

Optimisation à l'aide d'un plan d'expériences de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels

Malika Benkahoul¹, Aicha Belmessikh¹, Hayet Boukhalifa¹, Aicha Mechakra-Maza¹

(1) Laboratoire de Biologie et Environnement, Université des Frères Mentouri- Constantine BP 325 Route de Ain El Bey, Constantine, Algérie

*Auteur correspondant : benkahoul.malika@umc.edu.dz
malika1174@yahoo.fr

RÉSUMÉ

La production d'une protéase neutre a été réalisée par fermentation d'une moisissure mésophile (*Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72) en erlenmeyers sur milieux à base de déchets d'oranges enrichis à l'aide de sous-produits agro-industriels. L'optimisation de la synthèse de l'enzyme a été effectuée en utilisant une méthode statistique de planification expérimentale (les matrices de Plackett et Burman à $N = 8$, soit à 8 expériences et $N-1 = 7$ variables). Les variables utilisées sont les 5 facteurs de production (lactosérum, déchets de dattes ou dattes déclassées, corn-steep liquor, sels minéraux et pH) et 2 erreurs. Les résultats ont été modélisés selon une régression linéaire multiple de type : $\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + e$. Les résultats statistiques (corrélations et seuil de signification) ont permis de sélectionner les facteurs permettant la meilleure production de l'enzyme. Celle-ci (2016 U) est obtenue sur un milieu à base de déchets d'oranges enrichis en corn-steep liquor après 72 h de fermentation à pH 6. Ainsi, le milieu optimal permet une production importante de protéase neutre sur un milieu à moindre coût.

MOTS-CLÉS : protéase neutre, *Aspergillus oryzae*, déchets d'oranges, optimisation, matrices de Plackett et Burman

ABSTRACT

The production of neutral protease was carried out by the cultivation of *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 in submerged fermentation using orange waste resulting from juice processing as a basal medium enriched with agro-industrial wastes. Optimization of the enzyme synthesis was achieved using the statistical method of Plackett-Burman design with $N = 8$ experiments and $N-1$ factors; five real (corn-steep liquor, pH, salt, decommissioned dates, whey) and two errors. The results were modeled using a linear regression of the type: $\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + e$. The statistical results (correlations and significance level) made it possible to select the factors allowing the maximum production of protease (2016 U) obtained on a medium containing orange waste enriched in corn-steep liquor in 72 h and at pH 6. A large production is therefore obtained on a cheap medium.

KEYWORDS: neutral protease; *Aspergillus oryzae*; orange waste; optimization; Plackett-Burman design

Optimisation à l'aide d'un plan d'expériences de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels

Malika Benkahoul, Aicha Belmessikh, Hayet Boukhalifa, Aicha Mechakra-Maza

Introduction

La pollution du milieu environnant par les déchets et les sous-produits rejetés par les industries représente une grande préoccupation. En Algérie, le phénomène s'accroît de jour en jour avec le développement industriel, en particulier celui du secteur agro-alimentaire. Les agrumes sont les fruits les plus produits dans le monde. Le Ministère de l'agriculture et du développement rural algérien (MADR) montre qu'en 2011 l'agrumiculture couvrait une superficie totale de 64 323 ha avec une production totale avoisinant les 1 100 000 tonnes toutes variétés confondues. Celle-ci est constituée à 72 % d'oranges dont une grande partie est utilisée dans l'industrie citricole où les déchets représentent 50 % du produit traité. Plusieurs sous-produits agro-industriels générés par de nombreux processus représentent l'une des sources les plus abondantes en carbone et peuvent être utilisés comme matière première pour d'autres industries. L'utilisation de ces déchets dans différentes fermentations microbiennes permet la production de métabolites à haute valeur ajoutée tels que les antibiotiques et les enzymes ; ce qui représente un moyen prometteur économiquement (Zouari *et al.*, 2002). Les déchets d'oranges ont été utilisés dans la production de l' α -amylase microbienne (Bennamoun *et al.*, 2004 ; Oussadi et Kitouni, 2015).

40 % des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes parmi lesquels, des souches fongiques (García-Gómez *et al.*, 2009). En effet, les moisissures sont considérées comme les microorganismes les plus importants en biotechnologie. *Aspergillus oryzae* est l'une des principales espèces fongiques appliquées dans la production commerciale des enzymes. Par ailleurs, l'emploi des enzymes connaît un succès remarquable et entrouvre des perspectives nouvelles. En effet, le marché mondial des enzymes industrielles dépasse 1,5 milliard de dollars et enregistre une croissance annuelle de 6,5 % (Danson et Hough, 1998). Certaines industries n'ont vu le jour que grâce à la mise sur le marché d'enzymes purifiées. Parmi ces enzymes, les protéases constituent le groupe le plus important avec 40 à 60 % du total des ventes d'enzymes dont les deux tiers sont d'origine microbienne (Gupta *et al.*, 2002 ; Garcia-Gomez *et al.*, 2009). Les ventes industrielles des protéases sont estimées à plus de 350 millions de dollars annuellement (Kumar *et al.*, 2008). Par ailleurs, dans la production des enzymes industrielles, le milieu compte

pour 25 à 30 % du prix de revient (Hepner, 1983) et peut aller jusqu'à 40 % (Srinubabu *et al.*, 2007). L'utilisation des sous-produits dans la composition d'un milieu de culture permet non seulement de réaliser des économies, mais aussi de lutter contre la pollution de l'environnement.

Dans ce cadre nous nous proposons de produire une protéase neutre (ou métalloprotéase) par *Aspergillus oryzae* sur des milieux à base de déchets d'oranges enrichis par trois sous-produits agro-industriels (lactosérum, dattes déclassées et *corn-steep liquor* (concentré de solution de trempage de maïs). Ce travail consiste à déterminer au préalable la composition chimique des déchets d'oranges, utilisés comme base du milieu de culture, puis l'optimisation de ce dernier. Pour cela, une méthode statistique a été adoptée ; le plan d'expériences factoriel fractionnaire de Plackett et Burman (1946). Alors que la démarche classique consiste à faire varier successivement chacun des facteurs en maintenant les autres constants et ne peut aboutir à des optima (Larpen et Sanglier, 1992), ce plan permet d'étudier plusieurs facteurs à la fois tout en réduisant le nombre d'expériences et d'exprimer la production selon un modèle mathématique. Cette méthode est considérée comme un outil fiable, reproductible et économique ; elle a été utilisée dans l'optimisation de la production de différentes enzymes comme l' α -amylase par *Aspergillus oryzae* et *Rhizopus oryzae* (Francis *et al.*, 2003 ; Ait Kaki El-Hadef El-Okki *et al.*, 2017), la chitinase par *Streptomyces griseorubens* (Gasmi et Kitouni, 2016) et les protéases par *Aspergillus oryzae* et *Bacillus subtilis*. Ces protéases ont été produites sur des milieux de cultures à base de substrats naturels issus de déchets agricoles et des industries agroalimentaires (Belmessikh *et al.*, 2013 ; Sathishkumar *et al.*, 2015).

I. Matériel et Méthodes

I.1. Préparation des spores

La souche fongique utilisée est *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72, conditionnée sous forme lyophilisée dans une ampoule en verre fournie par l'Institut Pasteur de Paris (France). Sa réactivation est effectuée sur gélose inclinée à l'extrait de malt à 30°C jusqu'à formation de mycélium. La sporulation est réalisée sur le milieu de culture *Potato Dextrose Agar* (PDA).

1.2. Déchets utilisés

1.2.1. Déchets d'oranges

Les déchets d'oranges ont été fournis par l'ENAJUC, (Skikda, Algérie).

1.2.2. Dattes déclassées

Les dattes déclassées sont impropres à la consommation humaine et sont destinées à l'alimentation du bétail. Après leur récupération (Tolga, Biskra, Algérie) et avant leur utilisation, elles sont séchées à l'ombre puis broyées.

1.2.3. Lactosérum

Le lactosérum doux est fourni par l'unité LONALAIT (Constantine, Algérie) sous forme liquide, il est obtenu par coagulation du lait avec de la présure. Avant son utilisation le lactosérum est d'abord filtré puis centrifugé à 15000 g durant 20 minutes pour éliminer les impuretés. Il est utilisé sous sa forme liquide.

1.2.4. Corn-steep liquor

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

1.3. Milieu de culture et conditions de fermentation

Le milieu de culture de base est préparé à partir de 20 g de déchets d'oranges secs qui sont dissous dans 500 ml

d'eau distillée ; la suspension est centrifugée à 15000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est dilué à 50 % à l'aide du tampon phosphate 0,1 M à pH 5 ou 6. Le milieu est enrichi (selon le plan expérimental) puis réparti dans des erlenmeyers de 250 ml à raison de 40 ml par erlenmeyer. Avant stérilisation à 115°C pendant 20 min le pH de chaque erlenmeyer est ajusté selon le plan statistique. Il estensemencé avec 10^5 spores/ml, puis homogénéisé afin d'éviter l'agrégation et incubé à 30°C pendant 3 jours sous une agitation de 220 rpm.

1.4. Plan d'expériences

Le plan d'expériences adopté est celui de Plackett et Burman (1946) afin de sélectionner les facteurs influençant la production de la métalloprotéase. Une matrice de 7 facteurs (5 facteurs réels et 2 facteurs irréels ou erreurs) et 8 expériences a été utilisée. C'est une matrice carrée, ne contenant que des éléments égaux à +1 ou -1, les facteurs de la dernière combinaison étant toujours pris au niveau inférieur -1. Cette matrice est obtenue par permutation circulaire à partir d'un générateur de base.

1.5. Analyse statistique

À la fin de chaque expérience, l'effet de chaque facteur sur la production de l'enzyme et de la biomasse est estimé comme étant la différence entre la moyenne des valeurs de réponses observées au niveau supérieur (+) et la moyenne des valeurs de réponses observées au niveau inférieur (-) selon l'expression mathématique suivante :

$$E_i = \frac{\sum \text{Réponses au niveau (+)}}{\text{Nombre de valeurs (+)}} - \frac{\sum \text{Réponses au niveau (-)}}{\text{Nombre de valeurs (-)}}$$

E_i : effet de chaque facteur

La variance du système est égale à la moyenne des carrés des erreurs, qui peut être exprimée mathématiquement par :

$$V_E = \frac{\sum (\text{Erreurs})^2}{\text{Nombre des erreurs}}$$

Tableau 1. Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs

Facteurs	Niveau inférieur (-1)	Niveau supérieur (+1)
X₁ : Corn-steep liquor (ml/L)	0	5%
X₂ : dattes déclassées (g/L)	0	5%
X₃ : Erreur	-	-
X₄ : pH	5	6
X₅ : Erreur	-	-
X₆ : Lactosérum (ml/L)	0	5%
X₇ : Sels (mg/L) :		
- Mn SO ₄	0	1 mg/L
- Zn SO ₄	0	3 mg/L
- Fe SO ₄	0	4 mg/L
- Mg SO ₄	0	0,5 g/L

V_{effets} : Variance des effets ; c'est la moyenne des carrés des écarts des valeurs de la distribution de x_i (facteur) par rapport à la moyenne.

L'erreur standard E.S est égale à la racine carrée de la variance :

$$E.S = \sqrt{V_{\text{effets}}}$$

La signification de chaque effet est déterminée par le test T de Student :

$$T = \frac{\text{Effet}}{E.S}$$

Les calculs ont été effectués par le logiciel STATISTICA 6.0. Toutes les variables ayant une probabilité de signification inférieure à 70 % sont rejetées. Les résultats de production (enzyme et biomasse) se présentent sous forme d'une équation polynomiale du premier degré avec seulement les variables explicatives à effet significatif positif ou négatif :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + e. \quad (1)$$

Y : la réponse expérimentale ;

β_0 : la réponse moyenne (constante) ;

X_1, X_2, X_3, X_4 et X_5 : les variables explicatives ;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ et β_5 : les coefficients des variables explicatives ;

e : la moyenne des erreurs expérimentales.

1.6. Les mesures effectuées

1.6.1. La matière sèche (Lecoq, 1965)

5 g de déchets d'oranges sont placés dans une étuve à $103^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durant quatre heures, refroidis dans un dessiccateur et pesés. L'échantillon est remis à l'étuve pendant une heure et pesé plusieurs fois jusqu'à stabilité du poids. Les résultats sont rapportés à 100 g de produit.

1.6.2. La matière minérale (Lecoq, 1965)

La teneur en matière minérale est conventionnellement le résidu de l'échantillon après incinération. Celle-ci est réalisée dans un four à moufle jusqu'à combustion complète du charbon formé et obtention d'un résidu gris clair.

1.6.3. Dosage des sucres (Dubois, 1956)

La méthode de Dubois est basée sur le développement d'une coloration brique sous l'effet du phénol. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du sucre dans le milieu. L'acide sulfurique concentré et la chaleur provoquent le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des alcools des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxyméthyl furfural dans le cas d'un hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Le produit se condense avec le phénol pour donner des composés colorés.

1.6.4. La biomasse

La biomasse est séparée du milieu de culture par simple filtration sur du papier Whatman n° 1. La biomasse humide est séchée dans une étuve à $103^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, puis pesée plusieurs fois jusqu'à stabilité du poids dit poids sec.

1.6.5. L'activité protéolytique

L'activité de la métalloprotéase est mesurée à pH 7 sur caséine selon la méthode d'Anson, (1938) adoptée et modifiée par Lenoir et Auberger (1977) et Mechakra *et al.* (1999). Le mélange réactionnel est préparé par addition de 1,5 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7, 2,5 ml de substrat (caséine à 2,5 % dans citrate de sodium 0,02 M) et 1 ml de la solution enzymatique. Après agitation, la solution est incubée 1 heure au bain-marie à 40°C .

La réaction est arrêtée par addition de 5 ml de T.C.A à 4 %, ce qui entraîne une précipitation des protéines. Les composés azotés non protéiques sont dosés sur le filtrat par colorimétrie selon Folin et Ciocalteu (1927). Les mélanges de digestion, non incubés sont traités dans les mêmes conditions afin de supprimer l'absorbance liée aux acides aminés aromatiques faisant partie des structures des enzymes. L'unité d'activité

Tableau 2. Composition des déchets utilisés par rapport à 100 % de matière sèche.

Paramètres	Déchets d'oranges	Dattes déclassées	Lactosérum	Corn-steep liquor
Matière sèche	20,10 %	87,34 %	6,5 %	45 %
Matière minérale	03,40 %	1,29 %	10,46 %	16,42 %
Sucres totaux (solubles)	45,50 %	59 %	71,53 %	8,31 %
Protéines	03,74 %	0,89 %	8,61 %	50,44 %

protéolytique correspond à 1 µg de tyrosine libérée par heure et par ml de milieu de culture.

2. Résultats et discussions

2.1. Composition des déchets

La composition des déchets utilisés pour la préparation des milieux de cultures est présentée dans le tableau 2.

Dans le tableau 2 sont synthétisées les compositions chimiques des déchets utilisés.

Le tableau 2 montre la richesse des déchets d'oranges en sucres solubles (45,5 %) comme cela a été mentionné par Souci *et al.* en 1994 (44 %). Il fait apparaître une teneur en matière sèche de 20,1 %, ce qui représente un pourcentage très proche de celui obtenu par Fadel (1999), soit 21 %. Il montre également un taux de 3,4 % de matière minérale, comparable à celui de Nouel et Combellas (1999) qui rapportent une teneur de 3,9 %. Le taux de protéines totales est très faible par rapport à celui de la bibliographie. En effet, la valeur déterminée sur nos échantillons représente 3,74 %, soit presque la moitié du résultat obtenu par Nishio et Nagai (1981) pour la composition de l'orange entière. Cette perte peut s'expliquer aussi bien par le traitement thermique lié au processus de fabrication du jus afin d'éviter les contaminations que par la variété des oranges utilisées dans la production du jus.

Ces résultats montrent la richesse de ces déchets en sucres solubles et en minéraux et encouragent leur utilisation comme milieu de base dans la culture des moisissures et donc la production d'enzymes.

Pour les dattes, on observe des teneurs de 59 % en sucres solubles, de 87,34 % en matière sèche, de 1,29 % en matière minérale et de 0,89 % de protéines totales (tableau 2).

Comme dans notre étude, la bibliographie indique la richesse des dattes en sucres et leur de faible teneur en composés protidiques (Vayalil, 2012 ; Mkaouar et Kachaou, 2013). Elles sont particulièrement utilisées comme substrat de fermentation pour leur richesse en source carbonée (Ait Kaki El-Hadef El-Okki *et al.*, 2017).

Concernant le lactosérum, la composition indique un taux de 71,53 % pour les sucres solubles, de 10,46 % pour la matière minérale et de 8,61 % pour les protéines. Ce sous-produit de l'industrie laitière se caractérise par sa richesse en lactose et en sels minéraux (Alais, 1981 ; Sienkiewicz et Riedel, 1990).

Le tableau 2 mentionne également la composition du *corn-steep liquor* où les sucres totaux solubles représentent 8,31 %, la matière sèche 45 % et les protéines 50,44 %. La littérature rapporte des résultats variables selon la source du *corn-steep liquor* (Hull *et al.*, 1996 ; Gao et Yuan, 2011) mais toutes les références présentent ce sous-produit industriel comme une bonne source d'azote englobant une large variété d'acides aminés (Xiao, *et al.*, 2013).

2.2. Sélection des facteurs de croissance et de production

Les résultats des expériences réalisées suivant le plan de Plackett et Burman donnent les résultats de la biomasse sèche et de l'activité protéolytique représentés dans le tableau 3. La meilleure croissance est obtenue dans l'essai n°6 contenant le *corn-steep liquor*, le lactosérum et les sels et à pH 5. Alors que la meilleure activité protéolytique est observée dans l'essai n°7 contenant le *corn-steep liquor*, les dattes déclassées et les sels à pH. Par contre, l'activité la plus faible est obtenue dans le milieu de base (l'essai n°8).

L'analyse statistique permet de mesurer l'effet de chaque facteur sur les deux paramètres, biomasse et activité protéolytique (tableaux 4 et 5).

Tableau 3. Résultats de la biomasse et de l'activité métalloprotéasique produites selon le plan de Plackett et Burman.

N° d'essai	Facteurs							Biomasse sèche (g/l)	Activité protéolytique (U)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇		
1	+	+	+	-	+	-	-	18,72	216,10
2	-	+	+	+	-	+	-	4,50	513,80
3	-	-	+	+	+	-	+	4,55	181,40
4	+	-	-	+	+	+	-	5,37	1913,70
5	-	+	-	-	+	+	+	6,40	132,80
6	+	-	+	-	-	+	+	21,78	160,80
7	+	+	-	+	-	-	+	2,68	2016,80
8	-	-	-	-	-	-	-	3,59	17,30

Tableau 4. Effet des variables sur la production de la biomasse (signification minimale supérieure à 70 %).

Facteur	Estimation	Valeur de T	Signification
Corn-steep liquor	7,632	1,319	70,00 %
Pulpe des dattes déclassées	-0,732	0,131	NS
Erreur	7,861	1,409	80,00 %
pH	-8,332	1,493	80,00 %
Erreur	0,637	0,114	NS
Lactosérum	2,112	0,378	NS
Sels	0,792	0,142	NS

Moyenne = 8,4412500, variance = 31,1126563, T : test de Student, NS : non significatif.

Tableau 5. Effet des variables sur l'activité protéolytique (signification minimale supérieure à 70 %).

Facteur	Estimation	Valeur de T	Signification
Corn-steep liquor	865,525	1,621	80,00 %
Pulpe des dattes déclassées	151,575	0,283	NS
Erreur	-752,125	1,408	80,00 %
pH	1024,675	1,919	90,00 %
Erreur	-66,175	0,123	NS
Lactosérum	72,375	0,135	NS
Sels	-42,275	0,0791	NS

Moyenne = 644,087500, variance = 2850,3557313, T : test de Student, NS : non significatif.

2.2.1. Effet du corn-steep liquor

L'effet du *corn-steep liquor* est significatif sur la croissance de la moisissure. En effet la présence du *corn-steep liquor* entraîne une augmentation de la biomasse par rapport à son absence de 7,63 g/l, avec une signification de 70 %, comme cela a été observé par Kassim (1983) et Silveira et al. (2001). Une signification de 90 % a été notée par Djekrif-Dakhmouche et al. (2006). Les résultats indiquent un effet positif du *corn-steep liquor* sur la production de la protéase neutre, une augmentation de 865,5 U est notée avec une signification de 80 %. Ces résultats confirment ceux obtenus par Abdel-Fatah et Saleh (1979) et Tsujita et Endo (1978) qui trouvent que les enzymes protéolytiques issues d'*Aspergillus sp.*, sont produites en quantités importantes quand le milieu est enrichi par le *corn-steep liquor*. D'autres travaux rapportent que parmi les sources d'azote utilisées dans la production d'enzymes, le *corn-steep liquor* est l'un des meilleurs car il stimule de manière significative la production enzymatique (Sonawat et al., 1981). En utilisant le même plan d'expériences et les mêmes déchets, Bennamoun et al. (2004) trouvent que le *corn-steep liquor* présentait une signification positive de 70 % sur la production de l' α -amylase.

2.2.2. Effet des dattes

L'addition des dattes déclassées est sans effet sur la production des protéases et de la biomasse. Ceci peut être expliqué par la richesse des dattes en sucres solubles et leur faible teneur en

protéines. Un apport suffisant en sucre est déjà assuré par les déchets d'oranges. Le travail réalisé par Ait Kaki El-Hadef El-Okki et al. (2017) confirme ce résultat en rapportant que les dattes déclassées utilisées dans la composition de leur milieu de culture pour la production de l' α -amylase présentaient un rapport carbone/azote (C/N) égal à 64/1.

2.2.3. Effet du pH

L'augmentation du pH de 5 à 6 est défavorable à la croissance d'*Aspergillus oryzae* (tableau 4). Ceci confirme les résultats rapportés par Hang et Woodam, (1977) où le pH optimal de croissance des moisissures est acide. En effet, ces auteurs montrent que dans un intervalle de pH compris entre 3 et 8 *Aspergillus foetidus* NRRL 337 présentait une croissance optimale à pH 4.

Par ailleurs parmi les 5 facteurs étudiés, le pH apparaît comme celui ayant l'effet positif le plus significatif sur la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* (90 %). Ainsi la variation du pH de 5 à 6 entraîne une augmentation de la production de l'enzyme de 1024,6 U (tableau 5). Cette augmentation montre que le pH 6 du milieu figure parmi les conditions optimales de production de la protéase neutre ; le même résultat a été décrit par Yang et al. (2000). Un pH proche de la neutralité a été favorable à la production des protéases neutres par *Aspergillus oryzae* (Fushimi et al., 1999). D'après ces résultats, il apparaît que les conditions optimales de la

production des protéases sont différentes de celles de la croissance de la moisissure (Lenoir *et al.*, 1973 ; Mechakra *et al.*, 1999). D'autres travaux réalisés sur la production d'autres enzymes, utilisant les matrices de Plackett et Burman montrent que la variation du pH de 5 à 6 permet une augmentation de l'activité enzymatique, c'est le cas de l'exo-polygalacturonase où les auteurs notent une signification positive de 97,3 % (Bennamoun *et al.*, 2016)

2.2.4. Effet du lactosérum

La présence du lactosérum dans le milieu de culture entraîne une augmentation de la production des protéases et de la croissance mais cette augmentation est non significative. En effet, le lactosérum seul est un milieu insuffisant pour la production des protéases (Mechakra *et al.*, 1999). Ce phénomène est lié à l'absence des acides aminés nécessaires à la synthèse enzymatique (Lenoir *et al.*, 1973).

2.2.5. Effet des sels

L'utilisation des sels minéraux est sans effet significatif sur la biomasse. En effet, les déchets d'oranges renferment une quantité suffisante en sels pour couvrir les besoins de la croissance de la moisissure (Sauvant, 1984 ; Mahmood, Greenman et Scragg, 1998 ; Bennamoun, 2004).

L'effet des minéraux avec les concentrations utilisées est négatif sur la production de la protéase neutre. En effet, étant donné que les déchets d'oranges sont très riches en matière minérale (Souci *et al.*, 1994), un apport supplémentaire en sels rend le milieu plus concentré. Ce résultat est confirmé par les travaux de Tomonago (1966), ce dernier mentionne que les concentrations élevées en sels minéraux tels que le $ZnSO_4$, le $FeSO_4$, le $MnSO_4$ et le $MgSO_4$ diminueraient la production des protéases par *Aspergillus niger*. Ire *et al.* (2011) rapportent l'influence des concentrations des ions métalliques sur la production de la protéase produite par *A. carbonarius*. Ces auteurs notent par exemple, l'augmentation de la production de la protéase lorsque le $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ est utilisé dans le milieu à 0,04 %, au-delà de cette valeur, la production protéolytique diminue.

D'après les tableaux 4 et 5, une erreur dans la production de la protéase et une dans la biomasse ont des effets significatifs. Cet effet significatif des erreurs sur les deux réponses peut être expliqué par l'ordre élevé du fractionnement dans les matrices de Plackett et Burman où l'erreur peut être confondue avec une interaction à effet significatif entre variables, ou bien les erreurs sont dues réellement aux erreurs lors des dosages effectués.

À partir de ces résultats, deux facteurs sont sélectionnés : le *corn-steep liquor* et le pH.

2.3. Expression des réponses sous forme d'équations

À partir des résultats présentés dans les tableaux 4 et 5 et après exclusion des facteurs non significatifs (signification inférieure à 70 %) sur les réponses, activité protéolytique et biomasse, la réponse peut s'écrire sous forme d'une équation polynomiale réduite (1) comme suit :

- Production de la protéase :

$$Y = 644,08 + 865,52 X_1 + 72,37 X_4 - 409,15 \quad (2)$$
 où X_1 est le *corn-steep liquor*, X_4 est le pH.

- Production de la biomasse :

$$Y = 8,44 + 7,63 X_1 - 72,37 X_4 + 4,24 \quad (3)$$
 où X_1 est le *corn-steep liquor*, X_4 est le pH.

Conclusion

La richesse des déchets d'oranges en sucres solubles permet leur utilisation comme substrat dans les cultures de moisissures et la production des métabolites recherchés. Cependant, leur emploi comme milieu de culture nécessite un enrichissement en protéines et en facteurs de croissance qui peuvent être fournis par d'autres substrats naturels. Ces derniers sont utilisés et sélectionnés en suivant des méthodes de planifications expérimentales. Celles-ci permettent de déterminer les facteurs ayant un effet significatif aussi bien sur la production de l'enzyme recherchée que sur la croissance de la moisissure utilisée. Parmi ces 5 facteurs (*corn-steep liquor*, dattes déclassées, pH, lactosérum et sels : $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$ et $MgSO_4$) seul le *corn-steep liquor* a montré une signification positive supérieure à 70 % ; le rôle capital du pH (la valeur 6 est retenue) vis-à-vis de la production de la protéase neutre produite par *Aspergillus oryzae* a été aussi noté avec une signification de 90 %. Ce travail fait donc apparaître l'influence de la source d'azote et de facteurs de croissance contenus dans le *corn-steep liquor*. L'enrichissement par ce dernier permet non seulement d'éviter l'utilisation d'autres substrats plus coûteux mais aussi de lutter contre la pollution par ces déchets agro-alimentaires.

Références bibliographiques

- Abdel Fateh A. F., Saleh S.A., (1979) Production and isolation of milk clotting enzyme from *Aspergillus versicolor*. *Zentralbl Bakteriol (Naturwiss)*, 134(6), p. 547-550. [https://doi.org/10.1016/s0323-6056\(79\)80079-8](https://doi.org/10.1016/s0323-6056(79)80079-8)
- Alais C., (1981) La valorisation du lactosérum, les bases et les problèmes. *Technique laitière*, 952, p. 7-10.
- Ait Kaki El-Hadef El-Okki A., Gagaoua M., Bennamoun L., Djekrif S., Hafid K., El-Hadef El-Okki M., Meraihi Z., (2017) Statistical Optimization of Thermostable α -Amylase Production by a Newly Isolated *Rhizopus oryzae* Strain FSIS4 Using Decommissioned Dates. *Waste and Biomass Valorisation*, 8(6). <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9727-6>
- Anson M.L., (1938) Estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, 22(1), p. 79-89. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
- Belmessikh, A., Boukhalfa, H., Mechakra-Maza, A., Gheribi-Aoulmi, Z., Amrane, A., (2013) Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers* 44(3), p. 377-385. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.12.011>
- 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. *Journal of Food Engineering*, 64(2), p. 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.10.007>
- Bennamoun L., Hiligsmann S., Dakhmouche S., Ait-Kaki A., Labbani F-Z K., Nouadri T., Meraihi Z., Turchetti B., Buzzini P., Thonart P., (2016) Production and Properties of a Thermostable, pH-Stable Exo-Polygalacturonase Using *Aureobasidium pullulans* Isolated from Saharan Soil of Algeria Grown on Tomato Pomace. *Foods* 5(4), p. 72; <https://doi.org/10.3390/foods5040072>
- Danson M., Hough D., (1998) Les enzymes de l'extrême. *Biofutur*, 179, p.43-46. [https://doi.org/10.1016/S0294-3506\(98\)80014-8](https://doi.org/10.1016/S0294-3506(98)80014-8)
- 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* ATCC16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*, 73(2), p. 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.021>
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton P.A. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances (1956). *Anal. Chem.*, 28(3): 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Fadel J. G., (1999) Quantitative analyses of selected plant by-product feedstuffs, a global perspective. *Animal Feed Science and Technology*, 79(4), p. 255-268. [https://doi.org/10.1016/s0377-8401\(99\)00031-0](https://doi.org/10.1016/s0377-8401(99)00031-0)
- Folin O., Ciocalteu V., (1927) On tyrosine and tryptophane determination in protein. *Journal of biochemistry*, 73(2), p. 627-650.
- Francis F., Sabu A., Madhavan Nampoothiri K., Ramachandran S., Ghosh S., Szakacs G., Pandey A., (2003) Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 15(2), p. 107-115. [https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(02\)00192-4](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(02)00192-4)
- Fushimi N., Ewe Ee C., Nakajima T., Ichishima E., (1999) Aspincin, a family of Metalloendopeptidases with a New Zinc-binding Motif. *Journal of biological chemistry*, 274(34), p. 24195-24201. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.24195>
- Gao Y., Yuan, Y.J., (2011) Comprehensive Quality Evaluation of Corn Steep Liquor in 2-Keto-L-gulononic Acid Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), p. 9845-9853. <https://doi.org/10.1021/jf201792u>
- García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragan L.A., (2009) Avantages of proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry*, 112(3), p. 604-608. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.016>
- Gasmi M., Kitouni M., (2016) Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology. *Annals of Microbiology*, 67(2), p. 175-183. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1249-8>
- Gupta R., Beg Q., Khan S., Chauhan B., (2002) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(4), p. 381-395. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1142-1>
- Hang Y.D., Woodams E.E., (1977) Baked-bean waste: a potential substrate for producing fungal amylases. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(6), p. 1293-1294. <http://aem.asm.org/content/33/6/1293>
- Hepner L., Male C., (1983) *Industrial enzymes. Present Status and Opportunities* In Lafferty R.M. (eds) Enzyme Technology. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69148-5_2
- Hull S.R., Yang B.Y., Venzke D., Kulhavy K., Montgomery R., (1996) Composition of Corn Steep Water during Steeping. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), p. 1857-1863. <https://doi.org/10.1021/jf950353v>
- Ire F. S., Okolo B. N., Moneke A. N., Odibo F. J., (2011) Influence of cultivation conditions on the production of a protease from *Aspergillus carbonarius* using submerged fermentation. *African Journal of Food Science*, 5(6), p.353-365. <http://www.academicjournals.org/journal/AJFS/article-full-text-pdf/24B29C63624>
- Kassim, E. A., (1983) Effect of physiological conditions on α -amylase and glucoamylase formation by a selected strain of *Aspergillus oryzae*. *Mikrobiologia*, 52, p. 422-427.
- Kumar D., Savitri, Thakur N., Verma R., Bhalla T.C., (2008) Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Research Journal of Microbiology*, 3(12), p. 661-672. <https://doi.org/10.3923/jm.2008.661.672>
- Larpent-Gourgaud M., Sanglier J.J., (1992) *Biotechnologies. Principes et méthodes*. Doin, 667 p.

- Lecoq R., (1965). *Manuel d'analyses alimentaires d'expertises usuelles*. Doin, 938 p.
- Lenoir J., Auberger B., (1977) Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. II- Caractérisation d'une protéase neutre. *Le Lait*, 57(568), p. 471-491. <https://doi.org/10.1051/lait:197756819>
- Lenoir J., Glenza A., Bergere J.L., Cerf O., Choisy C., Desmazeaud M., Hermier J., Auberger B., Michèle Schmidt., (1973) Les facteurs de production du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. *Le Lait*, 53(525-526), p. 246-279. <https://doi.org/10.1051/lait:1973525-52612>
- Mahmoud A.U., Greenman J., Scragg A. H., (1998) Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(2) p. 130-137. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(97\)00150-6](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(97)00150-6)
- Mkaouer S., Kechaou N. (2013) Valorisation des écarts de triage de dattes par séchage pour l'obtention d'une poudre pour alimentation animale. *Déchets sciences et techniques*, 63, p. 26-30. <https://doi.org/10.4267/dechets-sciences-techniques.2651>
- Mechakra A., Auberger B., Remeuf F., Lenoir J., (1999) Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sciences des Aliments*, 19(6), p. 663-675.
- Nishio N., Nagai S., (1981) Single cell protein from mandarin orange peel. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 11(3), p. 156-160. <https://doi.org/10.1007/bf00511254>
- Noel G., Combellas J., (1999) Liveweight gain of growing cattle offered maize meal or citrus pulp as supplements to diets based on poultry litter and restricted grazing of low quality pastures. *Livestock Research for Rural Development*, 11(1). <http://www.fao.org/ag/aga/agaP/Frg/FEEDback/lrrd/lrrd11/1/nou111.htm>
- Oussadi M., Kitouni M., (2015) Statistical optimization of cultural conditions of an halophilic α -amylase production by halophilic *Streptomyces* sp. grown on orange waste powder. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), p.685-693. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.011>
- Plackett, R.L., Burman, J.P., (1946) The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), p. 305-325. <https://doi.org/10.1093/biomet/33.4.305>
- Sathishkumar R., Ananthan G., Arun J., (2015) Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2), p. 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.12.003>
- Sauvant D., (1984) *Les pulpes de citrus*. ITEB, centre d'information sur les sous-produits.
- Sienkiewicz T., Riedel C.L., (1990) *Whey and Whey Utilization: Possibilities for Utilization in Agriculture and Foodstuffs Production*, Verlag Th. Mann, Gelsenkirchenbuer, Germany.
- Silveira M., Wisbeck E., Hoch I., Jonas R., (2001) Production of **glucose-fructose oxidoreductase** and **ethanol** by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(4), p. 442-445. <https://doi.org/10.1007/s002530000569>
- Sonawat H. M., Agrawal A., Dutta S.M., (1981) Production of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. *Folia Microbiologica*, 26(5), p. 370-376. <https://doi.org/10.1007/bf02927329>
- Souci, F. K., (1994) *La composition des aliments*. 5^e édition. Medpharm Scientific Publishers, CRC Press, p. 872-873.
- Srinubabu G., Lokeswari N., Jayaraju K., (2007) Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. *E-Journal of Chemistry*, 4(2), p. 208-215. <https://doi.org/10.1155/2007/915432>
- Tomonago G., (1966) Preferential synthesis of extracellular protease by *Aspergillus niger* in sulfur deficiency. *Journal of Applied Microbiology*, 12(3), p. 267-276. <https://doi.org/10.2323/jgam.12.267>
- Tsujita Y., Endo A., (1978) Purification and characterization of the two molecular forms of membrane acid protease from *Aspergillus oryzae*. *The FEBS Journal*, 84(2), p. 347-353. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12174.x>
- Vayalil P.K. (2012) Date fruits (*Phoenix dactylifera* Linn): an emerging medicinal food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(3), p. 249-271. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499824>
- Xiao X., Hou Y., Liu Y., Liu Y., Zhao H., Dong L., Du J., Wang Y., Bai G., Luo G., (2013) Classification and analysis of corn steep liquor by UPLC/Q-TOF MS and HPLC. *Talanta*, 107, p. 344-348. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.044>
- Yang J.K., Shih I.L., Tzeng Y.M., Wang S.L. (2000) Production and purification of protease from *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzymes and Microbial Technology*, 26(5-6) p. 406-413. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(99\)00164-7](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(99)00164-7)
- Zouari N., Ali S.B.S., Jaoua S. (2002) Production of delta-endotoxins by *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various insecticidal activities towards lepidoptera and diptera in gruel and fish meal media. *Enzymes and Microbial Technology*, 31(4), p. 411-418. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00096-0)