

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie - Microbiologie

N°d'ordre : 119/Mag/2011
N°de série : 016/SN/2011



Mémoire

Présenté pour l'Obtention du Diplôme de **Magister**
En Microbiologie Appliquée
Option : Biotechnologies Microbiennes

Préparé par : **BELMESSIKH Aicha**

Thème

**Optimisation de la production de la protéase neutre par
Aspergillus oryzae sur milieu à base de déchets de tomates.
Comparaison entre milieu solide et milieu liquide.**

Soutenu le : 03/05/2011

Devant le jury :

Président :	Mr. BOUSSEBOUA H.	Prof. Univ. Mentouri Constantine
Rapporteur :	Mme. MECHAKRA A.	Prof. Univ. Mentouri Constantine
Examinatrices :	Mme. MERAIHI Z.	Prof. Univ. Mentouri Constantine
	Mme. DJEGHRI B.	M.C. Univ. Badji Mokhtar Annaba

Année universitaire : 2010 – 2011

J'exprime tout d'abord, mes profonds remerciements et louanges à DPEU tout puissant, qui m'a guidé sur le droit chemin et m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie et Environnement au biopôle de Chaab-Ersass, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri Constantine.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à ma Directrice de mémoire, Mme. MECHAKRA A., Professeur à l'université Mentouri Constantine, pour sa patience, ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont j'ai pu bénéficier.

Je tiens à exprimer ma grande considération et mes sentiments de reconnaissance à Mr. BOUSSEBONA H., Professeur à l'université Mentouri Constantine, qui me fait l'honneur de présider le jury.

C'est avec un très grand plaisir que je remercie infiniment Mme. MERATTA Z., Professeur à l'université Mentouri Constantine, d'avoir bien voulu juger ce modeste travail, qu'elle trouve ici ma très profonde gratitude.

Je voudrais exprimer également ma sincère reconnaissance au Dr. DJEGHRI B., Maître de conférences à l'université Badji Moukhtar de Annaba, qui me fait l'honneur d'accepter d'examiner mon travail.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Mme. BOURHALFA H. Maître assistante à l'université Mentouri Constantine, pour ses précieux conseils, ses encouragements, son aide et sa gentillesse, elle a été une grande sœur ; toujours à mes côtés.

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

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU les bénisse.

À mes chers sœurs et mes chers frères surtout à mon frère Abd el Karim ; tu es le meilleur frère qui existe, je te souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.

À tous mes amies

À tous mes collègues de promotion

À tous ceux que j'aime.

Aicha



Table des matières

	Pages
Introduction	1
Partie I. Synthèse bibliographique	
1. Les protéases	3
1.1. Généralités sur les enzymes	3
1.1.1. Définition	3
1.1.2. Marché des enzymes	3
1.1.3. Origine des enzymes industrielles	4
1.1.4. Classification des enzymes	4
1.2. Les enzymes protéolytiques	5
1.2.1. Définition	5
1.2.2. Sources des protéases	5
1.2.2.1. Protéases végétales	5
1.2.2.2. Protéases animales	6
1.2.2.3. Protéases microbiennes	6
1.2.3. Classification des protéases	8
1.2.4. Les protéases neutres d' <i>Aspergillus oryzae</i>	9
1.2.5. Les protéases et l'industrie	11
1.2.5.1. Industrie alimentaire	11
1.2.5.2. Industrie pharmaceutique et médicale	12
1.2.5.3. Détergents	12
1.2.5.4. Tanneries	13
1.2.5.5. Autres applications	13
2. Les moisissures	14
2.1. Généralités	14
2.1.1. Organisation des moisissures	14
2.1.2. Organes de reproduction	14
2.1.3. Conditions de croissance des moisissures	15
2.2. Les <i>Aspergilli</i>	15
2.2.1. Caractéristiques du genre <i>Aspergillus</i>	17
2.2.2. Applications technologiques d' <i>Aspergillus</i>	17
2.2.2.1. Production d'acides organiques	17
2.2.2.2. Production d'enzymes	17
2.2.3. Applications dans l'environnement	18
2.3. L'espèce <i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlburg) Cohn	18
2.3.1. Historique	18
2.3.2. Classification d' <i>Aspergillus oryzae</i>	19
2.3.3. Caractères morphologiques d' <i>Aspergillus oryzae</i>	19
2.3.4. Utilisation d' <i>Aspergillus oryzae</i>	19
2.3.4.1. Production d'enzymes	21
2.3.4.2. Alimentation au bétail	21
3. Déchets de tomates	22
3.1. Généralités	22
3.2. Les vertus thérapeutiques de la tomate	22

3.3.	Production de la tomate en Algérie.....	22
3.4.	Les déchets de tomates.....	24
3.5.	Utilisations de déchets de tomates.....	25
3.5.1.	Alimentation.....	25
3.5.2.	Agent antioxydant.....	25
3.5.3.	Production d'enzymes.....	26
3.5.4.	Production d'huiles.....	26
3.5.5.	Traitement de diarrhée.....	26
4.	Types de fermentation.....	27
4.1.	Fermentation liquide (<i>SmF</i>).....	27
4.2.	Fermentation solide (<i>SSF</i>).....	27
4.2.1.	Bioréacteurs utilisées en fermentation solide.....	29
4.2.1.1.	<i>Les bioréacteurs de laboratoires</i>	29
4.2.1.2.	<i>Les bioréacteurs industriels</i>	29
4.2.2.	Applications de la culture solide.....	29
4.2.3.	Les protéases et la culture solide.....	30
4.3.	Autres techniques de fermentation.....	31
5.	Méthodes d'optimisation.....	32
5.1.	Le plan de Plackett et Burman.....	32
5.2.	Plan composite centré.....	33

Partie II. Matériel et méthodes

1.	Matériel biologique.....	35
1.1.	Origine et entretien de la souche.....	35
1.2.	Préparation de l'inoculum.....	35
1.2.1.	Préparation de la suspension de spores.....	35
1.2.2.	Dénombrement des spores.....	35
2.	Méthode de fermentation.....	36
2.1.	Préparation des milieux de culture.....	36
2.1.1.	Milieu solide.....	36
2.1.2.	Milieu liquide.....	36
2.2.	Conduite des fermentations.....	37
2.2.1.	Fermentation solide (<i>SSF</i>).....	37
2.2.2.	Fermentation liquide (<i>SmF</i>).....	37
3.	Méthodes analytiques.....	37
3.1.	Détermination de la matière sèche.....	37
3.2.	Détermination des cendres.....	38
3.3.	Détermination des sucres totaux.....	38
3.4.	Détermination des protéines.....	38
3.5.	Détermination de la biomasse.....	39
3.6.	Dosage de l'activité protéolytique.....	39
4.	Méthode d'optimisation.....	42
4.1.	Sélection des variables significatives.....	42
4.2.	Détermination des optima.....	44
4.3.	Analyse statistique.....	46

4.4. Expérience de confirmation.....	46
5. Cinétique de production de la protéase neutre par <i>A. oryzae</i>.....	46
6. Etude des caractéristiques de la protéase neutre produite.....	46
6.1. Détermination du pH optimal.....	46
6.2. Détermination de la température optimale.....	47
6.3. Stabilité à la température optimale.....	47
6.4. Effet des effecteurs.....	47

Partie III. Résultats et discussions

1. Composition de déchets de tomates.....	48
2. Optimisation des milieux de cultures.....	51
2.1. Détermination du taux d'humidité optimal en culture solide.....	51
2.2. Détermination de la concentration optimale du substrat en culture liquide.....	53
2.3. Résultats de l'optimisation par la méthode de Plackett et Burman.....	55
2.3.1. Résultats du pH.....	55
2.3.2. Effet des facteurs sur la production de protéines en <i>SSF</i>	57
2.3.3. Effets des facteurs sur la production de biomasse en <i>SmF</i>	59
2.3.4. Effet des facteurs sur la production de la protéase neutre.....	62
2.3.5. Détermination des optima.....	68
2.3.5.1. <i>Analyse de la variance</i>	68
2.3.5.2. <i>Forme des modèles</i>	70
2.3.5.3. <i>Calcul des optima</i>	70
2.3.6. Test de confirmation.....	73
3. Cinétique de production de la protéase neutre en <i>SSF</i> et en <i>SmF</i>.....	73
4. Etude de quelques caractéristiques de la protéase neutre produite.....	76
4.1. pH optimal.....	76
4.2. Température optimale.....	78
4.3. Stabilité de la protéase neutre à la température optimale.....	80
4.4. Effet des effecteurs.....	82
4.4.1. Effet de l'EDTA.....	82
4.4.2. Effet du zinc.....	82
4.4.3. Effet du calcium.....	82
4.4.4. Effet du NaCl.....	83
4.4.5. Effet de Tween 80.....	83
5. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide.....	84
5.1. Mode de développement de la moisissure sur <i>SSF</i> et <i>SmF</i>	84
5.2. Comparaison des activités de la protéase neutre produite.....	84
5.3. Discussion.....	85
Conclusion générale.....	87
Références bibliographiques.....	89
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

ADEME : Agence De l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie.

A. oryzae : *Aspergillus oryzae*.

aw : Activity of Water.

BSA : Bovine Serum Albumin.

Da : Dalton.

E.C. Enzyme Commission

EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acetate.

FDA : Food and Drug Administration.

Fig : Figure.

GRAS: Generally Regarded As Safe.

INPV : Institut National de Protection des Végétaux.

I.U.B.: International Union of Biochemistry.

Mr : Molecular weight.

NpI : Neutral protease I.

NpII : Neutral protease II.

NRRL : Northern Regional Research Laboratory.

PDA : Potato Dextrose Agar.

pH : potentiel d'Hydrogène.

rpm: round per minute.

SmF : Submerged Fermentation.

SSF : Solide State Fermentation.

TCA: TriChloroacetic Acid.

U: $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$

Φ : diamètre.

Liste des figures

	Pages
Fig. 1. Distribution des ventes des enzymes.....	3
Fig. 2. Exemple d'un conidiophore de l'espèce <i>Aspergillus penicillioides</i>	16
Fig. 3. Développement d'un conidiophore chez <i>Aspergillus nidulans</i>	16
Fig. 4. Processus de fabrication de concentré de tomate.....	23
Fig. 5. <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 2220.....	35
Fig. 6. Effet de la teneur en humidité initial sur la production de protéase en <i>SSF</i>	50
Fig. 7. Effet de la concentration du substrat sur la production de protéase en <i>SmF</i>	52
Fig. 8. Evolution de la production de la protéase neutre par <i>A. oryzae</i> NRRL 2220 sur milieu solide.....	72
Fig. 9. Evolution de la production de la protéase neutre par <i>A. oryzae</i> NRRL 2220 sur milieu liquide.....	72
Fig. 10. Effet du pH sur l'activité protéolytique produite en <i>SSF</i>	75
Fig. 11. Effet du pH sur l'activité protéolytique produite en <i>SmF</i>	75
Fig. 12. Effet de la température sur l'activité protéolytique produite en <i>SSF</i>	77
Fig. 13. Effet de la température sur l'activité protéolytique produite en <i>SmF</i>	77
Fig. 14. La stabilité de la protéase neutre à sa température optimale.....	79
Fig. 15. Aspect d' <i>A. oryzae</i> NRRL 2220.....	84

Liste des tableaux

	Pages
Tableau 1. Les six classes d'enzymes.....	4
Tableau 2. Spécificité des protéases.....	5
Tableau 3. Exemples des protéases microbiennes.....	7
Tableau 4. Classification des protéases.....	7
Tableau 5. Exemples de protéases commerciales.....	10
Tableau 6. Quelques exemples des enzymes produites par <i>A. oryzae</i>	20
Tableau 7. Composition chimique de déchets de tomates.....	24
Tableau 8. Comparaison entre <i>SSF</i> et <i>SmF</i>	28
Tableau 9. Quelques substrats utilisés pour la production des protéases en <i>SSF</i>	30
Tableau 10. Générateur des matrices.....	33
Tableau 11. Matrice d'expériences de Plackett et Burman.....	41
Tableau 12. Les différents facteurs étudiés et leurs concentrations correspondantes.....	41
Tableau 13. Structure du plan composite centré à deux facteurs.....	43
Tableau 14. Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels.....	45
Tableau 15. Composition chimique des déchets de tomates.....	48
Tableau 16a. Résultats du pH, de protéines et de la protéase en culture solide.....	54
Tableau 16b. Résultats du pH, de biomasse et de la protéase en culture liquide.....	54
Tableau 17. Résultats du pH du plan de Plackett et Burman.....	55
Tableau 18. Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production des protéines en <i>SSF</i>	56
Tableau 19. Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de la biomasse en <i>SmF</i>	58
Tableau 20. Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de la protéase neutre.....	61
Tableau 21. Résultats de l'activité de la protéase neutre produite selon le plan composite centré de Box et Wilson.....	67
Tableau 22. Analyse statistique des résultats du plan composite centré.....	69
Tableau 23. Coordonnées codées des extremums des facteurs étudiés en <i>SSF</i> et en <i>SmF</i> et leurs valeurs réelles.....	70
Tableau 24. Effet de quelques effecteurs sur l'activité protéolytique.....	81
Tableau 25. Comparaison des activités produites en <i>SSF</i> et en <i>SmF</i>	85

Introduction

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines. Par la diversité de leurs applications, elles représentent l'un des plus grands groupes d'enzymes industrielles. De plus, les protéases sont ubiquistes ; elles se retrouvent aussi bien chez les plantes que chez les animaux et les microorganismes. Cependant, grâce à leur diversité biochimique extensive, les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases. En effet, quarante pourcent des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes parmi lesquels, des souches fongiques (García-Gómez et *al.*, 2009). Celles-ci possèdent plusieurs avantages comme leur qualité *GRAS* (*Generally Regarded As Safe*) et leur aptitude à produire une large gamme d'enzymes extracellulaires.

Les protéases neutres fongiques sont les composants les plus importants des préparations enzymatiques commerciales ; *Aspergillus oryzae* est la source prédominante de la protéase neutre. La principale caractéristique de cette enzyme est son affinité vis-à-vis des acides aminés hydrophobes ; ce qui lui fournit un avantage pour son utilisation dans l'enlèvement de l'amertume des aliments (Sumantha et *al.*, 2005).

La production d'enzymes industrielles exige la préparation de milieux à moindre coût sachant que l'estimation du coût du milieu de croissance représente 30-40% du coût de production des enzymes industrielles (Srinubabu et *al.*, 2007). Ceci peut être atteint par l'utilisation des résidus agroindustriels disponibles et bon marché et par l'optimisation des conditions nutritionnelles et physicochimiques du milieu de culture. C'est ainsi que plusieurs déchets et sous-produits agro-industriels sont appliqués pour la production d'enzymes.

En 2010, près de 217 000 tonnes de tomate fraîche ont été transformés en Algérie. Le processus de transformation produit une grande quantité de déchets estimée à environ 10-30% des tomates fraîches (King et Zeidler, 2004). Ces déchets restent inutilisables et posent un problème de pollution environnementale.

Cependant, la composition des déchets de tomates indique la présence d'une source très significative de lycopène, de lipides, d'acide ascorbique, de fibres et de protéines (Al-Muhtaseb et *al.*, 2010). Cela permet leur exploitation dans plusieurs domaines, en particulier, l'alimentation animale et la production d'enzymes et de vitamines. Dans notre cas, ces déchets ont été testés comme milieu de production de la protéase neutre par *Aspergillus*

oryzae (Boukhalifa, 2003). Les protéases d'*Aspergillus oryzae* peuvent être produites soit par culture solide (*SSF*), soit par culture liquide (*SmF*).

L'objectif principal souligné dans cette étude est la production de la protéase neutre par *A. oryzae* NRRL 2220 en *SSF* et sa comparaison avec celle en *SmF*, en utilisant les déchets de tomates comme substrat de base.

*Synthèse
bibliographique*

1. Les protéases

1.1. Généralités sur les enzymes

1.1.1. Définition

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (Bergmeyer et *al.*, 1979; Pelmont, 1995; Drouin, 2005).

En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (Patel et *al.*, 2005) ; la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (Leisola et *al.*, 2001).

Les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés (Sandhya et *al.*, 2005a).

1.1.2. Marché des enzymes

Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité conserve une forte croissance. Estimé à plus de 1,5 milliards US\$ en l'an 2000. Il est prévu qu'en 2011, il atteindra 6 milliards de dollars (Kumar et *al.*, 2008b). Parmi les enzymes industrielles, les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes, soit environ 60% (García-Gómez et *al.*, 2009; Rai et Mukherjee, 2010) (Fig. 1). Les ventes industrielles des protéases sont estimées à plus de 350 millions US\$ annuellement (Kumar et *al.*, 2008b).

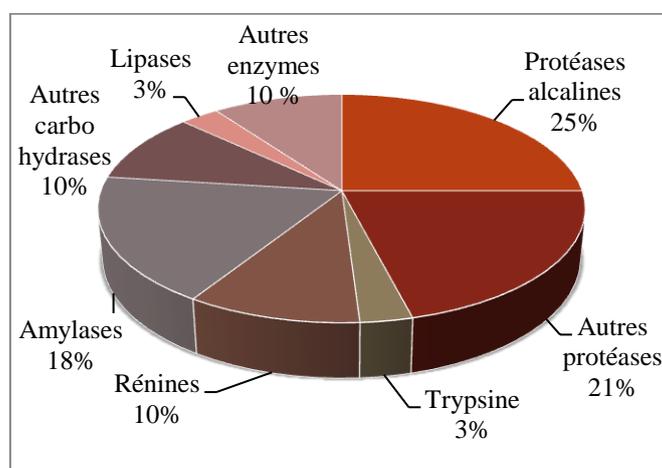


Fig. 1. Distribution des ventes des enzymes (Rao et *al.*, 1998).

1.1.3. Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles proviennent de source végétale, animale ou microbienne. L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. En effet, les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (Scriban, 1993).

1.1.4. Classification des enzymes

Selon la commission des enzymes de l'I.U.B. (*International Union of Biochemistry*) (Bergmeyer, 1979), les enzymes se répartissent en six classes (Tableau 1). Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases (Rao et al., 1998; Assamoi et al., 2009).

Tableau 1. Les six classes d'enzymes

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductases (EC 1.x.x.x)	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atome d'hydrogène)
Transférases (EC 2.x.x.x)	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, etc.)
Hydrolases (EC 3.x.x.x)	Réactions d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau)
Lyases (EC 4.x.x.x)	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse
Isomérases (EC 5.x.x.x)	Réactions d'isomérisation (réaction où un composé est transformé en un de ses isomères)
Ligases (EC 6.x.x.x)	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP

1.2. Les enzymes protéolytiques

1.2.1. Définition

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique (Tableau 2) et sont produites extracellulairement comme intracellulairement (Kumar et al., 2008b). Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux (Pelmont, 1995). Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulateurs plus spécifiques (Kumar et al., 2008a).

Tableau 2. Spécificité des protéases (Rao et al., 1998).

Enzyme	Liaison peptidique à clivée
Trypsine	-Lys (ou Arg)↓-----
Chymotrypsine, subtilisine.....	-Trp (ou Tyr, Phe, Leu)↓-----
<i>Staphylococcus</i> V8 protéase	-Asp (ou Glu)↓-----
Papaïne	-Phe (ou Val, Leu)-Xaa↓-----
Thermolysine.....	---↓Leu (ou Phe) -----
Pepsine.....	-Phe (ou Tyr, Leu)↓ Trp (ou Phe, Tyr)

La flèche indique le site d'action des protéases, Xaa, n'importe quel acide aminé

1.2.2. Sources des protéases

Les protéases sont extraites aussi bien des plantes que des animaux ou des microorganismes (Rao et al., 1998).

1.2.2.1. Protéases végétales

Les enzymes d'origine végétale et spécialement les protéases sont par ordre décroissante en technologie. La papaïne, la bromélaïne, la kératinases et la ficine représentent quelques-unes des protéases bien connues d'origine végétale (Rao et al., 1998).

- **La papaïne** (*Mr* 25 kDa) en provenance du latex de fruit *Carica papaya* qui se développe dans les régions subtropicales de l'ouest et le centre d'Afrique, ainsi en Inde. Elle est largement utilisée dans l'industrie pour la préparation des hydrolysats de protéines très solubles et aromatisés (Scriban, 1993; Pelmont, 1995; Rao et al., 1998).

- **La bromélaïne** est extraite à partir de l'ananas (*Ananas comosus*). Elle est moins thermostable que la papaïne (Rao et al., 1998).

• **Les kératinases** sont produites par certains groupes botaniques des plantes pour dégrader les cheveux et la laine. Cette digestion est importante pour la production d'acides aminés essentiels tels que la lysine et pour la prévention du colmatage des systèmes de traitement des eaux usées (Rao et *al.*, 1998).

- **La ficine** est issue de la figue (*Ficus glabrata*) (Scriban, 1993).

1.2.2.2. *Protéases animales*

La plupart des protéases d'origine animales sont pancréatiques. En effet, elles ont la propriété de dégrader les protéines alimentaires. Elles sont toutes synthétisées sous forme d'un précurseur qui peut s'activer de façon autocatalytique dans des conditions bien déterminées (Rao et *al.*, 1998).

• **La trypsine** (M_r 23,3 kDa) est une protéase à sérine, elle est la principale enzyme digestive intestinale responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires. L'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du goût très amer qu'elle entraîne (Rao et *al.*, 1998).

• **La chymotrypsine** (M_r 23,8 kDa), La chymotrypsine pure est très coûteuse et elle est utilisée uniquement pour les applications de diagnostic et d'analyse (Rao et *al.*, 1998).

• **La pepsine** (M_r 34,5 kDa) est une protéase acide présente dans l'estomac de presque tous les vertébrés (Rao et *al.*, 1998), seules les pepsines bovines et porcines présentent un intérêt industriel (Scriban, 1993).

• **La rénine** (M_r 30,7 kDa) *pepsin-like* protéase (chymosine ; EC 3.4.23.4) (Rao et *al.*, 1998) est une protéase à aspartate. C'est un constituant majeur de la présure utilisé en industrie laitière comme agent principal de caillage du lait (Pelmont, 1995). Elle a la propriété de couper la liaison Phe-Met dans la κ -caséine pour générer une *para*- κ -caséine et un glycopeptide C-terminal (Rao et *al.*, 1998).

1.2.2.3. *Protéases microbiennes*

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (Sandhya et *al.*, 2005b). Elles sont produites par une grande variété de bactéries dont, les actinomycètes, de moisissures et de levures (Devi et *al.*, 2008). Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial (Sandhya et *al.*, 2005b). Le grand succès des protéases microbiennes dans les

Tableau 3. Exemples des protéases microbiennes.

Sources	Espèces	Références
<ul style="list-style-type: none"> • Moisissures 	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus terreus</i> <i>Bauveria felina</i> <i>Aspergillus clavatus</i> ESI	García-Gómez et al., 2009 Sathya et al., 2009 Laxman et al., 2005 Germano et al., 2003 Wu et al., 2006 Agrawal et al., 2005 Hajji et al., 2007
<ul style="list-style-type: none"> • Levures 	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida lypolytica</i>	Chi et al., 2007 Tobe et al., 1976
<ul style="list-style-type: none"> • Bactéries 	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Virgibacillus</i> sp. SK33 <i>Synergistes</i> sp.	Ferrero et al., 1996 George et al., 1995 Soares et al., 2005 Patel et al., 2005 Sinsuwan et al., 2008 Kumar et al., 2008a
<ul style="list-style-type: none"> • Actinomycètes 	<i>Streptomyces</i> sp. <i>Nocardiopsis alkaliphila</i> sp.	Mehta et al., 2006 Hozzein et al., 2004

Tableau 4. Classification des protéases (Rao et al., 1998).

Type de protéase	Classes et sous-classes
Exopeptidases	Aminopeptidases <ul style="list-style-type: none"> • Peptidyle peptidases • Dipeptidyle peptidases • Tripeptidyle peptidases Carboxypeptidases <ul style="list-style-type: none"> • Sérine carboxypeptidases • Metallocoarboxypeptidases • Cystéine carboxypeptidases
Endopeptidases	Protéases sérines Protéases cystéines ou protéases thiols Protéases aspartiques ou protéases acides Métalloprotéases

systèmes biotechnologiques est attribué à la diversité biochimique très large, à la faisabilité de la culture de masse et la facilité des manipulations génétiques (Ferrero, 2000; Wu et *al.*, 2006). Quelques exemples de microorganismes producteurs de protéases sont présentés dans le Tableau 3.

Une large proportion des protéases commerciales disponibles, principalement les protéases neutres et alcalines sont dérivées de bactéries, particulièrement de souches de *Bacillus* (Joo et Chang, 2005; Laxman et *al.*, 2005; Srinubabu et *al.*, 2007). Leurs propriétés sont adaptées à l'usage dans industrie de détergents (Rao et *al.*, 1998). Des protéinases à partir *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus subtilis* sont commercialement utilisées (Sinsuwan et *al.*, 2008).

D'autre part, une large variété de protéases sont également élaborées par les moisissures (Rao et *al.*, 1998; Wu et *al.*, 2006). Les enzymes d'origine fongiques sont des enzymes extracellulaires, ce qui permet une séparation du mycélium du milieu de fermentation par une simple filtration (Sandhya et *al.*, 2005b; Devi et *al.*, 2008). En outre, ces moisissures sont des souches GRAS et peuvent se développer sur des substrats moins chers (Devi et *al.*, 2008).

1.2.3. Classification des protéases

Les protéases sont classées selon la gamme du pH dans laquelle leur activité est optimale, en protéases acides, neutres et alcalines (Kumar et *al.*, 2008b). Elles se différencient également selon leur site d'action en deux groupes ; les exopeptidases et les endopeptidases (Tableau 4). Les exopeptidases agissent seulement sur les liens peptidiques près des extrémités de la chaîne peptidique. En se basant sur la nature de l'extrémité N ou C terminale, elles sont classées en amino et carboxypeptidases, respectivement. Par contre, les endopeptidases sont caractérisées par leur action spécifique à l'intérieur de la chaîne peptidique (Rao et *al.*, 1998).

La plupart des enzymes utilisées industriellement sont des endopeptidases. Celles-ci sont divisées en quatre familles en se basant sur le mécanisme catalytique ; les protéases sérines (EC 3.4.21.x), les protéases cystéines (EC 3.4.22.x), les protéases aspartiques (EC 3.4.23.x), et les métalloprotéases (EC 3.4.24.x). Ces dernières forment le groupe de protéases le plus varié (Kumar et *al.*, 2008b).

Les métalloprotéases sont caractérisées par l'exigence en un cation divalent pour leur activité ; la stabilité thermique de ces protéases augmente si les ions Ca^{++} sont ajoutés au milieu. Les métalloprotéases neutres montrent une haute spécificité vers les acides aminés

hydrophobes. La plupart des métalloprotéases contient le motif His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH) (Rao et al., 1998). Ces protéases sont inactivées en présence d'agent chélateurs forts [ex : EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetate*)] ou phenanthroline (Beynon et Oliver, 2004). La thermolysine est une métalloprotéase neutre thermostable produite par *Bacillus stearothermophilus*. La collagénase est une autre métalloprotéases très spécifique, elle réagit seulement sur le collagène et la gélatine, elle est produite par *Achromobacter iophagus* et autres microorganismes y compris les moisissures (Rao et al., 1998).

1.2.4. Les protéases neutres d'*Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae est la source prédominante des métalloprotéases neutres et l'affinité de ces dernières vis-à-vis des acides aminés hydrophobes leur fournit l'avantage d'utilisation en industrie alimentaire en réduisant l'amertume des hydrolysats des protéines (Sumantha et al., 2005). *A. oryzae* produit deux types de métalloprotéases ; la protéase neutre I (NpI) et la protéase neutre II (NpII) (Nakadai et al., 1973).

Les deux protéases neutres contiennent 1 g d'atome de zinc et 2 g d'atome de calcium par molécule d'enzyme ; le zinc est essentiel pour l'activité (Tatsumi et al., 1991). Les métalloprotéases d'*A. sojae*, qui est reliée taxonomiquement avec *A. oryzae* ont été bien caractérisées par Sekine (1972a; 1972b).

- **La protéase neutre I (NpI)**, de poids moléculaire de 41,7 kDa (Fushimi et al., 1999) et de pH optimal de 7 à 30°C pour 10 min. Sa température optimale est de 55°C à pH 7,3 pour 10 min en présence de Ca^{++} (Sekine, 1972a).

Les propriétés enzymatiques et physicochimiques de NpI sont similaires à ceux de la protéase neutre de *Bacillus thermoproteolyticus* ; la thermolysine (EC 3.4.24.27) (Fushimi et al., 1999)

- **La protéase neutre II (NpII)**, aujourd'hui est désignée sous le nom de deuterolysine (EC 3.4.24.39) (Fushimi et al., 1999), elle possède un poids moléculaire de 19,8 kDa (Sekine, 1972b). Elle est constituée de 177 acides aminés incluant 3 ponts disulfures. Elle présente des activités élevées vis-à-vis des substrats nucléaires basiques, comme l'histone, la protamine et la salmine et des activités faibles sur les substrats utilisés habituellement en laboratoire, tel que la caséine, l'hémoglobine, l'albumine et la gélatine (Fushimi et al., 1999). L'optimum de pH pour la digestion de la caséine est d'environ 6 à 30°C pendant 10 min et la température optimale est 65°C à pH 7,3 pour 10 min. L'activité spécifique de NpII est environ 30 fois plus basse que celle de NpI (Sekine, 1972a).

Tableau 5. Exemples de protéases commerciales.

Nom Commercial	Firmes Productrices	Souches microbiennes	Références
Kojizyme TM	Novozymes, Denmark	<i>A. oryzae</i>	Sumantha et al. (2006)
Flavourzyme TM	Novozymes, Denmark	<i>A. oryzae</i>	
Alcalase [®]	Novozymes, Denmark	<i>B. licheniformis</i>	Kumar et al. (2008b)
Savinase [®]	Novozymes, Denmark	<i>B. amyloliquefaciens</i>	
Esperase [®]	Novozymes, Denmark	<i>B. licheniformis</i>	
Chymosine recombinante	Genencor International, USA	<i>A. niger, A. awamori</i>	Rao et al. (1998)
Purafect [®]	Genencor International, USA	<i>B. lentus</i>	Kumar et al. (2008b)
Maxatase	Gist-Brocades, Hollande	<i>B. licheniformis</i>	Rao et al. (1998)
BLAPS	Henkel, Allemand	<i>B. lentus</i>	Kumar et al. (2008b)
Bioprase	Nagase Biochemicals, Japon	<i>B. subtilis</i>	
Dispase	Invitrogen Corp, USA ; BD Biosciences, USA ; etc.	<i>B. polymyxa</i>	Sumantha et al. (2006)
Aspergillo-pepsin I	Kikkoman Corp, Japon	<i>A. saitoi</i>	

1.2.5. Les protéases et l'industrie

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Le Tableau 5 présente quelques exemples de protéases produites commercialement. Les principaux secteurs industriels employant des protéases sont :

1.2.5.1. Industrie alimentaire

Mis à part le cas de la protéase alcaline dans les détergents, les industries alimentaires constituent aujourd'hui encore le principal domaine d'application des technologies enzymatiques, qui à partir d'un nombre limité de types de réactions catalysées donnent lieu à une grande diversité d'application (Aviron-Violet et *al.*, 1982). Les principales industries alimentaires utilisant les protéases sont :

- **Fromageries**

L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages (Rao et *al.*, 1998). La présure a été l'enzyme utilisée à cette fin depuis longtemps. Cependant, les fluctuations du prix de caillotte et leur pénurie épisodique fait qu'elle est de moins en moins utilisée et tend à être remplacée par des protéases microbiennes (Aviron-Violet et *al.*, 1982). Les protéases utilisées à cette fin sont produites par des microorganismes GRAS tels que *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* et *Endothia parasitica*. Les protéases fongiques acides, alcalines et neutres produites par *A. oryzae* ont également été utilisées en industrie laitière (Aguilar et *al.*, 2008).

- **Boulangeries**

Les endo et les exoprotéinases d'*A. oryzae* sont utilisées pour modifier le gluten de blé par une protéolyse limitée selon les caractéristiques désirées de la pâte ; un tel traitement enzymatique permet de réduire le temps de pétrissage (Aviron-Violet et *al.*, 1982 ; Aguilar et *al.*, 2008). Des protéases bactériennes sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (Rao et *al.*, 1998).

- **Préparation de produits à base de soja**

Les protéases neutres ou alcalines d'origine fongiques sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce de soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Le traitement de ces protéines par la protéase alcaline "*alcalase*" à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats solubles utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans la

formulation des aliments diététiques (Rao et *al.*, 1998). Kojizyme™ est un complexe d'exopeptidases et d'endopeptidases dérivées d'*A. oryzae* utilisé dans la fermentation du sauce du soja (Sumantha et *al.*, 2006).

- **Synthèse de l'aspartam**

Biens que les protéases soient des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse. Sous certaines conditions cinétiquement contrôlées, une préparation de thermolysine provenant de *Bacillus thermoprotolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartam (un édulcorant à basse calorie) à partir de l'acide *L*-aspartique et de la *L*-phénylalanine méthyle ester. Il est produit industriellement par Toya Soda (Japon) (Rao et *al.*, 1998; Leisola et *al.*, 2001).

1.2.5.2. Industrie pharmaceutique et médicale

La grande diversité et spécificité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement des agents thérapeutiques efficaces. Par exemple, des protéases d'*A. oryzae* (Luizim et Nortase) sont utilisées comme aide à la digestion ; des collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des bruleurs, plaies et des ulcères dermiques (Rao et *al.*, 1998) ; la « Brinase » (une protéase acide *plasmin-like*) permet l'hydrolyse de la fibrine et la fibrinogène chez les patients souffrant d'une hémodialyse (Sumantha et *al.*, 2006) ; une élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes (Kudrya et Simenenko, 1994) ; etc.

1.2.5.3. Détergents

A l'heure actuelle, les protéases sont ajoutées comme des ingrédients clé dans la formulation des détergents pour usage domestiques (détergents à lessive, détergents à vaisselles), les produits de nettoyage pour usage industriels et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le marché le plus important au niveau de détergents est de loin celui des détergents à lessive (Kumar et *al.*, 2008b). Une protéase détergente idéal doit avoir une large spécificité de substrat et stable dans l'environnement hostile de la machine à laver (température élevée et pH alcalin) (Rao et *al.*, 1998). Bien que la pepsine soit utilisée depuis 1913 (Hajji et *al.*, 2007), la plupart des protéases ajoutées dans les détergents sont produites par des souches de *Bacillus* (Gupta et *al.*, 2002).

Clear-lens Pro[®], une marque de Novozyme Denmark est utilisée pour enlever les dépôts à base de protéines ainsi que les films protéiniques présentés dans les lentilles cornéennes (Sumantha et *al.*, 2006).

1.2.5.4. Tanneries

Les protéases sont utilisées en tannerie depuis le début du siècle dernier pour leurs capacités à libérer les poils et la laine (Laxman et *al.*, 2005). Les trois traitements de la peau à tanner (le reverdissage, le délainage et le confitage) sont susceptibles de solutions enzymatiques de protéases produites par *B. licheniformis*, *A. oryzae*, *B. amyloliquefasciens*. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients (Rao et *al.*, 1998; Gupta et *al.*, 2002).

1.2.5.5. Autres applications

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines (Dalev, 1994; Ichida et *al.*, 2001). La protéase neutre de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (Aviron-Violet et *al.*, 1982). Une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir des films photographiques par hydrolyse de la gélatine (Sumantha et *al.*, 2006).

2. Les moisissures

2.1. Généralités

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

2.1.1. Organisation des moisissures

Les moisissures sont des eucaryotes non photosynthétiques et immobiles (à cause de la rigidité de leur paroi). Elles possèdent un appareil végétatif dépourvu de tiges, de racines et de feuilles appelé *thalle* (Botton et *al.*, 1990).

Les cellules de moisissures forment des filaments (hyphes) où chacun montre une croissance apicale. La ramification des hyphes au cours de leur croissance sur un substrat donne le mycélium ; un mycélium et ses spores forment le thalle, détectable à l'œil nu (Guiraud, 1998; Perry et *al.*, 2004; Walker et White, 2005). Dans la majorité des cas, la cellule végétative d'un hyphe contient plus d'un noyau, parfois de centaines. La paroi de la plupart des moisissures est chitineuse ; la chitine est un polymère formé d'unité de N-acétyl glucosamine (Madigan et Martinko, 2007).

Durant la croissance, la division des noyaux peut être accompagnée par la formation de *septa* délimitant une cellule. Toutefois, la formation des *septa* est d'ordinaire incomplète laissant un pore central permettant la libre circulation du cytoplasme et des noyaux. Parfois celle-ci n'existe pas ; l'hyphe correspond alors à un tuyau contenant du cytoplasme où baignent les noyaux, le thalle est donc d'organisation *coenocytique* (Scriban, 1993; Perry et *al.*, 2004; Madigan et Martinko, 2007).

2.1.2. Organes de reproduction

La reproduction et la dissémination des moisissures s'effectuent grâce aux spores et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative (Guiraud, 1998). Les conidies sont des spores asexuées, elles peuvent être noires, bleues, vertes, rouges, jaunes ou brunes; leur présence donne au mycélium un aspect poussiéreux (Madigan et Martinko, 2007).

Les spores d'origine végétative assurent la reproduction et la dissémination de l'espèce chez les formes imparfaites (Deutéromycètes) ; mais on les trouve également chez les autres groupes où elles coexistent à côté des formes de reproduction sexuée (Guiraud, 1998).

2.1.3. Conditions de croissance des moisissures

Ces microorganismes sont chimioorganotrophes, se caractérisant par des besoins nutritionnels élémentaires (Madigan et Martinko, 2007). Leur tolérance à l'égard du pH est souvent étendue mais avec généralement une préférence pour les pH légèrement acides (Botton et al., 1990) ; beaucoup d'espèces supportent des pH très acides (Delarras, 2007). Elles se développent dans une gamme de température allant de 0 à 40°C ou plus ; la plupart se développe bien aux températures comprises entre 20 et 25°C. La température optimale pour la croissance d'*A. oryzae* est de 35°C, mais la production optimale de protéases se situe à 30°C (Botton et al., 1990). La plupart des moisissures sont aérobies strictes et se développent bien en l'absence de lumière. Elles tolèrent des teneurs en eaux très faibles. De surcroît, elles ont un métabolisme très actif, lié à leur production enzymatique variée et intense (Delarras, 2007).

De nombreuses moisissures sont utilisées par l'homme depuis fort longtemps dans la fabrication de certains produits alimentaires. Certaines synthèses sont effectuées à l'échelle industrielle et sont de premières importances telles celles d'enzymes et d'antibiotiques (Scriban, 1993).

2.2. Les *Aspergilli*

Le genre *Aspergillus* a été reconnu comme un microorganisme en 1729 par Micheli. Il se trouve dans le monde entier et se compose de plus de 180 espèces officiellement reconnues (Ward et al., 2006). Même s'il inclut les principaux agents pathogènes de champignons filamenteux de l'homme : *Aspergillus fumigatus* (Latgé, 1999; Brookman et Denning, 2000), la plupart des membres sont des microorganismes utiles dans la nature pour la dégradation des polysaccharides végétaux et sont d'importance industrielle pour la production d'enzymes. Parmi eux, *A. niger*, *A. oryzae* et *A. sojae* sont des souches GRAS (Ward et al., 2006). Par ailleurs, les espèces *A. flavus* et *A. parasiticus* sont aflatoxigéniques. Toutes ces espèces appartiennent au genre *Aspergillus* section *Flavi* et ont de nombreuses similitudes phénotypiques (Lee et al., 2004).

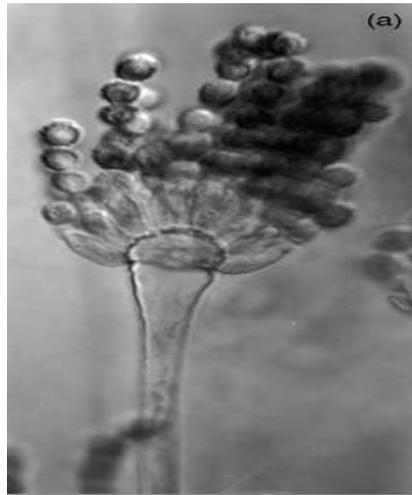


Fig. 2. Exemple d'un conidiophore de l'espèce *Aspergillus penicillioides*

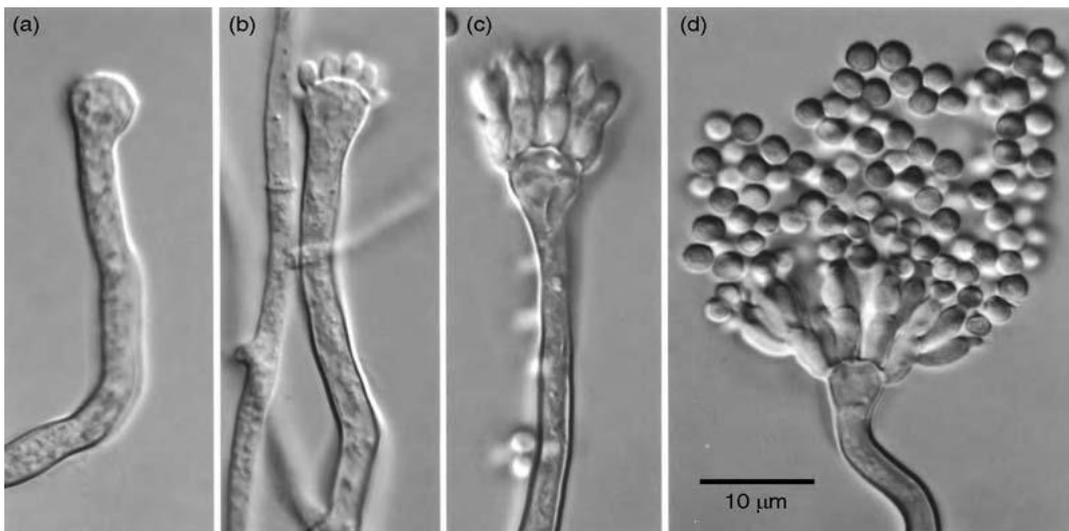


Fig. 3. Développement d'un conidiophore chez *Aspergillus nidulans*.

- (a) Pointe d'un conidiophore qui a gonflée pour produire une vésicule. Le conidiophore est multinucléaire (noyaux non visibles).
- (b) Développement des métules. Chaque métule contient un seul noyau.
- (c) Production des phialides à partir de chaque métule. Chaque phialide contient un seul noyau.
- (d) Production des conidies uninucléaires.

2.2.1. Caractéristiques du genre *Aspergillus*

Le thalle des *Aspergillus* est à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés. La pointe du conidiophore est gonflée en une structure hémisphérique "la vésicule". Les phialides sont formées directement sur la vésicule, dans ce cas le conidiophore est dit unisérié (Fig. 2). Alternativement, des cellules stériles (métules) sont formées par la vésicule et les pointes des métules donnent naissance à des phialides (tête bisériée) (Webster et Weber, 2007) (Fig. 3).

Les conidies issues des phialides sont sèches, en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, brun, noir ou vert. Cellules à paroi épaissie et sclérotées parfois présents (Botton et al., 1990).

2.2.2. Applications technologiques d'*Aspergillus*

Jusqu'à récemment, les principales applications industrielles des espèces d'*Aspergillus* sont appuyées sur l'art traditionnel et les sciences liées à la production d'aliments fermentés, ainsi que sur les procédés classiques de biochimie, microbiologie, génétique et le génie génétique (Ward et al., 2006). Les acides organiques et les enzymes constituent les métabolites d'*Aspergillus* les plus importants.

2.2.2.1. Production d'acides organiques

La majorité des *Aspergillus* produisent de l'acide citrique, *A. niger* le produit par fermentation jusqu'à 200 g/l dans une période de 5 à 7 jours (Ward et al., 2006). L'acide gluconique et l'acide oxalique sont par ailleurs produits par *Aspergillus niger* (Liu et al., 2003; Rymowicz et Lenart, 2003). *Aspergillus itaconicus* et *Aspergillus terreus* sont ainsi utilisées pour la production de l'acide itaconique (Murphy et Horgan, 2005).

2.2.2.2. Production d'enzymes

Les espèces d'*Aspergillus* en particulier les souches GRAS servent à la production à grande échelle d'enzymes industriellement précieuses telles que des cellulases, pectinases, xylanases, amylases, glucoamylases et des protéases (Murphy et Horgan, 2005; Ward et al., 2006). Les espèces nonaflatoxigéniques d'*A. oryzae* (Ahlburg) Cohn et d'*A. sojae* sont largement utilisées pour la production d'amylase de qualité alimentaire et dans la fermentation du saké et la sauce de soja (Lee et al., 2004; Maeda et al., 2004).

Les protéases sont également produites par plusieurs espèces d'*Aspergillus*; *A. oryzae* (Sandhya et al., 2005b) ; *A. fumigatus* (Wang et al., 2005b), *A. terreus* (Wu et al., 2006), *A. parasiticus* (Tunga et al., 2003), *A. niger* (Singh et al., 1994; Paranthaman et al., 2009).

Par ailleurs, d'autres enzymes d'importance industrielle sont produites par des espèces d'*Aspergillus* comme la tannase (Ramirez-Coronel et al., 2003), l'inulinase (Jing et al., 2003) et la glucose oxydase (Malherbe et al., 2003).

2.2.3. Applications dans l'environnement

Les applications d'*Aspergillus* dans l'environnement sont plutôt limitées. Néanmoins, une souche de *A. terreus* a été signalée de métaboliser les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Capotorti et al., 2004). *A. niger* a également été étudiée par différents laboratoires pour la biosorption des métaux lourds (Dursun, 2003).

2.3. L'espèce *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn

2.3.1. Historique

Aspergillus oryzae a été isolé pour la première fois à partir de *koji* par H. Ahlburg en 1876. Son nom d'origine, *Eurotium oryzae*, a été rebaptisé *A. oryzae* par F. Cohn parce qu'il trouvait qu'elle n'avait pas la capacité de la reproduction sexuée. D'après les historiens, *A. oryzae* a dû exister dans la nature avant la domestication et a pu être isolé des autres espèces dangereuses comme *A. flavus* (Machida et al., 2008).

Les inoculum de ce champignon filamenteux pour la fermentation ont été disponibles commercialement sous le nom de *koji* depuis les siècles 13 à 15. Ainsi, le mot *koji* indique à la fois la matière fermentée par *A. oryzae* en fermentation solide et le microorganisme *A. oryzae* lui-même (*koji mold*) (Machida et al., 2008).

Son utilisation intensive dans les industries alimentaires incite la FDA (*Food and Drug Administration*) de l'États-Unis à placer *A. oryzae* sur la liste des organismes GRAS. La sécurité d'*A. oryzae* est également supportée par l'organisation mondiale de la santé (*World Health Organization*) (Kobayashi et al., 2007). Aujourd'hui, il a été décidé par la majorité de la communauté scientifique que *A. oryzae* ne produit pas des aflatoxines (Blumentha, 2004).

2.3.2. Classification d'*Aspergillus oryzae*

Les champignons sont classés en fonction de leur morphologie et la diversité des types de cycles de reproduction, en incluant la formation de spores sexuées différentes (Scriban, 1993; Madigan et Martinko, 2007) ; mais il n'existe pas encore une classification universelle.

En effet, selon Botton et *al.* (1990) et Guiraud (1998), la moisissure *Aspergillus oryzae* est classifiée comme suit :

Règne : **Fungi**
Division : **Eumycota**
Classe : **Deuteromycetes**
Ordre : **Moniliales**
Famille : **Moniliaceae**
Genre : *Aspergillus*
Espèce : *Aspergillus oryzae*

Cependant, Geiser et LoBuglio (2001) donnent une autre classification où le genre *Aspergillus* appartient au phylum des Ascomycota, classe des Plectomycetes de l'ordre des Eurotiales et de la famille des Trichomaceae (Webster et Weber, 2007).

2.3.3. Caractères morphologiques d'*Aspergillus oryzae*

Selon Botton et *al.* (1990), *Aspergillus oryzae* se caractérise par un thalle à croissance rapide sur milieu de Czapek, à revers incolore, têtes conidiennes uni ou bisériées (parfois pour une même souche), radiées rarement d'un vert franc, d'abord jaunâtres puis jaune verdâtre à vert-olive, enfin dans les tons de brun, conidiophores hyalins, souvent longs, 2,5 à 5 μm , plus ou moins verruqueux suivant les souches, vésicules sub-globuleuses à paroi mince, 40-75 μm , métules 8-12 x 4-5 μm , phialides 8-15 x 3-5 μm , conidies d'abord piriformes à elliptiques puis sub-globuleuses à globuleuses, de taille très variable, 4,5 - 7(10) μm , lisses à finement verruqueuses.

2.3.4. Utilisation d'*Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae a été utilisée pendant de nombreux siècles auparavant dans l'industrie de fermentation traditionnelle japonaise pour produire du saké (vin de riz), *shoyu* (sauce de soja) et le *miso* (pâte de soja) dans une fermentation solide (Oda et *al.*, 2006; Kobayashi et *al.*, 2007; Khaldi et Wolfe, 2008). Dans cette fermentation *A. oryzae* secrète des quantités importantes d'amylases et/ou des protéases pour briser les complexes d'amidons en sucres simples et les protéines en peptides/acides aminés, qui sont ensuite fermentés par des levures

Tableau 6. Quelques exemples des enzymes produites par *A. oryzae*.

Enzymes	Applications industrielles	Références
Protéases	<ul style="list-style-type: none"> • Sauce de soja, Fromagerie, Panification, Tannerie. 	(Neelakantan et <i>al.</i> , 1999; Thammarongtham et <i>al.</i> , 2001; Murphy et Horgan, 2005; Sumantha et <i>al.</i> , 2005).
α- amylases	<ul style="list-style-type: none"> • Panification, Sirops de glucose. 	(Kavanagh, 2005).
Glucoamylases	<ul style="list-style-type: none"> • Panification, Saké et <i>shoyu</i>. 	(Hata et Ishida, 2000; Oda et <i>al.</i> , 2006; Ward et <i>al.</i> , 2006).
Xylanases	<ul style="list-style-type: none"> • Bioblanchiment, Panification. 	(Ward et <i>al.</i> , 2006).
Glutaminase	<ul style="list-style-type: none"> • Sauce de soja, Traitement de leucémie. 	(Thammarongtham et <i>al.</i> , 2001).
Polygalacturonases et Pectinases	<ul style="list-style-type: none"> • Sauce de soja. 	(Kobayashi et <i>al.</i> , 2007).
Lactases	<ul style="list-style-type: none"> • Hydrolyse du lactosérum acide 	(Neelakantan et <i>al.</i> , 1999).
Cutinases	<ul style="list-style-type: none"> • Recyclage des plastiques biodégradables 	(Machida et <i>al.</i> , 2008).
Lipases	<ul style="list-style-type: none"> • Fromagerie 	(Neelakantan et <i>al.</i> , 1999).

et des bactéries acidolactiques (Kobayashi et al., 2007). La société *koji seed* nommé "*Kojiya Sanzaemon*" est la plus vieille industrie à Kyoto (Murai, 1989).

2.3.4.1. Production d'enzymes

Aspergillus oryzae ou "*koji mold*" est une espèce largement utilisée dans l'industrie de la fermentation (Maeda et al., 2004; Ward et al., 2006), par son potentiel à sécréter de grandes quantités d'enzymes dans son environnement ; par exemple, des amylases, des protéases, des phytases, etc. (Tableau 6) (Hata et Ishida, 2000; Müller et al., 2002).

Due à l'abondance des peptidases secrétées par *A. oryzae*, elle a été sélectionnée pour la fermentation des matières protéiques comme le soja (Machida et al., 2008). Les protéases secrétées par *A. oryzae* jouent un rôle important dans la production d'un goût délicieux de la sauce de soja (Tatsumi et al., 1991). Umamizyme, une préparation commerciale de protéase neutre d'*A. oryzae* présente une activité protéolytique très élevée par rapport aux autres préparations protéasiques (Guerard et al., 2002).

Aspergillus oryzae a été utilisée également pour le premier exemple de la production commerciale de la lipase recombinante pour détergents à lessive en 1988 (Machida et al., 2008).

2.3.4.2. Alimentation au bétail

Le supplément alimentaire amylase (Amaize™, Alltech Inc., Nicholasville, KY, USA), qui est composé d'un extrait en poudre d'*A. oryzae* contenant principalement une activité amylasique. Ce supplément peut améliorer les performances des bovins laitiers en modifiant la digestion ruminale de l'amidon (Tricarico et al., 2008).

En outre, l'utilisation d'un DFM (*direct-fed microbials*) d'*A. oryzae* (Amaferm® , Biozyme, St. Joseph, MO) montre une augmentation de la digestibilité des fibres alimentaires. En effet, plus de matière grasse et de bons rendements en protéines du lait, résultants de l'alimentation des vaches laitières par Amaferm (Higginbotham et al., 1993).

Dans une autre application en cours, *koji molds* sont utilisés comme des cellules hôtes pour la production d'enzymes en utilisant la technologie de recombinaison de l'ADN (Maeda et al., 2004).

3. Déchets de tomates

3.1. Généralités

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) est une plante originaire d'Amérique du sud ; sa valeur nutritive élevée et ses usages multiples dans les préparations culinaires (utilisée comme salade, dans les préparations alimentaires, jus, soupe, purée, ketchup ou pâte) en font le légume le plus important (Sogi et al., 2005; Altan et al., 2008; Kaur et al., 2008). La culture de la tomate est très répandue dans le monde entier mais 90% de la production mondiale est obtenue dans l'hémisphère nord (bassin méditerranéen, Californie et Chine) (Celma et al., 2009). En 2008, environ 130 millions de tonnes de tomates ont été produites dans le monde; la Chine, le plus grand producteur, représente environ un quart de la production mondiale, suivie par les Etats-Unis et la Turquie (FAO, 2008). La tomate est cultivée aussi bien pour la consommation fraîche que pour la transformation industrielle (Celma et al., 2009).

3.2. Les vertus thérapeutiques de la tomate

Les produits de la tomate contiennent des niveaux élevés en caroténoïdes ; le β -carotène et le lycopène (Eller et al., 2010). Ce dernier est synthétisé massivement pendant la maturation des fruits, il est responsable de la couleur rouge intense de *Lycopersicum esculentum* (Guil-Guerrero et Reboloso-Fuentes, 2009). Les résultats de diverses études suggèrent que le lycopène joue un rôle dans la prévention de différents problèmes de santé (maladies chroniques, maladies cardiovasculaires, certains cancers, etc) (Altan et al., 2008; Benakmoum et al., 2008; Kaur et al., 2008; Bicanic et al., 2010).

Les β -carotènes ont une activité de pro-vitamine A car ils sont convertis enzymatiquement en rétinol par les mammifères. Autres éléments nutritifs de la tomate sont des minéraux et la vitamine C (Guil-Guerrero et Reboloso-Fuentes, 2009).

3.3. Production de la tomate en Algérie

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

La culture de la tomate industrielle en Algérie a démarré dans les années 1920, dans la région de l'est avec la création de la première conserverie TOMACOOOP à Bône (actuellement Annaba). Les tomates industrielles sont principalement cultivées au nord-est du pays: la région d'El Tarf, Annaba, Guelma, Skikda et Jijel représente 85% de la superficie totale

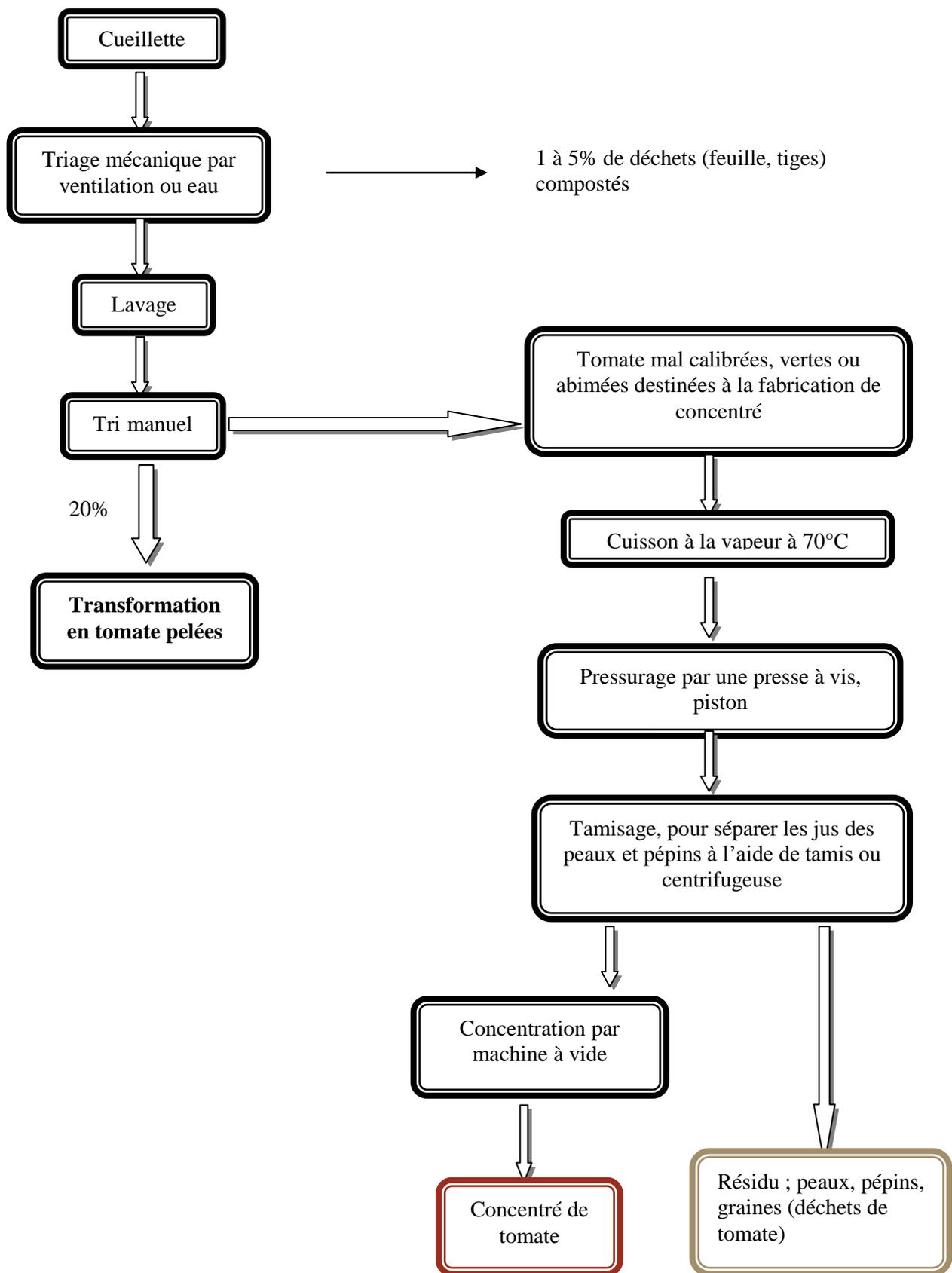


Fig. 4. Processus de fabrication de concentré de tomate (ADEME).

consacrée à cette culture. Le reste est réparti entre le centre du pays (7%) et l'ouest (3%) (INPV).

Selon un bilan réalisé sur une superficie cultivée de 38 000 ha (32 000 ha en 2009), la production de la tomate industrielle en Algérie a presque doublé en 2010 dépassant les 6,6 million de quintaux (mq) contre 3,8 mq en 2009. Les quantités de tomate fraîche transformées ont atteint 216 860 tonnes (t), le total équivalent de double concentré de tomate (DCT) 40 220 t contre 20 912 t en 2009, mais reste loin des besoins nationaux estimés à 80 000 tonnes (<http://www.algerie-focus-com/...>).

3.4. Les déchets de tomates

La transformation commerciale de la tomate pour les jus, la pâte et/ou de ketchup produit une grande quantité de déchets en provenance de canaux d'eau, du lavage, du tri sur table, du pulpeur-raffineur et du nettoyage du matériel (Sogi et *al.*, 2003). La Fig. 4 montre le processus de transformation de tomates.

Les déchets de tomates représentent, environ 10-30% du poids des fruits fraîches (King et Zeidler, 2004) ; ils se composent de 33% de graines, 27% de peaux et 40% de pulpe en plus de tomates vertes non transformées, parfois mélangés à des feuilles. Les déchets de tomates séchés contiennent 44% de graines et le reste, 56% de peaux et de pulpe (Sogi et Bawa, 1998). Le Tableau 7 montre quelques différences dans la composition entre la peau et la farine de graines :

Tableau 7. Composition chimique de déchets de tomates.

Composition	Peau de tomates			Farine de graines de tomates
	Christakopoulos et <i>al.</i> , 1998	Kaur et <i>al.</i> , 2008	Sogi et Bawa, 1998	Liadakis et <i>al.</i> , 1995
Humidité (%) MS	7,5	5,74	6,69-10	8,1
Protéines (%) MS	13,5	14,3	10-10,7	31,3
Lipides (%) MS	3	3,72	1,7-3,96	1,3
Cendres (%) MS	2,9	1,28	1,13-5,6	4,6
Sucres (%) MS	5,0	3,46	26,7	3,2
Fibres (%) MS	68,1	71,3	46,1-55,9	54,1

MS : Matière Sèche

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

3.5. Utilisations de déchets de tomates

Pour maximiser ses profits, les déchets de tomates connaissent de nombreuses utilisations.

3.5.1. Alimentation

De part sa teneur élevée en fibres et grâce à la capacité des animaux à digérer ces fibres (Al-Muhtaseb et *al.*, 2010), les déchets de tomates sont principalement utilisés pour nourrir le bétail, en particulier les ovins et les bovins (Celma et *al.*, 2009). Leur utilisation a également été évaluée pour l'alimentation des volailles (Mansoori et *al.*, 2008), des vaches laitières (Weiss et *al.*, 1997), des chèvres (Ventura et *al.*, 2009) et des moutons (Denek et Can, 2006).

Par ailleurs, les déchets de tomates peuvent représenter une source intéressante de fibres pour la consommation humaine (Alvarado et *al.*, 2001). De leur côté, les graines contiennent environ 40% de protéines (Al-Wandawi Rahman et *al.*, 1985). Par conséquent, les graines de tomates sont recommandées comme source de protéines dans les applications alimentaires pour l'homme (Sogi et *al.*, 2005). En outre, Brodowski et Geisman (1980) ont rapporté que ces déchets contiennent 13% de lysine de plus que les protéines de soja, ce qui pourrait améliorer substantiellement la qualité des protéines des aliments à basse teneur en lysine tels les produits de céréales.

3.5.2. Agent antioxydant

Baysal et *al.* (2000) ont signalés qu'une grande quantité de caroténoïdes est perdue sous forme de déchets au cours de la transformation des tomates. Du fait que, 72–92% du lycopène (le pigment rouge) est associée à la fraction insoluble dans l'eau et à la peau. Ces déchets représentent donc une excellente source de caroténoïdes bon marché. Par conséquent, les extraits de peau sont particulièrement riches en lycopène qui pourrait être extraite en utilisant des solvants organiques (Kaur et *al.*, 2008). De plus, la qualité des huiles comestibles pourrait être améliorée en les enrichis par les caroténoïdes de peaux (Benakmoum et *al.*, 2008). Par ailleurs, Knoblich et *al.* (2005) ont montré le transfert de caroténoïdes vers le jaune d'œuf lorsque les poulets sont nourris de peaux et de graines de tomates.

D'autre part, King et Zeidler (2004) ont révélé que les niveaux élevés de l'antioxydant α -tocophérol (vitamine E) dans les déchets de tomates ont réduit la détérioration des lipides au cours du chauffage et permet d'améliorer la durée de conservation de la viande de poulets stockés.

3.5.3. Production d'enzymes

Il y a peu de rapports dans la littérature sur l'utilisation des déchets de tomates pour la production d'enzymes. Certaines études décrivent la production d'enzymes par des souches bactériennes par des fermentations submergées ; c'est le cas de la xylanase (Katapodis et *al.*, 2006). D'autres travaux ont permis le fractionnement des laccases et des xylanases par *Pleurotus ostreatus* et *Coriolus versicolor*. De plus, la quantité de pectine dans les déchets de tomates est suffisamment élevée pour obtenir des niveaux élevés en polygalacturonases par *Coriolus versicolor* (Freixo et *al.*, 2008a, 2008b, 2008c).

3.5.4. Production d'huiles

Les graines de tomates contiennent environ 20% d'huile. Elles seraient une bonne source d'huile de salade à condition qu'elle subisse un raffinage adéquat ; très peu de connaissances sont disponibles sur la capacité antioxydante de l'huile de graines de tomates (Eller et *al.*, 2010).

De plus, la réduction du taux de cholestérol chez les cochons de Guinée a été mentionnée, en leur donnant 1 ml d'huile/kg. L'huile de graines de tomates a également été utilisée dans les produits cosmétiques tels que le savon, les lubrifiants, les peintures et les industries de vernis (Giannelos et *al.*, 2005).

3.5.5. Traitement de diarrhée

En 1940, McCay et Smith ont rapporté l'effet anti-diarrhéique des déchets de tomates chez une série de chiens, de visons et de renards. Par la suite, Lester et Morrison (1946) ont déterminé l'action pharmacologique spécifique des déchets de tomates sur l'intestin comme un recours efficace dans le traitement de nombreux types de diarrhées chez des sujets humains.

4. Types de fermentation

Les protéases d'*A. oryzae* peuvent être produites par fermentation liquide (Wang *et al.*, 2005a; Srinubabu *et al.*, 2007) ou solide (Battaglino *et al.*, 1991; Agrawal *et al.*, 2005; Sumantha *et al.*, 2008).

4.1. Fermentation liquide ou *Submerged Fermentation* (*SmF*)

La fermentation submergée comprend une large variété de processus microbiens agités et non agités, où la biomasse est complètement encerclée dans le milieu de culture liquide. Les protéases de *Mucor miehei*, *Endothia parasitica* et la majorité des espèces de *Bacillus* sont produites par les fermentations liquides (Sandhya *et al.*, 2005a). Celles-ci sont réalisées avec différents substrats, habituellement dissout ou en suspension dans un milieu aqueux. La supplémentation d'un milieu riche en azote avec du glucose augmente souvent la production de la protéase. Beaucoup de types de *SmFs* ont été décrits, tel que, la culture en *batch*, *fed batch* et continue. Les fermentations continues donnent de meilleurs rendements que celles des cultures en *batch* (Sumantha *et al.*, 2006).

La fermentation continue est utilisée par exemple pour la fabrication de *Quorn* en mycoprotéines et elle implique le maintien de la moisissure dans un état stable pour maximiser la production de biomasse (Kavanagh, 2005).

Approximativement, 90% de toutes les enzymes industrielles sont produites par *SmF*, fréquemment en utilisant des microorganismes génétiquement modifiés, spécifiquement optimisés (Hölker *et al.*, 2004). Cette méthode de culture permet un meilleur contrôle des facteurs environnementaux tels que la température et le pH. Cependant, les produits sont dilués et les extraits enzymatiques peuvent être moins stables (Sandhya *et al.*, 2005b).

Cependant, il y a un intérêt significatif d'utilisation des techniques de *SSF* pour produire une large variété d'enzyme, notamment d'origine fongiques, comme il est indiqué par l'augmentation de nombre des travaux dans la littérature et par le développement d'un nombre visible du nombre de fermentations industrielles (Viniegra-González *et al.*, 2003).

4.2. Fermentation solide ou *Solid-State Fermentation* (*SSF*)

La fermentation solide (appelée également fermentation de substrats solides, fermentation humide, culture solide, etc. ; en anglais : *Solid-State Fermentation* ou *SSF*) est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides qui jouent le rôle d'un support physique et source de nutriments en l'absence (ou quasi absence) d'eau libre

Tableau 8. Comparaison entre *SSF* et *SmF* (Raimbault, 1998; Assamoi et al., 2009).

Facteur	Fermentation solide (<i>SSF</i>)	Fermentation liquide (<i>SmF</i>)
Substrat	Polymère insolubles (amidon, pectine, cellulose, lignine)	Substrats solubles (sucres)
Eau	Consommation limitée de l'eau; <i>aw</i> faible	Des grands volumes d'eau sont consommés
pH et Température	Contrôle aléatoire et transfert difficile de la chaleur	Contrôle facile
Aération (O₂)	Aération facile et diffusion rapide de l'oxygène	Faible solubilité de l'(O ₂) dans l'eau
Scale up	Nécessité de nouveaux équipements	Equipements industrielles disponibles
Fermentation	Fermentation en <i>batch</i>	Fermentation continue
Contamination	Risque de contamination fongique	Risque de contamination bactérienne
Demande énergétique	Besoin énergétique faible	Consommation élevée d'énergie
Biomasse	Inséparable du substrat	Facilement séparable
Produit	Concentré	Très dilué
Pollution	Pas d'effluents	Grands volumes d'effluents

(Gervais et Molin, 2003; Pandey, 2003; Rahardjo et *al.*, 2006). La technologie de *SSF* permet l'utilisation des déchets agricoles et agroindustriels comme substrat de fermentation. Les particules à 1 mm de diamètre sont trouvées d'être bien adaptées pour la production des protéases dans le cas de divers déchets agroindustriels (Murthy et Naidu, 2010).

De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci (Rahardjo et *al.*, 2006). Le Tableau 8 présente une comparaison de quelques paramètres en *SSF* à ceux en *SmF*.

4.2.1. Catégories de bioréacteurs utilisés en fermentation solide

Les bioréacteurs utilisés en fermentation solide sont classés en deux catégories selon l'échelle de fermentation (Durand, 2003).

4.2.1.1. Les bioréacteurs de laboratoires

Les bioréacteurs utilisés au stade de laboratoires utilisent quelques grammes à quelques kilogrammes de substrat solide. Un exemple, le bioréacteur d'ORSTOM des années 1975 et 1980 est composé de petites colonnes ($\Phi = 4$ cm, 20 cm de long), rempli avec le milieu de culture préalablement inoculé et placé dans un bain d'eau thermostaté.

4.2.1.2. Les bioréacteurs industriels

Les bioréacteurs utilisés aux stades industriels utilisent des kilogrammes à des tonnes de substrat solide. Le nombre de ces réacteurs est limité. A grande échelle, les transferts de chaleur et d'oxygène se font très délicatement. Les solutions proposées consistent à faire circuler l'air à travers les couches du substrat ou l'air traverse le substrat. Deux principales catégories de réacteurs sont utilisées : les réacteurs non mélangés et les réacteurs mélangés.

4.2.2. Applications de la culture solide

Depuis la description de la production d'acide citrique dans une culture en surface par Currie en 1917, *A. niger* est devenue un organisme modèle pour la biotechnologie de la culture solide (Hölker et *al.*, 2004). Actuellement, il y a un grand nombre de références qui décrivent les applications des cultures solides (Botella et *al.*, 2005; Rodríguez Couto et Sanromán, 2006; Sathya et *al.*, 2009).

Tableau 9. Quelques substrats utilisés pour la production des protéases en *SSF*.

Substrat	Microorganisme	Enzyme	Références
Son de blé + déchets d'huile de noix de coco	<i>A. oryzae</i> NRRL 2217	Protéase neutre	(Sumantha et al., 2005)
Son de riz	<i>A. niger</i> MTCC 281	Protéase neutre	(Paranthaman et al., 2009)
Son de blé	<i>A. flavus</i>	Protéase alcaline «Clarizyme»	(Pandey et al., 1999)
Son de blé + épiluchures de lentille	<i>Bacillus</i> sp.	Protéase alcaline	(Uyar et Baysal, 2004)
Son de riz + son de blé	<i>A. oryzae</i> Ozykat-1	Protéase alcaline	(Chutmanop et al., 2008)
Son de blé + farine de déchets de poissons	<i>Streptomyces</i> sp. CN902	Protéase alcaline	(Lazim et al., 2009)
Déchets du café	<i>A. oryzae</i> CFR305	Protéase alcaline	(Murthy et Naidu, 2010)
Déchets de pomme de terre douce	<i>A. niger</i>	Protéase acide	(Pandey et al., 1999)
Son de blé	<i>A. niger</i> FFB1	Protéase acide	(Fazouane-Naimi et al., 2010)

La culture solide est appliquée à large échelle dans les processus industriels, principalement en Japon pour la production d'aliments traditionnels, d'enzymes et d'acides citrique et d'acides itaconique (Fujiwara, Ltd) (Raimbault, 1998), de même que Lyven-France qui utilise exclusivement la fermentation solide pour la production des enzymes industrielles (Assamoi *et al.*, 2009).

Des exemples typiques de la culture solide sont des fermentations traditionnelles, *Koji* (Japonais) et *Tempeh* (Indonésien), les deux sont les plus importantes applications de *SSF* produites par *A. oryzae* et *Rhizopus oligosporus*, respectivement. Un autre exemple est la fermentation du fromage bleu (Français) par *Penicillium roquefortii*, etc. (Raimbault, 1998; Hölker *et al.*, 2004; Rodríguez Couto et Sanromán, 2006). La culture solide est également utilisée pour la production des champignons comestibles (*Agaricus bisporus*) (Kavanagh, 2005).

4.2.3. Les protéases et la culture solide

La fermentation solide détient un grand potentiel de production d'enzymes ; sa particularité est l'utilisation directe du produit fermenté brut comme une source d'enzyme (Pandey *et al.*, 1999). C'est ainsi que différents types des protéases (acides, neutres et alcalines) peuvent être produites par la culture solide en utilisant différents résidus agroindustriels. Cependant, le son de blé est le substrat le plus utilisé (Tableau 9).

4.3. Autres techniques de fermentation

Les processus de *SmF* et *SSF* sont généralement les plus utilisés. Cependant, plusieurs modifications de ceux-ci ont été rapportées. Une méthode de culture liquide membrane-surface (*Membrane-Surface Liquid Culture* ou *MSLC*) pour la production d'une protéase neutre par *A. oryzae* IAM 2704 a été développée, dans laquelle le microorganisme se développe sur une surface membranaire microporeuse exposée à l'air, alors que l'autre côté de la membrane est en contact avec les nutriments du milieu liquide (Ogawa *et al.*, 1995).

5. Méthodes d'optimisation

Le processus d'optimisation est un sujet d'importance centrale pour la production industrielle. Dans le cas de la surproduction de enzymes, les manipulations des milieux représentent la meilleure alternative aux manipulations génétiques (Reddy *et al.*, 2008).

La démarche expérimentale traditionnelle “*one-variable-at-a-time*” qui consiste à faire varier successivement un seul facteur en maintenant les autres constants, est longue et coûteuse. De plus, lorsque un grand nombre de variables est considéré, elle est incapable de détecter l'optimum réel et ne prend pas en compte les interactions entre les facteurs (Hajji *et al.*, 2008; Kammoun *et al.*, 2008). Les limites d'une telle méthode sont évitées par l'utilisation des plans statistiques (les plans expérimentaux factoriels) qui permettent de mesurer l'effet de plusieurs facteurs ainsi que les interactions entre les facteurs (Kammoun *et al.*, 2008).

Les modèles statistiques pour optimiser les composants et les conditions des milieux de cultures sont de plus en plus utilisés dans la biotechnologie actuelle grâce à son applicabilité facilitée par l'informatique (Reddy *et al.*, 2008). Ces plans sont particulièrement appliqués dans les processus d'optimisation de la fermentation des cultures par les bactéries (Tari *et al.*, 2006; Oskouie *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008; Rai et Mukherjee, 2010), les cellules animales (Castro *et al.*, 1992) et les moisissures (Hajji *et al.*, 2008; Kammoun *et al.*, 2008; Lakshmi *et al.*, 2009).

Les plans d'expériences les plus utilisés sont les plans factoriels fractionnaires type matrice de Plackett et Burman (1946) et le plan composite centré type plan de Box et Wilson (1951).

5.1. Le plan de Plackett et Burman (1946)

Le plan de Plackett et Burman est un plan factoriel qui a pour but de sélectionner, parmi un grand nombre de variables, les principaux facteurs requis pour augmenter la production de métabolite désiré dans des études préliminaires. Ces facteurs sont retenus pour des processus d'optimisation ultérieurs. Ces matrices permettant d'évaluer l'influence de k facteurs à deux niveaux sur la réponse étudiée avec un nombre d'expériences N , tel que $N = k+1$, donc avec un minimum d'essais. Le plan d'expériences de Plackett et Burman est constitué de matrices carrées dites matrices d'Hadamard ne contenant que des éléments égaux à $+1$ ou -1 , construites par permutation circulaire à partir d'un générateur de base (Tableau 10).

Tableau 10. Générateur des matrices pour N=8, N=12, N=16, N=20, N=24 essais selon Plackett et Burman (1946).

N=8	+	+	+	-	+	-	-																
N=12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-												
N=16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-								
N=20	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-				
N=24	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-

La signification de chaque variable sur la production de métabolite désiré est déterminée via le test-*t* de Student. Le niveau de confiance accepté est $(1 - \alpha) \geq 70\%$, qui est considéré par plusieurs études (Castro et *al.*, 1992; Bennamoun et *al.*, 2004; Djekrif-Dakhmouche et *al.*, 2006). Il peut être égal à $(1 - \alpha) \geq 95\%$, comme c'est le cas dans les travaux de (Hajji et *al.*, 2008; Reddy et *al.*, 2008).

5.2. Plan composite centré

Chaque microorganisme possède ses propres conditions pour une production maximale du métabolite désiré. Donc, l'optimisation des composants du milieu doit être réalisée pour maintenir un équilibre entre les diverses composants, ce qui minimise la quantité des substances non utilisés à la fin de la fermentation (Murthy et Naidu, 2010).

Le plan composite centré est un outil expérimental efficace permettant l'identification des facteurs effectifs, l'étude de leurs interactions et la sélection des conditions optimales d'un système multivariable.

Plusieurs rapports sur les plans composites centrés sont utilisés pour l'optimisation de la production de diverses enzymes :

- La protéase neutre par *Pseudomonas* sp. (Dutta et *al.*, 2004).
- La protéase alcaline par *A. oryzae* NCIM 637 (Srinubabu et *al.*, 2007).
- La protéase alcaline par *Bacillus subtilis* DM-4 (Rai et Mukherjee, 2010).
- La xylanase par *Bacillus* sp. 2129, (Mullai et *al.*, 2010).
- Etc.

Le plan composite centré est originalement introduit par Box et Wilson en 1951. Il est adopté pour déterminer les optima des variables significatives permettant la réponse maximale. Ce plan est formé de trois parties distinctes pour générer un nombre de traitements de combinaisons égal à $2^k + 2.k + N$.

- Un plan factoriel à deux niveaux factoriels (-1, +1), habituellement fractionné à partir de k facteur, ce qui forme un plan factoriel complet 2^k .
- 2.k points en étoiles, avec des niveaux $(-\alpha)$ et $(+\alpha)$, La valeur du α est fonction du nombre de facteurs k.
- N répétitions du point central (niveau 0). La valeur de N est fonction du nombre de facteurs k.

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Origine et entretien de la souche

La souche utilisée dans ce travail est la moisissure *Aspergillus oryzae* NRRL 2220 fournie par l'Institut Pasteur de Paris (France) ; elle a été propagée sur le milieu *Potato-Dextrose-Agar* (PDA) (voir composition dans Annexe 1) en boîte de Pétri à 30°C pendant sept jours (Fig. 5), puis conservée à 4°C. Les repiquages sont effectués tous les mois (Kammoun et *al.*, 2008; Lakshmi et *al.*, 2009).



Fig. 5. *Aspergillus oryzae* NRRL 2220.

1.2. Préparation de l'inoculum

1.2.1. Préparation de la suspension de spores

La suspension de spores est préparée par addition de 10 ml d'eau distillée stérile contenant 0,1% de Tween 80 à la souche cultivée sept jours sur PDA en boîte de Pétri. Les spores sont déboîtées superficiellement en utilisant une anse de platine sous des conditions aseptiques (Sandhya et *al.*, 2005b).

1.2.2. Dénombrement des spores

A 1 ml de suspension de spores préalablement agitée, on ajoute 9 ml d'eau tweenée ; la solution mère ainsi obtenue permet de préparer la gamme étalon. Le nombre de spores dans chaque dilution est déterminé par la technique de dénombrement en utilisant la cellule de Thomas (Guiraud, 1998). L'examen s'effectue au microscope au grossissement x 40. La courbe d'étalonnage est établie par mesure de l'absorbance de chaque dilution à 650 nm au spectrophotomètre (JENWAY 6315 ; UK) en fonction du nombre de spores comptées sur la cellule (voir Fig. c. en Annexe 4).

Avant chaque inoculation, le nombre de spores est estimé par référence à la courbe d'étalonnage puis, la suspension est diluée de manière à obtenir un nombre de spores de 10^6 /ml (Sumantha et *al.*, 2008; Paranthaman et *al.*, 2009; Murthy et Naidu, 2010).

2. Méthode de fermentation

2.1. Préparation des milieux de culture

Le milieu de culture est préparé à partir de déchets de tomates industrielles composés de graines et de pulpe adhérente à la peau fournis par la conserverie *Maison Latina à Chelghoum Laid, MILA*. Les déchets sont séchés à l'air libre (25 – 30°C) pendant 3 - 4 jours puis broyés à l'aide d'un moulin électrique ménager (Katapodis et *al.*, 2006) de manière à obtenir une farine avec des particules de Φ : 0,5 mm pour la culture liquide et de Φ : 1 mm pour la culture solide (Murthy et Naidu, 2010).

2.1.1. Milieu solide

Dix grammes de déchets de tomates sont introduits par Erlenmeyer de 250 ml puis imbibés de l'eau distillée à différentes teneurs (40%, 50%, 60% et 70%) afin de déterminer la teneur optimale en humidité pour la production de la protéase. L'agent humidifiant est supplémenté par différents facteurs (le son de blé, la caséine, le nitrate d'ammonium, le NaCl et le ZnSO₄) selon un plan expérimental. Le pH des milieux est ajusté à 6,8 par la solution de NaOH 1N. Le contenu de chaque flacon doit être bien mélangé à l'aide d'une tige. Les milieux ainsi préparés sont stérilisés à 121°C pendant 20 min.

2.1.2. Milieu liquide

La farine de déchets de tomates est diluée dans de l'eau distillée tiède à différentes concentrations (2%, 4%, 6% et 8%) afin de déterminer la concentration optimale pour la production de la protéase. Après agitation pendant 20 min, la solution subit une centrifugation à 4000 rpm pendant 20 min. Le surnageant est filtré à travers de la gaze afin d'éliminer les impuretés. Le filtrat constitue alors le milieu de base. Il est supplémenté par les facteurs indiqués ci-dessus pour le milieu solide selon le même plan expérimental. Le pH du milieu est ajusté à 6,8 avec du NaOH 2N. Les milieux sont répartis en Erlenmeyers de 250 ml à raison de 50 ml par erlen puis autoclavés à 121°C pendant 20 min.

2.2. Conduite des fermentations

2.2.1. Fermentation solide (*SSF*)

Les milieux solides sont inoculés avec 1 ml de la suspension de spores, agités vigoureusement et incubés à 30°C dans un bain-marie thermostaté (CERTOMAT[®] WR ; Allemand) pendant 72 h. Toutes les expériences sont réalisées en triple.

Après fermentation, une quantité connue (5 g) de substrat fermenté est broyée manuellement (Chutmanop et *al.*, 2008) et mélangée avec 50 ml de solution de Tween 80 (0,1%). Le mélange est laissé s'homogénéiser dans un incubateur agitateur pendant 1 h à 180 rpm (Sumantha et *al.*, 2005). Le mélange est alors filtré à travers un tissu de coton pour éliminer les solides (Tunga et *al.*, 2003) ; le filtrat est lui-même clarifié par une autre filtration sur papier filtre (Whatman n° 1). Le filtrat clair obtenu constitue l'extrait enzymatique brut ; il est conservé au congélateur pour les études analytiques ultérieures.

2.2.2. Fermentation liquide (*SmF*)

Les milieux liquides sont inoculés avec 1 ml de la suspension de spores et incubés à 30°C pendant 72 h sous agitation à 180 rpm dans un incubateur agitateur (Edison, NJ. USA) (Sandhya et *al.*, 2005b). Toutes les expériences sont réalisées en triple.

Après fermentation, les milieux de culture sont filtrés sur papier Whatman n° 1. Le filtrat clair représente l'extrait enzymatique brut. Il est congelé pour les dosages ultérieurs.

A la fin des fermentations (solides et liquides), les paramètres suivants sont estimés : pH, biomasse, protéines et activité protéolytique.

3. Méthodes analytiques

3.1. Détermination de la matière sèche (Le coq, 1965)

La matière sèche des déchets de tomates est déterminée par séchage d'un échantillon de 5 g introduit dans une capsule en porcelaine séchée et placée dans une étuve à 105 ± 2°C (JOUAN) jusqu'à poids constant (Annexe 2).

3.2. Détermination des cendres (Le coq, 1965)

La teneur en cendres correspond conventionnellement à la masse du résidu d'incinération de la substance dans les conditions déterminées ci-après. Les capsules contenant la prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche sont portées au four à moufle électrique (Heraeus) et chauffées très progressivement jusqu'à 550°C. Les échantillons sont maintenus à cette température pendant 5 h (Annexe 2).

3.3. Détermination des sucres totaux (Dubois et *al.*, 1956)

Les sucres totaux des déchets de tomates sont déterminés par la méthode « *phenol-sulfuric-acid* ». Cette méthode est utilisée largement à cause de sa sensibilité et sa simplicité. Les sucres sont dégradés à chaud en présence d'acide sulfurique concentré, ce qui provoque le départ de plusieurs molécules d'eau. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthylfurfural dans le cas d'un hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces produits se condensent avec le phénol pour donner le complexe jaune-orangé. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses en cause. Le protocole est décrit en Annexe 3.

Après dosage, le taux de sucre est calculé par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie avec une solution mère de glucose à 100 µg/ml (voir Fig. a. dans Annexe 4). Chaque dosage est effectué en triple.

3.4. Détermination des protéines (Lowry et *al.*, 1951)

Le principe du dosage des protéines est fondé sur la résultante de deux réactions ; la première est la réaction de Biuret, où la présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin entraîne la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et la liaison peptidique dans la protéine ; la deuxième est la réaction au réactif de *Folin-Ciocalteu* qui réagit sur la tyrosine et la tryptophane présentes dans les protéines et se réduit en un complexe bleu. Cela engendre une réduction par perte d'un à trois atomes d'oxygène et c'est la fixation de cuivre par chélation qui faciliterait le transfert d'électrons vers ce réactif. Le protocole est décrit en Annexe 3.

Après dosage, le taux de protéines est calculé par référence à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution standard de *Bovin Serum Albumin* (BSA) à 500 µg/ml (voire Fig. b. dans Annexe 4). Ce dosage est réalisé sur les déchets de tomates, ainsi que sur les filtrats des cultures solides. Chaque dosage est effectué en triple.

3.5. Détermination de la biomasse

La détermination directe de la biomasse en fermentation solide n'a pu être réalisée à cause des contraintes pour séparer la biomasse microbienne du substrat de fermentation.

Par contre, dans la fermentation liquide, le poids sec de la biomasse est déterminé à la fin des fermentations après filtration sur papier Whatman n° 1 (préalablement séché et taré) et rinçage deux fois avec de l'eau distillée. Les échantillons sont séchés à 70°C jusqu'à poids constant puis pesés.

3.6. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité de la protéase neutre dans l'extrait enzymatique brut est dosée par la méthode décrite par Lenoir et Auberger (1977) et modifiée par Mechakra et *al.* (1999).

• Principe

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines et les polypeptides en libérant des acides aminés libres et des peptides simples qui se trouvent dans la phase soluble. Les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA. La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines, que l'on utilise comme standard de dosage colorimétrique de l'activité protéasique à l'aide du réactif de *Folin-Ciocalteu*. Celui-ci réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu.

• Réaction enzymatique

Le mélange réactionnel est préparé par addition de :

- 1 ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage ;
- 1,5 ml du tampon citrate - phosphate (0,1M / 0,2 M), pH 6,8 ;
- 2,5 de substrat (solution de caséine 2,5% dans le citrate de sodium à 0,02 M).

Après agitation et incubation 1 h au bain-marie à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid (4%). Le mélange est laissé reposer 30 min dans un bain de glace ou à 4°C (Beynon et Oliver, 2004; Wu et *al.*, 2006; Devi et *al.*, 2008) ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées (Sandhya et *al.*, 2005a). Il est ensuite filtré sur papier Whatman n° 1.

- **Protocole de dosage**

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'Anson (1938). 0,5 ml du filtrat sont mélangés avec 2,5 ml de Na₂CO₃ à 2% dans le NaOH (0,1N). Après agitation et incubation 15 min à température ambiante, 0,25 ml de réactif de *Folin-Ciocalteu* dilué au 1/4^{ème} sont ajoutés. Les mélanges sont bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant au moins 30 min (Sumantha et *al.*, 2006; Paranthaman et *al.*, 2009).

L'absorbance de la coloration bleue développée est lue à 750 nm ; l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 100 µg/ml (voir Fig. d. dans Annexe 4). Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1 µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme. Le blanc est préparé de la même manière, sauf que le TCA est rajouté avant le substrat. Chaque dosage est effectué en triple.

Tableau 11. Matrice d'expériences de Plackett et Burman pour l'étude de 7 facteurs avec 8 combinaisons.

<i>N° d'essai</i>	Facteurs						
	X_1	X_2	(X_3)	X_4	(X_5)	X_6	X_7
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
3	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
4	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
5	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
6	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

(+1) : niveau supérieur du facteur

(-1) : niveau inférieur du facteur

Tableau 12. Les différents facteurs étudiés et leurs concentrations correspondantes.

Facteurs	Code du facteur	Niveau (-)	Niveau (+)	
			<i>Culture solide</i>	<i>Culture liquide</i>
Son de blé	X_1	0%	25% (w/w)	1,45% (w/v)
Caséine	X_2	0%	1% (w/v)	1% (w/v)
Erreur	X_3	-	-	-
NH₄NO₃	X_4	0%	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)
Erreur	X_5	-	-	-
NaCl	X_6	0%	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
ZnSO₄.7H₂O	X_7	0%	0,01% (w/v)	0,01% (w/v)

4. Méthode d'optimisation

L'optimisation des milieux de cultures est réalisée en deux étapes ; la première étape a pour but de sélectionner les paramètres (variables) ayant un effet positif sur la production de la protéase neutre en utilisant le plan de Plackett et Burman (1946), la deuxième étape permet de déterminer les optima des paramètres sélectionnés par le plan composite centré de Box et Wilson (1951).

4.1. Sélection des variables significatives par le plan d'expériences de Plackett et Burman

Le plan d'expériences de Plackett et Burman est constitué de matrices carrées ne contenant que des éléments égaux à +1 ou -1. Dans cette étude, la matrice employée étudie 7 facteurs (5 réels et 2 irréels) pour 8 combinaisons (Tableau 11). Les facteurs de la dernière combinaison étant toujours pris au niveau (-1). Les concentrations réelles de l'ensemble des facteurs testés sont consignées dans le Tableau 12.

Les effets principaux de chaque variable sur l'activité protéolytique sont estimés comme la différence entre chacune des moyennes des mesures effectuées au niveau supérieur et au niveau inférieur (Annexe 5).

La signification de chaque variable sur la production de la protéase neutre, la biomasse et les protéines est déterminée via le test-*t* de Student (Annexe 5). Le niveau de confiance accepté est $(1 - \alpha) \geq 70\%$.

La réponse expérimentale \hat{Y} s'écrit sous forme d'une équation du premier degré où seules sont retenues les variables explicatives X_i à effet significatif positif.

$$\hat{Y} = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \varepsilon \quad (1)$$

- \hat{Y} la réponse expérimentale ;
- β_0 constante ;
- β_i coefficient de régression de la variable explicative X_i ;
- X_i variable explicative ;
- ε la moyenne des erreurs expérimentales.

Tableau 13. Structure du plan composite centré à deux facteurs.

<i>N^o d'essai</i>	Niveaux codés	
	X_1	X_2
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	-1,414	0
9	0	-1,414
10	1,414	0
11	0	1,414

4.2. Détermination des optima à l'aide du plan composite centré de Box et Wilson

Le plan composite centré de Box et Wilson (1951) est adopté pour déterminer les optima des deux variables significatives permettant la production maximale de la protéase neutre par *A. oryzae*. Notre plan est formé de trois parties distinctes générant 11 traitements de combinaisons (Tableau 13).

- Un plan factoriel complet (2^2) à deux niveaux factoriels (-1, +1) ;
- 2.k soit 4 points en étoiles, avec des niveaux (- α) et (+ α), $\alpha = 1,414$;
- N=3 répétitions du point central (niveau 0).

Un tel plan est représenté par l'équation polynomiale du second degré suivante :

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (2)$$

\hat{Y} la réponse (activité protéolytique) ;
 X_1, X_2 les formes codées des variables explicatives ;
 β_0 la constante du modèle ;
 β_1, β_2 les coefficients linéaires ;
 β_{11}, β_{22} les coefficients quadratiques ;
 β_{12} le coefficient d'interaction.

La relation entre les valeurs codées des variables entrées et ses valeurs réelles (Tableaux 14a et 14b) est décrite par l'équation suivante :

$$X_i = \frac{(A_i - A_0)}{\Delta A} \quad \text{où : } X_i : \text{valeur codée du facteur ;}$$

A_i : valeur réelle de ce facteur ;
 A_0 : valeur réelle du même facteur au niveau central ;
 ΔA : pas entre le niveau central et les niveaux ± 1 .

Le plan composite centré permet d'exprimer les résultats sous forme d'un modèle quadratique nécessitant une analyse de la variance (ANOVA) qui donne la statistique de Fisher F . En général, pour que les prédictions soient significatives, la valeur de F observée doit être plus élevée que la valeur tabulée p .

La validité du modèle est vérifiée en déterminant les coefficients de corrélation multiple (R^2) et R^2 ajusté. Lorsque R^2 est large, la régression a été alors expliquée pour une large proportion de variabilité totale des valeurs observées de \hat{Y} , ce qui favorise le modèle.

Tableau 14. Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels utilisés dans le plan composite centré à 2 facteurs.

a. Culture solide

Facteurs	Niveaux codés				
	$-\alpha$ (-1,414)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,414)
X_1 : Caséine (g/l)	2,93	5	10	15	17,07
X_2 : NaCl (g/l)	0,086	0,5	1,5	2,5	2,92

b. Culture liquide

Facteurs	Niveaux codés				
	$-\alpha$ (-1,414)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,414)
X_1 : Son de blé (g/l)	4,1	7	14	21	23,9
X_2 : NaCl (g/l)	0,086	0,5	1,5	2,5	2,92

4.3. Analyse statistique

Les coefficients de régression ainsi que le test de *Student* pour la régression linéaire multiple sont évalués à l'aide du logiciel « Minitab 15 » (Minitab Inc, PA, USA).

Concernant le plan composite centré, les dérivés par rapport à 0 permettant de déterminer les coordonnées des extremums qui sont ensuite transformées en valeurs réelles (les optima).

4.4. Expérience de confirmation

Deux fermentations sont réalisées en triple avec les optima calculés, l'une pour la culture solide et l'autre pour la culture liquide, afin de confirmer la validité du modèle.

5. Cinétique de production de la protéase neutre par *A. oryzae*

Les milieux optimisés sont ensemencés et incubés à 30°C pendant 144 h. Des prélèvements sont effectués chaque 12 h afin de mesurer la production de la protéase neutre en *SSF* et en *SmF* ; ce qui permet d'établir leurs cinétiques en fonction du temps et déterminer le meilleur temps de production.

6. Etude des caractéristiques de la protéase neutre produite

L'extrait de la protéase neutre produite a été étudié afin de déterminer quelques caractéristiques de l'enzyme : pH optimal, température optimale, stabilité à la température optimale et effet des effecteurs (activateurs / inhibiteurs).

6.1. Détermination du pH optimal

Le pH optimum de la protéase neutre des deux types de cultures est déterminé par l'utilisation des solutions tampons à des pH de 4 à 10 (avec un intervalle de 0,5).

- Citrate - phosphate (0,1 M / 0,2 M) de pH 4 à 7,5 (plus le pH 6,8).
- Glycine - NaOH (0,1 M) de pH 8 à 10.

6.2. Détermination de la température optimale

L'influence de la température sur l'activité de la protéase neutre des deux types de cultures est étudiée en incubant le mélange réactionnel à différentes températures (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 et 90°C) pendant 1 h à pH optimal.

6.3. Stabilité à la température optimale

La stabilité de l'enzyme est déterminée par incubation des deux mélanges réactionnels à la température optimale à différents intervalles de temps (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 90 min).

6.4. Effet des effecteurs

L'activité protéolytique est mesurée en présence de l'EDTA, de Zn^{++} et de Ca^{++} (à des concentrations de 1 et de 5 mM), du NaCl (1% et 5%) et de Tween 80 (1% et 2%).

Les activités résiduelles de la protéase neutre produite par *SSF* et *SmF* sont ensuite comparées avec celle du contrôle incubé dans les mêmes conditions sans effecteurs.

Résultats et discussions

1. Composition de déchets de tomates

L'étude de la composition de déchets de tomates utilisés pour la préparation des milieux de culture a donné les résultats résumés dans le Tableau 15.

Tableau 15. Composition de déchets de tomates par rapport à 100% de déchets séchés

Paramètre	Pourcentage
Matière sèche	90,1%
Cendres	4,45%
Sucres solubles	13,85%
Protéines	12,33%

Ces résultats font apparaître une teneur en matière sèche très élevée (90,1%) comparable à celle rapportée par Alvarado et *al.* (2001), à savoir une valeur moyenne de 89,9%. Ils montrent également la richesse de déchets de tomates en sels minéraux (4,45%), ce qui est en concordance avec les travaux décrits par Jafari et *al.* (2006) et Del Valle et *al.* (2006) qui indiquent une teneur de 4,24% et 3,92%, respectivement.

Les déchets de tomates utilisés au cours de cette étude contiennent un taux de sucres totaux de 13,85%, soit une valeur très faible par rapport à celle rapportée par Alvarado et *al.* en 2001 (59,07%). Cela s'explique par le fait que les glucides présents dans les résidus de tomates sont principalement des fibres dont une proportion élevée (40,54%) est constituée de fibres insolubles (Alvarado et *al.*, 2001).

Par ailleurs, la teneur en protéines totales est faible par rapport à celle annoncée par la littérature (17,66% pour Alvarado et *al.*, 2001 ; 19,27% pour Del Valle et *al.*, 2006 ; 19,5% pour Denek et Can, 2006 et plus de 20,77% pour Jafari et *al.*, 2006). Al-Wandawi et *al.* (1985) rapportent également une teneur très élevée en protéines (~ 40% dans les graines et environ 11% dans la peau).

La composition chimique de déchets de tomates peut varier fortement d'une usine à l'autre ou au sein d'une même usine. D'après Jafari et *al.* (2006). Ces variations sont dues principalement à :

- La variété de tomate employée ;
- Les méthodes de récoltes (manuelle ou mécanique) ;
- Les technologies utilisées dans le processus de transformation de tomates.

Selon la bibliographie, il existe des différences entre la composition chimique des fruits de tomates et celle des déchets de tomates ; cependant, selon Ventura et *al.* (2009), les fruits de tomates contiennent 17% de protéines ; soit une teneur similaire à celle des déchets.

- **Conclusion**

Par leur richesse en matières carbonées et azotées et en sels minéraux, les déchets de tomates peuvent être aisément utilisés comme milieu de base pour la culture des microorganismes, en particulier les moisissures. En effet, d'après Knoblich et *al.* (2005), les déchets de tomates sont équivalents à la farine de soja comme source de protéine ; ils sont donc favorables à l'induction de la production des protéases.

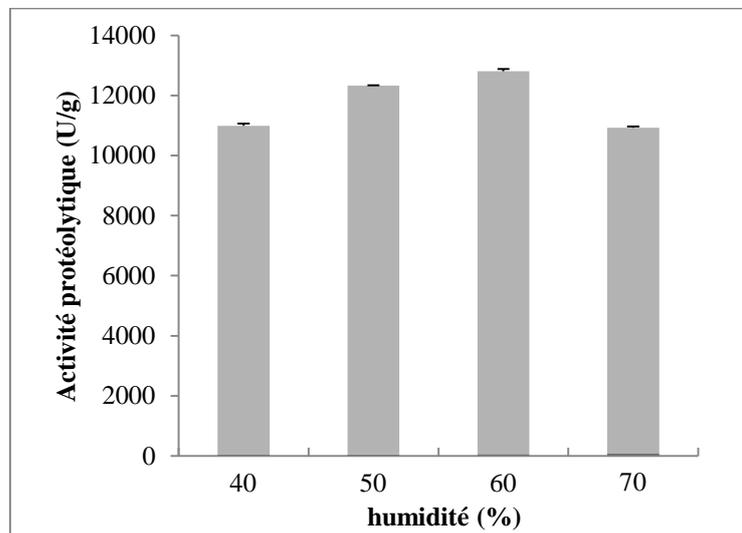


Fig. 6. Effet de la teneur en humidité initial sur la production de protéase en *SSF*.

2. Optimisation des milieux de cultures

2.1. Détermination du taux d'humidité optimal en culture solide

Les résultats de la production de la protéase en fonction du taux d'humidité sont présentés dans la Fig. 6. Ils montrent que le niveau optimal d'humidité se situe entre 50% et 60% avec une activité supérieure pour le taux 60% (12745 U/g). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par de nombreux auteurs en particulier Agrawal et *al.* (2005) pour l'activité protéasique produite par *A. oryzae* NCIM 649 sur le son de blé supplémenté par 0,1% des protéines de soja, Lazim et *al.* (2009) pour la production d'une protéase alcaline par *Streptomyces* sp. CN902 cultivée sur un mélange du son de blé et des pierres de dattes hachées (5 : 5) et Chellappan et *al.* (2006) lors de la production d'une protéase alcaline par *Engyodontium album* BTMFS10 sur un milieu à base du son de blé. Tous ont rapporté un taux d'humidité optimal de 60%.

De même, ces résultats sont très proches de ceux obtenus pour la production de la protéase neutre par *A. oryzae* (Sumantha et *al.*, 2005) et la protéase alcaline par la même espèce (Chutmanop et *al.*, 2008; Murthy et Naidy, 2010) où l'humidité optimale est de 50%. En outre, Germano et *al.* (2003) décrivent l'exigence de 55% de teneur en humidité pour une production maximale de la protéase neutre par *Penicillium* LPB-9.

Pour d'autres auteurs par contre, les teneurs en humidité maximales sont supérieures à 60%. C'est le cas dans la sécrétion de la protéase alcaline par *Bacillus subtilis* DM-04 (Mukherjee et *al.*, 2008) et la production de la protéase alcaline par *Beauveria felina* (Agrawal et *al.*, 2005), où l'humidité initiale optimale a été trouvée à 100% et 120%, respectivement.

L'humidité initiale du milieu est un facteur critique en *SSF* car c'est elle qui détermine la croissance microbienne et le rendement en produit (Gervais et Molin, 2003). Des taux d'humidité faibles ou élevés affectent largement les activités métaboliques des cultures et par conséquent, la synthèse des produits. Les déchets de tomates ont un taux d'humidité faible (~10%), à environ 7 - 13%, l'humidité naturelle de substrat est trop basse pour supporter la croissance de la moisissure et pour cela le substrat doit être humidifié pendant la préparation (Chutmanop et *al.*, 2008). Dans les cultures solides fongiques et bactériennes, des niveaux d'humidité inférieurs peuvent conduire à une réduction de la solubilité des éléments nutritifs, un faible degré de gonflement des substrats et une tension d'eau plus élevée dans les substrats solides (Gervais et Molin, 2003; Lazim et *al.*, 2009).

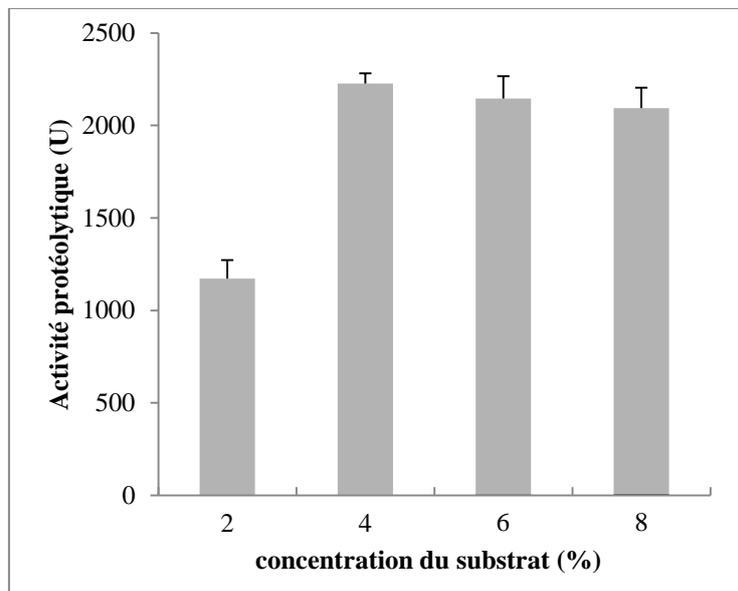


Fig. 7. Effet de la concentration du substrat sur la production de protéase en *SmF*.

De même, des niveaux d'humidité plus élevée que 60% engendrent une diminution de l'activité protéolytique (10708 U/g). Car, des teneurs en humidité élevées peuvent provoquer une diminution de la porosité, ce qui interfère avec le transfert de l'oxygène ainsi que la perte de la structure des particules et la réduction du volume de gaz. De plus, elles diminuent les échanges gazeux et augmentent la formation du mycélium aérien (Sandhya et *al.*, 2005b; Murthy et Naidy, 2010).

2.2. Détermination de la concentration optimale du substrat en culture liquide

Un des paramètres les plus importants dans les systèmes de fermentation est la concentration du substrat utilisé. Dans cette étude, les résultats montrent que l'activité protéasique la plus élevée (2223 U) est produite par *A. oryzae* NRRL 2220 dans le milieu à 4% de déchets de tomates (Fig. 7). Par ailleurs, Freixo et *al.* (2008c) préconisent l'utilisation de 2% de déchets de tomates pour la production d'une laccase et d'une xylanase par *Coriolus versicolor*. D'un autre côté, un plan composite centré réalisé par Katapodis et *al.* (2006) a donné des optima de 4,6% des épis du maïs et de 2,1% de farine des graines de tomates pour un maximum d'activité xylanasiq.

Tableau 16a. Résultats du pH, de protéines et de la protéase selon le plan de Plackett et Burman en culture solide.

<i>N° d'essai</i>	<i>X₁</i>	<i>X₂</i>	<i>X₃</i>	<i>X₄</i>	<i>X₅</i>	<i>X₆</i>	<i>X₇</i>	pH	Protéines (g/l)	Activité (U/g)
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	6,77	4,11	14571
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	7,67	4,29	14168
3	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	6,51	4,20	14053
4	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	6,73	5,35	17512
5	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	7,06	3,75	13129
6	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	6,94	3,45	10379
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	7,2	5,27	13735
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	6,73	4,15	12967

U : $\mu\text{g.h}^{-1}.\text{ml}^{-1}$

Tableau 16b. Résultats du pH, de la biomasse et de la protéase selon le plan de Plackett et Burman en culture liquide.

<i>N° d'essai</i>	<i>X₁</i>	<i>X₂</i>	<i>X₃</i>	<i>X₄</i>	<i>X₅</i>	<i>X₆</i>	<i>X₇</i>	pH	Biomasse (g/l)	Activité (U)
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	8,84	7,59	2229
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	8,52	6,82	2307
3	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	8,45	8,79	2813
4	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	8,79	6,30	2172
5	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	8,14	6,25	2453
6	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	7,95	4,65	2117
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	8,60	5,40	2266
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8,56	3,55	2240

U : $\mu\text{g.h}^{-1}.\text{ml}^{-1}$

2.3. Résultats de l'optimisation de la production de la protéase neutre par la méthode de Plackett et Burman

L'effet des facteurs étudiés dans le cadre du plan du Plackett et Burman (son de blé, caséine, nitrate d'ammonium, NaCl et ZnSO₄) a permis de mesurer 4 réponses : pH, biomasse, protéines et activité protéolytique. L'analyse statistique et la modélisation des résultats ont permis de mesurer l'effet de chaque facteur et son niveau de signification sur la croissance et la production. L'ensemble des résultats est synthétisé dans les Tableaux 16a et 16b.

2.3.1. Résultats du pH

Les résultats du pH des 8 essais sont mentionnés dans le Tableau 17. Ils montrent une stabilité du pH proche de la neutralité dans les cultures solides avec une légère diminution dans certains essais. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les déchets de tomates possèdent un excellent pouvoir tampon, comme c'est le cas pour la plupart des résidus agroindustriels (Chutmanop et *al.*, 2008). La diminution du pH peut être due à une libération d'acides organiques dans le milieu (Botton et *al.*, 1990).

Tableau 17. Résultats du pH du plan de Plackett et Burman.

<i>N°d'essai</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
Moyennes des pH en SSF	6,77	7,67	6,51	6,73	7,06	6,94	7,2	6,73
Moyennes des pH en SmF	8,84	8,52	8,45	8,79	8,14	7,95	8,60	8,56

On observe par contre, une augmentation importante du pH dans les cultures liquides ; ce qui indique une production d'ammoniac résultant du métabolisme de protéines après l'action des protéases puis de l'oxydation des acides aminés au cours de leur utilisation comme source d'énergie (García-Gómez et *al.*, 2009). L'oxydation s'effectue selon la réaction suivante :

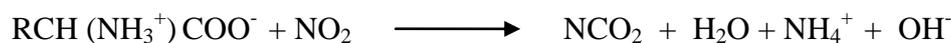


Tableau 18. Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production des protéines en *SSF*.

Facteur	Effet	Coef.	Er-T Coef.	<i>t</i>	<i>p</i>
<i>Constante</i>		4,3213	0,1193	36,21	0,001
Son de blé	-0,4674	-0,2337	0,1193	-1,96	0,189
Caséine	0,8676	0,4338	0,1193	3,63	0,068
NH₄NO₃	-0,2626	-0,1313	0,1193	-1,10	0,386
NaCl	0,6426	0,3213	0,1193	2,69	0,115
ZnSO₄.7H₂O	0,0026	0,0013	0,1193	0,01	0,993

Ces résultats indiquent que le pH du milieu est affecté par les processus enzymatiques et le transport des divers composants à travers la membrane. En effet, les variations du pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques. Mais ces variations dépendent du type de fermentation (Sandhya et al., 2005b).

2.3.2. Effet des facteurs sur la production de protéines en SSF

En SSF, la biomasse est estimée par le dosage des protéines solubles (Sumantha et al., 2008) ; car il est impossible de la mesurer à cause des difficultés de séparation du mycélium à partir du substrat de fermentation.

Les résultats des protéines (Tableau 16a) montrent que le meilleur taux de protéines (5,35 g/l) est obtenu dans l'essai n° 4 (contenant la caséine, le NaCl et le ZnSO₄), alors que le taux le plus faible (3,45 g/l) est constaté dans l'essai n° 6 (contenant le nitrate d'ammonium et le ZnSO₄). Avec une moyenne de 4,32 g/l. Les taux de protéines les plus élevés correspondent à des activités protéolytiques également importantes.

- **Effet du son de blé**

L'analyse statistique des résultats (Tableaux 18) révèle que la présence du son de blé influe de manière significative ($p = 0,189$) mais négativement ($\beta = - 0,23$) sur la production des protéines soit une diminution de 11,26% par rapport à son absence. Cela peut s'expliquer par la quantité du son de blé ajoutée aux déchets de tomates solides déjà riches en sucres ; une forte augmentation du taux de sucres dans le milieu peut jouer le rôle d'un répresseur de la synthèse des protéines (Hölker et al., 2004; Sandhya et al., 2005a).

- **Effet de la caséine**

La caséine exerce pour sa part un effet positif très significatif sur la production des protéines en SSF ($p = 0,068$), soit une augmentation de 21%.

- **Effet de NaCl**

La présence de NaCl à un taux de 0,1% se traduit par un effet positif très significatif sur la production protéique ($p = 0,115$), ce qui correspond à une augmentation de 15,48%.

- **Effet du nitrate d'ammonium et de ZnSO₄**

Le nitrate d'ammonium ainsi que le ZnSO₄ entraînent un effet très faible ou négatif sur la production des protéines. Dans les deux cas, les résultats sont non significatifs.

Tableau 19. Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de la biomasse en *SmF*.

Facteur	Effet	Coef.	Er-T Coef.	<i>t</i>	<i>p</i>
<i>Constante</i>		6,1688	0,3109	19,84	0,003
Son de blé	2,3876	1,1938	0,3109	3,84	0,062
Caséine	0,7176	0,3588	0,3109	1,15	0,368
NH₄NO₃	-0,7774	-0,3887	0,3109	-1,25	0,338
NaCl	1,0326	0,5163	0,3109	1,66	0,239
ZnSO₄·7H₂O	0,9426	0,4713	0,3109	1,52	0,269

- **Modélisation**

La production des protéines s'exprime sous forme de l'équation suivante où seuls les deux facteurs X_2 et X_6 sont retenus :

$$\hat{Y}_{SSF} = 4,32 + 0,434 X_2 + 0,321 X_6 + \varepsilon$$

Où X_2 : caséine, X_6 : NaCl

2.3.3. Effets des facteurs testés sur la production de biomasse en *SmF*

Les résultats de biomasse ainsi que leur analyse statistique sont mentionnés dans les Tableaux 16b. et 19. D'après ces tableaux, le poids du mycélium sec d'*Aspergillus oryzae* dans la culture liquide varie de 3,55 à 8,79 g/l avec une moyenne de 6,16 g/l. La simple observation de ces résultats montre que la meilleure croissance est enregistrée dans l'essai n° 3 contenant le son de blé, le NaCl et le ZnSO₄ ; alors que la plus faible croissance est obtenue dans l'essai n° 8 où le milieu ne contient aucun des facteurs testés.

- **Effet du son de blé**

L'addition du son de blé influence de façon hautement significative la production de la biomasse en *SmF* ($p = 0,062$). Il est considéré comme source adéquate de carbone et d'énergie, entraînant une augmentation de 67,25%. Ceci est confirmé par les travaux de Sandhya et al. (2005b) qui préconisent l'utilisation du son de blé comme substrat de base dans les milieux de cultures. Sun et al. (2008) rapportent également l'augmentation de la croissance de *Penicillium decumbens* cultivée dans un milieu supplémenté par le son de blé.

- **Effet de la caséine**

L'apport en azote organique sous forme de caséine a un effet positif faible et non significatif sur la croissance mycélienne, car le milieu de base de déchets de tomates renferme de l'azote organique sous la forme de protéines (12,33%).

- **Effet du nitrate d'ammonium**

Le nitrate d'ammonium exerce de son côté un effet négatif non significatif. Ces résultats semblent être en accord avec les travaux de Johnvesly et Naik (2001) et de Patel et al. (2005) qui rapportent le même phénomène de répression de la croissance par l'ammonium.

- **Effet du NaCl**

Le NaCl à 0,1% affecte positivement la croissance mycélienne ($p = 0,239$) ; il entraîne une augmentation de 29% de biomasse. Ce résultat corrobore les études de Wang et *al.* (2005a) et de Patel et *al.* (2005) qui ont trouvé que l'addition du NaCl favorise fortement la croissance d'*A. oryzae* et de *Bacillus* sp., respectivement. C'est dû à la tolérance de NaCl par *A. oryzae* (Wang et *al.*, 2005a).

- **Effet de ZnSO₄**

La présence de sulfate du zinc dans le milieu de culture a un effet positif ($p = 0,269$) se traduisant par une augmentation du poids du mycélium de 26,55%. Cela s'explique par le rôle du zinc comme cofacteur enzymatique ; en effet, il existe plus de 300 enzymes dont l'activité dépend des ions Zn⁺⁺ (Pelmont, 1995).

- **Modélisation**

La réponse expérimentale (la biomasse) s'écrit sous la forme d'une équation du premier degré suivante avec sélection de trois facteurs à effet positif significatif.

$$\hat{Y}_{SmF} = 6,17 + 1,19 X_1 + 0,516 X_6 + 0,471 X_7 + \varepsilon$$

Où X_1 : son de blé, X_6 : NaCl, X_7 : ZnSO₄

De cette équation, on constate que le coefficient de régression de la variable explicative X_1 est le plus important. Donc, la production de la biomasse en *SmF* est mieux expliquée par cette variable. Ceci est confirmé par le taux de signification élevé ($p = 0,062$).

Tableau 20. Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de la protéase neutre.

a. Culture solide

Facteur	Effet	Coef.	Er-T Coef.	t	p
<i>Constante</i>		13814,3	449,2	30,75	0,001
Son de blé	332,0	166,0	449,2	0,37	0,747
Caséine	2364,4	1182,2	449,2	2,63	0,119
NH₄NO₃	-1923	-961,5	449,2	-2,14	0,166
NaCl	1586	793,0	449,2	1,77	0,220
ZnSO₄·7H₂O	427,6	213,8	449,2	0,48	0,681

b. Culture liquide

Facteur	Effet	Coef.	Er-T Coef.	t	p
<i>Constante</i>		2324,63	62,06	37,46	0,001
Son de blé	251,76	125,88	62,06	2,03	0,180
Caséine	-162,24	-81,12	62,06	-1,31	0,321
NH₄NO₃	-77,76	-38,88	62,06	-0,63	0,595
NaCl	202,76	101,38	62,06	1,63	0,244
ZnSO₄·7H₂O	55,26	27,63	62,06	0,45	0,700

2.3.4. Effet des facteurs sur la production de la protéase neutre

En culture solide, l'activité protéolytique varie de 10379 U/g à 17512 U/g avec une moyenne de 13814,25 U/g (Tableau 16a). L'activité la plus élevée est constatée dans l'essai n° 4 où le milieu de base est enrichi en caséine, en NaCl et en ZnSO₄. La composition de ce dernier semble être favorable aussi bien pour la production de l'enzyme ciblée (17512 U/g) que pour la production de protéines (5,35 g/l). Par contre, l'activité la plus faible est obtenue dans l'essai n° 6 où le milieu de culture contient le nitrate d'ammonium et le ZnSO₄.

En ce qui concerne la culture liquide, l'activité protéolytique varie de 2117 U à 2813 U avec une moyenne de 2324,6 U (Tableau 16b). L'activité protéolytique la plus importante est constatée dans l'essai n° 3 où le milieu de base est enrichi par le son de blé, le NaCl et le ZnSO₄. La composition de ce dernier semble favorable pour la production de la protéase neutre (2813 U) et pour la croissance microbienne (8,79 g/l). Au contraire, l'activité la plus faible est obtenue dans l'essai n° 6 contenant le nitrate d'ammonium et le ZnSO₄.

L'analyse statistique des résultats de la culture solide (Tableau 20a) et de la culture liquide (Tableau 20b) permet la mesure de l'effet de chaque facteur.

- **Effet du son de blé**

Dans la culture solide, l'augmentation de la production de la protéase neutre liée à la présence du son de blé est non significative. Ce qui diffère des résultats de Chutmanop *et al.* (2008) où de meilleurs rendements sont obtenus lorsque le son de riz est enrichi par du son de blé.

Par contre, dans la culture liquide, le son de blé à 1,45% (*w/v*) engendre un effet très significatif ($p = 0,180$) entraînant une augmentation de 11,24%.

Plusieurs auteurs ont remarqué l'efficacité du son de blé dans la synthèse des protéases ; Kumar *et al.* (2002) ont montré la potentialité de ce substrat pour la production de protéases par *Bacillus* sp. S4 et *Pseudomonas* sp. S22 en *SmF*. Il en est de même pour Sandhya *et al.* (2005b) qui ont trouvé que le son de blé est le substrat le plus efficace pour la production de la protéase neutre par *A. oryzae* NRRL 1808 soit en *SSF* ou en *SmF*.

Par ailleurs, la farine de blé entraîne un effet similaire à celui du son de blé. En effet, Joo et Chang (2005) ont montré qu'à 1%, elle augmente la production de la protéase par un facteur de 2,4 ; tandis que Margesin *et al.* (2005) ont trouvé que l'addition de 2% de la farine de soja

et de 0,5% de la farine de blé dans le milieu de culture de *Pedobacter cryoconitis* a augmenté la production de la métalloprotéase d'environ 40%.

Ces résultats en culture solide s'expliquent par la présence de quantités suffisantes de sucres solubles dans les déchets de tomates ; donc, l'addition du son de blé n'améliore pas la production et peut jouer le rôle d'un répresseur de la synthèse des protéases (Sandhya et al., 2005a).

En culture liquide, l'extrait de déchets de tomates est pauvre en sucres solubles du fait qu'une quantité importante de sucres solubles et de protéines est perdue avec les résidus solides débarrassés de ces déchets au cours de la centrifugation. En effet, l'enrichissement du milieu de culture en son de blé complète l'apport en sucre et en protéines aussi, car le son de blé en contient 18% d'amidon, 5% de sucres solubles et environ 18% de protéines : (Illman et al., 1993; Sun et al., 2008).

- ***Effet de la caséine***

Bien que les déchets de tomates soient riches en protéines, la présence de la caséine à 1% (w/v) dans le milieu conduit à une augmentation significative ($p = 0,119$) de la production de la protéase neutre de 18,23% en *SSF* par rapport au milieu de base. Des résultats similaires sont rapportés par différents travaux sur culture solide, aussi bien chez *Aspergillus oryzae* NRRL 2160 où la caséine augmente le rendement en protéase neutre par 59% (Battaglino et al., 1991), que chez *Aspergillus niger var. tieghem* où la présence de la caséine avec le son de blé augmente l'activité de la protéase acide d'environ 1,4 fois (Chakraborty et al., 1995).

Cependant, ces résultats sont en désaccord avec ceux de Sumantha et al. (2005) chez *A. oryzae*, de Chellappan et al. (2006) chez *Engyodontium album* et de Lazim et al. (2009) chez *Streptomyces* sp, qui ont tous trouvé que l'addition de la caséine dans le milieu de culture solide à base de son de blé n'augmentait pas la production de protéase.

L'induction de l'activité protéolytique par l'enrichissement des substrats en protéines semble être dépendante de la souche microbienne et du type de substrat utilisé pour l'expérience (Agrawal et al., 2005). Les sources d'azote organiques sont des inducteurs de la production d'une grande quantité de protéase par rapport aux sources inorganiques (Wang et al., 2008a). La caséine pourrait donc fournir les peptides nécessaires au processus d'induction.

Au contraire des *SSF*, la caséine à 1% (*w/v*) n'entraîne pas d'effet significatif sur la production de l'enzyme en *SmF* ; dans ce cas, l'effet est négatif et non significatif. Ceci est en accord avec les résultats de plusieurs études qui signalent des activités protéolytiques très faibles produites en présence de caséine en *SmF* (Joo et Chang, 2005; Laxman et *al.*, 2005; Tari et *al.*, 2006; Chi et *al.*, 2007; Abidi et *al.*, 2008; Hajii et *al.*, 2008). Ceci est probablement dû à la nature du substrat azoté ; en effet, les substrats simples tels que la caséine et la gélatine possèdent une faible solubilité et donnent des faibles rendements en activités enzymatiques en *SmF*. Au contraire, les substrats complexes tels que la farine de soja entraînent de bons rendements en activités protéolytiques (Sumantha et *al.*, 2006).

Cependant, lorsque le milieu est préparé avec des substrats autres que les déchets de tomates, la caséine peut devenir inductible de la production des protéases. C'est le cas de la production de la protéase alcaline en *SmF* par *Bacillus horikoshii* développée sur la farine de soja (1,5% ; *w/v*) et la caséine (1%, *w/v*) (Joo et *al.*, 2002).

- ***Effet du nitrate d'ammonium***

L'enrichissement par le NH_4NO_3 à 0,5% (*w/v*) influe négativement sur la production de la protéase neutre dans les deux types de culture. Dans la culture solide, l'influence est significative ($p = 0,166$) conduisant à une diminution de 14,83% de l'activité protéolytique, alors qu'en culture liquide, l'influence est non significative ($p = 0,595$).

Ce résultat est confirmé par la littérature où la production de la protéase est inhibée par les ions ammonium (Markovits et Acevedo, 1980; Patel et *al.*, 2005; Srinubabu et *al.*, 2007; Devi et *al.*, 2008), alors qu'elle est augmentée par les sources azotées organiques comme le tryptone, la peptone, l'extrait de levure et la farine de soja (Rao et *al.*, 2006; Abidi et *al.*, 2008). Ces conclusions supportent le phénomène de la répression de la croissance et la production de l'enzyme par l'ammonium décrite par Johnvesly et Naik (2001) et Patel et *al.* (2005).

Cependant, les travaux de Sumantha et *al.* (2005) et Chellappan et *al.* (2006) ont montré un effet positif de NH_4NO_3 sur la production de la protéase en culture solide. Par ailleurs, Ambati et Ayyanna (2001) ont pour leur part trouvé que cette source azotée augmente le rendement en acide citrique par *Aspergillus niger*.

- ***Effet du NaCl***

L'utilisation du NaCl à 0,1% (w/v) dans le milieu de culture semble avoir un effet positif significatif sur la production de la protéase neutre, aussi bien dans la culture solide ($p = 0,220$) que dans la culture liquide ($p = 0,244$) ; les augmentations sont de 12,23% en *SSF* et de 9% en *SmF*.

Ce résultat corrobore les études de Wang et *al.* (2005a) qui démontrent que la concentration optimale pour l'amélioration de la production de protéase par *A. oryzae* est de 1%. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres microorganismes ; c'est le cas de l'archaeon haloalcalophile *Natronococcus occultus* qui sécrète la protéase à 1-2 M de NaCl (Patel et *al.*, 2005) et de *Aspergillus clavatus* ES1 qui produit une protéase alcaline en présence de 0,3 g/l du NaCl (Hajii et *al.*, 2007).

Ces résultats peuvent être expliqués par le rôle protecteur des ions Na^+ contre la dénaturation de l'enzyme (Murthy et Naidu, 2010).

- ***Effet de ZnSO_4***

L'addition du $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 0,01% (w/v) au milieu de culture n'a aucun effet significatif sur la production de l'enzyme dans les deux types de cultures malgré que la protéase neutre d'*A. oryzae* soit une enzyme à zinc et que ce métal joue un rôle capital dans le maintien de l'activité enzymatique (Sumantha et *al.*, 2006). Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Hajii et *al.* (2008).

L'absence d'effet significatif du zinc pourrait s'expliquer par sa présence en quantité suffisante dans les déchets de tomates (Alvarado et *al.*, 2001). Cependant, plusieurs études préconisent l'emploi de ce sel pour la production de la protéase (Hajii et *al.*, 2007; Rajmalwar et Dabholkar, 2009).

- **Modélisation**

L'analyse statistique permet d'exprimer la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* NRRL 2220 en fonction des facteurs sélectionnés, c'est-à-dire ayant un effet significatif positif :

$$\hat{Y}_{SSF} = 13814 + 1182 X_2 + 793 X_6 + \varepsilon$$

$$\hat{Y}_{SmF} = 2325 + 126 X_1 + 101 X_6 + \varepsilon$$

En effet, la production de la protéase neutre est mieux expliquée par les variables explicatives ayant les coefficients de régression les plus importants, à savoir X_2 (caséine) et X_6 (NaCl) en *SSF* et X_1 (son de blé) et X_6 (NaCl) en *SmF*.

La détermination des concentrations optimales des facteurs sélectionnés nécessite d'employer un autre plan d'expériences représenté par le plan composite centré de Box et Wilson (1951).

Tableau 21. Résultats de l'activité de la protéase neutre produite selon le plan composite centré de Box et Wilson.

a. Culture solide

<i>N° d'essai</i>	Niveaux codés		Activité protéolytique (U/g)
	Caséine	NaCl	
1	-1	-1	15270
2	1	-1	17470
3	-1	1	14145
4	1	1	15670
5	0	0	16920
6	0	0	16870
7	0	0	17145
8	-1,414	0	15220
9	0	-1,414	16320
10	1,414	0	18045
11	0	1,414	14545

b. Culture liquide

<i>N° d'essai</i>	Niveaux codés		Activité protéolytique (U)
	Son de blé	NaCl	
1	-1	-1	2270
2	1	-1	3700
3	-1	1	2070
4	1	1	3570
5	0	0	3900
6	0	0	3830
7	0	0	3850
8	-1,414	0	1690
9	0	-1,414	3670
10	1,414	0	3530
11	0	1,414	2520

2.3.5. Détermination des optima par la méthode de Box et Wilson

Les résultats de l'ensemble des réponses de l'activité protéolytique réalisées selon le plan expérimental de Box et Wilson (1951) sont rassemblés dans le Tableau 21a pour les cultures solides et le Tableau 21b pour les cultures liquides.

2.3.5.1. Analyse de la variance

Les valeurs observées de R^2 montrent que le modèle peut expliquer des variations totales de la réponse à 97,60% en SSF et à 96,64% en SmF (une valeur $> 0,75$ indique la validité du modèle). Cela veut dire que le modèle choisi est représentatif du système et confirme la forte relation qui existe entre la production de la protéase neutre et les deux facteurs dans les deux types de cultures (Tableau 22a et 22b). Le R^2 ajusté corrige les valeurs de R^2 . Les valeurs de R^2 ajusté (95,19% en SSF ; 93,28% en SmF) dans cette étude préconisent une signification élevée du modèle (pour un bon modèle statistique, la valeur de R^2 devrait être la plus proche possible de 1) (Dagnelie, 1977).

L'analyse de la variance confirme les résultats de R^2 et donne une statistique $F = 40,58 > (p < 0,001)$ pour la culture solide et $F = 28,75 > (p = 0,001)$ pour la culture liquide. Cela confirme aussi la forte corrélation existant entre la production de la protéase neutre et les facteurs sélectionnés dans chacune des deux types de cultures. Les résultats montrent par ailleurs que la valeur observée F pour la régression linéaire est beaucoup plus élevée que la valeur tabulée p aussi bien en SSF ; $F = 72,72 > (p < 0,001)$ qu'en SmF ; $F = 46,55 > (p = 0,001)$. C'est aussi le cas pour les effets des carrés ; en SSF : $F = 27,99 > p = 0,002$ et en SmF : $F = 25,32 > p = 0,002$ (Annexe 6).

En se basant sur les résultats obtenus avec les analyses de la régression, l'interaction entre le NaCl et la caséine en culture solide se traduit par un effet négatif sur la production de la protéase neutre ($\beta_{12} = -168,7$; $F = 1,49 > p = 0,277$). Par contre, en culture liquide, l'interaction du NaCl avec le son de blé a un effet positif ($\beta_{12} = 17,5$; $F = 0,03 < p = 0,877$). Dans les deux types de cultures, les effets sont non significatifs. De ce fait, les termes X_1 et X_2 du modèle sont hautement significatifs ($p < 0,05$), alors que l'effet des interactions est non significatif ($p > 0,05$) (Tableau 22a et Tableau 22b).

Tableau 22. Analyse statistique des résultats du plan composite centré.

a. Culture solide

Terme	Coef.	Er-T. Coef.	t	p
<i>Constant</i>	16978,4	159,81	106,243	0,000
X_1	965,1	97,87	9,861	0,000
X_2	-679,5	97,87	-6,943	0,001
X_1^2	-271,4	116,50	-2,330	0,067
X_2^2	-871,6	116,50	-7,481	0,001
X_1X_2	-168,7	138,40	-1,219	0,277

$R^2 = 97,60\%$, R^2 (prév) = 84,21%, R^2 (ajust) = 95,19%

b. Culture liquide

Terme	Coef.	Er-T. Coef.	t	p
<i>Constante</i>	3859,99	124,14	31,093	0,000
X_1	691,57	76,03	9,096	0,000
X_2	-244,55	76,03	-3,217	0,024
X_1^2	-612,60	90,50	-6,769	0,001
X_2^2	-370,03	90,50	-4,089	0,009
X_1X_2	17,50	107,51	0,163	0,877

$R^2 = 96,64\%$, R^2 (prév) = 76,28%, R^2 (ajust) = 93,28%

2.3.5.2. *Forme des modèles*

La production de la protéase neutre (\hat{Y}) en fonction des facteurs utilisés est exprimée par les équations du second degré suivantes :

$$\hat{Y}_{SSF} = 16978,4 + 965,1 X_1 - 679,5 X_2 - 271,4 X_1^2 - 871,6 X_2^2 - 168,7 X_1 X_2 \quad (1)$$

Où : X_1 est la caséine et X_2 est le NaCl.

$$\hat{Y}_{SmF} = 3859,99 + 691,57 X_1 - 244,55 X_2 - 612,60 X_1^2 - 370,03 X_2^2 + 17,50 X_1 X_2 \quad (2)$$

Où : X_1 est le son de blé et X_2 est le NaCl.

2.3.5.3. *Calcul des optima*

Les optima des facteurs utilisés sont obtenus par le calcul des dérivées partielles des équations (1) et (2), ce qui permet de déterminer les coordonnées codées des extremums qui sont ensuite convertis en valeurs réelles traduisant les valeurs optimales des facteurs retenus (caséine et NaCl en *SSF*, son de blé et NaCl en *SmF*) (Tableau 23).

Tableau 23. Coordonnées codées des extremums des facteurs étudiés en *SSF* et en *SmF* et leurs valeurs réelles.

	Facteurs	Coordonnées codées	Valeurs réels
<i>SSF</i>	Caséine	1,96	19,8 g/l
	NaCl	- 0,58	0,92 g/l
<i>SmF</i>	Son de blé	0,56	17,92 g/l
	NaCl	- 0,32	1, 18 g/l

- **Optima en *SSF***

- *Caséine*

La concentration optimale de la caséine en *SSF* est évaluée à 19,8 g/l. Cette valeur est très proche de celle rapportée par Battaglino et *al.* (1991) pour la production de cette même enzyme par la souche *A. oryzae* NRRL 2160 ; les auteurs rapportent une concentration de 20 g/l de caséine dans un milieu à base de coque du riz : son du riz (7 : 3).

- *NaCl*

La concentration optimale de NaCl est de 0,92 g/l. Cette valeur est en parfaite concordance avec celles préconisées par Sumantha et *al.* (2008) et Paranthaman et *al.* (2009) qui décrivent l'utilisation de 1 g/l de chlorure de sodium pour la production d'une protéase neutre, les premiers par *A. oryzae* NRRL 2217 sur un mélange de substrats solides, son de blé et déchets d'huile de noix de coco (3 : 1) et les derniers par *A. niger* MTCC 281 sur déchets de riz.

- **Optima en *SmF***

- *Son de blé*

La concentration optimale de son de blé en *SmF* est de 17,92 g/l. Ce résultat corrobore celui obtenu par Mehta et *al.* (2006) qui ont trouvé que 15 g/l de son de blé ajoutés à 10 g/l de farine de blé peuvent augmenter la production de la protéase alcaline par *Streptomyces* sp. De plus, Hajji et *al.* (2007) recommandent l'utilisation de ce substrat à 10 g/l avec 2 g/l de la farine du poisson et des sels minéraux pour la production d'une protéase alcaline par *Aspergillus clavatus* ES1. Ces différences sont dues apparemment à la composition du milieu et à la souche microbienne utilisée.

- *NaCl*

La concentration optimale de NaCl en *SmF* est de 1,18 g/l. Ce résultat est inférieur à celui préconisée par Sandhya et *al.* (2005b) qui décrivent l'utilisation de 5 g/l de NaCl pour la production de la protéase neutre par *A. oryzae* NRRL 1808 sur son de blé (2%; *w/v*), ainsi qu'elle est inférieur à celui rapportée par Sinsuwan et *al.* (2008) en optimisant la production de la protéase alcaline par *Virgibacillus* sp et ont déduit une concentration optimale de 5%.

- **Conclusion**

La méthode statistique adoptée dans cette étude représentée par le plan composite centré de Box et Wilson (1951) a permis d'établir la composition du milieu de culture pour une production maximale de la protéase neutre par *A. oryzae* NRRL 2220 :

- Pour la culture solide : déchets de tomates avec un taux d'humidité de 60% ; l'agent humidifiant contenant 19,8 g/l de caséine et 0,92 g/l de NaCl.
- Pour la culture liquide : milieu de base à 4% (*w/v*) de déchets de tomates enrichi par 17,92 g/l du son de blé et 1,18 g/l de NaCl.

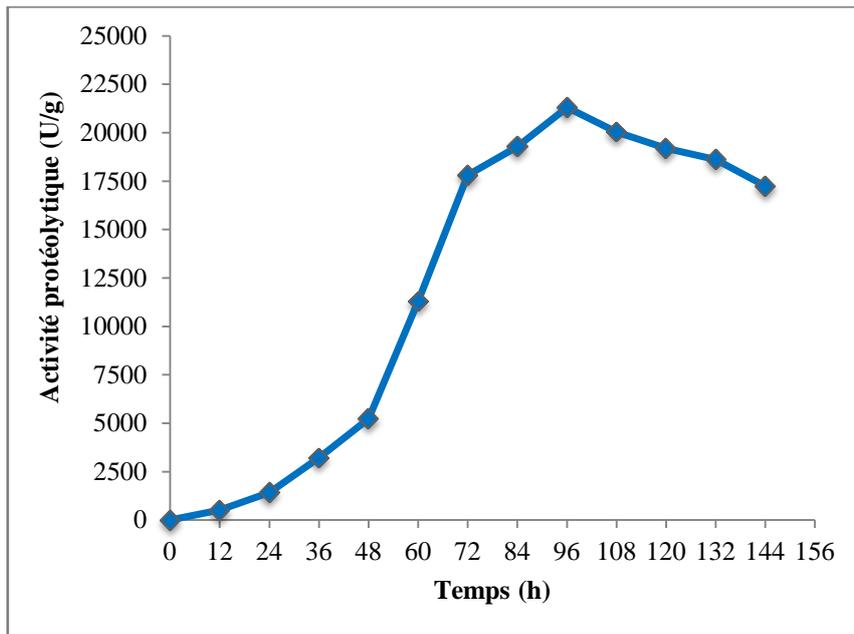


Fig. 8. Evolution de la production de la protéase neutre par *A. oryzae* NRRL 2220 sur milieu solide.

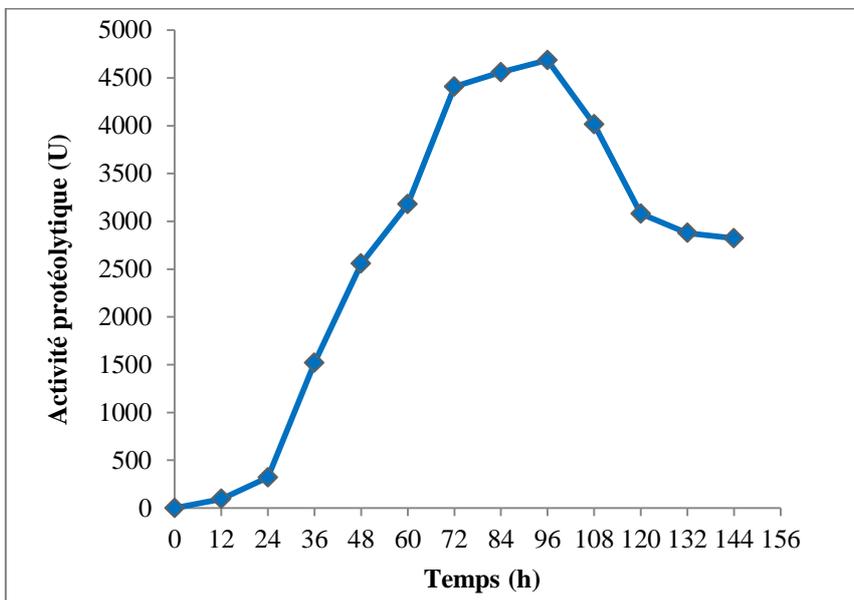


Fig. 9. Evolution de la production de la protéase neutre par *A. oryzae* NRRL 2220 sur milieu liquide.

2.3.6. Test de confirmation

Les résultats de l'optimisation sont confirmés par des cultures sur les milieux contenant les facteurs sélectionnés à la valeur optimale déterminée par le plan de Box et Wilson. Les activités protéolytiques obtenues sont comme suit :

- 18113 U/g pour le milieu solide.
- 4506 U pour le milieu liquide.

Ces tests montrent qu'en milieu solide le résultat est très proche de l'activité maximale obtenue par le plan d'expériences (18045 U/g), alors qu'en milieu liquide, la valeur-test a augmenté de 15,5% par rapport à l'activité maximale mesurée dans le cadre du plan de Box et Wilson (3900 U).

3. Cinétique de production de la protéase neutre par *A. oryzae* en *SSF* et en *SmF*

La production de la protéase neutre par *A. oryzae* NRRL 2220 est représentée dans la Fig. 8 pour les cultures en *SSF* et dans la Fig. 9 pour les cultures en *SmF*. L'activité enzymatique a été détectée dans le filtrat de la culture dès le premier jour. Durant les premières 24 h, l'activité est très faible, surtout dans la culture solide ; cela indique que les spores sont métaboliquement dormantes et que la dégradation du substrat ne peut s'installer qu'après la germination (Assamoi et *al.*, 2009).

Le profil cinétique montre que la production maximale est obtenue après 96 h de fermentation, aussi bien dans la culture solide (21309 U/g) que dans la culture liquide (4687 U). Le même temps de production est rapporté aussi bien pour la production de protéase neutre par *Microbacterium* sp. kr10 (Thys et *al.*, 2006) que pour la protéase alcaline par *Colwellia* sp. NJ341 et *A. oryzae* CFR 305 (Wang et *al.*, 2008a; Murthy et Naidu, 2010). Par ailleurs, Battaglino et *al.* (1991) indiquent un intervalle de temps de 72-96 h nécessaire pour la production d'une activité maximale de la protéase neutre par *A. oryzae* NRRL 2160 cultivée sur le son de blé en *SSF*.

Cependant, d'autres travaux rapportent des temps de fermentation différents selon l'activité protéasique mesurée ; 84 h pour Chutmanop et *al.* (2008), 72 h pour Sandhya et *al.* (2005b), Hajji et *al.* (2008) et Kumar et *al.* (2008b) et 44 h pour García-Gómez et *al.* (2009).

Au-delà de 96 h, la production montre un déclin du rendement en enzyme dans les deux types de cultures. Cela s'explique par plusieurs raisons : épuisement de nutriments disponibles pour le microorganisme et donc l'arrêt de la production ; car les enzymes sont des métabolites primaires, ainsi au variation de pH (Sandhya et *al.*, 2005b; Sumantha et *al.*, 2005; García-Gómez et *al.*, 2009), production d'acides aminés et de composés à faible poids moléculaire (Gupta et *al.*, 2002), ainsi que la libération des protéases endogènes lors de la destruction complète des cellules (Wang et *al.*, 2005a).

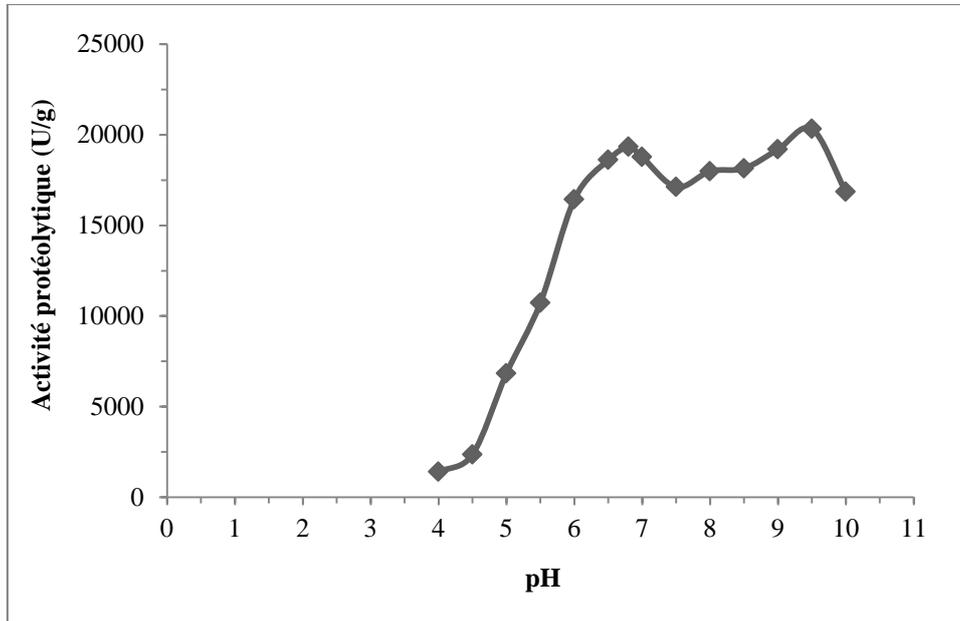


Fig. 10. Effet du pH sur l'activité protéolytique produite en *SSF*.

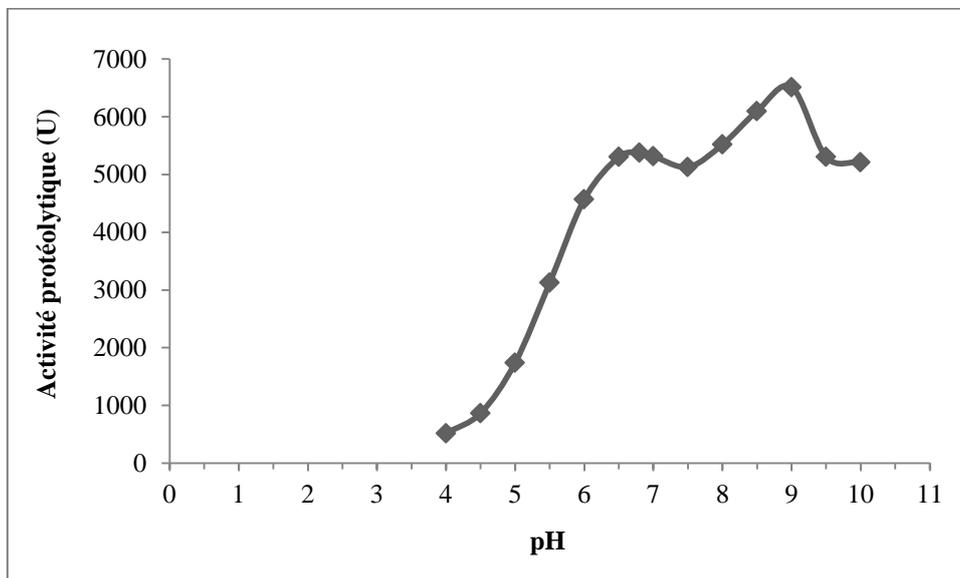


Fig. 11. Effet du pH sur l'activité protéolytique produite en *SmF*.

4. Etude de quelques caractéristiques de la protéase produite par *Aspergillus oryzae* en *SSF* et en *SmF*

4.1. pH optimal

L'analyse de la variance (ANOVA) des résultats montre que le pH a un effet significatif sur l'activité enzymatique de la protéase neutre d'*A. oryzae* NRRL 2220 des deux types de culture [$F = 21,908 > (p = 0,001)$ pour *SSF* et $F = 28,649 > (p < 0,001)$ pour *SmF*] (Annexe 7).

L'effet du pH sur l'activité protéolytique donne un pH optimal de 6,8 pour la protéase neutre des deux types de cultures (Fig. 10 et 11). Ces résultats sont très proches du pH optimal de la protéase neutre produite par plusieurs moisissures. En effet, les protéases neutres d'*A. oryzae* présentent des pH optimums de 7 (Sekine, 1972a; Benkahoul, 2002; Sumantha et al., 2005) ; entre 6,0 et 7,0 (Battaglino et al., 1991) et de 7,2 (Boukhalfa, 2003). La protéase neutre de *Penicillium* sp. montre un pH optimum de 6,5 (Germano et al., 2003). En outre, les protéases neutres microbiennes sont généralement actives dans un intervalle de pH compris entre 5 et 9 (Ferrero, 2000).

Par ailleurs, une deuxième augmentation de l'activité est observée après le pH 7,5. Cela indique la *co-production* d'une protéase alcaline ayant un pH optimal de 9,5 pour la *SSF* et de 9 pour la *SmF*. *A. oryzae* NRRL 2220 produit donc plusieurs protéases comme chez beaucoup de moisissures (Mechakra et al., 1999). De cette étude, l'extrait enzymatique brut peut contenir plusieurs protéinases (Sumantha et al., 2005; Sinsuwan et al., 2008).

Les protéases neutres servent beaucoup à la fabrication d'aliments traditionnels en Extrême Orient tel que le *shoyu* (sauce de soja) même si les protéases alcalines sont produites en plus grandes quantités, en effet le pH du *koji* est voisin de pH 6,7-7,0 (Botton et al., 1990).

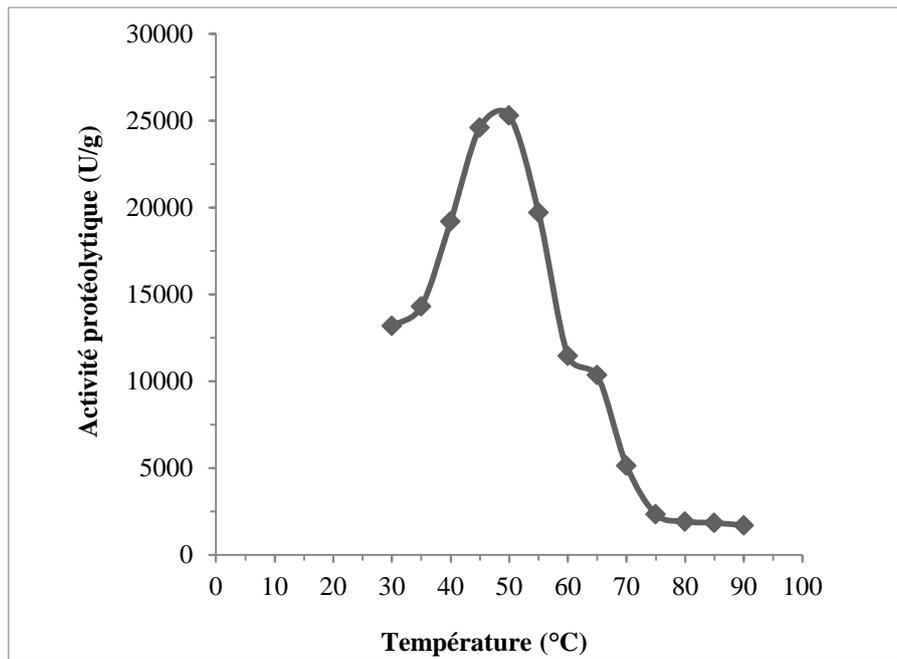


Fig. 12. Effet de la température sur l'activité protéolytique produite en *SSF*.

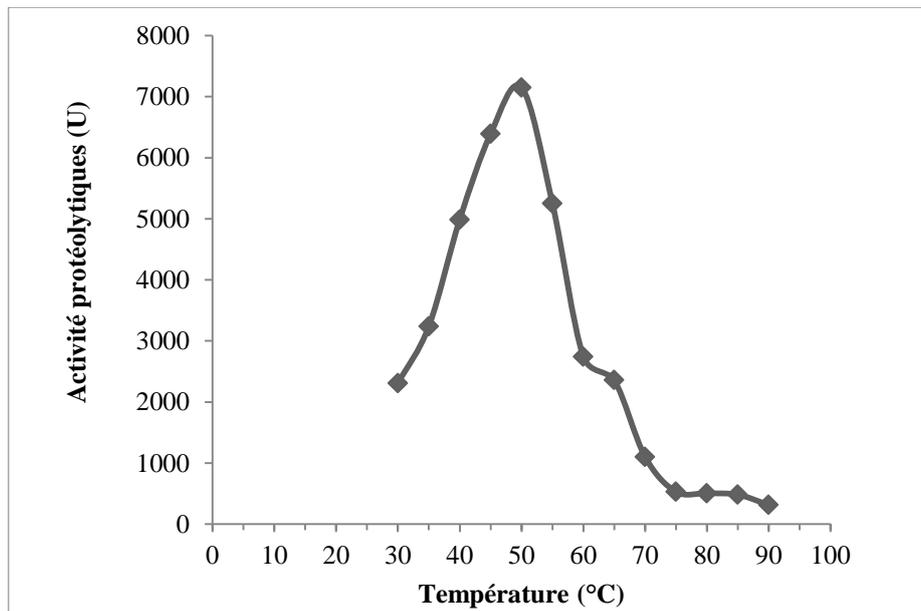


Fig. 13. Effet de la température sur l'activité protéolytique produite en *SmF*.

4.2. Température optimale

L'analyse de la variance des résultats (ANOVA) révèle que la température exerce un effet significatif sur l'activité enzymatique de la protéase neutre d'*A. oryzae* NRRL 2220 des deux types de culture [$F = 17,481 > (p = 0,002)$ pour *SSF* et $F = 9,729 > (p = 0,010)$ pour *SmF*] (Annexe 8).

L'effet de la température sur l'activité de la protéase neutre montre que l'enzyme est active dans une large gamme de température ; l'activité maximale est enregistrée à 50°C aussi bien pour l'enzyme produite en *SSF* (Fig. 12) que pour celle produite en *SmF* (Fig. 13). Au-delà de cette température, l'activité protéolytique diminue ; l'enzyme devient presque inactive, cela prouve l'instabilité des structures conformationnelles (Kumar et al., 2008a).

L'enzyme produite au cours de cette étude apparaît comme une protéase mésophile. Cependant, une fraction mineure de l'activité est observée à 65°C.

La température optimale de 50°C est obtenue par plusieurs auteurs aussi bien pour la protéase neutre d'*A. oryzae* (Boukhalifa, 2003; Sumantha et al., 2005) que pour la protéase alcaline d'*Aspergillus clavatus* ES1 (Hajji et al., 2007), de *Virgibacillus* sp. SK33 (Sinsuwan et al., 2008) et d'*Aspergillus oryzae* 2095 (García-Gómez et al., 2009). Par ailleurs, quelques protéases fongiques présentent des optima de température de 60°C (Singh et al., 1994; Chellappan et al., 2006).

La variation de la température optimale des activités protéolytiques dépend d'une part, de l'espèce microbienne et d'autre part, de la niche écologique dans laquelle elle vit. En effet, les températures optimales des protéases bactériennes sont généralement plus élevées que celles des protéases fongiques (Joo et Chang, 2005; Shaheen et al., 2008; Wang et al., 2008b). D'autre part, les métalloprotéases des souches antarctiques de *Pseudomonas* sp. montrent des activités maximales à 40°C (Vazquez et al., 2004).

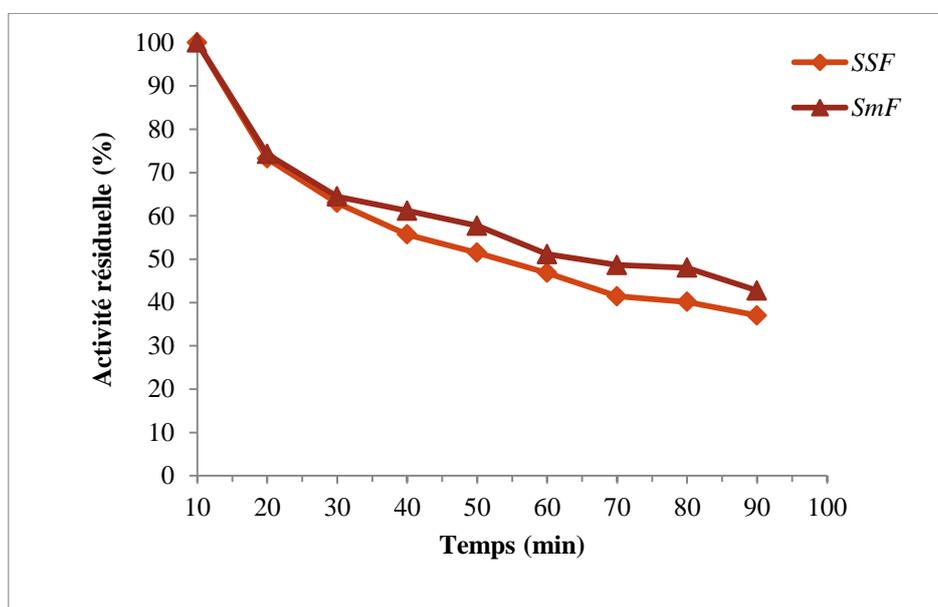


Fig. 14. La stabilité de la protéase neutre à sa température optimale.

4.3. Stabilité de la protéase neutre à la température optimale

L'étude de la stabilité de l'enzyme à la température optimale (50°C) est réalisée en incubant l'enzyme à des temps variant de 10 à 90 min à pH 6,8. La Fig. 14 représente l'évolution de l'activité après 10 min d'incubation, soit après que l'activité maximale de l'enzyme soit atteinte. L'activité résiduelle est de 74% après 20 min et de 64% après 30 min pour la protéase neutre des deux types de cultures. Après 90 min l'enzyme ne garde que 37% de son activité maximale pour la *SSF* et 42% pour la *SmF*.

Les valeurs du temps de demi-vie ($t_{1/2}$) à 50°C pour la protéase neutre de *SSF* et de *SmF* sont de 54 min et de 65 min, respectivement. Des résultats similaires sont décrits par García-Gómez et al. (2009) qui ont comparé le $t_{1/2}$ de la protéase d'*A. oryzae* 2095 cultivée en *SSF* avec celui de l'extrait commercial (*Flavourzyme* 500 MG[®]) ; le résultat est de 52 min à 50°C pour la première et de 25 min à 50°C pour la dernière. D'autre part, Vazquez et al. (2004) rapportent un $t_{1/2}$ de 22 min à 50°C pour des métalloprotéases des souches antarctiques.

Les profils de la température et de la stabilité de l'enzyme révèlent que l'enzyme n'est pas thermostable. Cependant, il existe plusieurs champs d'application de cette protéase. Par exemple, lorsqu'il est nécessaire d'inactiver sélectivement des protéases après leur action dans un mélange de protéines (Vazquez et al., 2004) ; de telles enzymes pourraient être de nouveaux outils utiles dans la biologie moléculaire. Par ailleurs, les protéases thermolabiles pourraient être utiles pour de nouvelles applications telles que la purification des produits entre les étapes enzymatiques (Margesin et al., 2005). En outre, la plupart des industries alimentaires telles que la boulangerie exigent que leurs processus soient portés à des températures autour de 50-60°C ; la protéase neutre d'*A. oryzae* pourrait servir alors comme agent de transformation des aliments (Sumantha et al., 2005).

En se basant sur le pH optimal et la température optimale, les résultats ont montré la convenance de l'enzyme pour les applications biotechnologiques où des valeurs de température de 30 à 55 °C et du pH de 6 à 10 sont exigées.

Tableau 24. Effet de quelques effecteurs sur l'activité protéolytique.

Effecteurs	Concentration	Activité résiduelle (%)	
		<i>SSF</i>	<i>SmF</i>
Contrôle		100	100
EDTA	1 mM	71,65	69,1
	5 mM	47,19	30,77
ZnSO₄	1 mM	119,14	120,65
	5 mM	118,31	122
CaCl₂	1 mM	112,31	115,96
	5 mM	119,37	120,27
NaCl	1%	108,68	102,6
	5%	95,02	81,55
Tween 80	1%	112	121,67
	2%	121,62	141,69

4.4. Effet des effecteurs

L'étude de l'action de quelques effecteurs (EDTA, Zn^{++} , Ca^{++} , NaCl et Tween 80) sur l'activité protéolytique a donné les résultats résumés dans le Tableau 24.

4.4.1. Effet de l'EDTA

Les résultats de l'action de l'EDTA montrent une inhibition de l'activité de la protéase neutre synthétisée en *SSF* ou en *SmF*. A 5 mM, l'EDTA réduit l'activité de la protéase neutre en *SSF* de 52,81% en *SSF* et de 69,23% en *SmF*. Cela indique la présence d'ions métalliques dans le site actif de l'enzyme ; celle-ci appartient donc au groupe des métalloprotéases. En effet, l'EDTA est un agent chélateur qui se lie spécifiquement avec les cations divalents (Joo et Chang, 2005), d'où l'inhibition observée. Ces valeurs sont similaires à celles décrites par Sekine (1972a), Nakadai et al. (1973), Boukhalifa (2003), Margesin et al. (2005) et Wang et al. (2008b) qui ont montré la nature métalloprotéasique des protéases étudiées.

4.4.2. Effet du zinc

D'après le Tableau 24, les ions Zn^{++} exercent un effet positif sur l'activité de l'enzyme pour les deux types de cultures. Ce résultat de l'effet du zinc est en accord avec celui de Boukhalifa (2003) et de Margesin et al. (2005) pour la métalloprotéase d'*A. oryzae* et de *Pedobacter cryoconitis*, respectivement.

A 1 mM, $ZnSO_4$ engendre une augmentation de l'activité de la protéase neutre de 19% en *SSF* et de 20% en *SmF*, à 5 mM, l'augmentation est pratiquement la même qu'à 1 mM. Cela indique la présence du zinc dans le site actif de la protéase neutre d'*A. oryzae* et que celui-ci joue un rôle capital dans le maintien de l'activité. Zn^{++} est ici le métal pour lequel l'activité de l'enzyme est dépendante (Rao et al., 1998; Sumantha et al., 2006). Donc, ce résultat confirme l'effet de l'EDTA.

4.4.3. Effet du calcium

La présence du calcium dans le mélange réactionnel a un effet positif sur l'activité protéolytique pour les deux types de culture, où il entraîne une augmentation d'environ 20%. Ce même effet est mentionné pour les protéases de plusieurs moisissures (Sumantha et al., 2005; Hajji et al., 2007; Devi et al., 2008).

Les liaisons peptidiques des systèmes enzymatiques peuvent se lier avec les ions Ca^{++} . En effet, les sites de liaison du calcium avec la liaison peptidique impliquent des boucles de surfaces qui permettent une augmentation de la stabilité de la liaison peptidique et fournissent une atmosphère protectrice contre les conditions de l'environnement extraordinaires (Kumar et al., 2008a) ; les ions Ca^{++} , non seulement protègent l'enzyme contre la dénaturation, mais aussi augmentent largement l'activité (Agrawal et al., 2005).

4.4.4. Effet du NaCl

Le NaCl affecte peu l'activité protéolytique d'*A. oryzae* ; à 1% elle augmente de 9% en *SSF* et de 3% en *SmF*. Par contre, à 5% l'enzyme perd 5% d'activité en *SSF* et 18,45% en *SmF*. L'augmentation de l'activité s'explique par une augmentation des interactions hydrophobes entre le site actif de la protéase et le substrat, provoquée par la présence d'une faible concentration de NaCl, conduisant à une augmentation de l'activité protéolytique (Sinsuwan et al., 2008). D'autre part, le NaCl a été évalué pour son effet comme agent stabilisateur de l'activité enzymatique par Laxman et al. (2005), dans ce cas, il n'y a aucun besoin d'addition d'agent de conservation.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Nakadai et al. (1973) qui ont trouvé que le NaCl à 4% est un stimulateur de l'activité de la protéase neutre II d'*A. oryzae*, mais il devient inhibiteur au-delà de cette concentration.

4.4.5. Effet de Tween 80

Le Tableau 24 montre que la protéase neutre d'*A. oryzae* NRRL 2220 est non seulement stable vis-à-vis du Tween 80, mais à 2% (v/v) ce dernier peut engendrer des augmentations importantes de l'activité enzymatique (21,62% en *SSF* et jusqu'à 41,69% en *SmF*). L'augmentation de l'activité est plus élevée pour l'enzyme de *SmF*, car l'extrait brut de l'enzyme en *SSF* contient déjà de 0,1% Tween 80 utilisé pour l'extraction de l'enzyme.

Ces résultats corroborent les travaux de Hajji et al. (2007) pour la protéase alcaline d'*Aspergillus clavatus* ES1 après traitement par le Tween 80 (5%) et de Joo et Chang (2005) pour une protéase alcaline de *Bacillus* sp. I-312 après traitement par le Tween 20 à 1%. Tous rapportent une grande stabilité de l'enzyme. Cette stabilité peut s'expliquer par le rôle du Tween 80 comme stabilisateur des protéines (Beynon et Oliver, 2004). Cette grande stabilité de la protéase indique que l'enzyme pourrait servir dans les détergents (Hajji et al., 2007).

5. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide

5.1. Mode de développement de la moisissure sur *SSF* et *SmF*

La croissance d'*A. oryzae* donne une morphologie différente selon le type de culture. Sur milieu solide, la moisissure se développe par extension des hyphes en surface et à l'intérieur des particules du substrat, d'où la difficulté à séparer la biomasse du milieu. En milieu liquide, elle donne un mycélium sous forme de *pellets* séparables par simple filtration (Fig.15).

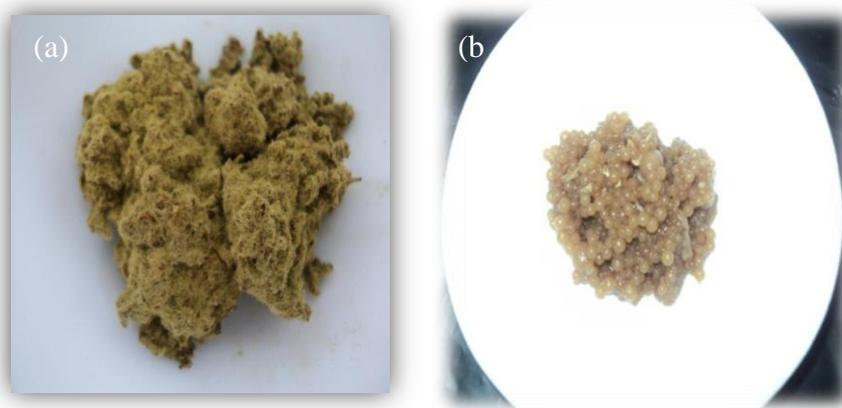


Fig. 15. Aspect d'*A. oryzae* NRRL 2220

(a) Substrat fermenté en *SSF*

(b) Biomasse séparée en *SmF*

En *SSF* le processus de croissance reste encore mal compris ; par contre, en *SmF*, la croissance des hyphes affecte la rhéologie du milieu de culture et par conséquent les caractéristiques du mélange. Il en résulte une mauvaise homogénéisation provoquant un mauvais transfert du substrat, ce qui modifie la morphologie des moisissures (forme de *pellets*) (Müller et al., 2002).

5.2. Comparaison des activités de la protéase neutre produite

Les résultats des optimisations des cultures en *SSF* et en *SmF* sont comparés afin de déterminer le type de fermentation donnant le meilleur rendement en protéase neutre produite par *A. oryzae* NRRL 2220. Pour cela, les activités sont exprimées en U/g dans les deux cas (Tableau 25).

Tableau 25. Comparaison des activités produites en *SSF* et en *SmF*.

	<i>SSF</i>	<i>SmF</i>	<i>Efficacité SSF/SmF</i>
Activité protéolytique sur milieu de base	12967 U/g	1120 U/g	11,5 fois
Activité protéolytique sur milieu optimisé*	18113 U/g	2253 U/g	8 fois
Taux d'amélioration	40%	101%	

* Composition du milieu ; *SSF* : 19,8 g/l de caséine et 0,92 g/l de NaCl ;
SmF : 17,92 g/l du son de blé et 1,18 g/l de NaCl.

En culture solide, l'activité obtenue dans le milieu optimal est de 18113 U/g, alors en culture liquide elle est de 2253 U/g. Donc, l'activité de la protéase neutre produite en *SSF* est 8 fois plus élevée qu'en *SmF*. Cela montre l'efficacité de la technique de *SSF* pour la production d'enzymes par rapport à la technique de *SmF*, aussi bien pour les moisissures (Sandhya et al., 2005b; Assamoi et al., 2009) que pour les bactéries (Soares et al., 2005). En effet, une étude comparative sur la production de la protéase alcaline en *SSF* et en *SmF* par *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23844 montre que 1 g de son (*SSF*) est équivalent de 100 ml du bouillon (*SmF*) (George et al., 1997).

C'est ainsi de plusieurs enzymes hydrolytiques, en particulier les glucoamylases, les protéases et les phosphatases, sont produites à grande échelle par *A. oryzae* en culture solide (Maeda et al., 2004). Par exemple, 50 g d' α -amylase sont produits à partir d'un kg de son blé qui est approximativement équivalent à 1 L du milieu de culture liquide (Machida et al., 2008) ; la chymosine recombinante est également produite à un taux 500 fois plus élevée dans la culture solide sur son de blé, que dans la culture liquide (Oda et al., 2006).

5.3. Discussion

Beaucoup de champignons secrètent plus de protéines en cultures solides qu'en cultures liquides comme le montrent Oda et ses collaborateurs (2006) dans l'étude de la production de protéines extracellulaires au cours de la croissance d'*A. oryzae* RIB40 sur son de blé. C'est ainsi qu'après 32 h et 40 h, *A. oryzae* a secrété environ 4 à 6,4 fois plus de protéines par mg de mycélium dans *SSF* que celle dans *SmF*. En *SSF*, la moitié de ces protéines ont été les α -amylases et les protéases, une protéine était le α -mannosidase et les autres protéines sont avec fonction inconnu.

Cependant, le mécanisme de production des enzymes par *A. oryzae* reste vague (Maeda et al., 2004). Plusieurs théories essayent d'expliquer l'efficacité de la *SSF* par rapport à la technique de *SmF* :

- A la différence des autres microorganismes, les moisissures se développent dans la nature sur des substrats solides (Battaglino et al., 1991). Les conditions naturelles de croissance des cellules ainsi que la disponibilité des nutriments sont donc plus favorables dans la culture solide (Sandhya et al., 2005b).

- La croissance des moisissures en hyphes et leur bonne tolérance de a_w faibles les rendent efficaces et compétitives dans la microflore naturelle pour la bioconversion des substrats solides (Rahardjo et al., 2006). Les enzymes hydrolytiques excrétées ont donc une action très efficace dans un milieu peu dilué et permettant la pénétration dans la plupart des particules de substrats solides. Cette pénétration augmente l'accessibilité des éléments nutritifs disponibles dans les particules (Raimbault, 1998).

- Quelques protéines secrétées dans la culture solide se retrouvent piégées dans la paroi cellulaire en culture liquide. *A. oryzae* a donc besoin d'une paroi cellulaire statique dans la culture submergée pour s'adapter avec la faible pression osmotique externe. En revanche, il n'y a aucun besoin d'une paroi cellulaire statique dans la culture solide ; la paroi cellulaire peut être dégagée, par conséquent, la sécrétion des enzymes devient plus facile (Oda et al., 2006).

- Une analyse protéomique a montré qu'*A. oryzae* produit une quantité beaucoup plus grande de protéines totales dans la culture solide (son du blé) que dans la culture submergée (la suspension du son du blé). La sécrétion d'une grande quantité d'enzymes serait nécessaire pour obtenir des éléments nutritifs sous une faible activité d'eau libre (Machida et al., 2008).

De ce fait, plusieurs facteurs de l'environnement affectent l'expression des gènes chez *A. oryzae* et donc divers phénotypes, comme la croissance et la production des enzymes (Oda et al., 2006; Ward et al., 2006).

Conclusion générale

Le but de cette étude est la production de la protéase neutre par une moisissure filamenteuse, *Aspergillus oryzae* NRRL 2220, sur milieu solide (*SSF*) et sa comparaison avec le milieu liquide (*SmF*). En effet, de part ses propriétés physiologiques, enzymologiques et biochimiques, les moisissures sont le groupe des microorganismes le plus important utilisé dans les processus *SSF*. Pour cela, des déchets agroindustriels (les déchets de tomates) ont été utilisés comme substrat, ce qui permet une valorisation de ces déchets et la préparation de milieux à moindre coût telle que l'exige la production d'enzymes industrielles.

L'étude de la composition des déchets de tomates révèle sa richesse en sucres (13,85%) et une teneur importante en protéines (12,33%). Ces proportions en sources carbonées et azotées conviennent donc aussi bien à la croissance microbienne qu'à la production de métabolites. Dans ce cas, la protéase neutre.

La production de l'enzyme par *A. oryzae* NRRL 2220 a commencé par fixer le taux d'humidité de la culture solide (60%) et la concentration en substrat dans la culture liquide (4%). Ces deux milieux ont donné un rendement en activité protéasique élevé qui indique que la teneur en protéines des déchets de tomates a provoqué une bonne induction de la synthèse de l'enzyme.

La production s'est poursuivie par l'optimisation de la composition des milieux de culture en réalisant les expériences dans le cadre de deux plans ; le premier pour la sélection des facteurs d'enrichissement ayant un effet significatif et le second pour la détermination des optima. Pour cela, cinq facteurs de supplémentation des milieux de base sont utilisés : le son de blé, la caséine, le nitrate d'ammonium, NaCl et ZnSO₄.

L'analyse statistique des résultats du premier plan (matrice de Plackett et Burman) et la modélisation selon une régression linéaire multiple ont permis de sélectionner la caséine et le NaCl pour la *SSF*, le son de blé et le NaCl pour la *SmF*. L'application du deuxième plan (de Box et Wilson) suivi du calcul des optima des facteurs sélectionnés a permis d'établir la composition du milieu optimal pour chaque type de culture : 19,8 g/l de caséine avec 0,92 g/l de NaCl pour la *SSF* et 17,92 g/l du son de blé avec 1,18 g/l de NaCl pour la *SmF*.

L'optimisation a ainsi entraîné une augmentation de l'activité enzymatique de 40% en *SSF* et de 101% en *SmF*. D'autre part, les milieux optimisés sont composés de substrats naturels bon marché pouvant entraîner une réduction considérable dans le coût de production. De plus, l'utilisation de déchets de tomates constitue un très bon moyen de lutte contre la pollution.

L'étude cinétique ainsi que l'étude des propriétés physicochimiques de la protéase neutre produite par *A. oryzae* a pour but d'établir les conditions et le mécanisme d'action de l'enzyme ce qui permet de montrer ses aptitudes technologiques. Le pH optimal de 6,8, la température optimale de 50°C et la stabilité à la température optimale indiquent que cette enzyme peut servir dans les applications technologiques telles que la boulangerie et biotechnologiques telles que la biologie moléculaire.

Des informations sur le site actif de l'enzyme sont obtenues après l'étude de l'action des effecteurs sur l'activité protéolytique ; celle-ci montre que l'EDTA inhibe la protéase neutre d'*Aspergillus oryzae* alors que le zinc et le calcium l'activent ; l'enzyme est donc une métalloprotéase.

La stabilité des enzymes reste un aspect critique dans les applications pharmaceutiques et industrielles. C'est ainsi qu'à 1% du NaCl, l'activité de la protéase neutre reste stable ; il pourrait donc servir comme agent de conservation de l'enzyme. Cette protéase montre également une grande stabilité vis-à-vis du Tween 80, indiquant que l'enzyme pourrait servir dans les détergents.

La comparaison entre les fermentations solides et liquides a donné une activité protéolytique en *SSF* 8 fois plus élevée qu'en *SmF*. Cela confirme l'application de plus en plus fréquente de la fermentation solide par l'enzymologie industrielle utilisant des moisissures pour la production des protéases. En effet, la culture solide est bien adaptée aux processus de développement des moisissures sur des substrats végétaux naturels. En outre, le substrat fermenté après *SSF* pourrait être utilisé comme source directe d'enzymes dans plusieurs applications technologiques : en tannerie, comme fourrage ensilé, comme additif alimentaire, pour l'hydrolyse ligno-cellulosique et pour le traitement des fibres naturelles.

Enfin, ces résultats exigent d'autres études et ouvrent de nouvelles perspectives :

- Tester les milieux optimisés à l'échelle semi-pilote.
- Mettre au point le protocole de séparation de l'enzyme.
- Etudier les domaines d'application de l'enzyme et son mécanisme d'action.

*Références
bibliographiques*

- Abidi F., Limam F., Marzouki M.N., 2008.** Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. *Proc. Biochem.*, **43**; 1202–1208.
- ADEME** : Comité national des coproduits. Fiche n°15 – Ecarts de fruits et légumes et coproduits de conserverie. Pulpe de tomate, Institut de l’Elevage.
<http://www.inst-elevage.asso.fr/IMG/pdf/Fichecoprod15.pdf>
- 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. *Proc. Biochem.*, **40**; 1131–1136.
- Aguilar C.N., Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán P.A., Rodríguez-Herrera R., Martínez-Hernandez J.L., Contreras-Esquivel J.C., 2008.** Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American J. Biochem. Biotechnol.*, **4**(4); 354-366.
- Al-Muhtaseb A.H., Al-Harashsheh M., Hararah M., Magee T.R.A., 2010.** Drying characteristics and quality change of unutilized-protein rich-tomato pomace with and without osmotic pre-treatment. *Ind. Crops Prod.*, **31**; 171–177.
- Altan A., McCarthy K.L., Maskan M., 2008.** Evaluation of snack foods from barley–tomato pomace blends by extrusion processing. *J. Food Eng.*, **84**; 231–242.
- Alvarado A., Pacheco-Delahaye E., Hevia P., 2001.** Value of a tomato byproduct as a source of dietary fiber in rats. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **56**; 335–348.
- Al-Wandawi H., Abdul-Rahman M., Al-Shaikhly K., 1985.** Tomato processing wastes as essential raw materials source. *J. Agric. Food. Chem.*, **33**; 804–807.
- Ambati P., Ayyanna C., 2001.** Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**; 331–335.
- Anson M.L., 1938.** The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, **22**; 79–89.
- Assamoi A.A., Destain J., Thonart P., 2009.** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13**(2); 281–294.
- Aviron-Violet P., Baret J.L., Bertrand C., Blazy B., Bouvier F., 1982.** Les enzymes : Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. pp. 23; 123; 140–153.
- Battaglino R.A., Huergo M., Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B., 1991.** Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**; 292–296.
- Baysal T., Ersus S., Starmans D.A.J., 2000.** Supercritical CO₂ extraction of β -carotene and lycopene from tomato paste waste. *J. Agric. Food Chem.*, **48**; 5507–5511.

- Benakmoum A., Abbeddou S., Ammouche A., Kefalas P., Gerasopoulos D., 2008.** Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste. *Food Chem.*, **110**; 684–690.
- Benkahoul M., 2002.** Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur déchets d'oranges. Optimisation du milieu de cultures, purification partielle et étude des propriétés physico-chimiques de l'enzyme. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université *Mentouri Constantine*.
- Bennamoun L., Meraihi Z., Dakhmouche S., 2004.** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. *J. Food Eng.*, **64**; 257–264.
- Bergmeyer H.U., Gawekn K., et al., 1979.** Principes de l'analyse enzymatique. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 17.
- Beynon R.J., Oliver S., 2004.** Avoidence of proteolysis in extracts. *Methods Mol. Biol.*, **596**; 81–93.
- Bicanic D., Dimitrovski D., Luterotti S., Marković K., van Twisk C., Buijnsters J.G., Dóka O., 2010.** Correlation of trans-lycopene measurements by the HPLC method with the optothermal and photoacoustic signals and the color readings of fresh tomato homogenates. *Food Biophys.*, **5**; 24–33.
- Blumentha C.Z., 2004.** Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.*, **39**; 214–228.
- Botella C., de Ory I., Webb C., Cantero D., Blandino A., 2005.** Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem. Eng. J.*, **26**; 100–106.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. 2^{ème} édition. Masson. Paris. pp. 16-41; 110; 364.
- Boukhalfa H., 2003.** Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* cultivée sur milieu à base de déchets de tomates. Optimisation de milieu de culture et étude des caractéristiques de l'extrait enzymatique. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université *Mentouri Constantine*.
- Box G.E.P., Wilson K.B., 1951.** On the experimental ultainment of optimum conditions. *J. Roy. Stat. Soc. B.*, **13**; 1-45.
- Brodowski D., Geisman J.R., 1980.** Protein content and amino acid composition of protein of seeds from tomatoes at various stage of ripness. *J. Food Sci.* **45**; 228–229, 235.
- Brookman J.L., Denning D.W., 2000.** Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**(5); 468–474.

- Capotorti G., Digianvincenzo P., Cesti P., Bernardi A., Guglielmetti G., 2004. Pyrene and benzo[a]pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. *Biodegr.*, **15**; 79–85.
- Castro P.M.L., Hayter P.M., Ison A.P., Bull A.T., 1992. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**; 84–90.
- Celma A.R., Cuadros F., López-Rodríguez F., 2009. Characterisation of industrial tomato by-products from infrared drying process. *Food Bioproducts Proc.*, **87**; 282–291.
- 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. Microb. Biotechnol.*, **10**(1); 17–30.
- Chellappan S., Jasmin C., Basheer S.M., Elyas K.K., Bhat S.G., M. Chandrasekaran M., 2006. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Proc. Biochem.*, **41**; 956–961.
- Chi Z., Ma C., Wang P., Li H.F., 2007. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresour. Technol.*, **98**; 534–538.
- Christakopoulos P., Tzalas B., Mamma D., Stamatis H., Liadakis G.N., Tzia C., Kekos D., Kolisis F.N., Macris B.J., 1998. Production of an esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing transesterification reactions in organic solvents. *Proc. Biochem.*, **33**; 729–733.
- 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.
- Dagnelie P., 1977. Analyse statistique à plusieurs variables. Presses agronomiques de Gembloux ; p 86.
- Dalev P.G., 1994. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresour. Technol.*, **48**; 265–267.
- Delarras C., 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Lavoisier, pp. 318-319.
- Del Valle M., Cámara M., Torija M.E., 2006. Chemical characterization of tomato pomace. *J. Sci. Food Agric.*, **86**; 1232–1236.
- Denek N., Can A., 2006. Feeding value of wet tomato pomace ensiled with wheat straw and wheat grain for Awassi sheep. *Small Ruminant Res.*, **65**; 260–265.
- Devi M.K., Banu A.R., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V., Palaniswamy M., 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.*, **1**(7); 1–6.

- Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z., Bennamoun L., 2006.** Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.* **73**; 190–197.
- Drouin M., 2005.** Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de *Maître ès sciences* (M.Sc.). Canada.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**; 350–360.
- Durand A., 2003.** Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, **13**; 113–125.
- Dursun A.Y., 2003.** The effect of pH on the equilibrium of heavy metal biosorption by *Aspergillus niger*. *Fres. Environ. Bull.*, **12**; 1315–1322.
- Dutta J.R., Dutta P.K., Banerjee R., 2004.** Optimization of culture parameters for extracellular protease production from a newly isolated *Pseudomonas* sp. using response surface and artificial neural network models. *Proc. Biochem.*, **39**; 2193–2198.
- Eller F.J., Moser J.K., Kenar J.A., Taylor S.L., 2010.** Extraction and analysis of tomato seed oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **87**; 755–762.
- FAO., 2008.** World crop production statistics. Food and Agricultural Organization of United Nations Statistical Database Online Services.
- Fazouane-Naimi F., Mechakra A., Abdellaoui R., Nouani A., Magagi Daga S., Aizouma A.M., Gais S., Penninckx M.J., 2010.** Characterization and cheese-making properties of Rennet-like enzyme produced by a local Algerian isolate of *Aspergillus niger*.
- Ferrero M.A., Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D., Sineriz F., 1996.** Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**; 327–32.
- Ferrero M.A., 2000.** Protein hydrolysis: Isolation and characterization of microbial proteases. *Food Microbiol. Protocols*, **14**; 227–232.
- Freixo M.R., Karmali A., Arteiro J.M., 2008a.** Production of polygalacturonase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and its chromatographic behavior on immobilized metal chelates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**; 475–484.
- Freixo M.R., Karmali A., Arteiro J.M., 2008b.** Production and chromatographic behavior of polygalacturonase from *Pleurotus ostreatus* on immobilized metal chelates. *Proc. Biochem.*, **43**; 531–9.
- Freixo M.R., Karmali A., Frazão C., Arteiro J.M., 2008c.** Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. *Proc. Biochem.*, **43**; 1265–1274.

- Fushimi N., Ewe Ee C., Nakajima T., Ichishima E., 1999.** Aspincin, a family of metalloendopeptidases with a new zinc-binding motif. *J. Biol. Chem.*, **274**(34); 24195–24201.
- García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L.A., 2009.** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.*, **112**; 604–608.
- Geiser D.M., LoBuglio K.F., 2001.** The monophyletic Plectomycetes: Ascosphaerales, Onygenales, Eurotiales. In the mycota VIIA: Systematics and evolution, ed. D. J. McLaughlin, E. G. McLaughlin & P. A. Lemke. Berlin: Springer-Verlag, pp. 201–19.
- George S., Raju V., Krishnan M.R.V., Subramanian T.V., Jayaraman K., 1995.** Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. *Proc. Biochem.*, **30**; 457–462.
- George S., Raju V., Subramanian T.V., Jayaraman K., 1997.** Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. *Bioproc. Eng.*, **16**; 381–382.
- Germano S., Pandey A., Osaku C.A., Rocha S.N., Socol C.R., 2003.** Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, **32**; 246–251.
- Gervais P., Molin P., 2003.** The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, **13**; 85-101.
- Giannelos P.N., Sxizas S., Lois E., Zannikos F., Anastopoulos G., 2005.** Physical, chemical and fuel related properties of tomato seed oil for evaluating its direct use in diesel engines. *Ind. Crops Prod.*, **22**; 193–199.
- Giove R.M., Abis S., 2007.** Place de la Méditerranée dans la production mondiale de fruits et légumes. *Les notes d'analyse du CIHEAM, N°23*.
- Guerard F., Guimas L., Binet A., 2002.** Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **19–20**; 489–98.
- Guil-Guerrero J.L., Reboloso-Fuentes M.M., 2009.** Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. *J. Food Composition Anal.*, **22**; 123–129.
- Guiraud J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. pp. 79.
- Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P., 2002.** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**; 15–32.
- 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. *Proc. 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.
- Hata Y., Ishida H., 2000.** Glucoamylase-encoding genes of *Aspergillus oryzae* – Monograph –, Seibutsu-kogaku, **78**; 120-127.
- Higginbotham G.E., Bath D.L., Butler L.J., 1993.** Effect of feeding an *Aspergillus oryzae* extract on milk production and related responses in a commercial dairy herd. *J. Dairy Sci.*, **76**; 1484– 1489.
- Hölker U., Höfer M., Lenz J., 2004.** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**; 175–186.
- Hozzein Wael N., Li Wen-Jun, Ali Mohammed I.A., Ola Hammouda Mousa, Ahmed S., Xu Li-Hua, Jiang Cheng-Lin, 2004.** *Nocardiosis alkaliphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycetes isolated from desert soil in Egypt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**; 247–252.
- Ichida J.M., Krizova L., Lefebvre C.A., Keener H.M., Elwell D.L., Burt Jr E.H., 2001.** Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. Microbiol. Methods.*, **47**; 199–208.
- Illman R.J., Storer G.B., Topping D.L., 1993.** White wheat flour lowers plasma cholesterol and increases cecal steroids relative to whole wheat flour, wheat brand and wheat pollard in rats. *J. Nutr.*, **123**; 1094–1100.
- INPV (Institut National de la Protection des Végétaux) de Annaba.** La tomate d'industrie en Algérie. <http://www.amitom.com/amitom/File/algeria.pdf>.
- Jafari M., Pirmohammadi R., Bampidis V., 2006.** The use of dried tomato pulp in diets of laying hens. *Int. J. Poult. Sci.*, **5**; 618–622.
- Jing W., Zhengyu J., Bo J., Xueming X., 2003.** Separation and identification of exoand endoinulinase from *Aspergillus ficuum*. *Curr. Microbiol.*, **47**; 109–112.
- Johnvesly B., Naik G.R., 2001.** Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Proc. Biochem.*, **37**; 139–44.
- Joo H.-S., Kumar C.G., Park G.-C., Kim K.T., Paik S.R., Chang C.-S., 2002.** Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Proc. Biochem.*, **38**; 155–159.
- Joo H.S., Chang C.S., 2005.** Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Proc. Biochem.*, **40**; 1263–1270.

- Kammoun R., Naili B., Bejar S., 2008.** Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresour. Technol.*, **99**; 5602–5609.
- Katapodis P., Christakopoulou V., Christakopoulos P., 2006.** Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in tomato seed meal using response surface methodology. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **22**; 501–506.
- 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 Chem.*, **108**; 711–718.
- Kavanagh K., 2005.** Fungal fermentation systems and products, in Kavanagh K., *Fungi : Biology and applications*; John Wiley & Sons Ltd, England. pp. 89–111.
- Khalidi N., Wolfe K.H., 2008.** Elusive origins of the extra genes in *Aspergillus oryzae*. *PLoS ONE* 3(8): e3036.
- King A.J., Zeidler G., 2004.** Tomato pomace may be a good source of vitamin E in broiler diets. *California Agric.*, **58**(1); 59–62.
- Knoblich M., Anderson B., Latshaw D., 2005.** Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids. *J. Sci. Food Agric.*, **85**; 1166–1170.
- Kobayashi T., Abe K., Asai K., Gomi K., Juvvadi P.R., Kitamoto K., Takeuchi M., Machida M., 2007.** Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**(3); 646–670.
- Kudrya V.A., Simonenko I.A., 1994.** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**; 505–509.
- Kumar A., Sachdev A., Balasubramanyam S.D., Saxena A.K., Lata., 2002.** Optimization of conditions for production of neutral and alkaline protease from species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Ind. J. Microbiol.*, **42**(3); 233–236.
- Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G., 2008a.** Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresour. Technol.*, **99**; 2364–2372.
- Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R., Bhalla T.C., 2008b.** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.*, **3**(12); 661–672.
- Lakshmi G.S., Rao C.G., Rao R.S., Hobbs P.J., Prakasham R.S., 2009.** Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. *Biochem. Eng. J.*, **48**; 51–57.
- Latgé J.P., 1999.** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**(2); 310–350.

- Laxman R.S., Sonawane A.P., More S.V., Rao B.S., Rele M.V., Jogdand V.V., Deshpande V.V., Rao M.B., 2005.** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Proc. Biochem.*, **40**; 3152–3158.
- 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.
- Le coq R., 1965.** Manuel d'analyse alimentaires d'expertises usuelles. Doin. Paris.
- Lee C.-Z., Liou G.-Y., Yuan G.-F., 2004.** Comparison of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* by amplified fragment length polymorphism. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **45**; 61–68.
- Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O., 2001.** Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc. Eng.*, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.
- Lenoir J., Auberger B., 1977.** Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*, II- Caractérisation d'une protéase neutre. *Le lait*, **57**; 471-489.
- Lester M., Morrison M.D., 1946.** The control of diarrhea by tomato pomace. *American J. Digestive Diseases*, **13**(6); 196-198.
- Liadakis G.N., Tzia C., Oreopoulou V., Thomopoulos C.D., 1995.** Protein isolation from tomato seed meal, extraction optimization. *J. Food Sci.*, **60**; 477–482.
- Liu J.-Z., Weng L.-P., Zhang Q.-L., Xu H., Ji L.-N., 2003.** A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biochem. Eng. J.*, **14**; 137–141.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**(1); 265–275.
- Machida M., Yamada O., Gomi K., 2008.** Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Res.*, **15**; 173–183.
- Madigan M.T., Martinko J.M., 2007.** Biologie des microorganismes. 11^{ème} édition. *Pearson Education*. Broek. France. pp. 478; 479.
- Maeda H., Sano M., Maruyama Y., Tanno T., Akao T., Totsuka Y., Endo M., Sakurada R., Yamagata Y., Machida M., Akita O., Hasegawa F., Abe K., Gomi K., Nakajima T., Iguchi Y., 2004.** Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65**; 74–83.
- Malherbe D.F., du Toit M., Otero R.R.C., van Rensburg P., Pretorius I.S., 2003.** Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**; 502–511.

- Mansoori B., Modirsanei M., Radfar M., Kiaei M.M., Farkhoy M., Honarзад J., 2008.** Digestibility and metabolisable energy values of dried tomato pomace for laying and meat type cockerels. *Animal Feed Sci. Technol.*, **141**; 384–390.
- Margesin R., Dieplinger H., Hofmann J., Sarg B., Lindner H., 2005.** A cold-active extracellular metalloprotease from *Pedobacter cryoconitis*—production and properties. *Res. Microbiol.*, **156**; 499–505.
- Markovits A., Acevedo F., 1980.** Effect of the medium composition on the synthesis of protease by *Aspergillus* sp. *Rev. Argent Microbiol.*, **12**(2); 34-8.
- McCay O.M., Smith S.E., 1940.** Tomato pomace in the diet. *Sci.*, **91**; 388.
- Mechakra A., Auburger B., Remeuf F., Lenoir J., 1999.** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*, **19**; 663–675.
- Mehta V.J., Thumar J.T., Singh S.P., 2006.** Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresour. Technol.*, **97**; 1650–1654.
- 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. *Biochem. Eng. J.*, **39**; 353–361.
- Mullai P., Syed Ali Fathima N., Rene E.R., 2010.** Statistical analysis of main and interaction effects to optimize xylanase production under submerged cultivation conditions. *J. Agric. Sci.*, **2**(1); 144–153.
- Müller C., McIntyre M., Hansen K., Nielsen J., 2002.** Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(4); 1827–1836.
- Murai T., 1989.** Tane-Koji Konjaku Monogatari (The old and new story of koji seeds), in “Shushi-kenkyu” (Studies on the Sake Brewing History), **7**; 39-44.
- Murphy R.A., Horgan K.A., 2005.** Antibiotics, enzymes and chemical commodities from fungi, in Kavanagh K., Fungi: Biology and applications, John Wiley & Sons Ltd, England. pp. 125; 134.
- Murthy P.S., Naidu M.M., 2010.** Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Appl. Sci. J.*, **8**(2); 199-205.
- Nakadai T., Nasuno S., Iguchi N., 1973.** Purification and properties of neutral proteinase II from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, **37**; 2703-2708.
- Neelakantan S., Mohanty A.K., Kaushik J.K., 1999.** Production and use of microbial enzymes for dairy and industrial processing. *Curr. Sci.*, **77**; 143–148.

- Oda K., Kakizono D., Yamada O., Iefuji H., Akita O., Iwashita K., 2006.** Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(5); 3448–3457.
- Ogawa A., Yasuhara A., Tanaka T., Sakiyama T., Nakanishi K., 1995.** Production of neutral protease by membrane-surface liquid culture of *Aspergillus oryzae* IAM 2704. *J. Ferment. Bioeng.*, **80**; 35–40.
- Oskouie S.F.G., Tabandeh F., Yakhchali B., Eftekhar F., 2008.** Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochem. Eng. J.*, **39**; 37–42.
- Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R., Nigam P., 1999.** Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.*, **77**; 149–62.
- Pandey A., 2003.** Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, **13**; 81–84.
- Paranthaman R., Alagusundaram K., Indhumathi J., 2009.** Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World J. Agric. Sci.*, **5**(3); 308-312.
- Patel R., Dodia M., Singh S.P., 2005.** Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.* : Production and optimization. *Proc. Biochem.*, **40**; 3569–3575.
- Pelmont J., 1995.** Enzymes : catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. pp. 7; 621; 652–654.
- Perry J.J., Staley J.T., Lory S., 2004.** Microbiologie. Sinauer associates. Paris. pp. 575–576.
- Plackett R.L., Burman J.P., 1946.** The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, **33**; 305–325.
- Rahardjo Y.S.P., Tramper J., Rinzema A., 2006.** Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol. Adv.*, **24**(2); 161-179.
- Rai S.K., Mukherjee A.K., 2010.** Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwpirase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochem. Eng. J.*, **48**; 173–180.
- Raimbault M., 1998.** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, *Elec. J. Biotech.*, **1**(3); 1–15.
- Rajmalwar S., Dabholkar P.S., 2009.** Production of protease by *Aspergillus sp.* using solid state fermentation. *African J. Biotechnol.*, **8**(17); 4197-4198.
- Ramirez-Coronel M.A., Vinigera-Gonzalez G., Darville A., Augur C., 2003.** A novel tannase from *Aspergillus niger* with beta-glucosidase activity. *Microbiol.*, **149**; 2941–2946.

- 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.
- Rao Y.K., Lu S.-C., Liu B.-L., Tzeng Y.-M., 2006.** Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. *Biochem. Eng. J.*, **28**; 57–66.
- Reddy L.V.A., Wee Y.-J., Yun J.-S., Ryu H.-W., 2008.** Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour. Technol.*, **99**; 2242–2249.
- Rodríguez Couto S., Sanromán M.Á., 2006.** Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *J. Food Eng.*, **76**; 291–302.
- Rymowicz W., Lenart D., 2003.** Oxalic acid production from lipids by a mutant of *Aspergillus niger* at different pH. *Biotechnol. Lett.*, **25**; 955–958.
- Sandhya C., Nampoothiri K.M., Pandey A., 2005a.** Microbial proteases. *Methods Biotechnol.*, **17**; 165–179.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A., 2005b.** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, **40**; 2689–2694.
- Sathya R., Pradeep B.V., Angayarkanni J., Palaniswamy M., 2009.** Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **14**; 765–794.
- Scriban R., 1993.** Biotechnologie. 4^e édition. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 39; 42; 351–356.
- Sekine H., 1972a.** Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae*. Some enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.*, **36**; 207–216.
- Sekine H., 1972b.** Some properties of neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae* as zinc-containing metalloenzyme. *Agric. Biol. Chem.*, **36**; 2143–2150.
- Shaheen M., Ali Shah A., Hameed A., Hasan F., 2008.** Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1. *Pak. J. Bot.*, **40**(5); 2161–2169.
- Singh A., Ghosh V.K., Ghosh P., 1994.** Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters Appl. Microbiol.*, **18**; 177–180.
- Sinsuwan S., Rodtong S., Yongsawatdigul J., 2008.** Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Proc. Biochem.*, **43**; 185–192.

- Soares V.F., Castilho L.R., Bon E.P.S., Freire D.M.G., 2005.** High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol; 121–124.
- Sogi D. S., Bawa A. S., 1998.** Studies on dehydration of tomato processing waste. *Indian Food Packer*, **52**(2); 26–29.
- Sogi D.S., Shivhare U.S., Garg S.K., Bawa A.S., 2003.** Water Sorption Isotherm and Drying Characteristics of Tomato Seeds. *Biosystems Eng.*, **84** (3); 297–301.
- Sogi D.S., Bhatia R., Garg S.K., Bawa A.S., 2005.** Biological evaluation of tomato waste seed meals and protein concentrate. *Food Chem.*, **89**; 53–56.
- Srinubabu G., Lokeswari N., Jayaraju K., 2007.** Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. *E-J. Chem.*, **4**(2); 208-215.
- 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**(4); 313–319.
- Sumantha A., Larroche C., Pandey A., 2006.** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol. Biotechnol.*, **244**; 211–220.
- Sumantha A., Fontanille P., Larroche C., Pandey A., 2008.** Exploration of fungal spores as a possible storehouse of proteolytic biocatalysts. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**; 2897–2901.
- Sun X., Liu Z., Qu Y., Li X., 2008.** The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **146**; 119–128.
- Tari C., Genckal H., Tokatl F., 2006.** Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Proc. Biochem.*, **41**; 659–665.
- Tatsumi H., Murakami S., Tsuji R.F., Ishida Y., Murakami K., Masaki A., Kawabe H., Arimura H., Nakano E., Motai H., 1991.** Cloning and expression in yeast of a cDNA clone encoding *Aspergillus oryzae* neutral protease II, a unique metalloprotease. *Mol. Gen. Genet.*, **228**; 97-103.
- Thammarongtham C., Turner G., Moir A.J., Tanticharoen M., Cheevadhanarak S., 2001.** A New Class of Glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **3**(4); 611-617.
- Thys R.C.S., Guzzon S.O., Cladera-Olivera F., Brandelli A., 2006.** Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. *Proc. Biochem.*, **41**; 67–73.
- Tobe S., Takami T., Ikeda S., Horikoshi K., 1976.** Production of some enzymatic properties of alkaline protease of *Candida lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, **40**; 1087–1092.

- Tricarico J.M., Johnston J.D., Dawson K.D., 2008. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **145**; 136–150.
- Tunga R., Shrivastava B., Banerjee R., 2003. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Proc. Biochem.*, **38**; 1553–1558.
- Uyar F., Baysal Z., 2004. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation. *Proc. Biochem.*, **39**; 1893–1898.
- Vazquez S.C., Coriab S.H., Mac Cormack W.P., 2004. Extracellular proteases from eight psychrotolerant antarctic strains. *Microbiol. Res.*, **159**; 157–166.
- Ventura M.R., Pieltain M.C., Castanon J.I.R., 2009. Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **154**; 271–275.
- Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar C.N., Romero-Gomez S.J., Díaz-Godínez G., Augur C., 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.*, **13**; 157–167.
- Walker G.M., White N.A., 2005. Introduction to Fungal Physiology in Kavanagh K., Fungi: Biology and applications. John Wiley & Sons Ltd. England. pp; 2.
- Wang R., Law R.C.S., Webb C., 2005a. Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Proc. Biochem.*, **40**; 217–227.
- Wang S.-L., Chen Y.-H., Wang C.-L., Yen Y.-H., Chern M.-K., 2005b. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme Microb. Technol.*, **36**; 660–665.
- Wang Q., Hou Y., Xu Z., Miao J., Li G., 2008a. Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. *Bioresour. Technol.*, **99**; 1926–1931.
- Wang S.-L., Yang C.-H., Liang T.-W., Yen Y.-H., 2008b. Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001. *Bioresour. Technol.*, **99**; 3700–3707.
- Ward O.P., Qin W.M., Dhanjoon J., Ye J., Singh A., 2006. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Adv. Appl. Microbiol.*, **58**; 1-55.
- Webster J., Weber R.W.S., 2007. Introduction to fungi. 3rd edition. Cambridge University Press. New York, pp. 286–302.
- Weiss W.P., Frobose D.L., Koch M.E., 1997. Wet tomato pomace ensiled with corn plants for dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **80**; 2896–2900.
- Wu T.Y., Mohammad A.W., Jahim J.Md., Anuar N., 2006. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microb. Technol.*, **39**; 1223–1229.

Site web

<http://www.algerie-focus-com/.../la-production-de-la-tomate-industrielle-a-doublé-en-2010-la-filière-amorce-sa-sortie-de-crise/>

Annexes

Annexe 1

- **Gélose à la pomme de terre**

Le milieu pomme de terre dextrose agar (*Potato Dextrose Agar*), est recommandé pour l'isolement, la culture et le dénombrement des levures et des moisissures dans les denrées alimentaires et autres produits (Guiraud, 1998).

La composition chimique type en g/l d'eau distillée de ce milieu est :

- Infusât de pomme de terre (à partir de 200 g de pomme de terre).....4
- Glucose.....20
- Agar-agar.....15

pH final $5,6 \pm 0,2$ à 25°C

Stérilisation à l'autoclave : 121°C pendant 15 min.

Annexe 2

▪ Détermination de la matière sèche (MS)

Le taux de matière sèche exprimé en pourcent de l'échantillon est donné par la formule suivante :

$$(P_0 - P) \times 100 / P_0$$

Dont P_0 : poids initial en gramme, de la prise d'essai ;

P : poids en gramme, de la prise d'essai séchée ;

$$MS (\%) = 100 - H (\%) \quad \text{d'où } H : \text{humidité}$$

▪ Détermination des cendres

Le taux de la matière organique (MO) exprimé en pourcent de l'échantillon est donné par la formule suivante :

$$(P_0 - P) \times 100 / P_0$$

Dont P_0 : poids initial en gramme de la prise d'essai ;

P : poids en gramme du résidu gris résultant de l'incinération ;

$$C (\%) = 100 - MO (\%) \quad \text{d'où } C : \text{cendres}$$

Annexe 3

1. Dosage des sucres totaux

- **Protocole**

A 1 ml de l'échantillon dilué, est ajouté 1 ml de phénol à 5% et 5 ml de l'acide sulfurique 95% de pureté. Après agitation, le mélange réactionnel est laissé reposer 10 min à température ambiante. Il est ensuite incubé au bain-Marie à 30°C pendant 30 min. La lecture des absorbances est effectuée au spectrophotomètre (JENWAY 6315) à 490 nm.

2. Dosage des protéines

- **Réactifs**

Solution A : Na_2CO_3 à 2% dans le NaOH (0,1N) ;

Solution B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 1% dans l'eau distillée ;

Solution C : Tartrate double de sodium et de potassium à 2% dans l'eau distillée ;

Solution M : 1 ml de solution C + 1 ml de solution B + 20 ml de solution A ;

Réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10^{ème}.

- **Protocole**

A 1 ml de l'échantillon dilué, 1 ml de la solution M est ajouté. Le mélange est laissé reposer 10 à 15 min à température ambiante, ensuite 3 ml du réactif de Folin est ajouté. Après agitation vigoureuse, l'échantillon est incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 45 min. L'absorbance est lue à 750 nm.

Annexe 4

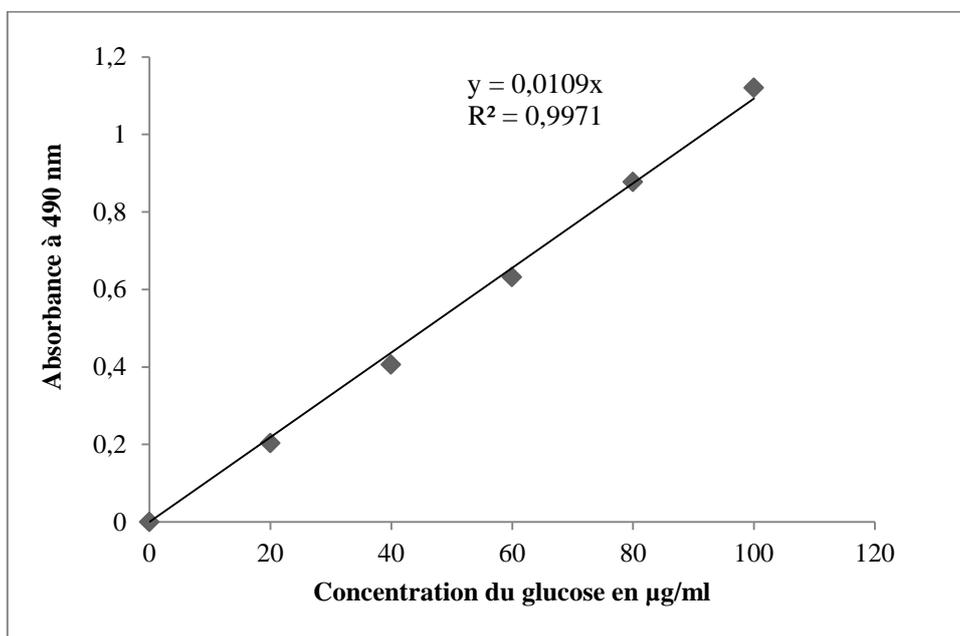


Fig. a. La courbe d'étalonnage de glucose.

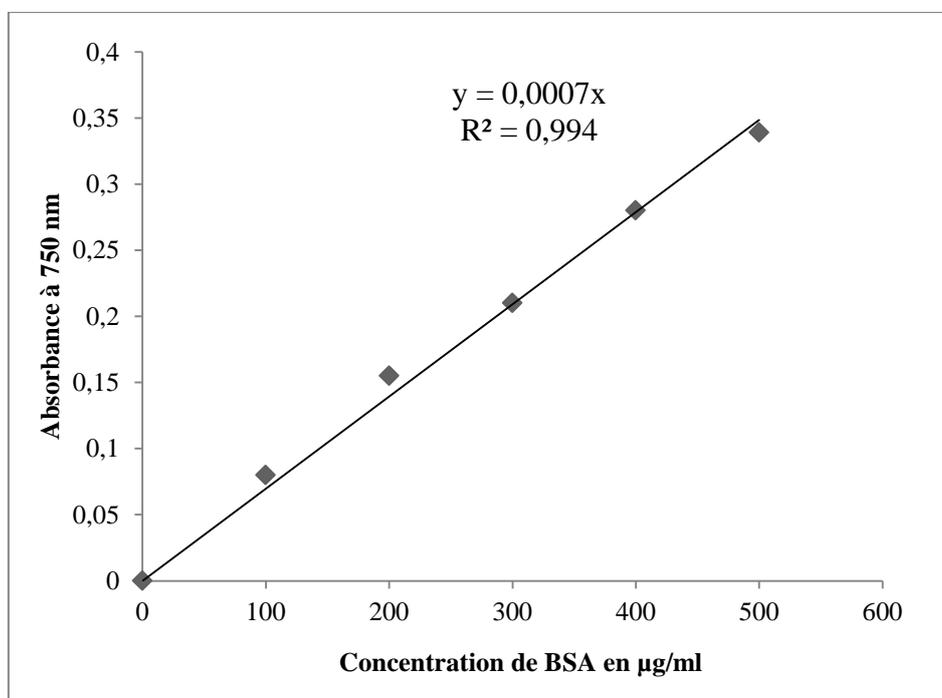


Fig. b. La courbe d'étalonnage des protéines.

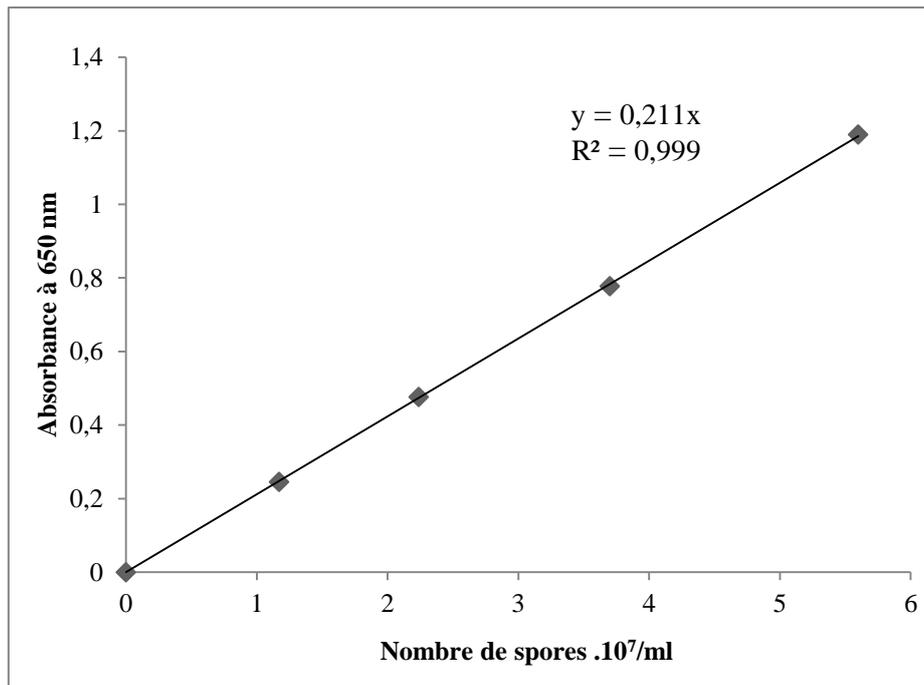


Fig. c. La Courbe d'étalonnage de spores d'*Aspergillus oryzae* NRRL 2220.

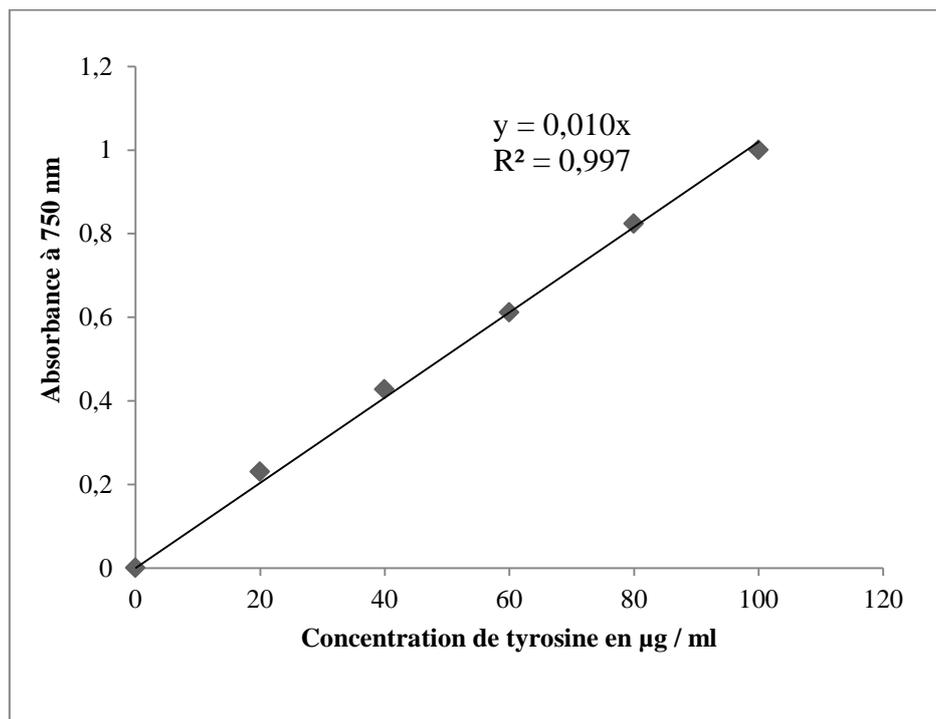


Fig. d. La courbe d'étalonnage de la tyrosine.

Annexe 5

Plan d'expériences de Plackett et Burman

Mathématiquement l'effet de chaque facteur ainsi que l'erreur est exprimé comme suit :

$$E = \frac{\sum \text{réponses au niveau (+)}}{n} - \frac{\sum \text{réponses au niveau (-)}}{n}$$

Où E : Effet de chaque facteur ;

n : Nombre d'apparition du facteur au niveau supérieur ou inférieur, $n = 4$

La variance du system est définie comme étant la moyenne des carrées des erreurs, qui peut être exprimé par :

$$V_E = \frac{\sum (\text{erreurs})^2}{N}$$

Où V_E : Variance des effets ;

N : nombre des erreurs.

L'erreur standard $E.S$ est définie comme étant la racine carré de la variance exprimée par :

$$E.S = \sqrt{V_E}$$

La signification de chaque facteur est déterminée par le test- t de Student.

$$t = E / E.S$$

Si le test- t est significatif, l'effet est donc dû au changement du niveau du facteur et non pas au hasard ni à l'erreur expérimental. C'est-à-dire le changement du facteur du niveau inférieur au niveau supérieur entraîne un effet positif ou négatif sur la réponse.

Annexe 6

Analyse de la variance pour la production de la protéase neutre selon le plan composite centré.

a. Culture solide

Source	DL	Som Car séq	Som Car ajust	CM just	F	p
Régression	5	15546243	15546243	3109249	40,58	0,000
Linéaire	2	5586213	5586213	2793106	72,72	0,000
Carré	2	4289523	4289523	2144762	27,99	0,002
Interaction	1	113906	113906	113906	1,49	0,277
Erreur résiduelle	5	619247	619247	123849		
Inadéquation de l'ajustement	3	340159	340159	113386	5,28	0,163
Erreur pure	2	42917	42917	21458		
Total	10	15929318				

b. Culture liquide

Source	DL	Som Car séq	Som Car ajust	CM just	F	p
Régression	5	6646500	6646500	1329300	28,75	0,001
Linéaire	2	4303987	4303987	2151993	46,55	0,001
Carré	2	2341288	2341288	1170644	25,32	0,002
Interaction	1	125	1225	1225	0,03	0,877
Erreur résiduelle	5	2321173	231173	46235		
Inadéquation de l'ajustement	3	228573	228573	76191	58,61	0,017
Erreur pure	2	2600	2600	1300		
Total	10	6877673				

Annexe 7

a. *Analyse de la variance de l'effet du pH sur l'activité protéolytique pour SSF ($p < 0,05$)*

Modèle	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	p
Régression	3,541	1	3,541	21,908	0,001
Résidu	1,940	12	1,616		
Total	5,480	13			

b. *Analyse de la variance de l'effet du pH sur l'activité protéolytique pour SmF ($p < 0,05$)*

Modèle	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	p
Régression	3,485	1	3,485	28,649	0,000
Résidu	1,460	12	1216375,828		
Total	4,944	13			

Annexe 8

a. Analyse de la variance de l'effet de la température sur l'activité protéolytique pour SSF ($p < 0,05$)

Modèle	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	<i>F</i>	<i>p</i>
Régression	5,567	1	5,567	17,481	0,002
Résidu	3,503	11	3,185		
Total	9,070	12			

b. Analyse de la variance de l'effet de la température sur l'activité protéolytique pour SmF ($p < 0,05$)

Modèle	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	<i>F</i>	<i>p</i>
Régression	3,194	1	3,194	9,729	0,010
Résidu	3,612	11	3283300,303		
Total	6,806	12			

Résumés

Résumé

Une étude comparative de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* NRRL 2220 sur deux types de fermentations (*SSF* et *SmF*) est réalisée sur un milieu à base de déchets de tomates. Pour cela, les milieux sont optimisés suivant des méthodes statistiques en utilisant deux plans d'expériences. Le premier correspond aux matrices de Plackett et Burman à $N = 8$ expériences et $N-1$ facteurs, cinq réels (les facteurs de production : son de blé, caséine, nitrate d'ammonium, NaCl et $ZnSO_4$) et deux erreurs. Le deuxième est le plan composite centré de Box et Wilson à deux facteurs. L'analyse des résultats a permis la sélection de deux facteurs ayant un effet significatif sur la production de l'enzyme (la caséine et le NaCl en *SSF* ; le son de blé et le NaCl en *SmF*) puis la détermination de leurs optima (19,8 g/l de caséine et 0,92 g/l de NaCl pour la *SSF* ; 17,92 g/l du son de blé et 1,18 g/l de NaCl pour la *SmF*). Le meilleur temps de production de la protéase neutre déterminé par l'étude cinétique est de 96 h pour 21309 U/g en *SSF* et 4687 U en *SmF*. Les caractéristiques de la protéase neutre produite montrent un pH optimum de 6,8 et une température optimale de 50°C avec des demi-vies de 54 min pour la *SSF* et 65 min pour la *SmF*. La protéase est inhibée par l'EDTA et activée par les cations divalents (Zn^{++} et Ca^{++}) ; il s'agit d'une métalloenzyme. Elle est stable en présence de 1% de NaCl et présente également une grande stabilité vis-à-vis du Tween 80. Lorsque l'activité protéolytique est exprimée par poids du substrat ; l'activité optimale en *SSF* est 8 fois plus élevée que celle en *SmF*. Ces résultats montrent clairement la rentabilité du *SSF* sur la *SmF* ; ils confirment le potentiel biotechnologique élevé de cette espèce fongique pour la production de la protéase neutre dans la culture solide.

Mots-clés : Protéase neutre, *Aspergillus oryzae*, fermentations solides, fermentations liquides, déchets de tomates, plans d'expériences, optimisation.

ملخص

إنّ دراسة إنتاج إنزيم Neutral protease بواسطة الفطر *Aspergillus oryzae* NRRL 2220 عن طريق التخمّر الصّلب (SSF) ومقارنتها بالتخمّر السائل (SmF) قد تمّت باستعمال مخلفات الطّماطم الصّناعية كمادّة أولية للوسط المعيشي. الأوساط المعيشية قد حُسنّت وفقاً لأساليب إحصائية و ذلك باستعمال مخطّطين للتّجارب. الأوّل يتوافق مع مصفوفات Plackett-Burman ذات ن = 8 تجربة و ن - 1 عامل؛ خمسة حقيقيّة (عوامل الإنتاج : نخالة القمح، الكازيين، نترات الأمونيوم ، كلوريد الصوديوم و $ZnSO_4$) و اثنين من الأخطاء. أما الثّاني فيتوافق مع مخطّط التّركيبات المركزيّة (Box and Wilson ل Central Composite Design) ذو عاملين. سمح تحليل النّتائج باختبار اثنين من العوامل التي لها تأثير كبير على إنتاج الإنزيم (الكازيين وكلوريد الصوديوم في ال *SSF* ؛ نخالة القمح وكلوريد الصوديوم في ال *SmF*) و بتحديد قيمهم المثلى (19,8 غ/ل من الكازيين و 0,92 غ/ل من كلوريد الصوديوم في ال *SSF*؛ 17,92 غ/ل من نخالة القمح و 1,18 غ/ل من كلوريد الصوديوم في ال *SmF*). أفضل وقت لإنتاج ال Neutral protease الذي تمّ تحديده بواسطة الدّراسة الحركية هو 96 ساعة ل 21309 U/g في ال *SSF* و 4687 U في ال *SmF*. أبرزت نتائج دراسة خصائص الإنزيم المنتج درجة حموضة مثلى تقدّر ب 6,8 و درجة حرارة مثلى عند 50° مئوية مع نصف حياة تقدّر ب 54 د بالنسبة لانزيم ال *SSF* و 65 د بالنسبة لانزيم ال *SmF*. قد تمّ تثبيط نشاط ال protease بواسطة ال EDTA من جهة، و تمّ تنشيطه بواسطة الكاتيونات الثنائية (Zn^{++} and Ca^{++}) من جهة أخرى؛ ممّا يؤكّد على أنّ الإنزيم معدني. كما أنّ نشاط الإنزيم بقي مستقرًا عند 1% من كلوريد الصوديوم و أظهر استقراراً جيداً في وجود ال Tween 80. عندما تمّ التّعبير عن وحدة نشاط الإنزيم على أساس وزن المادّة الأولية؛ النّشاط الأمثل في ال *SSF* يمثّل 8 مرات أكبر منه في ال *SmF*. هذه النّتائج تظهر بوضوح فعالية ال *SSF* مقارنة ب ال *SmF* و تؤكّد على القدرة العالية لهذا النّوع الفطري في التّكنولوجيا الحيوية لإنتاج ال Neutral protease في الوسط المعيشي الصّلب.

الكلمات المتاحية : Neutral protease، *Aspergillus oryzae*، التخمّرات الصلبة، التخمّرات السائلة، مخلفات الطّماطم، مخطّطات التّجارب، تحسين التخمّرات.

Abstract

A comparative study of the production of neutral protease by *Aspergillus oryzae* NRRL 2220 on two types of fermentations (SSF and SmF) is achieved on tomato waste basis medium. For this, the media are optimized according to statistical methods while using two plans of experiences. The first corresponds to the matrixes of Plackett-Burman in N=8 experiences and N-1 factors, five are real (the factors of production: wheat bran, casein, ammonium nitrate, NaCl and ZnSO₄) and two errors. The second is the central composite design of Box and Wilson for two factors. The analysis of the results permitted the selection of two factors having a significant effect on the production of the enzyme (casein and NaCl in SSF; wheat bran and NaCl in SmF), then their optima (19,8 g/l of casein and 0,92 g/l of NaCl for the SSF; 17,92 g/l of wheat bran and 1,18 g/l of NaCl for the SmF). The best time of production of the neutral protease determined by the kinetic study is of 96 h for 21309 U/g in SSF and 4687 U in SmF. The characteristics of the produced neutral protease show an optimum pH of 6,8 and an optimal temperature of 50°C with half-lives of 54 min for the SSF and 65 min for the SmF. The protease is inhibited by the EDTA and activated by metal ions (Zn⁺⁺ and Ca⁺⁺); it is a metalloenzyme. It is stable in the presence of 1% of NaCl and presents a large stability against Tween 80. When the proteolytic activity is expressed by weight of the substrate; the optimal activity in SSF is 8 times more elevated than the one in SmF. These results clearly show the efficiency of SSF on the SmF; and confirm the high biotechnological potential of this fungal species for the production of the neutral protease in solid-state fermentation.

Key-words : Neutral protease, *Aspergillus oryzae*, solid-state fermentation (SSF), submerged fermentation (SmF), tomato pomace, experimental designs, optimization.
