches testées.

Pour *A. oryzae* 5777, on note une augmentation de 28 % de l'activité de la protéase neutre lorsque 1 g de substrat est supplémenté de 5 mg de caséine. L'activité atteint la valeur de 10,88 U/gms. En ce qui concerne la souche *A. oryzae* 2220, l'effet inducteur se révèle de façon plus importante avec une augmentation de plus de 76 % de l'activité protéasique. Ce maximum (11,6 U/gms), est obtenu par l'addition de 15 mg de caséine par gramme de substrat. Les valeurs de l'activité sont importantes avec toutes les concentrations de caséine testées. Ce facteur exerce un effet très significatif sur la production de l'enzyme recherchée, ceci est confirmé par l'ANOVA ($F = 82,82$; $p = 0$). Cet effet positif sur la production de la protéase a été démontré dans le travail de Belmessikh *et al.* (2013) sur les déchets de tomate et celui de Merheb *et al.* (2007) sur le son de blé.

Par contre, un effet négatif a été observé par Chellappan *et al.* (2006) et Sumantha *et al.* (2005). En effet, ces auteurs ont trouvé que l'addition de la caséine au milieu de culture ne conduit pas à une augmentation de la production de la protéase. L'effet de l'addition de cette protéine sur la production de l'enzyme dépend de la composition du substrat de culture et de la souche utilisée.



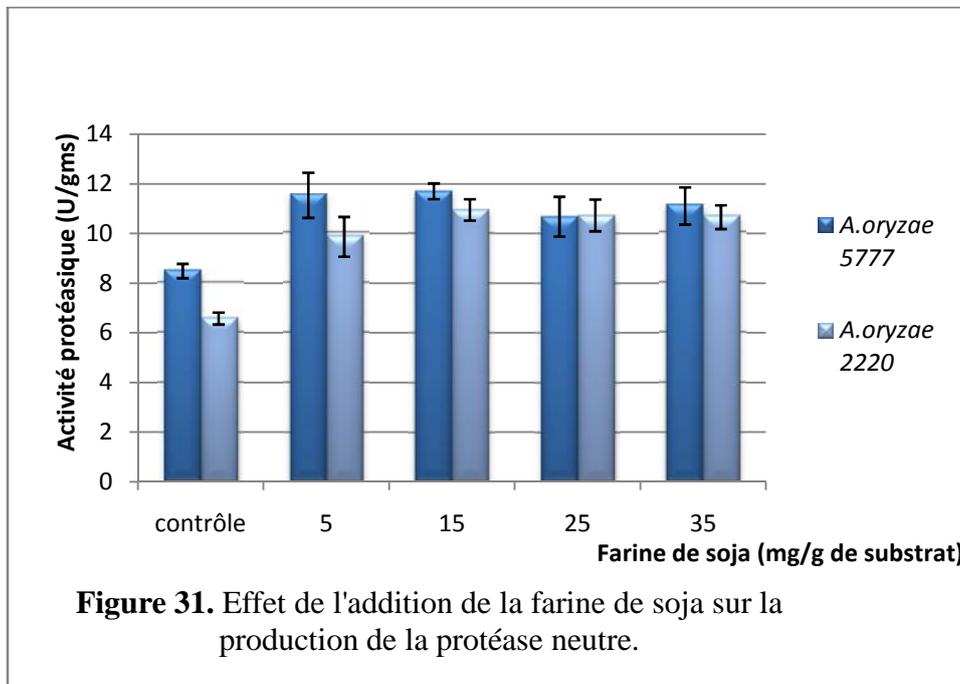
3.5.2. Effet de la farine de soja

Les résultats de l'effet de cette deuxième source de protéine sont présentés dans la **figure 31**. On constate des augmentations de l'activité protéasique par rapport aux deux souches pour toutes les concentrations de farine de soja ajoutées au milieu.

Pour *A. oryzae* 5777, le maximum de l'activité est obtenu par l'addition de 15 mg/g de substrat soit une production de 38 % d'activité supplémentaire. Cet effet est plus important avec la souche *A. oryzae* 2220, avec 66,5 % d'augmentation pour la même concentration de farine de soja. Nous avons constaté que les quantités supérieures à 15 mg/g de substrat, conduisent à des diminutions de l'activité enzymatique étudiée. L'analyse de la variance des résultats indique l'effet significatif de ce facteur ($F = 57,47$; $p = 0$). En effet, les protéines sont de bons inducteurs de la production des protéases.

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

Ainsi, ces deux protéines se révèlent comme des sources azotées capables de stimuler la production des protéases par les deux souches d'*A. oryzae* étudiées. Mais cette stimulation varie en fonction de la souche : la caséine induit la production de la protéase neutre beaucoup plus pour *A. oryzae* 2220, alors que la farine de soja le fait pour *A. oryzae* 5777. Il est donc clair que chaque souche a des besoins nutritionnels et d'inducteurs spécifiques pour produire l'enzyme recherchée. Par ailleurs, d'autres sources d'azote sont également inductrices de la production de l'enzyme comme c'est le cas de l'extrait de levure ou la peptone pour la protéase alcaline étudiée par Prakasham *et al.* (2006) en FMS.



3.6. Conclusion partielle

D'après cette étude, nous pouvons conclure qu'il est possible de produire des protéases fongiques avec des milieux de culture à base des déchets de tomate. Par sa composition en différentes matières organiques et minérales, ce substrat se trouve parfaitement adapté à la croissance des souches d'*Aspergillus*, particulièrement par la présence de protéines qui sont des inducteurs des protéases.

L'étude des différents facteurs sur la production de la protéase neutre en FMS avec les déchets de tomate comme substrat a permis de définir ceux qui ont des effets significatifs ; parmi ces paramètres, le taux de l'humidité, le pH initial, l'âge de l'inoculum et la teneur en protéines.

Ces résultats permettent de définir les conditions qui seront adoptées dans la deuxième partie du travail, à savoir, la production de la protéase neutre en fermenteur par la souche *A. oryzae* 2220. Cette dernière est la plus rapide, en effet, le facteur temps est très important pour une production à l'échelle industrielle. Cette souche arrive à produire le maximum de la protéase en 72 h (3 jours), alors que la souche *A. oryzae* 5777 le fait en 120 h (5 jours) pour le même niveau de la production de l'enzyme. Par ailleurs, le taux d'humidité du substrat adopté est de 50 % et l'enrichissement par la farine de soja est de 15 mg/ g de substrat, cela afin de rendre la production plus économique comparativement à la caséine qui ne permet pas d'augmenter la production de l'enzyme d'une façon très importante. En ce qui concerne le pH du substrat, nous avons opté pour une humidification du substrat de culture avec de l'eau osmosée sans utilisation de la solution tampon à pH 6 ; ce qui permet d'obtenir un pH de 5,49 convenable à la production de la protéase neutre par la souche fongique sélectionnée.

Pour la température, nous continuerons à travailler à 30°C comme en Erlenmeyers car c'est la température optimale de production des protéases par *Aspergillus oryzae*, rapportée par plusieurs auteurs (Botton *et al.*, 1990 ; Sandhya *et al.*, 2005 ; Sumantha *et al.*, 2005 ; Chutmanop *et al.*, 2008 ; Vishwanatha *et al.*, 2010 ; Chancharonpong *et al.*, 2012).

Par ailleurs, les essais sont poursuivis par des cultures en fermenteur pilote de type *Koji*, équipé d'un système d'aération avec des quantités importantes de substrat pour le « *scaling-up* » du procédé.

4. Production de la protéase neutre en réacteur Fujiwara

L'utilisation du bioréacteur *Koji* a permis de créer des conditions de fermentations les plus favorables au développement de la souche fongique et à la production de la protéase.

4.1. Culture avec le substrat enrichie par la farine de soja

Une culture préliminaire a été réalisée avec 20 kg de substrat enrichi avec la farine de soja, durant 3 jours. Cet essai a permis d'évaluer la productivité de l'enzyme et de déduire le temps de fermentation. En effet, nous avons constaté que la production de l'enzyme est détectable dès les premières heures de culture. Le maximum est obtenu après 41 heures (11,66 U/gms), avec dégagement d'une forte odeur d'ammoniac traduite par une augmentation du pH à 7,82 est une activité protéolytique importante. Au delà, la production de la protéase ralentit progressivement pour atteindre 3,85 (U/gms) en 71 heures. Ce déclin peut s'expliquer par le fait que le milieu n'est plus convenable à la croissance et à la production de l'enzyme après la consommation des nutriments et la modification du pH. Au cours de la fermentation, la moisissure se développe, envahit et solidifie le substrat. A la fin de la culture, l'apparition des spores rend le milieu entièrement vert (voir **figure 32**).

Dans le deuxième essai en fermenteur, la culture est réalisée avec une masse de substrat égale à 9,2 kg. Les résultats présentés dans la **figure 33** montrent une production plus rapide et plus importante comparée aux résultats obtenus en Erlenmeyers. La synthèse de l'enzyme débute après 12 heures de culture (1,41 U/gms), le maximum de l'activité (plus de 12 U/gms) est atteint après 42 heures. Le pH aussi augmente pour atteindre la valeur de 6,8 à la fin de la fermentation. Cette amélioration de la production s'explique par le fait qu'en réacteur la culture est aérée, contrairement à la fermentation en Erlenmeyers.

4.2. Culture avec déchets de tomate sans enrichissement

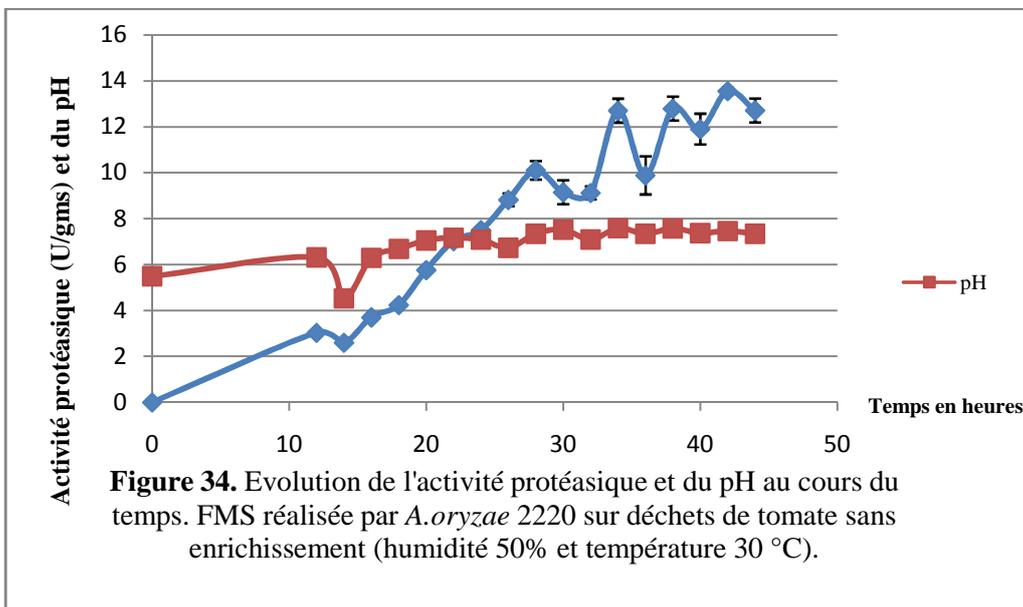
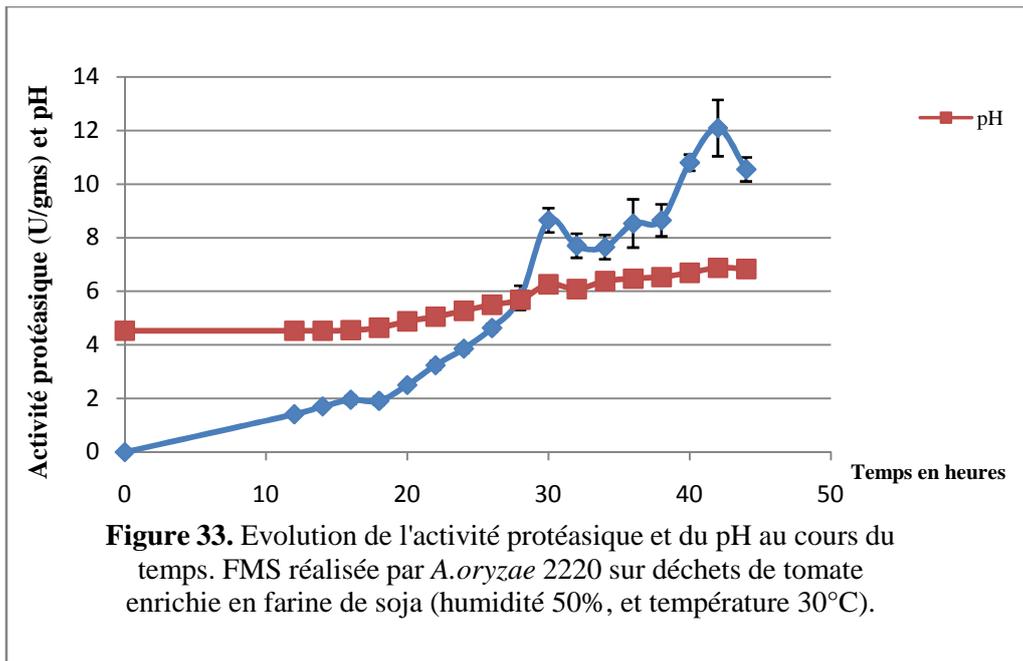
La culture en fermenteur *Koji* mais sur déchets de tomate sans addition de source de protéine additionnelle a permis d'obtenir 3,03 U/gms dès la 12^{ème} heure de culture, soit une augmentation de 115% comparée à l'essai réalisé avec enrichissement. Après 34 heures de FMS, l'activité est de 12,7 U/gms. Le maximum est produit à la 42^{ème} heure de fermentation (13,55 U/gms) (voir **figure 34**). Parallèlement, le pH augmente rapidement pour se stabiliser à partir de la 30^{ème} heure entre 7,34 et 7,57. Cette augmentation est due au métabolisme des

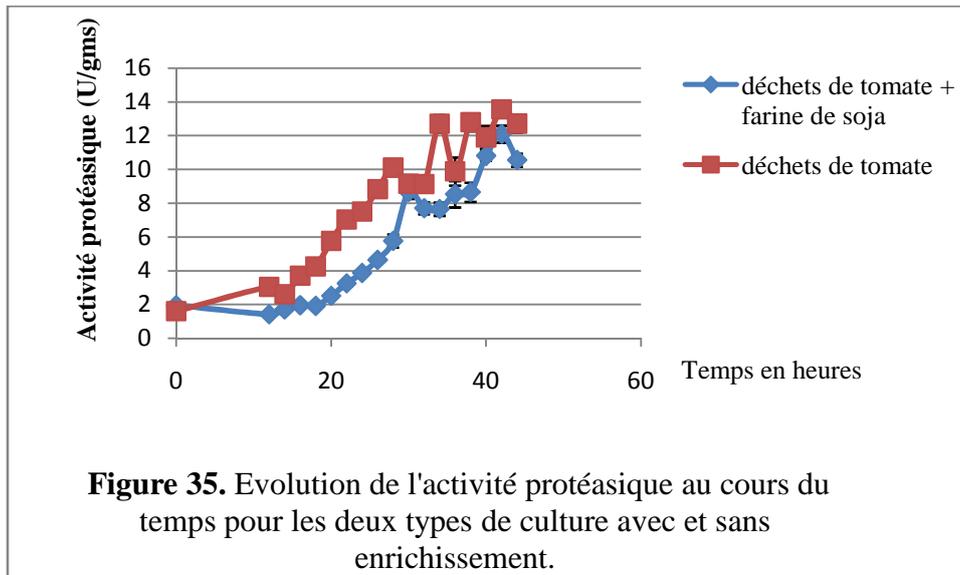
protéines se trouvant dans le substrat de culture. A la fin de la période de la fermentation, la stabilité du pH dans la zone neutre est convenable à l'activité de la protéase produite.

La production de la protéase neutre par la moisissure *A. oryzae* 2220 est plus importante et plus rapide dans le milieu formulé avec les déchets de tomate sans aucune addition (**figure 35**). Cela s'explique par la composition de ce substrat associée à des conditions d'aération correctes. Plusieurs auteurs ont montré l'efficacité de l'aération dans la production d'enzymes par les cultures en milieux solides : Labeille 1997 dans ses travaux sur la production de glucoamylases d'*A. niger* en FMS sur son de blé; Tunga *et al.* (1999) dans leurs travaux sur la production de protéase ; Anisha *et al.* (2010) dans les essais réalisés pour la production de l' - galactosidase par *Streptomyces griseoloalbus* ; et récemment Chen *et al.* (2014) dans les essais de production de cellulase par *Trichoderma viride* L3. Ce système d'aération apporte l'oxygène nécessaire à la croissance et accélère l'élimination du dioxyde de carbone produit par le métabolisme et devenu défavorable pour la moisissure. Cela permet également de réguler la température en évitant une accumulation de la chaleur métabolique. L'effet se traduit par une amélioration de la croissance et une meilleure production de l'enzyme.



Figure 32. L'aspect du substrat au cours de la culture : (a) Erlenmeyers inoculum, (b) cuve du fermenteur Fujiwara avec les déchets de tomate inoculés, (c) substrat fermenté après 13 heures de culture, (d) substrat après 20 heures de culture, (e) substrat à la fin de la fermentation.





5. Optimisation de l'extraction de l'enzyme

Après la fermentation, l'enzyme reste liée au substrat sous deux formes, l'une séchée après une déshydratation dans le fermenteur (pourcentage de l'humidité entre 4 et 6 %) ; l'autre conservée directement à -20°C. Ce qui nécessite une extraction permettant d'obtenir l'enzyme avec la meilleure activité. Pour cela, il faut choisir les conditions adéquates (type de solvant utilisé, durée de la centrifugation et temps de contact avec le solvant).

5.1. Effet de la solution utilisée pour l'extraction

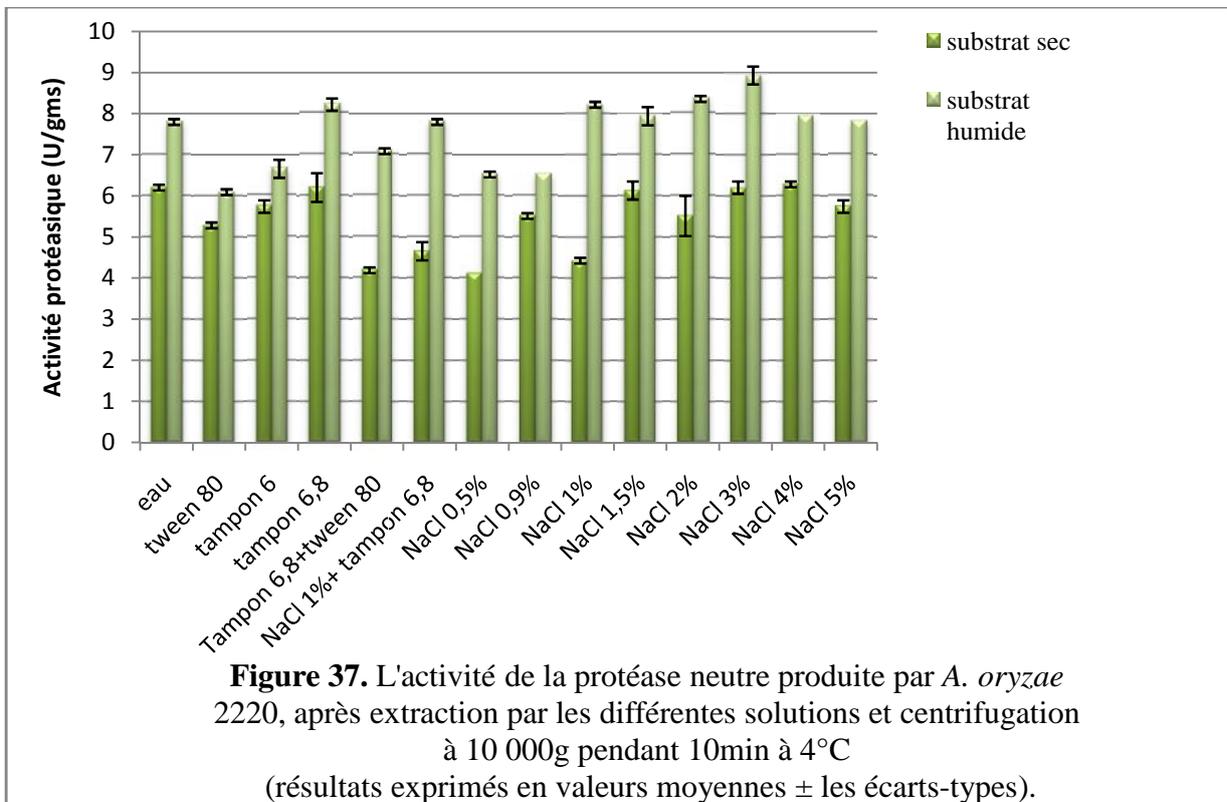
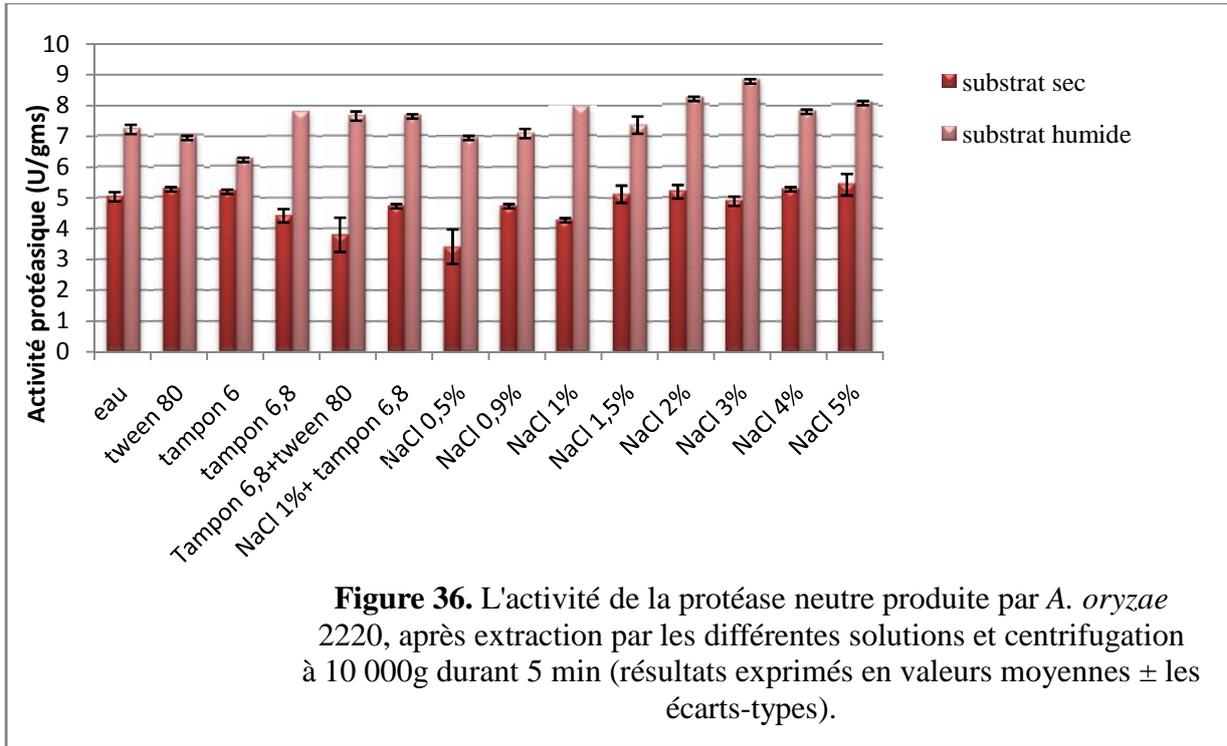
Au cours de cet essai, différentes solutions d'extraction ont été testées pour mesurer l'effet de chacune d'elles sur l'activité de l'enzyme. Les deux types de substrat fermenté utilisés sont le substrat séché et le substrat congelé humide. Les résultats sont regroupés dans les **figures 36** et **37**. Le substrat humide permet d'obtenir plus d'activité de la protéase neutre produite par *A. oryzae* 2220. L'analyse de la variance confirme l'effet significatif du facteur substrat avec $F = 114,36$ et $p = 0$, lorsque la centrifugation est réalisée durant 5 minutes et $F = 610,57$ et $p = 0$, après 10 minutes de centrifugation.

La solution de NaCl à 3 % (w/v) donne le maximum de l'activité pour les deux types de substrat. Comparativement à l'eau osmosée, ce solvant permet d'obtenir entre 14,5 et 21,5 % d'activité supplémentaire selon la durée de la centrifugation; l'activité diminue à des concentrations supérieures en sel.

L'extraction à partir du substrat sec avec une solution à 5 % de NaCl a donné une augmentation d'environ 8 % après une centrifugation de 5 minutes. Cela s'explique par la durée de centrifugation qui n'a pas été suffisante pour une concentration en sel plus faible.

L'analyse de la variance des résultats indique un effet significatif de la nature du solvant utilisé ($F = 10,33$ et $p = 0$) dans les cas de 5 minutes de centrifugation ; ($F = 33,26$ et $p = 0$) dans le deuxième cas. Díaz *et al.* (2007), ont étudié l'effet de la solution d'extraction de certaines hydrolases. Ils ont trouvé que le tween 80 à 0,1 %, est le meilleur solvant pour l'extraction de la xylanase ; alors que la solution de NaCl (0,1M) est la meilleure pour l'exopolysaccharidase de l'*Aspergillus awamori*. Mukherjee *et al.* (2008), ont trouvé la meilleure solution pour l'extraction de la protéase alcaline de *Bacillus subtilis*, l'eau distillée contenant 0,1 % de Triton X-100 à pH 8,0. L'analyse de la variance du facteur durée de centrifugation indique l'effet significatif de ce paramètre, pour le substrat séché ($F = 93,88$ et $p = 0$) et aussi pour le substrat congelé humide ($F = 11,98$ et $p = 0,001$).

Un bon solvant d'extraction doit être recherché pour que l'enzyme soit soluble et donne le maximum de son activité. Les solvants polaires tels que l'eau et de nombreux sels inorganiques, interagissent fortement avec les enzymes et les rendent solubles. Pour des concentrations plus fortes en sels, il se produit une nouvelle diminution de la solubilité (Laurent, 1982). L'utilisation de l'eau osmosée, le plus économique des solvants, permet d'obtenir de bonnes valeurs d'activité protéasique. Ceci est en accord avec les conclusions de Díaz *et al.* (2007).



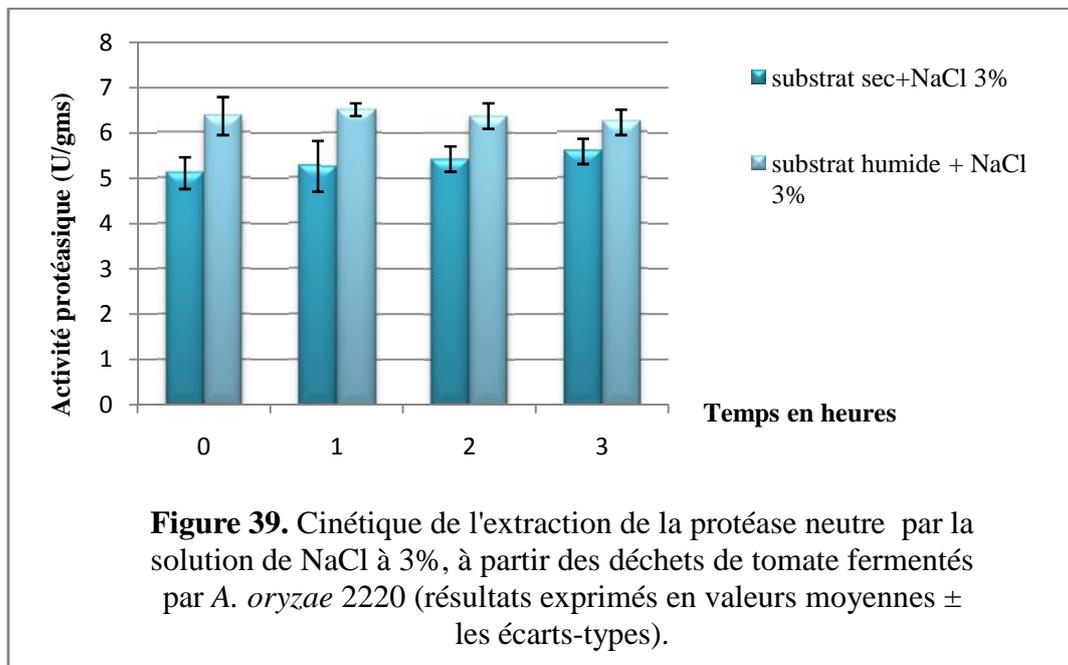
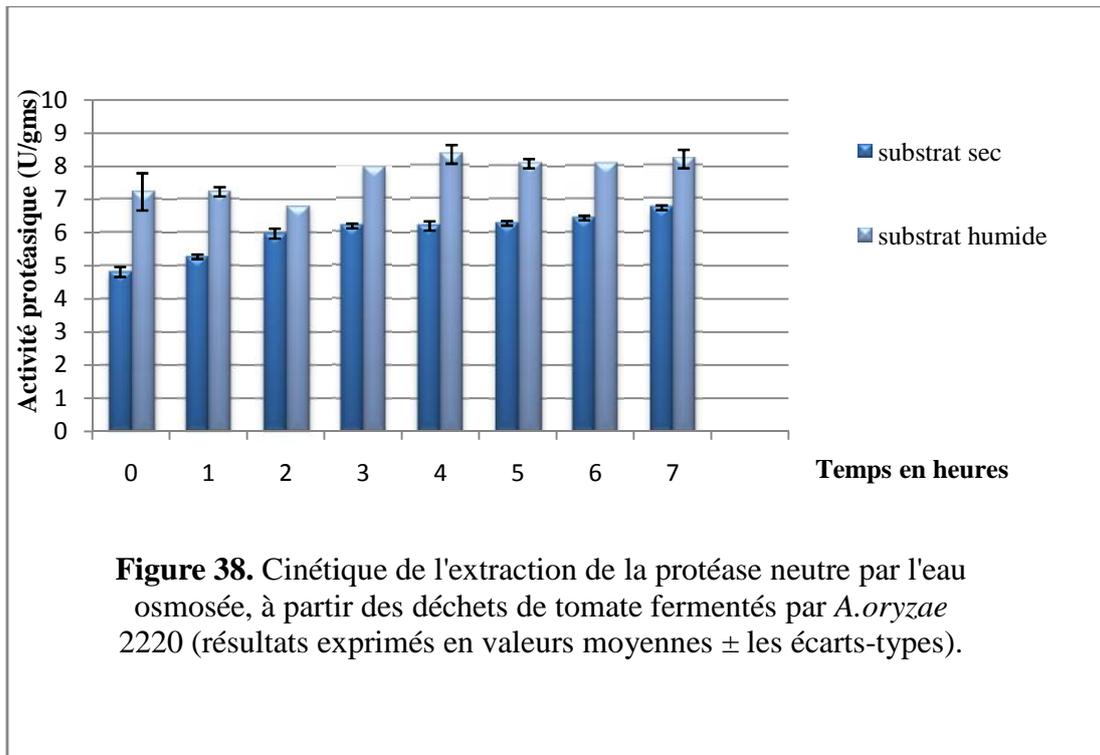
5.2. Effet de la durée de la solubilisation du substrat fermenté

5.2.1. Avec l'eau

Les résultats de l'étude de l'effet de la durée de contact du substrat fermenté avec l'eau sont regroupés dans la **figure 38**. Il apparaît que plus le substrat fermenté, reste en contact avec le solvant plus longtemps, cela permet d'augmenter l'activité protéasique. Cette augmentation est de (15,62 %) pour le substrat humide, alors qu'elle est beaucoup plus importante (40,33 %) dans le cas du substrat séché. On constate que pour le dernier, l'activité maximale est obtenue après 7 heures d'agitation. Cela est évident, puisque le substrat contenant l'enzyme a été complètement déshydraté. Pour le substrat humide, cela correspond à une durée plus courte. En effet, le maximum de l'activité est obtenu après 4 heures de solubilisation. L'analyse des résultats indique l'effet significatif du facteur temps sur la solubilisation et par conséquent sur l'extraction de l'enzyme ($F = 46,14$ et $p = 0$). Cela correspond aux résultats d'Arantes *et al.* (2011) qui ont trouvé une durée optimale de 4 à 5 heures pour l'extraction de la manganèse-peroxydase produite par le champignon *Lentinula edodes* en FMS.

5.2.2. Avec la solution de NaCl à 3 %

L'effet de la durée de contact du substrat contenant l'enzyme avec la solution de NaCl à 3 %, ayant donné la meilleure activité parmi les différentes solutions d'extraction testées a été non significatif ($F = 0,48$ et $p = 0,48$), comme cela apparaît dans la **figure 39**. Dans l'intervalle de temps étudié, les valeurs de l'activité protéasique restent rapprochées. Cela correspond aux résultats de Díaz *et al.* (2007), dans leur étude de l'effet temps de contact dans l'intervalle 15 à 60 minutes. Ces auteurs n'ont pas trouvé d'effet significatif sur l'extraction de leurs enzymes.



5.3. Conclusion partielle

L'analyse des différents résultats obtenus dans cette partie, indique que parmi les différentes solutions, l'eau est la plus convenable des solvants qui puissent être utilisés pour l'extraction de la protéase. Une durée de contact de 4 heures permet d'obtenir 8,36 U/gms à partir du substrat humide. Ce taux d'activité est relativement proche de ce qui est obtenu après extraction par la solution de NaCl (8,79 à 8,93 U/gms). En outre, la présence du sel pourrait poser des problèmes lors de la purification de l'enzyme et aussi à l'échelle d'une production industrielle. En ce qui concerne le mode de conservation du substrat fermenté, soit par le mode de séchage ou le mode de congélation directe après fermentation, il est convenable de faire une évaluation du coût pour chacun des deux traitements dans la perspective du développement du procédé.

6. Caractérisation de la protéase neutre produite par *A. oryzae* 2220

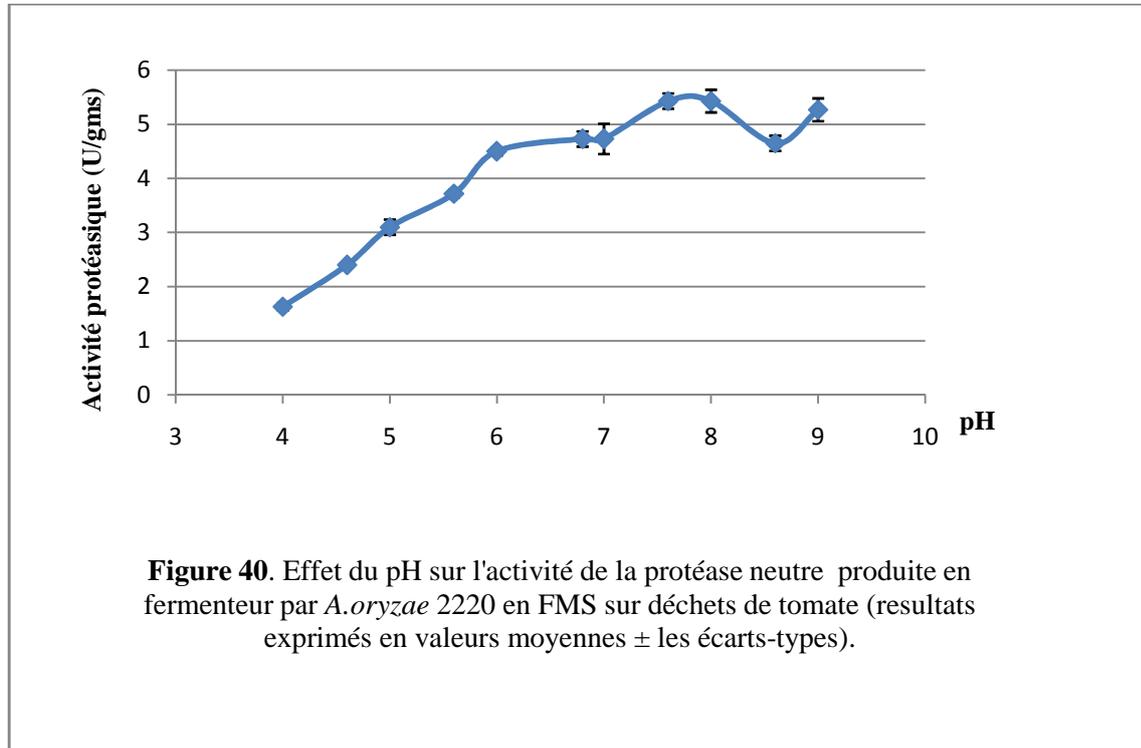
6.1. Effet du pH

Les résultats de l'action du pH sur l'enzyme indiquent une augmentation de l'activité protéasique dans l'intervalle étudié (**figure 40**). Le maximum catalytique est atteint entre les pH 7,6 et 8. Après une baisse de l'activité, une autre augmentation est constatée à pH 9. L'enzyme garde pratiquement le même niveau d'activité à partir du pH 6,8 jusqu'à pH 9. L'analyse de la variance montre un effet significatif de ce paramètre ($F = 116,6$ et $p = 0$).

Ces résultats correspondent à ceux obtenus par Sumantha *et al.* (2005) pour la protéase neutre d'*A.oryzae* 2217, Boulhafa-Lezzar (2010) pour la protéase neutre d'*A. oryzae* (Ahlburg) Cohen 1042.72 et Belmessikh (2011) pour la protéase neutre de la souche utilisée dans ce travail.

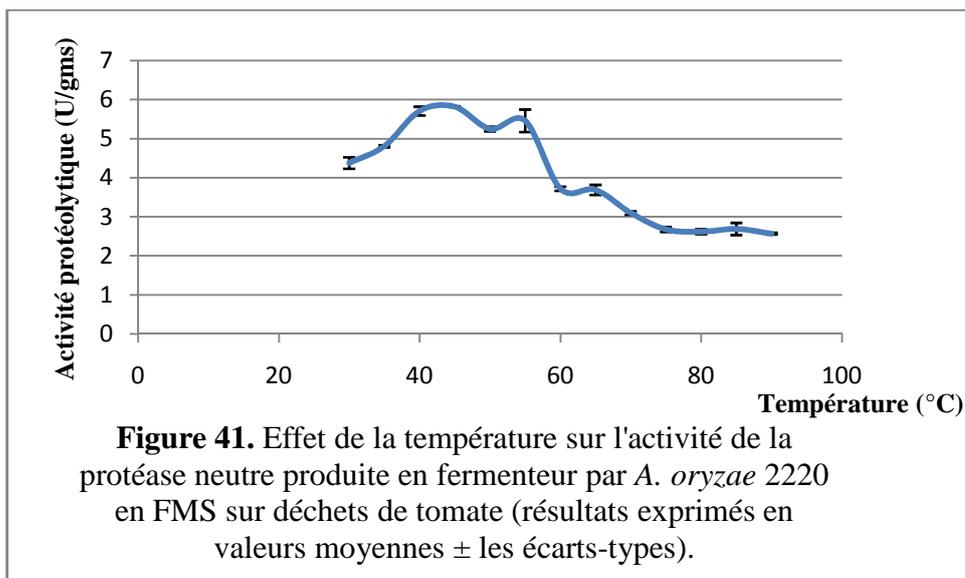
Tous ces travaux indiquent la présence de protéases neutre et alcaline. En effet, Les souches fongiques et notamment *A.oryzae*, sont connues pour leur production de protéase acide, neutre et alcalines en même temps dans les milieux de cultures (Botton *et al.*, 1990).

Ainsi, il est nécessaire de définir le pH optimal de la protéase produite, car des variations de ce paramètre affectent l'intégrité physique de la protéine enzymatique et peut conduire à sa dénaturation. Le pH peut aussi avoir un effet sur l'affinité de l'enzyme pour le substrat et son état d'ionisation dans le cas où des charges ioniques sont mises en jeu pour le déroulement de la réaction. Le pH optimal dépend de la nature des résidus d'acides aminés constituant le site actif (Pelmont, 1995).



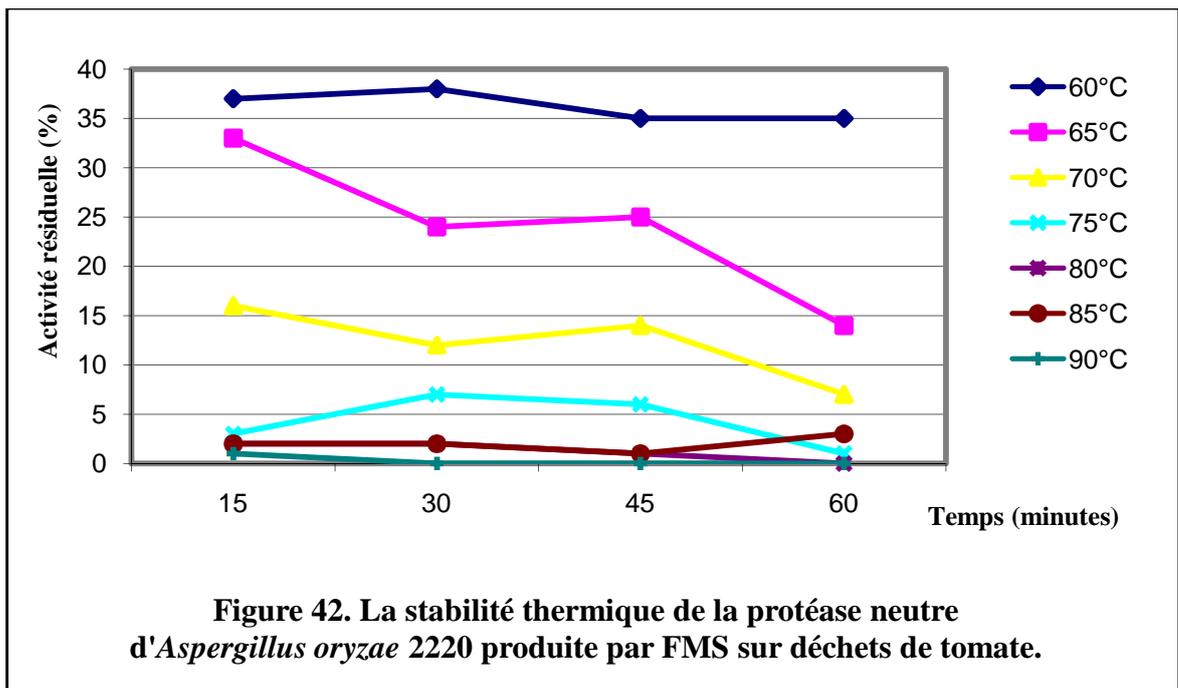
3.1.Effet de la température

Les résultats de l'effet de la température sur l'activité protéasique sont présentés dans la **figure 41**. Le maximum est obtenu à 45 °C. L'enzyme reste active jusqu'à la température 55 °C. Au-delà, une diminution de l'activité est observée suite à l'instabilité et la dénaturation de la protéine enzymatique. Ces résultats correspondent à ceux de Sumantha *et al.* (2005), de Boukhalifa-Lezzar (2010) et de Belmessikh (2011). La température est un facteur important dans la catalyse des transformations chimiques. En effet, elle augmente l'agitation des molécules et accroît la possibilité de contact entre les molécules. Dans le cas de réaction enzymatique, la température accélère la fréquence de collision entre le substrat et l'enzyme. Au-delà d'une certaine température, la protéine enzymatique va subir des modifications de sa structure tridimensionnelle, ce qui entraîne progressivement la perte de son activité (Cuvellier, 1999).



3.2. Stabilité thermique

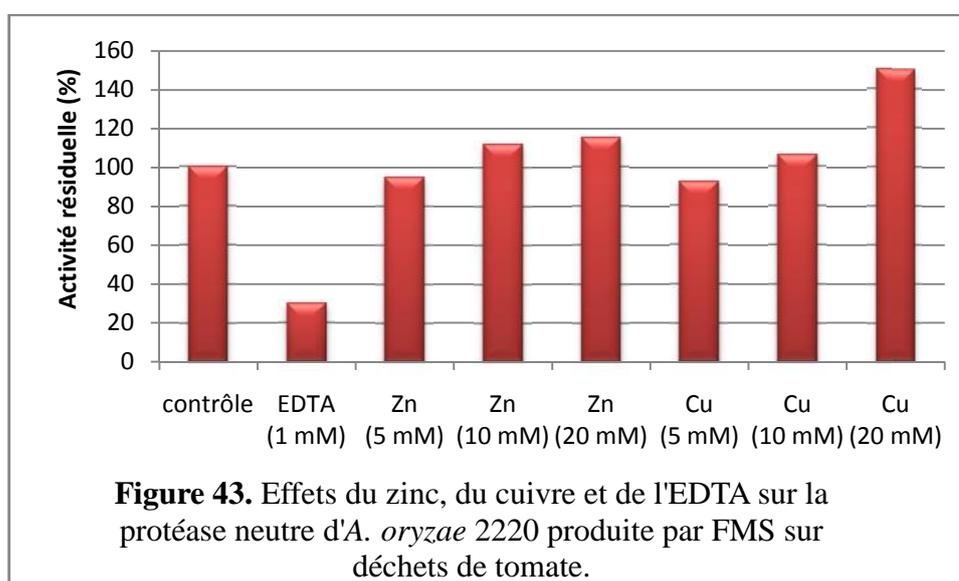
Les résultats de l'étude de la stabilité thermique sont regroupés dans la **figure 42**. Cette protéase présente une stabilité thermique reflétée par son activité résiduelle de 34 %, soit le 1/3 de l'activité totale, à 60°C après 60 minutes et de 25 %, le quart de l'activité totale, à 65°C après 45 minutes. Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Hajji *et al.* (2007) et García-Gómez *et al.* (2009), sur les protéases alcalines d'*Aspergillus clavatus* ES1 et d'*A. oryzae* 2095 respectivement. Cependant, à 70 °C l'activité résiduelle passe de 16 % après 15 minutes à 12 % après 45 minutes. L'enzyme se dénature presque totalement à température plus élevées. La vitesse à laquelle une enzyme se dénature à une certaine température est un moyen très pratique pour juger de sa stabilité. La dénaturation d'une protéine est mesurée par la perte de ses propriétés biologiques (Pelmont, 1995).



3.3. Effet de l'EDTA, du zinc et du cuivre

D'après la **figure 43**, l'EDTA à la concentration 1mM provoque une perte de 70 % de l'activité de la protéase neutre. Cet agent chélateur fixe les ions métalliques divalents et inhibe de ce fait la molécule enzymatique. Ce résultat confirme la présence d'un métal dans le site catalytique de cette protéase. Ces résultats sont déjà observés dans des travaux précédents Sumantha *et al.* (2005), Boukhalfa-Lezzar (2010) et Benkahoul *et al.* (2012).

Les cations du zinc et du cuivre exercent un effet positif sur l'activité de l'enzyme. Des augmentations de 12 % et de 15 % sont obtenues par les solutions de $ZnSO_4$ aux concentrations 10 et 20 mM respectivement. L'effet de l'activation est beaucoup plus important par la solution de $CuCl_2$ en particulier à la concentration 20 mM avec 50 % d'activité protéasique supplémentaire. Cet effet est mentionné par plusieurs auteurs Rao *et al.* (1998), Agrawal *et al.* (2005), Sumantha *et al.* (2005), Hajji *et al.* 2007, Boukhalfa-Lezzar (2010) et Benkahoul *et al.* (2012). L'ensemble de ces résultats indiquent l'état d'une protéase à métal.



4. Précipitation par le sulfate d'ammonium

Les résultats de la précipitation fractionnée de l'extrait enzymatique par le SA, sont regroupés dans le **tableau 23**. L'extrait brut contient plus de 1505 mg de protéines et 1120 U d'activité de la protéase neutre produite par *A. oryzae* 2220 par FMS sur déchets de tomate.

L'enzyme est purifiée 4 fois, dans la fraction 40-80 % de saturation en SA. Le rendement obtenu est de 30 %. Ce résultat est comparable à ceux rapportés dans la littérature : Sumantha *et al.* (2005) ont obtenu une purification de 3 fois la protéase neutre d'*A. oryzae* 2217, après une précipitation par le SA (sans indication de sa concentration). Chellappan *et al.* (2006) ont purifié de 10 fois la protéase alcaline d'*Engyodontium album* dans la fraction (40-90 %) de SA. Kumar *et al.* (2008) ont obtenu un taux de purification de 2,2 de la protéase produite par *Synergistes* sp. à 80 % de saturation par le SA. D'autres auteurs ont réalisé un fractionnement de l'extrait enzymatique par l'acétone. Les taux de purification obtenus sont de 1,6 et 2,6 pour les protéases alcalines d'*A. parasiticus* et *A. clavatus* ES1 respectivement (Tunga *et al.*, 2003 et Hajji *et al.*, 2007). Cependant, les solvants organiques sont dénaturants pour les protéines pour cela leur application est limitée.

Tableau 23 : Bilan de la précipitation au sulfate d'ammonium.

	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Taux de purification	Rendement (%)
Extrait brut	1505	1120	0.74	1	100
Précipitation au SA fraction (40-80 %)	120	337	3	4	30

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Le principal objectif de ce travail est la valorisation des sous-produits de la filière tomate transformée par FMS afin de produire une enzyme protéolytique d'origine fongique. Ce procédé permet d'exploiter toute la matière organique de ces déchets agro-industriels disponibles en grande quantité et jamais utilisés pour cet effet.

Dans la première étape, les déchets de tomate ont été analysés. Ils sont composés à plus de 52 % de fibres insolubles qui servent dans les cultures microbiennes par FMS à la fois de support et de nutriments pour les microorganismes. Cette composition donne au substrat une structure qui se maintient même après la stérilisation. Ces déchets sont également riches en protéines avec un taux de plus de 20%. De ce fait, ils sont considérés comme une matière riche en source azotée, ce qui favorise la synthèse d'enzymes. Ils répondent donc au besoin d'inducteurs, en particulier pour la production des protéases. En effet, l'inducteur peut être le substrat ou son analogue. Ainsi, son addition dans la cuve de fermentation peut multiplier par 1000 la production de l'enzyme. Les déchets de tomate contiennent un taux de 6,52% de cendres, ce qui représente aussi une quantité importante qui peut assurer l'apport en oligo-éléments nécessaires à toute culture microbienne. Par ailleurs, ces déchets, produits en été, peuvent être séchés à l'air libre sans aucune consommation d'énergie. Ils présentent un substrat riche en matière organique complexe et minérale très économique.

La deuxième partie a été consacrée aux choix des micro-organismes et à la mise au point du milieu de fermentation. Parmi les cinq souches d'*Aspergillus* cultivées en FMS sur déchets de tomate, en Erlenmeyers, deux souches *A. oryzae* 5777 et *A. oryzae* 2220 ont été sélectionnées pour la suite du travail. Ces deux champignons ont donné les activités protéasiques les plus importantes. L'augmentation du pH en fin de culture a confirmé le métabolisme des protéines. Les essais suivants ont été réalisés pour mesurer l'effet de différents paramètres pouvant affecter la production de l'enzyme. Parmi ces paramètres, le taux de l'humidité, le pH initial, l'âge de l'inoculum et la teneur en protéines ont eu des effets significatifs sur la production de la protéase neutre. Alors que les deux facteurs, le taux de spores et la taille des particules de substrat se sont révélés sans effet significatif sur la synthèse de l'enzyme. Ce dernier résultat paraît très intéressant, en effet les déchets de tomate sont composés de graines en petite taille présentant une large surface d'attaque microbienne ainsi que de pellicules de tailles variables permettant une meilleure aération et par conséquent

une bonne respiration pour le micro-organisme cultivé. Ce substrat se trouve encore économique puisque il est inutile de le broyer avant son utilisation dans les procédés en FMS.

Dans la troisième partie, la production de l'enzyme a été réalisée en bioréacteur « Fujiwara » équipé d'un dispositif d'aération, avec des quantités importantes de substrat. L'utilisation de ce bioréacteur a permis de créer des conditions de fermentations plus favorables au développement de la souche fongique utilisée et aussi à la production de la protéase.

Parmi les souches testées, *A. oryzae* 2220 est la plus rapide ; elle arrive à produire le maximum de la protéase en 72 h (3 jours), alors que *A. oryzae* 5777 le fait en 120 h (5 jours). Sachant que le facteur temps est très important pour une production à l'échelle industrielle, la première moisissure a été choisie pour la production de la protéase neutre.

Une nette amélioration de la production de la protéase est observée en réacteur. Cette production est non seulement plus rapide, mais aussi plus importante comparée aux résultats obtenus en Erlenmeyers. Pour la culture réalisée avec le substrat enrichi par la farine de soja, la synthèse de l'enzyme débute après 12 heures de culture pour atteindre un maximum de l'activité après 42 heures (plus de 12 U/gms). Le pH augmente aussi pour atteindre la valeur de 6,8 à la fin de la fermentation.

Une production remarquable a été obtenue après la fermentation des déchets de tomate sans apport d'une source de protéine additionnelle avec 13,55 U/gms, soit 12 % d'activité de plus par rapport à la fermentation avec supplémentation. Le pH augmente puis se stabilise entre 7,34 et 7,57 à partir de la 30^{ème} heure. Il ressort de cette étude que ce sous-produit est très adapté à la production d'enzymes protéolytiques en fermenteur par FMS, puisque il ne nécessite aucun enrichissement. La composition de ce substrat associée à une aération correcte stimule la production de la protéase neutre par la moisissure. Le système d'aération apporte l'oxygène nécessaire à la croissance et accélère l'élimination du dioxyde de carbone, produit du métabolisme défavorable à la moisissure. Il permet également de réguler la température en évitant une accumulation de la chaleur métabolique. Ceci améliore la croissance et conduit à une meilleure production d'enzymes. Le fermenteur utilisé permet également le séchage du substrat fermenté en fin de culture. L'enzyme peut donc être conservée sous cette forme à température ambiante pour les diverses utilisations ultérieures.

Dans la suite de ce travail, l'extraction de l'enzyme a été réalisée à partir de deux types de substrat fermenté, le substrat séché et le substrat humide congelé. Parmi les solvants d'extraction étudiés, le maximum de l'activité est obtenu avec une solution de NaCl à la concentration de 3 % (w/v). L'eau osmosée, la plus économique des solvants, donne également de bonnes valeurs d'activité. Les résultats ont montré que le substrat humide permettait d'obtenir plus d'unités de la protéase neutre produite par *A. oryzae* 2220 que le substrat sec.

L'effet de la durée de contact du substrat fermenté avec l'eau a montré que plus le substrat fermenté reste en contact avec le solvant, plus il permet d'augmenter l'activité protéasique récupérée. Pour le substrat humide, la durée est de 4 heures ; elle est plus courte que celle nécessaire à la solubilisation du substrat sec. Pour ce dernier, l'activité maximale est obtenue après 7 heures d'agitation. Cela est évident puisque le substrat contenant l'enzyme a été complètement déshydraté.

En dernière partie, l'étude des propriétés de l'enzyme vis-à-vis du pH, de la température et aussi de quelques ions a été réalisée. Une augmentation de l'activité protéasique avec le pH a été constatée, le maximum atteint se situe entre les valeurs de pH 7,6 et 8. L'enzyme a gardé pratiquement le même niveau d'activité à partir du pH 6,8 jusqu'à pH 9. D'autre part, la température optimale d'activité a été mesurée à 45°C ; celle-ci garde environ le même niveau catalytique jusqu'à la température de 55°C. La protéase a présenté une stabilité thermique de 25 % d'activité résiduelle à 65°C après 45 minutes, soit le quart de l'activité totale, et de 34 % à 60°C après 60 minutes, soit le tiers de l'activité totale. D'après l'étude de l'effet de l'EDTA sur l'activité enzymatique, une inhibition de 70 % a été observée, alors que les cations divalents du zinc et du cuivre activent l'enzyme. Cela met en évidence une structure métalloprotéasique de l'enzyme. L'enzyme a été purifiée 4 fois par le SA et ce dans la fraction 40-80 %. Le rendement de cette séparation est de 30 %, comparable à de nombreux résultats de la précipitation fractionnée de certaines protéases.

Cette thèse présente la mise au point d'un procédé en FMS pour la production à l'échelle pilote d'une enzyme ayant un intérêt technologique. Ces résultats mettent en relief l'intérêt de recycler les déchets de tomate industrielle par ce type de fermentation pour la production d'une protéase neutre fongique à un niveau élevé et à moindre coût.

En perspectives, il serait souhaitable de :

- ✓ Poursuivre l'optimisation du milieu et d'étudier les paramètres ayant des effets sur le système qui améliorent la production.
- ✓ Poursuivre la séparation de l'enzyme en fonction de l'utilisation envisagée.
- ✓ Réaliser des tests d'application de l'enzyme (tannerie, détergents, etc) comparativement à des protéases commerciales.
- ✓ Recherche d'autres activités enzymatiques dans le même extrait telles que les cellulases, les xylanases, les pectinases et les lipases, ainsi que d'autres métabolites.

RÉSUMÉS

Abstract

Agro-industrial residues are rich in organic matter. This makes such wastes very appropriate for transformation by biotechnological processes. Among these, the solid-state fermentation (SSF) have renewed interest worldwide because they provide significant production of various substances compared to submerged cultures. Thus, the objective of this thesis is the use of tomato waste in SSF for production of fungal protease. This substrate is composed of more than 52 % of insoluble fiber, more than 20 % of proteins, 6.52 % ash, and other organic materials. This composition is used in this type of fermentation as support and nutrients for the microorganism and covers the requirements for inducing production of proteases. Among five strains of *Aspergillus* grown on tomato pomace SSF in Erlenmeyer flasks, two strains were selected for the development of culture conditions, *A. oryzae* 5777 and *A. oryzae* 2220. The study of various parameters on neutral protease production gave a significant effect of moisture, initial pH, age of inoculum and protein content. Two factors (spores rate and particle size) were found no significant effect on enzyme synthesis. The fermentations performed on a pilot scale by *A. oryzae* strain 2220, at 50 % initial moisture of substrate and the enrichment of soy flour in an amount of 15 mg / g of substrate, more than 12 U / gds is achieved after 42 hours. Culture with tomato pomace without adding additional protein source allows higher production with 12 % more activity, of 13.55 U / gds. Among the solutions studied for protease extraction, the 3% NaCl (w / v) gives the maximum activity. The results also showed that the wet fermented substrate provides more neutral protease relative to the dry substrate. The effect of the contact time of the fermented substrate with water gave a maximum activity after stirring for 4 hours with the wet substrate and after 7 hours for the dry one. On the other hand, the pH between 7.6 and 8 and a temperature of 45 ° C allow to obtain maximum catalyst activity. The enzyme retains this activity until a temperature of 55 ° C. The produced protease has a residual activity of 25 % at 65 ° C after 45 minutes and 34 % at 60 ° C after 60 minutes; it is inhibited at 70% by EDTA and activated by divalent cations of zinc and copper. This indicates that it is a metallo-protease. The enzyme was purified 4-fold by SA precipitation in the 40-80% fraction. The efficiency of this separation is 30%. These results show the potential of tomato pomace as a culture substrate for protease production by SSF. This would make it very economical synthesis and could meet the demand of growing market for this group of hydrolases with very diverse technological interests

Key-words: Agro-industrial residues, tomato pomace, solid-state fermentation (SSF), proteases, *Aspergillus oryzae*, optimization.

نفايات الزراعة غنية العضوية، يمكن سترجاعها معالجتها العمليات البيوتكنولوجية من بينها طريقة (SSF) حيث الاهتمام بها جميع لأنها كبير الطماطم عن طريقSSF أنزيم البروتيد الهدف هذه هو

ون هذه النفايات بأ 52 % ألياف غير 20 % بروتين 6.52 % عضوية يتم هذه التركيبة هذا الميكرو المغذية الحية الدقيقة مع تغطية البروتيا . بين *Aspergillus* نفايات *A.oryzae* 2220 إن حوجلات ية اختيار ين وسط التخمر سمحت بالتعرف علي البروتين (عدد الجراثيم جسيمات لا تأثير لها تخليق الإنزيم . عملية تخمير تجريبي *A. oryzae* 2220 في وسط دو أولي 50 % دقيق الصويا بمقدار 15 / يتحق المزيد إنزيم 12 U /gds 42 . عملية تخمير نفايات بروتين بالحصول علي 12 % بين 13.55U/ gds الم البروتيد فان كلوريد الصوديوم 3 % (w/v) وأظهرت أيضا البروتيد المتعادلة مقارنة مع للمادة المخمرة. تأثير مدة بين 4 7 8 7.6 مئوية أدت إلى 45 مئوية يحتفظ هذا نزيم بنشا ه مئوية نسبة بروتيد هي 25 % 65 مئوية 45 دقيقة 34 % 60 مئوية بعد 60 دقيقة ينشط نشاط الأنزيم 70 % بواسطة EDTA يحفز باكتيونات الثلاثي هذا يدل الأنزيم هو بروتيد . تنقية هذا نزيم 40-80 SA هذا الفصل ه 30 . المتحصل عليها تدل على نفايات ها كوسط نمو في بيئة صلبة البروتيد . هذا شأنه يجعل ي اقتصادية للغاية يمكن تلبية المتزايد ا له الهيدرولاز المعروفة بالفوائد التكنولوجية المتنوعة .

الكلمات المفتاحية: نفايات الزراعة (SSF) ؛ أنزيم البروتيد *Aspergillus oryzae* تحسين

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdullah A. L., Tengerdy R.P., Murphy V. G. (1985). Optimization of solid state fermentation of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 20-27.
- Abdeshahian P., Samat N., Wan Yusoff W. M. (2009). Xylanase production by *Aspergillus niger* FTCC 5003 using palm kernel cake in fermentative bioprocess. *Pak. J. Biol. Sci.*, 12: 1049-1055.
- Abidi F., Limam F., Nejib M.M. (2008). Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials : assay as biodetergent. *Process Biochem.* 43 : 1202-1208.
- Adesh K., Archana S., Balasubramanyam, Lata. S.AK. (2002). Optimization of conditions for production of neutral and alkaline protease from species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Ind. J. Microbiol.* 42 : 233-6.
- Aehle W. (2007). *Enzymes in industry: Production and applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim.
- Agrawal D., Patidar P., Banerjee T., Patil S. (2005). Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition : parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Process Biochem.* 40: 1131-1136.
- Aikat K., Bhattacharyya B.C. (2000). Optimization of some parameters of solid state fermentation of wheat bran for protease production by a local strain of *Rhizopus oryzae*. *Acta Biotechnol.* 20 : 149-159.
- Al-Wandawi H., Abdul-Rahman M., Shaikhly K. (1985). Tomato processing wastes as essential raw material sources. *J. Agric. Food Chem.* 33: 804-807.
- AMFEP (2013). List of enzymes. Association of manufacturers and formulators of enzyme products. <http://www.amfep.org/list.html>. visité le 14 fevrier 2013.
- Anisha G. S., Rojan P.J., Prema P., Pandey A. (2010). Investigation on α -galactosidase production by *Streptomyces griseoloalbus* in a forcefully aerated packed-bed bioreactor operating in solid-state fermentation condition. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160: 421-427.
- Anisha G.S., Rojan P.J., Nicemol J., Niladevi K.N., Prema P. (2008). Production and characterization of partially purified thermostable α -galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus* for food industrial applications. *Food Chemistry* 111: 631–635.
- Anson M.L. (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-89.
- Arantes V., Silva E.M., Milagres A.M.F. (2011). Optimal recovery process conditions for manganese-peroxidase obtained by solid-state fermentation of

- eucalyptus residue using *Lentinula edodes*. *Biomass and Bioenergy* 35: 4040-4044.
- Assi J.A., King A.J. (2007). Assessment of selected antioxidants in tomato pomace subsequent to treatment with the edible oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, under solid-state fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 55: 9095-9098.
- Auria R., Morales M., Villegas E., Revah S. (1993). Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 1007-1013.
- Avelino A., Teixeira Avelino H., Carlos Roseiro J., Amaral Collaço M.T. (1997) Saccharification of tomato pomace for the production of biomass. *Bioresour. Technol.* 61 : 159-162.
- Barrios-González J. (2012). Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and Applications. *Process Biochem.* 47: 175-185.
- Barrios-González J., Mejía A. (2008). Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. Pp. 302-336. *In* : Pandey A., Soccol C.R. and C. Larroche (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, India
- Basu B. R., Banik A. K., Das M. (2008). Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB₁₀₀ grown on fish scale. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 449-455.
- BCC Research. (2013). FOD020C-World markets for fermentation ingredients. www.bccresearch.com. Visité en février, 2013.
- Bellon-Maurel V., Orliac O., Christen P. (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochem.* 38: 881- 896.
- Belmessikh A. (2011). Optimisation de la production de la protease neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Thèse de Magister. Université Constantine1.
- Belmessikh A., Boukhalfa H., Mechakra-Maza A., Gheribi-Oulmi Z., Amrane A. (2013). Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 44: 377-385.
- Benakmoum A., Abbeddou S., Ammouche A., Kefalas P., Gerasopoulos D. (2008). Valorization of low quality edible oil with tomato peel waste. *Food Chemistry.* 110: 684-690.
- Benkahoul M., Mechakra A., Boukhalfa H. (2012). Caractéristiques de la métalloprotéase produite par *Aspergillus oryzae* sur déchets d'oranges. *Sciences et Technologie C.* 35 : 50-54.

- Bergougnot V., (2013). The history of tomato: From domestication to biopharming. J. Biotechnol. Adv., <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.003>
- Bhanu Prakash G.V.S., Padmaja V., Siva Kiran R.R. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. Bioresour. Technol. 99: 1530–1537.
- Bhatnagar D., Joseph I., Paul Raj R. (2010). Amylase and acid protease production by solid state fermentation using *Aspergillus niger* from mangrove swamp. Indian J. Fish., 57(1): 45-51.
- Blanc P., Goma G. (2006). Valorisation non alimentaires de productions agricoles par voie biologique. Pp. 79-98. In : Colonna P. (Ed.), *la chimie verte*. Lavoisier, France.
- Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Ghauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2^e édition. Masson. Paris.
- Bouix M., Leveau J.Y. (1999). Origine microbienne. Pp.350-363. In : Scriban R. (Ed.), *Biotechnologie*. 5^e edition. Technique et Documentation. Paris, France.
- Boukhalfa-Lezzar H. (2010). Valorisation des sous-produits de la filière tomate transformée. EUE. Sarrebruck, Allemagne.
- Bramorski A., Christen P., Ramirez M., Soccol C.R., Revah S. (1998a). Production of volatile compounds by fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates. Biotechnology Letters. 20:359-362.
- Bramorski A., Soccol C.R., Christen P., Revah S. (1998b). Fruit aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in static cultures from solid agro-industrial wastes. Revista de Microbiologia. 28: 208-212.
- Cahagnier B., Richard-Molard D. (1998). Analyses mycologiques. Pp. 140-155. In: Cahagnier B. (Ed.), *Moisissures des aliments peu hydrates*. Technique & Documentation Lavoisier, Paris, France.
- Carvalho F., Carlos Roseiro J., Amaral Collaço M.T. (1994). Biological conversion of tomato pomace by pure and mixed fungal cultures. Process Biochem. 29: 601-605.
- Carvalho J.C., Soccol C.R., Babitha S., Pandey A., Woiciechowski A.L. (2008). Production of pigments. Pp. 337-355. In: Pandey A., Soccol C.R., C. Larroche (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, India.
- Castro R.J.S., Sato H.H. (2013). Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: an evaluation of the physical-chemical

parameters using agroindustrial wastes as supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.12.002>.

- Chakraborty R., Srinivasan M., Sarkar S.K., Raghvan K.V. (1995). Production of acid protease by a new *Aspergillus niger* by solid substrate fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 17-30.
- Chancharoonpong C., Hsieh P.C., Sheu S.C. (2012). Enzyme Production and Growth of *Aspergillus oryzae* S. on Soybean Koji Fermentation. *APCBEE Procedia.* 2: 57 – 61.
- Chellapan S., Jasmin C., Basheer S. M., Elyas K.K., Bhat S.G., Chandrasekaran M. (2006). Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochem.* 41 : 956-961.
- Chen H., Qin L., Li H. (2014). Influence of Forced Internal Air Circulation on Airflow Distribution and Heat Transfer in a Gas Double-dynamic Solid-state Fermentation Bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172: 2218–2226.
- Chiu Y. T., Chiu C. P., Chien J. T., Ho G. H., Yang J., Chen B. H. (2007). Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly (-glutamic acid) as carrier. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5123-5130.
- Choudhari S. M., Ananthanarayan L. (2007). Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chemistry.* 102: 77-81.
- Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y., Srinophakun P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83: 1012-1018.
- Couto S.R., Sanromán Ma. . (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering* 76 : 291–302.
- Cuvellier G.F., Bouix M., Leveau J.Y. (1999). Production des enzymes. Pp. 343-363. *In* : Scriban R. (Eds), *Biotechnologie*. Technique & Documentation Lavoisier, Paris, France.
- Cuvellier G.F. (1999). Enzymologie et biocatalyse. Pp. 317-341. *In*: Scriban R. (Eds), *Biotechnologie*. Technique & Documentation Lavoisier, Paris, France.
- D'íaz A.B., Caro I., de Ory I., Blandino A. (2007). Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme Microb. Technol.* 41: 302–306.
- Demain A., Solomon N. (1981). La microbiologie industrielle. Pour la science. Novembre : 14-24.
- Djama Y. (2013). L'Algérie peut atteindre l'autosuffisance en tomate industrielle dans 5 ans (Laid Benamor). www.maghrebemergent.com/economie/algérie. (visité en novembre, 2013).

- Do Rosario Freixo M., Karmali A., Arteiro J.M. (2008a). Production of polygalacturonas from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and its chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 475-484.
- Do Rosario Freixo M., Karmali A., Frazao C., Arteiro J.M. (2008b). Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. *Process Biochem.* 43: 1265-1274.
- Duchiron F., Copinet E. (2011). Fermentation en milieu solide (FMS). *Techniques de l'ingénieur.*
- Durand A. (1998). La fermentation en milieu solide. *Biofutur.* 181: 41-43.
- Durand A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 13: 113-125.
- Dutt K., Gupta P., Saran S., Misra S., Saxena R. K. (2009). Production of milk-clotting protease from *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 158 (3): 761-772.
- Elibol M., Moreira A.R. (2005) Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation. *Process Biochem.* 40: 1951-1956.
- Ellaiah P., Adinarayana K., Bhavani Y., Padmaja P., Srinivasulu B. (2002). Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochem.* 38: 615- 620.
- Elliott J., Mulvihill E., Duncan C., Forsythe R., Kritchevsky D. (1981). Effects of tomato pomace and mixed-vegetable pomace on serum and liver cholesterol in rats. *J. Nutr.* 111: 2203-2211.
- Ellouz Y., Bayouhd A., Kammoun S. Gharsallah N., Nasri M. (2001). Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on Sardinelle heads and viscera flour. *Bioresour. Technol.* 80: 49-51.
- Fakas S., Certik M., Papanikolaou S., Aggelis G., Komaitis M., Galiotou-Panayotou M. (2008). -Linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. *Bioresour. Technol.* 99: 5986-5990.
- Fan L., Soccol C.R., Pandey A. (2008). Mushroom production. Pp.253-274. *In* : Pandey A., Soccol C.R., C. Larroche (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, India.
- Fazouane-Naimi F., Mechakra A., Abdellaoui R., Nouani A., Magagi Daga S., Marou Alzouma A., Gais S., Pennicks M.J. (2010). Caractérisation and cheese-making properties of rennet-like enzyme produced by a local Algerian isolate of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnol.* 24:1-12.

- Fava, F., Totaro, G., Diels, L., Reis, M., Duarte, J., Carioca, O.B., Poggi-Varaldo, H.M., Ferreira, B.S. (2013). Biowaste biorefinery in Europe: opportunities and Research & Development needs, *New Biotechnology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2013.11.003>
- Favela-Torres E., Cordova-López J., García-Rivero M., Gutiérrez-Rojas M. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochem.* 33(2): 103-107.
- Feron G., Bonnarme P., Durand A. (1996). Prospects for the microbial production of food flavours. *Trends in Food Science & Technology.* 7: 285-293.
- García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragan L.A. (2009). Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry.* 112: 604-608.
- Garg V.K., Gupta R., Yadav A. (2008). Potential of vermicomposting technology in solid waste management. Pp.468-511. *In* : Pandey A., Soccol C.R. and C. Larroche (Eds.), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, India.
- Garrett R.H., Grisham C.M. (2000). *Biochimie*. DeBoeck Université.Google livres: <http://books.google.dz/books> . Visité en mai, 2013.
- Giovannozzi-Sermanni G., Tiso N. (2008). Aspects of design of bioreactors in SSF. Pp. 117-144. *In*: Pandey A., Soccol C. R., C. Larroche (Eds.), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, India.
- Goursaud J., Cuvellier G.F. (1999). Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. Pp. 365-409. *In* : Scriban R. (Eds), *Biotechnologie*. Technique & Documentation, Paris, France.
- Gripón J.C. (1985). Les enzymes protéolytiques des industries laitières. Pp. 239-278. *In* : Mouranche A. et Costes C (Eds.), *Hydrolases et dépolymérasés : Enzymes d'intérêt industriel*. Bordas, Paris, France.
- Guérard F. (2009). Valorisation des biomasses: l'or des coproduits. *Biofutur.* 301: 39-41.
- Guillou M. (2006). Introduction. Pp. 1-8. *In*: Colonna P. (Ed.), *la chimie verte*. Lavoisier, France.
- Hajji M., Kanoun S., Nasri M., Gharsallah N. (2007). Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochem.* 42: 791-797.
- Hajji M., Rebai A., Gharsallah N., Nasri M. (2008). Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79: 915-923.

- Hoogschagen M., Zhu Y., As H., Tramper J., Rinzema A. (2001). Influence of wheat type and pretreatment on fungal growth in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters* 23: 1183–1187.
- Iandolo D., Piscitelli A., Sannia G., Faraco V. (2011). Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163: 40-51.
- Imandi S.B., S.R. Bandaru V.V.R., Somalanka S.R., Bandaru S.R., Garapati H.R. (2008). Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. *Bioresour. Technol.* 99: 4445–4450.
- Irfan M., Rauf A., Syed Q., Nadeem M., Baig S. (2011). Exploitation of different agro-residues for acid protease production by *Rhizopus* sp. in koji fermentation. *IJAVMS*, 5(1): 43-52.
- Joyeaux A. (1982). Les préparations industrielles d'enzymes. Pp. 23-46. *In* : Durand G. et Monsan P. (Eds). *Enzymes : production et utilisations industrielles*. Bordas, Paris, France.
- Kaur D., Wani A.A., Oberoi D. P. S., Sogi D.S. (2008). Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology. *Food Chemistry* 108:711–718.
- Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 345-51.
- Kramer A., Kwee W. H. (1977a). Functional and nutritional properties of tomato protein concentrates. *J. Food Sci.* 42: 207-211.
- Kramer A., Kwee W.H. (1977b). Utilization of tomato processing wastes. *J. Food Sci.* 42: 212-215.
- Krishna C. (2005). Solid-state fermentation systems_ an overview. Pp. 1-30. *In* : *Critical reviews in biotechnology.* 25. Taylor & Francis inc.
- Krishna C., Nokes S. E. (2001). Influence of inoculums size on phytase production and growth in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. *Trans. ASAE.* 44: 1031-1036.
- Kumar A.G., Swarnalatha S., Sairam B., Sekaran G. (2008). Production of alkaline protease by *Pseudomonas aeruginosa* using proteinaceous solid waste generated from leather manufacturing industries. *Bioresour. Technol.* 99: 1939-1944.
- Labeille P. (1997). Production de glucoamylases par *Aspergillus niger* avec un procédé de fermentation du son de blé en milieu solide. Application à l'hydrolyse des farines de blé destinées à la production d'éthanol. Thèse de doctorat. Université de Reims, Champagne-Ardenne, France.

- Larpen-Gourgaud M., Sanglier J.J. (1992). *Biotechnologies. Principes et méthodes.* Doin. Paris.
- Larroche C., Desfarges C., Gros J.B. (1986). Spore production of *Penicillium roqueforti* by simulated solid state fermentation. *Biotechnology Letters.* 8 (6): 453-456.
- Laurent J. (1982). Les méthodes de purification d'enzymes. Pp. 47-80. *In: Durand G., Monsan P. (Eds). Enzymes Production et Utilisations industrielles.* Bordas, Paris, France.
- Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I., Limam F. (2009). Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 531-537.
- Li Q., Yi L., Marek P., Iverson B. L. (2013). Commercial proteases: present and future. *FEBS Lett.* 587 (8):1155-63.
- Lonsane B.K., Ghildyal N.P., Budiatman S., Ramakrishna S.V. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 7: 258-265.
- Machado C.M.M., Soccol C.R. (2008). Gibberellic acid production. Pp. 279-301. *In: Pandey A., Soccol C.R., C. Larroche (Eds), Current developments in solid-state fermentation.* Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, India.
- Mahajan R.T., Badgujar S.B. (2010). Biological aspects of proteolytic enzymes. *Journal of Pharmacy Research.* 3(9): 2048-2068.
- Mahanta N., Gupta A., Khare S.K. (2008). Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresour. Technol.* 99: 1729–1735.
- Mamma D., Kourtoglou E., Christakopoulos P. (2008). Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresour. Technol.* 99: 2373-2383.
- Mechakra A., Auberger B., Remeuf F., Lenoir J. (1999). Optimization d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Alim.* 19 : 663-675.
- Meena P., Tripathi A. D., Srivastava S. K., Jha A. (2013). Utilization of agro-industrialwaste (wheatbran) for alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* in SSF using Taguchi (DOE) methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 2:210–216.
- Merheb C. W., Cabral H., Gomes E., Da-Silva R. (2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chem.* 104: 127-131.

- Mirabella N, Castellani V, Sala S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*. 65: 28-41.
- Monsan P. (2012). Valorisation biologique des agroressources. Pp. :253-276. *In* : Minh-Thu Dinh-Audouin, Danièle Olivier et Paul Rigny (Eds.), *La chimie et la nature*, EDP Sciences, France.
- Mouranche A. (1985). Mode d'action des hydrolases. Pp. 13-44. *In* : Mouranche A. et Costes C (Eds.), *Hydrolases et dépolymérase: Enzymes d'intérêt industriel*. Bordas, Paris, France.
- Mukherjee A.K., Adhikari H., Rai S. K. (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrical* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal* 39: 353–361.
- Naga J.P., Raju S.S. (2010). Optimal production of thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* (NCIM 2724) using wheat bran and rice bran. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*. 12(2): 439-444.
- Narahara H., Koyama Y., Yoshida T., Pichangkura S., Ueda R., Taguchi H. (1982). Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.* 60 (4): 311-319.
- Neves M.A., Kimura T., Shimizu N., Shiiba K. (2006). Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour. *Brazilian Archives of Biology and Thechnology*. 49 (3): 481-490.
- Østergaard L. H., Olsen H. S. (2010). Industrial applications of fungal enzymes. Pp. 269-290. *In*: Hofrichter M. (Ed.), *The mycota*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Panda B.P., Javed S., M. Ali. (2010). Production of angkak through co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 757-764.
- Pandey A. (1991). Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 37: 169-172.
- Pandey A., Larroche C., Soccol C.R. (2008). General considerations about solid-state fermentation. pp.13-25. *In* : Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, India.
- Pasupuleti V.K., Braun S. (2010). State of the art manufacturing of protein hydrolysates. Pp.11-31. *In*: Pasupuleti V.K., Demain A.L.(eds.), *Protein hydrolysates in biotechnology*. Springer Science+Business Media, New York, USA.

- Pelmont J. (1995). *Enzymes : catalyseurs du monde vivant*. Presse universitaire de Grenoble.
- Porcel E., Lopez J., Ferron M., Perez J., Sanchez J., Chisti Y. (2006). Effects of the sporulation conditions on the lovastatin production by *Aspergillus terreus*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 29: 1-5.
- Prakasham R.S., Subba Rao Ch., Sarma P.N. (2006). Green gram husk- an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 97: 1449-1454.
- Raghavarao K.S.M.S., Ranganathan T.V., Karanth N.G. (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 127-135.
- Ramachandran S., Fontanille P., Pandey A., Larroche C. (2007). Spores of *Aspergillus niger* as reservoir of glucose oxidase synthesized during solid-state fermentation and their use as catalyst in gluconic acid production. *Letters in Applied Microbiology.* 44: 155-160.
- Ramachandran S., Fontanille P., Pandey A., Larroche C. (2008a). Stability of glucose oxidase activity of *A.niger* spores produced by solid-state fermentation and its role as biocatalyst in bioconversion reaction. *Food Technology and Biotechnology.* 46(2): 190-194.
- Ramachandran S., Larroche C., Pandey A. (2008b). Production of spores. *In* : Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, 230-252.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597-635.
- Rawashdeh R., Saadoun I., Mahasneh A. (2005). Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace. *African J. Biotechnol.* 4: 251-255.
- Richard H. (1988). Le genie enzymatique. *In*: Scriban R. (Eds), *Biotechnologie. Technique et Documentation*, Lavoisier, Paris, France. Pp. 333-388.
- Rivière J. (1975). *Les applications industrielles de la microbiologie*. Masson et Cie, Paris.
- Rodríguez Couto S. (2008). Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnol. J.* 3: 859-870.
- Rodriguez-Leon J., Soccol C.R., Pandey A., Rodriguez D.E. (2008). Factors affecting solid-state fermentation. *In* : Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, 26-47.

- Rose A. (1981). La production des aliments et des boissons. Pour la Science. Pp.120-130.
- Roukas T. (2005). Citric acid and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 25: 298-304.
- Roy R. V., Das M., Banerjee R., Bhowmick A. K. (2006). Comparative studies on rubber biodegradation through solid-state and submerged fermentation. Process Biochem. 41: 181–186.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochem. 40: 2689-2694.
- Sebillotte C. (2002). Autonomie en protéines et développement durable dans l'union européenne. Séminaires d'échange agriculteurs-chercheurs, Paris, 26-27 novembre. www7.inra.fr/dpenv/pdf/sebilld24.pdf.
- Shankar S.K., Mulimani V.H. (2007). -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. Bioresour. Technol. 98: 958–961.
- Shao D, Atungulu G G, Pan Z, Yue T, Zhang A, Fan Z. (2013). Characteristics of Isolation and Functionality of Protein from Tomato Pomace Produced with Different Industrial Processing Methods. Food Bioprocess Technol. DOI 10.1007/s11947-013-1057-0
- Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances 19: 627-662.
- Sicard P. (1982). Applications industrielles des enzymes. pp.121-164. In : Durand G., Monsan P. (Eds), *Les enzymes : Production et utilisations industrielles*. BORDAS. Paris.
- Singh O.V., Jain R.K., Singh R.P. (2003). Gluconic acid production under varying fermentation conditions by *Aspergillus niger*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 78: 208-212.
- Singh S.K., Szakacs G., Soccol C.R., Pandey A. (2008). Production of enzymes. pp. 181-204. In : Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi.
- Singhania R.R., Patel A. K., Soccol C.R., Pandey A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. Biochem. Eng. J. 44: 13-18.
- Smits J.P., Sonsbeek H.M., Rinzema A., Tramper J. (1998). Solid-state fermentation- A mini review. Agro. Food Industrial Hi-Technology 9: 29-36.
- Soccol C.R., Medeiros A. BP., Vandenberghe L. PS., Soares M., Pandey A. (2008b). Production of aroma compounds. Pp.356-376. In : Pandey A., Soccol C.R.,

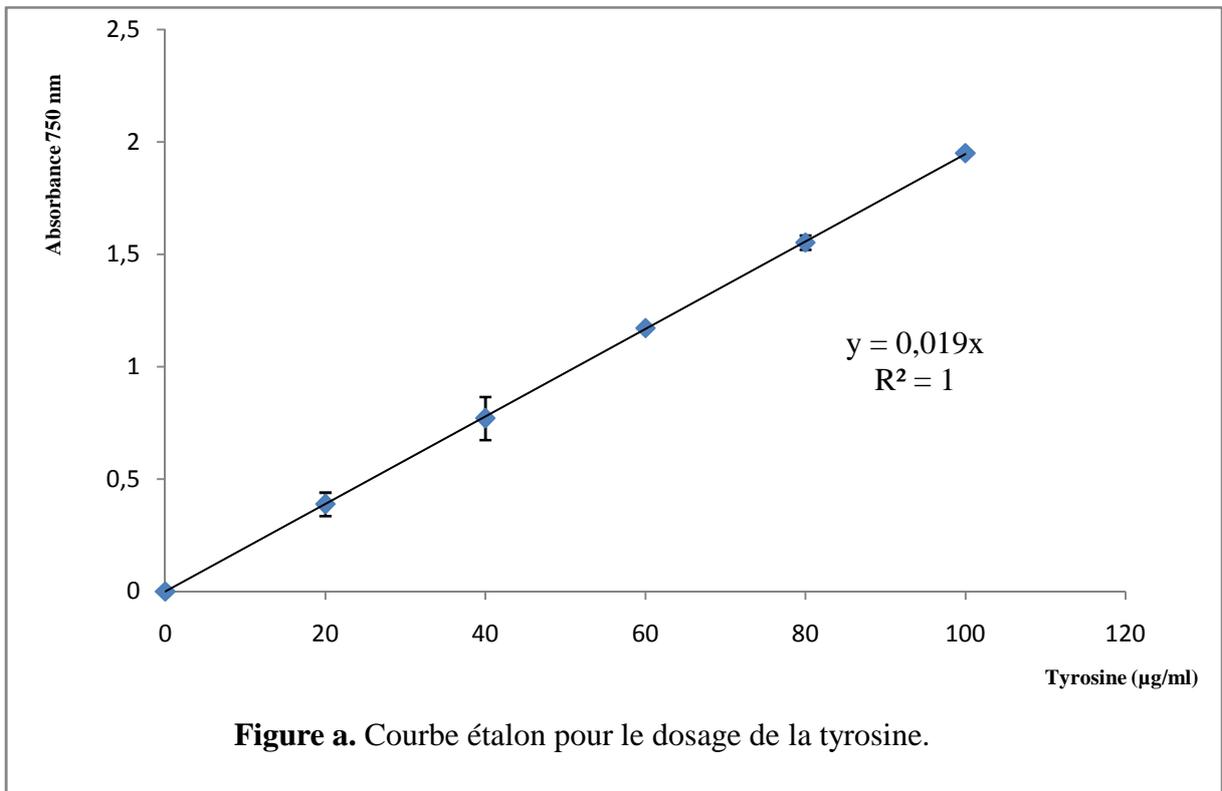
- Larroche C. (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi.
- Soccol C.R., Vandenberghe L. P. S. (2003). Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 205–218.
- Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Rodrigues C., Medeiros A.B.P., Larroche C., Pandey A. (2008a). Production of organic acids by solid-state fermentation. pp. 205-229. *In*: Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi.
- Sogi D S, Arora M S, Garg S K, Bawa A S. (2002). Fractionation and electrophoresis of tomato waste seed proteins. *Food Chemistry*. 76: 449-454.
- Sogi D S, Bhatia R, Garg S K, Bawa A S. (2005). Biological evaluation of tomato waste seed meals and protein concentrate. *Food Chemistry*. 89: 53-56.
- Sparringa R. A., Owens J.D. (1999). Causes of alkalization in tempe solid substrate fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 677-681.
- Stredansky, M., Conti E., Navarini, L., Bertocchi, C. (1999). Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. *Process Biochem.* 34: 11-16.
- Sukumaran R.K., Singhanian R.R., Mathew G.m., Pandey A. (2009). Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, 34: 421–424.
- Sumantha A., Sandhya C., Szakacs G., Soccol C.R., Pandey A. (2005). Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 43: 313-319.
- Thanapimmetha A., Luadsongkram A., Titapiwatanakun B., Srinophakun P. (2012). Value added waste of *Jatropha curcas* residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. *Industrial Crops and Products*. 37: 1– 5.
- Thomas L., Larroche C., Pandey A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>.
- Tsatsaronis G.C., Boskou D.G. (1975). Amino acid and mineral salts content of tomato seed and skin waste. *J. Sci. Food Agric.* 26: 421-423.
- Tunga R., Banerjee R., Bhattacharyya B.C. (1999). Studies of some physical parameters for large scale protease production by SSF. *Bioprocess Eng.* 21: 107-112.
- Tunga R., Banerjee R., Bhattacharyya B.C. (1998). Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. *Bioprocess Eng.* 19: 187-97.

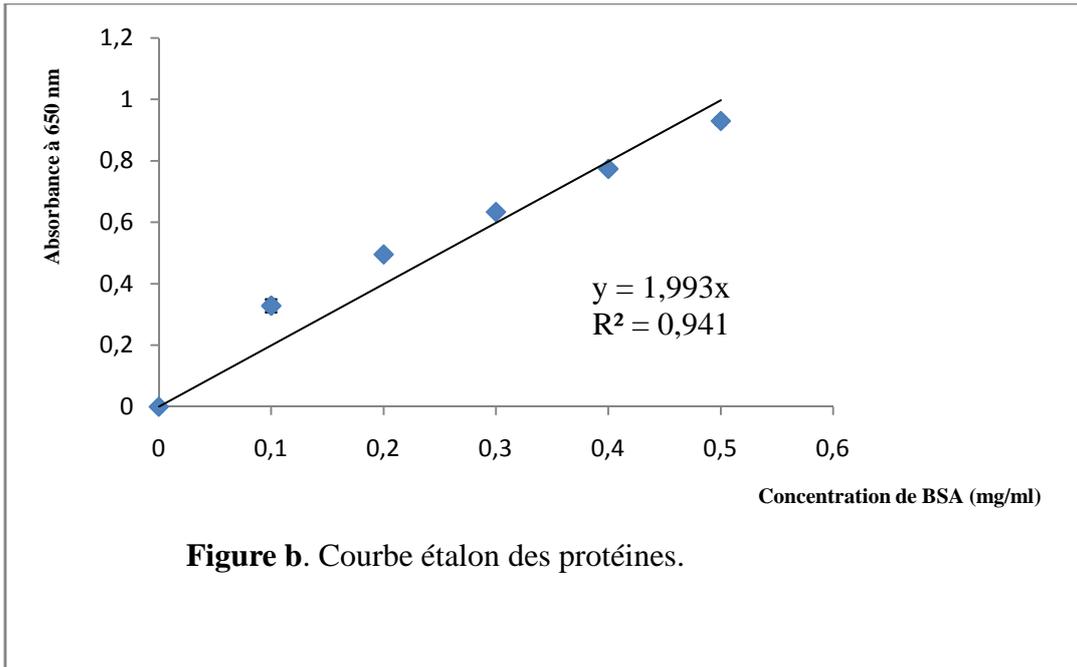
- Tunga R., Shrivastava B., Banerjee R. (2003). Purification and characterization of a protease from solid-state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochem.* 38: 1553-1558.
- Ustok F.I., Tari C., Gogus N. (2007). Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *J. Biotechnol.* 127: 322-334.
- Vági E., Simándi B., Vásárhelyiné K. P., Daood H., Kéry J., Doleschall F., Nagy B. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products. *J. of Supercritical Fluids.* 40: 218-226.
- Van Dyk J. S., Gama R., Morrison D., Swart S., Pletschke B. I. (2013). Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 26: 521–531
- Vijayaraghavan P., Lazarus S., Prakash Vincent S.G. (2013). De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties *Bacillus cereus* strain AT using cow dung →. *Saudi Journal of Biological Sciences*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.010>
- Vijayaraghavan P., Prakash Vincent S. G. (2012). Cow dung as a novel, inexpensive substrate for the production of a halo-tolerant alkaline protease by *Halomonas* sp. PV1 for eco-friendly applications. *Biochemical Engineering Journal.* 69: 57– 60.
- Vishwanatha K.S., Appu Rao A.G., Singh S.A. (2009). Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chem.* 114: 402-407.
- Vishwanatha K.S., Appu Rao A.G., Singh S.A. (2010). Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC5341: Optimization of process parameters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 129-138.
- Volontè F., Pisanelli I., D'Arrigo P., Viani F., Molla G., Servi S., Pollegioni L.(2011). Overexpression of a bacterial chymotrypsin: application for L-amino acid ester hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.* 49(6-7): 560-6. doi: 10.1016/j.enzmictec.2011.06.009. Epub 2011 Jun 16.
- Weinberg Z.G. (2008). Preservation of forage crops by solid-state lactic acid fermentation-ensiling. Pp. 443-467. *In* : Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi.
- Xiong C., Jinhua W., Dongsheng L. (2007). Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal.* 34: 179–184.
- Zanphorlin L.M., Facchini F.A., Vasconcelos F., Bonugli-Santos R.C., Rodrigues A., Durães Sette L., Gomes E., Bonilla-Rodriguez G. O. (2010). Production,

Partial Characterization, and Immobilization in Alginate Beads of an Alkaline Protease from a New Thermophilic Fungus *Myceliophthora* sp. *The Journal of Microbiology*. 48 (3): 331-336.

Zuorro A., Lavecchia R., Medici F., Piga L. (2013). Enzyme-Assisted Production of Tomato Seed Oil Enriched with Lycopene from Tomato Pomace. *Food Bioprocess Technol.* 6: 3499–3509.

ANNEXES





Hayet BOUKHALFA-LEZZAR

**Laboratoire de Biologie et Environnement- Université des frères Mentouri- Constantine
Laboratoire de Microbiologie Industrielle- Université de Reims**

Thème

ETUDE DE LA PRODUCTION DE LA PROTÉASE PAR *ASPERGILLUS ORYZAE* SUR MILIEU SOLIDE EN FERMENTEUR FUJIWARA. UTILISATION DES DÉCHETS DE TOMATE COMME SUBSTRAT DE FERMENTATION.

Résumé

Les déchets agro-industriels, riches en matières organiques, peuvent être recyclés et transformés par les procédés biotechnologiques. Parmi ces derniers, les fermentations en milieu solide (FMS) connaissent un regain d'intérêt à travers le monde, puisque elles permettent une production importante de diverses substances comparée à celle des cultures submergées. Ainsi, l'objectif de cette thèse est la valorisation des déchets de tomate par FMS pour la production d'une protéase fongique. Ce substrat est composé à plus de 52 % de fibres insolubles, de plus de 20% de protéines, de 6,52% de cendres et autres matières organiques. Cette composition sert dans ce type de culture microbienne à la fois de support et de nutriments pour le microorganisme et couvre les besoins d'inducteurs pour la production des protéases. Parmi cinq souches d'*Aspergillus* cultivées en FMS sur déchets de tomate en Erlenmeyers, deux ont été sélectionnées pour la mise au point des conditions de culture, *A. oryzae* 5777 et *A. oryzae* 2220. L'étude de différents paramètres sur la production de la protéase neutre a donné un effet significatif par le taux d'humidité, le pH initial, l'âge de l'inoculum et la teneur en protéines. Deux facteurs (taux de spores et taille des particules de substrat) se sont révélés sans effet significatif sur la synthèse de l'enzyme. Les fermentations réalisées à l'échelle pilote par la souche *A. oryzae* 2220, à 50 % d'humidité initiale du substrat et avec un enrichissement par la farine de soja à raison de 15 mg/g de substrat, a permis d'atteindre plus de 12 U/gms après 42 heures. La culture avec les déchets de tomate sans apport de la source de protéine additionnelle permet une production plus importante avec 12% d'activité supplémentaire, soit 13,55 U/gms. Parmi les solutions étudiées pour l'extraction de la protéase produite, le NaCl à 3 % (w/v) donne le maximum d'activité. Les résultats ont également montré que le substrat fermenté humide permet d'obtenir plus de protéase neutre par rapport au substrat sec. L'effet de la durée de contact du substrat fermenté avec l'eau a donné une activité maximale après 4 heures d'agitation pour le substrat humide et après 7 heures pour le substrat sec. D'autre part, le pH entre 7,6 et 8 et la température de 45°C permettent d'obtenir le maximum de l'activité catalytique. L'enzyme conserve cette activité jusqu'à la température de 55°C. La protéase produite présente une activité résiduelle de 25 % à 65°C après 45 minutes et 34 % à 60°C après 60 minutes ; elle est inhibée à 70 % par l'EDTA et activée par les cations divalents du zinc et du cuivre. Cela indique qu'il s'agit d'une protéase à métal. L'enzyme a été purifiée 4 fois par le SA dans la fraction 40-80 %. Le rendement de cette séparation est de 30 %. L'ensemble du travail réalisé montre les potentialités des déchets de tomate comme substrat de culture en phase solide pour la production de protéases. Cela rendrait cette synthèse très économique et pourrait satisfaire la demande du marché toujours croissante pour ce groupe d'hydrolases à intérêts technologiques très variés.

Mots-clés : fermentation en milieu solides (FMS), résidus agro-industriels, déchets de tomate, protéases, *Aspergillus oryzae*, optimisation.