

**République Algérienne Démocratique et populaire**  
**Ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche scientifique**  
**Université d'Abderrahmane MIRA – Bejaia**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**  
**Spécialité Biotechnologie Microbienne**



Réf : .....

Mémoire de fin de cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

**Thème**

**Valorisation des sous-produits résultants de la SPA Agrana  
fruit**

Présenté par :  
**Balit Sarah & Harzine Sylia Halima**

Soutenu le : 30/09/2021

Devant le jury composé de :

Mme Faradji/Hamma Samia	MCA	Présidente
M. KECHA Mouloud	Professeur	Promoteur
Mme Marzouk Hafida	MCB	Co-encadrante
M. Nouri Hamid	MCB	Examineur

Année universitaire : 2020/2021

# Remerciements

*Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant, le miséricordieux et l'unique, pour nous avoir bien guidé, protégé, nous donner la patience et la persévérance de mener à bien ce travail.*

*Avec un grand respect on transmet notre vive reconnaissance à notre encadreur le professeur Kecha M. directeur de laboratoire de recherche pour nous avoir accueilli au sein de son laboratoire et accepté de superviser ce travail mais également pour la confiance qu'il nous a témoigné et la liberté qu'il nous a accordé tant dans le choix du sujet que dans la prise d'initiatives. Qu'il reçoive l'expression de notre vive gratitude.*

*On souhaite remercier également M<sup>me</sup> Marzouk H. pour nous avoir assistées et guidées. On ne saurait la remercier assez pour son soutien et son suivi scientifique.*

*Soyons aussi reconnaissants aux efforts de monsieur Remdani N. qui n'a pas hésité de nous donner de son temps et de son énergie, merci infiniment.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aussi à Dr : Nouri pour le temps qu'il a consacré pour lire et juger avec bienveillances ce travail en tant qu'examineurs, nous en sommes très honoré.*

*On remercie également Dr : Faradji/ Hamma Samia qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.*

*Un grand merci pour notre chef de département Mr Djoudi F. son adjoint Mr Bettache, pour leur aide précieuse.*

*Nous remercions Samir, Narimane et Zahra pour leurs disponibilités au laboratoire ainsi pour l'aide matériel et scientifique qu'ils nous ont procuré. Nous tenons également à remercier tout le personnel d'AGRANA FRUITS, la responsable de la qualité la responsable HSE Benbatouche et madame SAIGHI Souhila et Les techniciens du laboratoire.*

*On exprime toute notre sympathie aux ingénieurs de laboratoire LMA ainsi qu'à ceux de microbiologie alimentaire pour leur précieux aide.*

*Nos remerciements vont plus particulièrement à nos familles qui ont su nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tout au long des années.*

*On finit par remercier toute personne que je n'ai pas cité, ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, Qu'Allah le généreux vous accorde son aide dans tous vos projets et toute votre vie.*

# *Dédicaces*

*Au nom d'Allah le clément, paix et salut sur son prophète Muhamed je dédie ce travail*

*Au meilleur papa du monde, mon héros, l'homme qui s'est sacrifié pour me voir réussir dans ma vie, et pour me rendre heureuse, celui qui m'a donné une éducation digne de confiance et qui a attendu son fruit avec patience que Dieu le garde pour moi.*

*À mon paradis sur terre « ma mère », qui m'a guidé vers le bon chemin, et qui a fait le possible du monde pour me voir réaliser mes rêves.*

*À mes petits frères : Malek, Fouaz, Rayane auxquels je souhaite beaucoup de réussite.*

*À tous mes professeurs qui m'ont enseigné particulièrement M<sup>r</sup> Nabti, M<sup>r</sup> Bettache et M<sup>me</sup> Yahyaoui, et à tous ceux qui nous sont chers.*

*À mes chères copines : Nissa, Houda, Nesrine, chahinez, Tina, Siham, Je suis très heureuse et fière des moments que j'ai passée avec vous et ceux encore à venir.*

*À toutes personnes de ma grande famille et un spécial dédie à ma tante Dalila et Moghniya, à ma cousine Latifa qui m'ont toujours conseillé et encouragé à faire le mieux.*



# *Dédicaces*

**À mes très chers parents « Omar et Sabah »**

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

**À mon cher époux « Fatah » et mes prunelles « Yani et Ania »**

**À mes très chères frères *Lyès et Yacine***

**À ma très chère sœur « Lamia » et sa petite famille**

**À ma très chère belle famille**

*« ... Et dis : Ô mon seigneur, accroît mes connaissances ! »*

**[Ta-Ha : 114]**

<b>Remerciement</b>	
<b>Dédicace</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des figures</b>	

## **Sommaire**

<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>
--------------------------	-----------

### **Partie I : Revue bibliographique**

<b>I. Les fruits et les sous- produits de l'industrie agro-alimentaire.....</b>	<b>3</b>
I. Produit et sous-produits de l'industrie agroalimentaire.....	3
I.2. Transformation de fruits .....	3
I.3. Produit fini de transformation de fruit.....	4
I.3.1. Préparation fruitée.....	4
I.3.2. Purée de fruit.....	4
II. Présentation des sous-produits majeurs utilisés .....	4
II.2. La composition chimique.....	5
III.3. Traitement des sous-produits par séchage. ....	5
<b>III. Valorisation des sous-produits issues de l'industrie de transformation de fruits.....</b>	<b>6</b>
III.1. Le cadre réglementaire lié à l'utilisation de sous- produits de fruits .....	6
III.2 Définition d'un procédé de valorisation des sous-produits. ....	8
III.3 Importance de la valorisation des sous-produits. ....	8
III.4 Directions de valorisation de résidus de fruits .....	9
III. Divers procédés de fermentation en vue de valoriser les sous-produits.....	12
III.1. Fermentation en milieu solide FMS.....	12
III.2 Fermentation en milieu liquide FML.....	12
III. Enzymes industriels obtenus par fermentation .....	14
III.3.1 Cellulases.....	14
III.3.2 Pectinases.....	15
III.4. Importance industrielle des enzymes et leurs potentielles applications.....	16

## Partie II : Partie expérimentale

### II. Matériel et méthodes

II.1. Présentation de l'organisme d'accueil.....	18
II.2. <b>Matériel biologique utilisé</b> .....	19
• Aspergillus niger .....	19
II.2.1. Vérification de la pureté.....	19
II.3. Traitement des résidus par séchage.....	19
II.3.1. Les analyses physicochimiques et microbiologiques des sous-produits avant et après séchage .....	20
II.3.2. Échantillonnage des résidus .....	20
II.3.3. Analyses physicochimiques des résidus.....	20
II.3.4. Analyses microbiologiques des résidus.....	20
II.4. Propriétés biochimique des résidus d'orange et de pomme.....	21
II.4.1. Taux d'humidité.....	21
II.4.2. Taux de matière sèche (MS).....	21
II.4.3. Taux de cendres totales.....	21
II.4.4. Potentiel d'hydrogène.....	22
II.4.5. Teneur en sucres totaux.....	22
II.4.6. Détermination de la teneur en sucres réducteurs .....	22
II.4.7. Dosage de l'azote total et de la teneur en protéines.....	23
II.4.8. Détermination de l'acidité titrable.....	23
II.4.9. Dosage de polyphénols et flavonoïdes.....	24
II.5. Test qualitatif .....	24
II.5.1 Test d'activité cellulolytique .....	25
II.5.2. Test d'activité pectinolytique .....	25
II.6. Test quantitatif .....	25
II.7. Mesure des activités cellulolytique et pectinolytique des extraits bruts de fermentation.....	26
• Test d'activité cellulasique (CMCase et FPase) .....	26
• Test d'activité pectinolytique .....	28
II.8. Mise en œuvre des fermentations solides et liquides avec les coproduits de pomme et d'orange.....	28
II.8.1. Production d'enzymes cellulolytique et pectinolytique par FMS.....	28

II.8.2. Production d'enzymes cellulolytique et pectinolytique par SmF.....	29
II.9. Suivi des paramètres de la fermentation.....	29
II.9.1. Évolution du PH.....	29
II.9.2. Évolution des protéines totales.....	29
II.9.3. Dosage des activités enzymatiques.....	29
• Dosage de l'activité papier filtre .....	29
• Dosage de l'activité carboxyméthyl cellulase (CMCase) .....	29
• Dosage de l'activité pectinase.....	29
II.10. Analyses du substrat fermenté.....	29

### **Partie III : Résultats et discussions**

III.1. Procédés de fabrication d'une purée à base d'orange et de pomme.....	30
III.2. L'effet du séchage.....	31
III.3. Les résultats d'analyse physicochimique sur résidus frais et secs.....	31
III.4. Résultats des analyses microbiologiques des sous-produits frais et secs.....	32
III.5. Résultats des propriétés biochimiques des résidus d'orange et de pomme.....	33
III. 6. Vérification de la pureté.....	39
III.7. Activité enzymatique.....	40
III.7. 1. Test qualitatif de l'activité cellulasique.....	40
III.7.2. Test qualitatif de l'activité pectinase.....	40
III.7.3. Test quantitatif.....	41
III.8. Suivi des paramètres de la fermentation.....	43
III.8.1. Évolution de PH.....	43
III.8.2. Évolution des protéines totales.....	44
III.8.3. Évolution des activités enzymatiques des extraits brutes.....	44
III.9. Caractérisation physicochimique du substrat fermenté.....	47
III.9.1. Dosage des protéines .....	47
III.9.2. Dosage des sucres réducteurs .....	48
III.9.3. Dosage des polyphénols .....	49
Conclusion et Perspectives.....	51

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

### **Résumé**



# Listes des abréviations

**AP** : appel pomace ou marc de pomme

**BGL** :  $\beta$ - glucosidases

**CBH** : les cellobiohydrolases

**CMC** : carboxyméthyl cellulose

**DNSA** : l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique

**EC** : enzyme commission

**ECS** : l'extraction conventionnelles par solvant

**EGL** : les Endo (1-4) beta-D glucanases

**F-C** : folin-Ciocalteu

**FML** : fermentation liquide

**FPase** : filter paper activity

**IC** : indice cellulolytique

**N** : Normalité

**NaCO<sub>3</sub>** : carbonate de sodium

**Pase** : pectinase

**PDA** : potato dextrose agar

**PE** : pectines estérases

**PG** : les polygalacturonases

**PL** : pectines lyases

**PO** : poudre d'orange

**SmF** : fermentation submergée

**SSF** : fermentation en milieu solide

**UI** : unité internationale

**VRBG** : la gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre

**VRBL** : cristal Violet neutral Red Bile Lactose

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure N° 1	Évolution de la production algérienne de fruit année 2000-2017 (Ministre de l'agriculture).	3
Figure N° 2	Schéma illustrant la production de déchets et de sous-produits (résidus).	8
Figure N° 3	Mode d'action des différentes composantes du complexe cellulases	13
Figure N° 4	Illustration schématique représentant les sites de clivage dans les différents types d'enzyme pectinolytique.	14
Figure N° 5	Schéma représentant les étapes de dosage de l'activité FPase selon la méthode de Miller 1959.	27
Figure N° 6	diagramme représentant le procédé de transformation purée pomme et orange.	30
Figure N° 7	Teneur en sucres réducteurs et totaux des deux poudres	36
Figure N° 8	Teneurs en azotes total et en protéines des deux poudres	37
Figure N° 9	Les différentes observations effectuées sur <i>A niger</i>	38
Figure N° 10	photographie révélatrice de l'activité CMCCase sur gélose sélective	40
Figure N° 11	Photographie révélatrice de l'activité pectinase d' <i>Aspergillus niger</i> sur gélose sélective après coloration.	40
Figure N° 12	Photographie représentant la culture liquide d' <i>A niger</i> afin de mettre en évidence de l'activité pectinase (A) et CMCCase (B)	42
Figure N° 13	Suivie d'évolution du PH des milieux de fermentation	43
Figure N° 14	Évolution de la teneur en protéines au cours des SmF	44
Figure N° 15	Représentation graphique du suivie de production des CMCCase et FPase en fonction du temps sur les deux milieux.	45
Figure N° 16	Représentation graphique de l'activité pectinase en fonction du temps	45
Figure N° 17	Histogramme montrant les pourcentages de protéines des marcs de pomme et écorces d'orange avant et après 6 jours de la culture FMS	48
Figure N° 18	Histogramme montrant les pourcentages des sucres réducteurs des marcs de pomme et écorces d'orange avant et après 6 jours de culture FMS	49
Figure N° 19	Histogramme montrant les concentrations des polyphénols des marcs de pomme et d'écorces d'orange avant et après culture	50

Figure N°20	Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs pour le dosage de la contenance des poudres en ces derniers.	/
Figure N°21	Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs pour le dosage de l'activité pectinase.	/
Figure N°22	Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs pour le dosage de l'activité CMC <sub>Case</sub> .	/
Figure N°23	Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs pour le dosage de l'activité FPase	/
Figure N°24	Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux	/
Figure N°25	Courbe d'étalonnage des flavonoïdes	/
Figure N°26	Courbe d'étalonnage des sucres totaux	/
Figure N°27	Photographie représentant les trois étapes du dosage de l'azote total	/

### Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau I</b>	Composition physicochimique de résidus de pomme et orange.	6
<b>Tableau II</b>	Composition chimique moyenne agros ensilages comparés des aliments pour les animaux.	10
<b>Tableau III</b>	Sommaire récapitulatif le potentiel productif d'enzymes par les fongis sur le rebut d'orange et de Pomme.	17
<b>Tableau IV</b>	Représentant l'effet du séchage sur quelques propriétés physicochimique du résidu.	31
<b>Tableau V</b>	les résultats des analyses microbiologiques effectués sur le marc de pomme	32
<b>Tableau VI</b>	les analyses microbiologiques sur les résidus d'orange	33
<b>Tableau VII</b>	Propriétés biochimiques des deux poudres	34

L'intérêt mondial croissant porté à la préservation de l'environnement des déchets solides induits par les différentes activités et transformations humaines, a suscité l'attention des industriels à trouver des moyens techniques pour réduire sinon recycler ces déchets.

Les écorces d'orange et le marc de pomme représentent les principaux sous-produits de l'industrie des jus de pomme et d'orange, leur richesse en fibres insolubles principalement la pectine qui est le majeur gélifique d'origine végétale, extraite à l'échelle industrielle du marc de pommes et d'écorces de citrus (Sid-Ahmed et al, 2007 ; Shalini et Gupta, 2010). Ces rebuts sont aussi riches en cellulose considérée comme étant le polymère le plus représentatif renouvelable sur terre (Karmakar et Ray, 2011). En plus de ces fibres insolubles ces résidus sont riches en protéines, sucres, et éléments minéraux, ce qui leur confèrent la caractéristique d'être hautement fermentescible. Ces dernières années, il ya eu un intérêt croissant pour le développement de nouvelles méthodes afin de tirer avantage des éléments présent dans ces résidus, ils peuvent servir de base pour la production d'éléments bioactifs, d'acides organiques, d'huiles essentiels et de produits pharmaceutiques, cependant la production d'enzymes est en tête de cette valorisation (Gouveia et Passarinho, 2017).

Les enzymes constituent un outil de fabrication et d'analyse irremplaçable dans de nombreux secteurs de la recherche, elles sont purifiées à partir de diverses matières biologiques premières, dont les micro-organismes présentent une source très avantageuse. Actuellement, deux organismes sont principalement utilisés *Bacillus* et *Aspergillus* ainsi, connus pour leur grande capacité de production d'enzymes de type polysaccharidases dégradant la biomasse végétale, et dans la perspective de sa purification et son utilisation industrielle (Boumendjel et al.,2009). La FMS et la SmF présentent une des meilleures façons qui est destinée à recycler la biomasse végétale pour la production d'enzymes industrielles principalement des cellulases et pectinases qui ont une importance exclusive dans l'industrie. Selon une étude récente, le marché des enzymes industrielles devrait croître à un taux de croissance annuel composé de 6,8 % pendant la période 2019\_2024. Les principales forces motrices de l'augmentation de la part de marché des enzymes microbiennes sont la diversité croissante des applications des enzymes et la sensibilisation croissante contre l'utilisation de produits chimiques. (Anand et al., 2020)

Notre travail effectué, dans le cadre de mémoire de fin de cycle, au niveau de l'entreprise SPA « AGRANA FRUIT » et au laboratoire LMA de l'université de Bejaïa a pour objectif de valoriser les sous-produits d'orange et de pomme.

Les différentes tâches réalisées au cours de ce travail sont :

- L'étude la stabilité physico-chimique et microbiologique de la purée de pomme et d'orange.
- L'étude de la composition biochimique des deux sous-produits ;
- Mise en évidence de l'activité cellulolytique et pectinolytique sur les deux rebuts ;
- Mise en œuvre de la production d'enzymes par FMS et SmF.

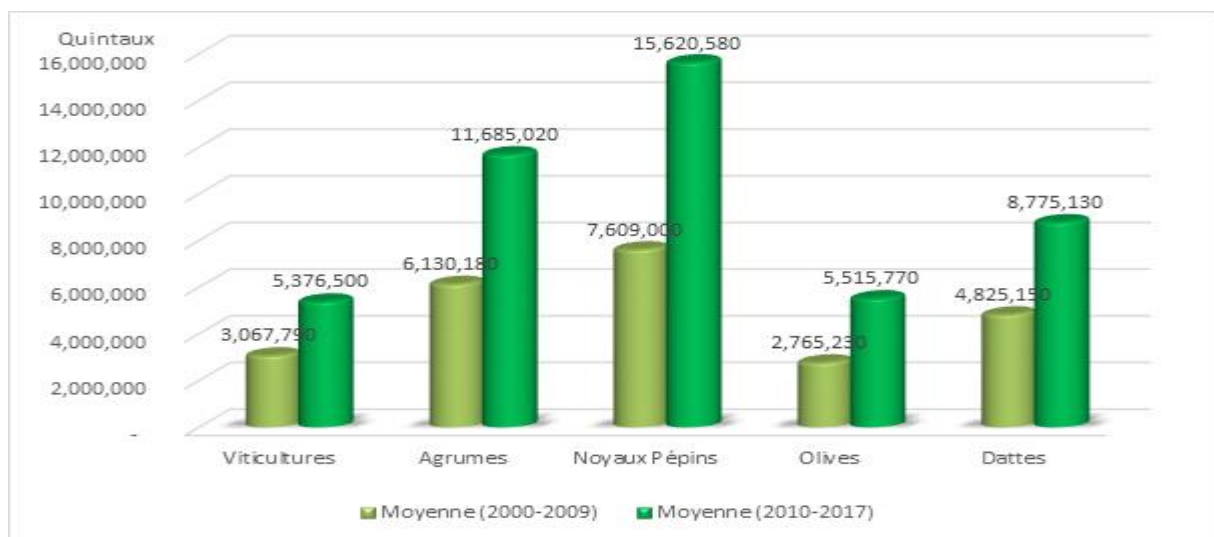
## 1. Les fruits et les sous-produits de l'industrie Agroalimentaire

La production mondiale en pomme a atteint le seuil de 85 000 000 tonnes, et ce, durant l'année 2018 (Ertunç ,2019). L'Algérie, comme d'autres pays producteurs de la pomme, a enregistré une augmentation sensible en termes de quantités produites. D'ailleurs, rien que pour l'année 2020 sa récolte a avoisiné les 5 million de quintaux de pommes. (DSA.2020)

À noter que la wilaya de kenchela s'est hissée "au rang de pôle d'excellence" en matière de production de pommes, notamment au niveau des communes : Bouhmama, Lemsara, Chelia, Yabous, Taouzianet, El Rmila et Khirana, (DSA ; 2020)

En ce qui concerne la production mondiale des agrumes dans le monde celle-ci ne cesse de s'accroître d'une année à l'autre. En effet, les agrumes (orange, mandarine, citron) sont parmi les fruits les plus abondants dans le monde, la production mondiale en agrume est considérée comme l'une des plus importantes dans le domaine agricole (Torquato et *al.*, 2017).

L'introduction de l'oranger en Algérie est ancienne, avec une production annuelle qui s'élève à plus d'un million de quintaux pendant la saison 2016/2017, l'Algérie se trouve ainsi placée au dixième rang mondial et compte parmi les grands producteurs du bassin méditerranéen.



**Figure N° 1** : Évolution de la production algérienne de fruit année 2000-2017 (Ministre de l'agriculture).

Pour mieux éclairer la réalité de l'industrie de transformation des oranges, on a pris l'exemple du groupe autrichien AGRANA Fruit, leader mondial de concentrés de jus et de préparations à base de fruits pour les industriels de jus, de yaourts, de glaces et de pâtisseries Présent sur cinq continents avec 42 usines, notamment au Maroc, en Égypte et en Afrique du Sud, il a développé en Algérie la seule unité de préparation à base de fruits existant à ce jour.

Depuis 2018, tous les agrumes et les pommes utilisés sont algériens. En trois ans, la société est passée de 2000 à 10 000 t de solutions alimentaires produites. Elle compte pour 55% de ce marché en Algérie.

Les chiffres d'AGRANA Fruit indiquent que, sur l'ensemble de la matière première achetée, la transformation de fruit génère environ mille tonnes de déchets qui sont évacués comme déchets ménagers assimilés. En effet, les déchets de la fabrication du jus constituent 55% du poids des fruits traités.

Devant un tel gaspillage, il faut réduire grandement leur quantité de déchet et surtout valorisation des sous-produits.

## **I.2. Transformation de fruits**

### **I.2.1 Produit alimentaire transformé**

On entend par un produit alimentaire transformé tout produit résultant de la mise en œuvre de procédés : physiques, chimiques ou biologiques, ou de combinaisons de ces procédés, à partir d'un « produit alimentaire primaire », qui est destiné à la vente directe au consommateur, à l'utilisation directe comme ingrédient dans la fabrication d'aliments, ou à une seconde transformation (codex alimentaire, 2021).

#### **I.2.2 Préparation fruitée**

La préparation de fruit est le produit non fermenté mais fermentescible obtenu par des procédés appropriés, par exemple en passant au tamis ou en broyant la partie comestible du fruit entier ou pelé sans en prélever le jus (CODEX STAN 296-2009)

Sources d'éléments nutritifs et aromatiques, elles confèrent au produit fini une grande partie de ses qualités organoleptiques.

- **Purée de fruit**

C'est La partie comestible du fruit entier, le cas échéant moins la pelure, la peau, les graines, les pépins et autres particules similaires, qui a été réduite en purée par tamisage (CODEX STAN 296 -2009).

## **II.1 Présentation des sous-produits agricoles majeur d'AGRANA**

**II.1.1. Le marc de pomme** : est le résidu issu de l'extraction du jus contenant la peau, les pépins et les parties solides restantes qui représentent environ 25 à 35 % du poids de la pomme fraîche transformée (Joshi e *tal.*, 1996).

### II.1.2. Écorce d'orange

Selon (Wilkins et *al.*, 2007) 50 à 60 % des agrumes transformés deviennent des déchets, ou écorce d'agrumes qui sont composés de la peau, des graines et des résidus membranaires résultants de l'extraction du jus.

### II.2. La composition chimique

Le marc de pomme est une source riche en pectine et d'autres nutriments : les glucides, les fibres alimentaires, minéraux et vitamine C (Joshi et *al.*, 2011)

La caractérisation physico-chimique du marc de pomme et résidus d'orange est illustrée dans le tableau I.

**Tableau I** : Composition physicochimique de résidus de pomme et orange

Paramètre	Pomme(a)	Orange(b)
Taux d'humidité (%)	71.28	79.02 <sup>b</sup>
Taux de MS (%)	28.7	20.98 <sup>b</sup>
Taux de cendre M/MS (%)	0.5-6.1	3.5% <sup>c</sup>
pH	3.43	3.42 <sup>b</sup>
Corps solides totaux (g/kg)	257	
Cellulose (M/MS)	7.2	9.21 <sup>c</sup>
Pectine (%M/MS)	3.5-14.32	
Taux de sucres totaux (g/kg)	127.9	460 <sup>b</sup>
Taux de sucres réducteurs (% M/M)	10.8-15	- <sup>c</sup>
Glucose	22.6	
Fructose	23.7	
Fibres (%)	1.8	
	4.7-51.1	42.12 <sup>b</sup>
Protéines (%)	3.9-5.7	6.5 <sup>b</sup>
Azote totale (g/kg)	6.8	15.6 <sup>b</sup>

(a) (Dhillon et *al.*, 2012) (b) (Kammoun et *al.*, 2010), (c) (Rivas et *al.*, 2008),

### II.3. Traitement des sous-produits (séchage)

Les résidus de fruits constituent un produit éminemment instable qui doit être traité rapidement (Grigoraş, 2012).



Le séchage du marc est un processus essentiel afin d'éliminer l'excès d'eau qui peut causer la salissure en plus des problèmes écologiques avant son utilisation. Habituellement, le marc de pomme frais contient une teneur en eau et une activité de l'eau élevées, environ 70 % et 0,84 respectivement. Ces conditions sont idéales pour la croissance de micro-organismes, en particulier de champignons, qui peuvent entraîner la détérioration et la production de toxines. De plus, le séchage facilite un stockage approprié car il occupe moins d'espace et de matériaux de stockage sont nécessaires pour stocker le marc séché par rapport au marc frais (Jung et *al.*, 2015).

Pour ce faire, de nombreuses techniques de séchage sont employées. Il y a d'abord, le séchage au soleil traditionnel, qui demeure le plus efficace, compte tenu du potentiel extraordinaire dont dispose l'Algérie en cette énergie. Ensuite, il existe des techniques sophistiquées telles que les séchoirs solaires, les fours conventionnels et les séchoirs à micro-ondes.

Quelle que soit la méthode de séchage utilisée, il est primordial de veiller sur la qualité des composés bioactifs résultants, l'énergie et le coût ainsi que le temps. Il est nécessaire d'étudier correctement et d'optimiser les différentes conditions de séchage qui peuvent conduire à des extraits à haute fonctionnalité.

Les travaux de Gonelimali et *al.* (2021) sur l'impact de la température (60 à 80 °C) et la durée de séchage du marc de pomme, le taux d'humidité et la capacité antioxydante ont révélé que le séchage à 60° C entraîne une activité antioxydante significativement plus élevée dans la préservation des composés phénoliques.

### **III. Valorisation des sous-produits issue de l'industrie de transformation de pomme et orange**

#### **III.1. Cadre réglementaire algérien lié à l'utilisation de sous-produits de fruits**

Puisqu'il est question de transformation de fruits au sein d'une entreprise, il s'avère utile de préciser que ce processus de transformation génère des résidus qu'il faut clairement expliciter. D'autant plus, la filière fruitière est en soi, un producteur de déchet par excellence. Ainsi, conformément à l'article 2.3.4. Loi n° 01 - 19 du 12 décembre 2001 relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets. On entend par le vocable « *déchets* » : toute substance ou tout objet dont le détenteur se défait ou dont il a l'intention ou l'obligation de se défaire. Ainsi, il y a lieu de distinguer les déchets tout court des **Biodéchets**, qui englobe les déchets biodégradables de jardin ou de parc, les déchets alimentaires ou de cuisine issus des ménages,

des restaurants, des traiteurs ou des magasins de vente au détail, ainsi que les déchets comparables provenant des usines de transformation de denrées alimentaires.

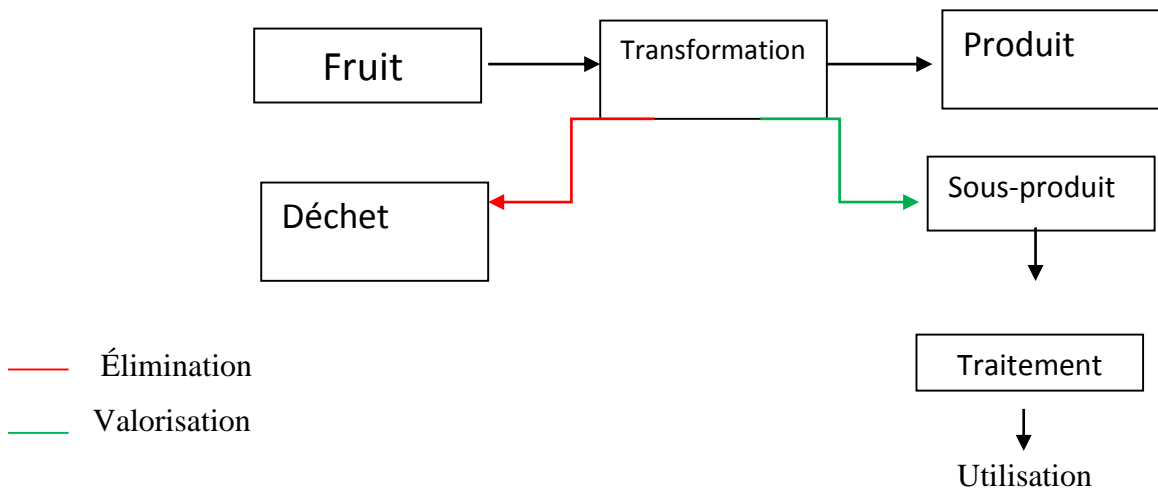
De ce qui précède, on constate que ce dernier ne fera l'objet d'aucun traitement visant sa réutilisation ou sa réhabilitation. Par ailleurs, dans le monde de la filière fruitière, on parle d'une autre forme de déchet que l'on désigne par le vocable « **sous-produit** ». Il désigne toute substance ou objet issu d'un processus de production dont le but premier n'est pas la production d'un bien. Il ne peut être considéré comme un sous-produit et non comme un déchet au sens de l'article que si les conditions suivantes sont remplies :

- L'utilisation ultérieure de la substance ou de l'objet est certaine ;
- La substance ou l'objet peut être utilisé directement sans traitement supplémentaire Autre que les pratiques industrielles courantes ;
- La substance ou l'objet est produit en faisant partie intégrante d'un processus de Production ;
- L'utilisation ultérieure est légale, c'est-à-dire que la substance ou l'objet répond à toutes les prescriptions pertinentes relatives au produit, à l'environnement et à la protection de la santé.

En d'autres termes, le déchet va subir une opération dont le résultat principal est de servir à des fins utiles en remplaçant d'autres matières qui auraient été utilisées à une fin particulière, ou que le déchet soit préparé pour être utilisé à cette fin, dans l'usine ou dans l'ensemble de l'économie.

En définitive, c'est ce processus que l'on désigne « **la valorisation du déchet** ». Il va sans dire que cette valorisation du déchet fait partie de l'ensemble désigné par « **Gestion des déchets** » : il s'agit de la collecte, le transport, la valorisation et l'élimination des déchets, y compris la surveillance de ces opérations ainsi que la surveillance des sites de décharge après leur fermeture. Ainsi, on peut situer les déchets de l'entreprise AGRANA Fruit dans la catégorie de déchets managés assimilés.

Les termes correspondant aux diverses définitions sont représentées de façon schématique dans la Figure N°2 :



**Figure N °2 :** Schéma illustrant la production de déchets et de sous-produits (Grigoraş, 2012).

### III.2 Définition d'un procédé de valorisation des sous-produits

Valoriser un objet tel qu'il soit, signifie que l'on tend, à partir d'un processus, à créer de la valeur à partir du déchet, en fabriquant un produit adapté pour l'utilisation économique et sociale. (Chandrasekaran, 2013).

Autrement dit, il s'agit d'une démarche ayant pour objet de diminuer les quantités de déchets agricoles, domestiques ou industriels à stocker, à mettre en décharge ou à éliminer d'une façon ou d'une autre (Ramade, 2008). En même temps, l'on accorde une seconde vie aux déchets (sous-produits), à travers "le réemploi, le recyclage ou toute autre action visant à obtenir, à partir de déchets, des matériaux réutilisables ou de l'énergie", selon la définition retenue par l'agence internationale de l'Environnement et de la Maîtrise de l'énergie (ADEME).

### III.3. L'importance de la valorisation des sous-produits

D'après Guillou, (2013), la valorisation des déchets permet non seulement la diminution du volume des déchets ultimes, mais surtout réduire la pollution, et parallèlement, améliorer les propriétés agronomiques des matières organiques en minimisant l'impact sur l'environnement et la santé.

En plus d'un impact fort intéressant sur la santé et l'environnement, la valorisation des sous-produits implique une dimension économique et financière. La valorisation permet d'un côté, l'attribution d'une valeur financière à un matériau usagé, et de l'autre côté, une économie de matières premières (fourrage comme complément alimentaire dans l'alimentation animale) et d'énergie (déchets des fruits et légumes destinés à la production de méthane) et même de réaliser un nouveau matériau ou produit de qualité égale ou supérieure.

### **III.4. Différentes sortes de valorisation des résidus**

On compte au moins de 100 millions de tonnes de marc de pomme rejetés au cours du processus d'extraction du jus de pomme. Hormis les résidus solides, tout le reste semble être déposé comme déchets, ce qui entraîne non seulement une énorme perte économique, mais aussi des problèmes environnementaux (Joshi *et al.*, 2006)

#### **III.4.1 dans l'alimentation animale**

À l'heure actuelle, le moyen le plus pratique pour exploiter la totalité du marc de pomme est de l'utiliser pour nourrir les animaux, (Villas-Boas *et al.*, 2003). Par rapport à l'aliment conventionnel, les avantages de l'alimentation biologique résident non seulement dans la teneur élevée en protéines, mais également les divers métabolites de micro-organismes produits durant le processus de fermentation, en particulier les enzymes interdépendants. Le marc de pomme a été utilisé comme matière première pour produire des aliments biologiques avec des enzymes enrichies (Zheng et Shetty, 2000 ; Joshi et Devender, 2006).

Dans leur étude, les chercheurs (Joshi *et al.*, 1996) ont évalué l'enrichissement de résidus de pommes en différents nutriments en vue de l'utilisation dans l'alimentation des animaux. Après une fermentation à l'état solide, avec différents champignons, des analyses effectuées sur le résidu de pommes sec montre que le taux de protéines, a été triplé ainsi que ceux des matières grasses et vitamine C. On a constaté aussi une forte augmentation en minéraux et en fibres brutes. Contre une légère baisse de sucre.

En outre, l'augmentation du poids corporel des bovins est beaucoup plus importante lorsqu'ils sont nourris avec des déchets d'orange que des aliments riches en amidon (Bampidis et Robinson, 2006). (Tripodo *et al.*, 2004) ont pu obtenir des aliments pour animaux, à partir de résidus d'agrumes. Après un traitement alcalin /enzymatique, on a montré une excellente digestibilité *in vitro* et en teneur en protéine, en comparant favorablement à celui de beaucoup d'autres déchets agro-industriels actuellement utilisés comme aliments pour animaux. Cependant, il faut noter qu'il existe une limite à la quantité de résidus d'orange qui peut être ajoutée dans l'alimentation, car à des concentrations élevées, elles peuvent provoquer une parak-ératose, en particulier lorsque le niveau de fourrage alimentaire est faible.

Dans une autre étude, (Pirmohammadi *et al.*, 2006), la valeur nutritive de résidus de pommes séchés a été comparée avec celle de maïs ensilé. 1 tonne de chaque type de résidus de pommes a été mélangée avec 100 kg de paille humide et 5 kg d'urée. Après stockage dans un tank de 30 tonnes pendant 45 jours, différents paramètres ont été suivis pour chaque mélange (Tableau 2).

**Tableau II** : Composition chimique moyenne des aliments pour les animaux (Pirmohammadi et al., 2006)

Analyse	Résidus de pommes séchés	Résidus de pommes ensilés	Mais ensilé
MS (g/kg).	749	248	229
MO (g/kg).MS	929	925	936
Fibres (g/kg.MS)	473	567	463
Lignine(g/kg.MS)	10	20	44
Protéines (g/kg.MS)	64	72	76
Azote totale (g/kg.MS)	5.6	6.5	4.4

Dans la même perspective, l'étude menée par (Ülger et al., 2018) affirme que l'ensilage de marc de pomme est considéré comme une technique prometteuse. En effet, en comparant la qualité de l'ensilage de marc de pomme ensilé avec du maïs, de la pulpe de betterave sucrière et de la pulpe de citrouille pour les compositions nutritives, les résultats suggèrent que les valeurs nutritives de l'ensilage de marc de pomme sont comparables à celles des ensilages d'autres sources végétales.

Sur un autre angle, Alarcon-Rojo et ses collaborateurs, (2018) ont démontré que l'utilisation de marc de pomme, fermenté dans l'alimentation des animaux, a diminué l'oxydation de la viande pendant le stockage, sans affecter les autres caractéristiques de qualité de la viande.

### III.4.2 la production enzymatique

Les travaux de Joshi et de ces collaborateurs (2006) ont permis d'obtenir une pectine méthyl estérase, à partir de résidus de pommes par fermentation solide, ayant une activité 2,3 fois plus importante que celle issue de la fermentation submergée. Dans l'étude (Seyis et al., 2005) sur la production de la xylanases par *Trichoderma harzianum* 1073 D3, à partir de quelques résidus de végétaux, y compris ceux d'oranges et de pommes, l'activité la plus importante a été observée pour les peaux de melons suivie par celle obtenue pour les résidus de pommes.

L'étude menée sur l'enzyme -furanosidase – a été produite sur un substrat de résidus de pomme inoculé par trois souches d'*Aspergillus*. La souche d'*Aspergillus foetidus* NRL 337 a permis à l'obtention de la -furanosidase ayant la plus forte activité enzymatique.

Par ailleurs, Singh et al., (2018) ont mis en évidence l'applicabilité du marc de pomme comme substrat majeur pour la production d'inulinase par *Muccor circinelloides* en fermentation à l'état solide (SSF). la production était maximal vers le cinquième jour avec 411,3 UI/gds.

### III.4.3 La production de biocarburant

L'éthanol est considéré comme l'une des énergies renouvelables les plus prometteuses dans le monde car il réduit considérablement la consommation de pétrole brut et les émissions de CO<sub>2</sub>.

Les travaux menés par les chercheurs (Ngadi et Correia, 1992a, 1992b ; Paganini et *al.*, 2005) ont relevé des problèmes liés à la croissance des levures productrices d'alcool et la faible teneur du marc de pomme en protéines est à l'origine de ces problèmes.

L'étude de Demiray (2020), a permis d'évaluer la production de bioéthanol en utilisant le marc de pomme enrichie avec les protéines de soja soluble comme substrat inoculé avec *S cerevisiae* et *K marxianus*. Le résultat obtenu sont 53,1 g/L d'éthanol ont été produite, en présence de 60 enzyme FPU et 80 mg de SSP. Le taux de protéines a connu une augmentation de production de 20% en présence de SSP.

### III.4.4 Perspectives écologiques

La valorisation du marc contribuerait à la préservation de l'environnement à travers :

- Production de l'acide biosuccinique (produit auparavant industriellement à partir de dérivés du pétrole qui rentre à la fabrication de détergents, tensioactifs, pigments, résines, solvants biodégradables, aliments, et produits pharmaceutiques...) à partir du marc de pomme fermenté par *Actinobacillus succinogenes*, (S. González-García et *al.*, 2018)
- L'élimination des teintures textiles avec le marc de pommes et paille de blé (T. Robinson et *al.*, 2001)
- La biorémediation et la rétention des métaux lourds (Maranon et *al.* (1992), Schiewer et *al.*, 2008)
- La production de biomatériaux (films biosourcés et des objets 3D) durables à partir du marc de pommes, vaisselle ou emballages alimentaires comestibles jetables Gustafsson et *al.*, 2019)

### III.4.5 Extraction des composées phénoliques

Le produit végétal peut être utilisé comme matière première pour l'obtention de principes actifs.

### III.4.6. Domaine alimentaire

Une valorisation des résidus de fruits pour obtenir des denrées alimentaires est possible :

- Le marc de pommes est utilisé comme ingrédient fonctionnel dans les produits alimentaires (Ackar et *al.*, 2018) : amélioration de la qualité nutritionnelle des produits

de boulangers (pain et cake) et biscuiterie (Jung et *al.*, 2015), charcuterie (yadav et *al.*, 2016)

- Incorporation des pectines, extraites de la pomme pour améliorer leurs propriétés organoleptiques (Min et *al.*, 2010, Walet *al.*, 2015. Wang et *al.*, 2015).
- Utilisation des fibres diététiques de résidus de pomme comme substitut de graisse dans l'industrie de viande, (Issar et *al.*, 2017).

D'autres utilisations sont possibles aussi, telles que la préparation de la gelée, l'extraction des huiles végétales, la production de levures boulangère, ...etc.

Toutefois, beaucoup de spécialistes émettent des réserves à propos du danger potentiel que pourrait occasionner le résidu de pesticides sur le marc de pommes.

Afin d'éviter cette situation toutes les précautions nécessaires pour garantir la sécurité des aliments doivent être fournis. Les fournisseurs sont obligés de se soumettre aux normes prescrites sur la nature et les taux de pesticides utilisés.

#### **IV. Procédés de fermentation en vue de valoriser les sous-produits :**

##### **IV.1. FMS**

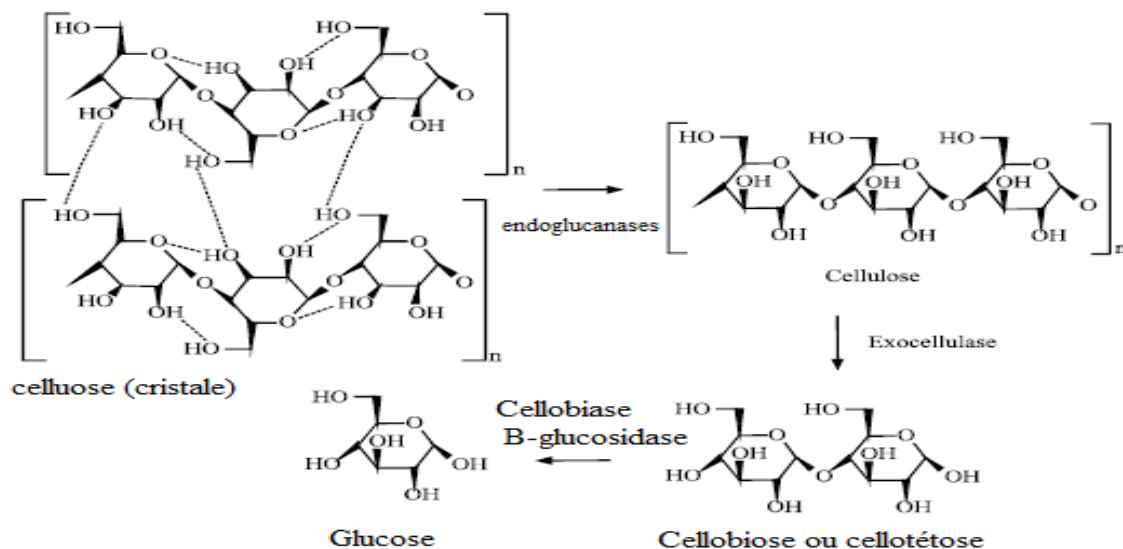
La biomasse végétale cellulosique représente le substrat le plus communément utilisé en Fermentation Milieu Solide (FMS) (Koyani et *al.*, 2015), ce type de fermentation s'avère plus approprié pour la culture d'organismes mycéliens. En effet, l'agitation nécessaire pour homogénéiser les milieux liquides (et les oxygéner pour les cultures aérobies) entraîne des contraintes de cisaillement que peu de souches mycéliennes sont capables de supporter (même si des souches fongiques ont pu être adaptées avec succès à ce type de culture). En outre, il n'y a pas de contraintes d'oxygénation en FMS (Duchiron et Copinet, 2019). En général des milieux de cultures bruts (à l'origine de déchets industriels ou autres) sont utilisés pour les différentes productions, néanmoins certaines conditions opérationnelles s'imposent dans ce type de fermentation comme par exemple une stérilisation poussée, une purification coûteuse, une haute énergie dépensée, en sus, cette technique requière l'utilisation de solvants toxiques et génère une importante quantité d'eau usée (Dhevagi et *al.*, 2021).

##### **IV.2. FML**

La FML par contre, est particulièrement bien adaptée aux cultures des micro-organismes unicellulaires, comme les bactéries et les levures (Duchiron et Copinet, 2019).

### IV.3. Enzymes industriels obtenus par fermentation

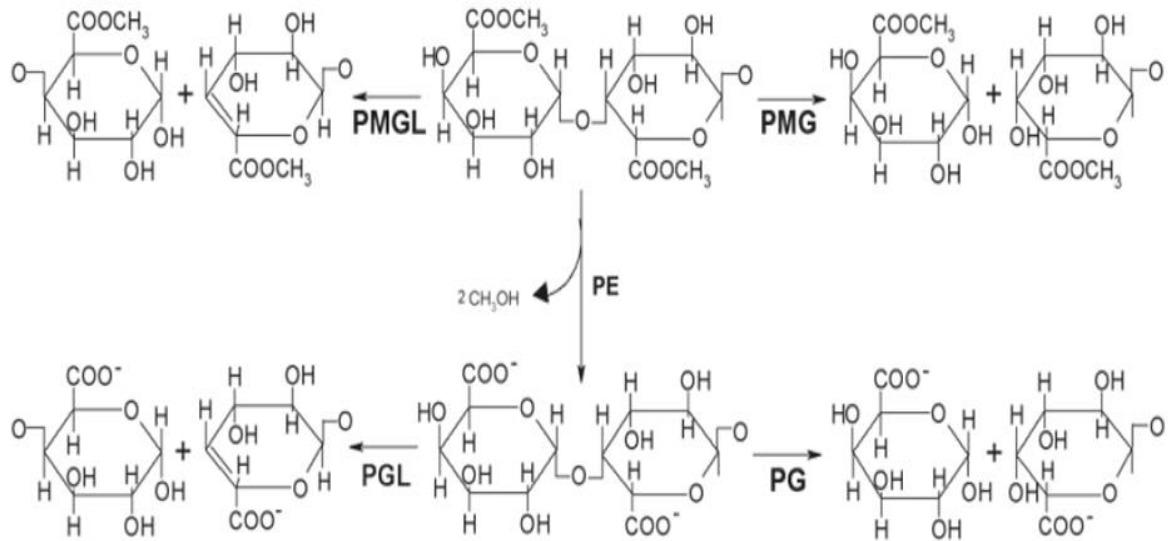
Les cellulases et les pectinases représentent une grande classe d'enzymes d'intérêt dans la biotechnologie, Elles sont souvent présentes sous forme d'un complexe dit cellulolytique, les Endo (1-4) beta-D glucanases (EGL) [E.C.3.2.1.4] interviennent en premier et attaquent les fibres de cellulose au milieu de la chaîne, les cellobiohydrolases (CBH) [E.C.3.2.1.91] attaquent les fibres de celluloses aux extrémités et libèrent des tétrasaccharides ou du cellobiose, enfin les  $\beta$ - glucosidases [E.C.3.2.1.21] (BGL) hydrolysent ce dernier en résidus glucose.



**Figure N°3** : Mode d'action des différentes composantes du complexe cellulases

Par contre les préparations pectinolytiques contiennent trois types d'enzymes en proportions différentes incluant des pectinases (PE) [EC 3.1.1.11] qui hydrolysent les liaisons entre l'acide galacturonique et les alcools, les polygalacturonases (PG) [EC 3.2.1.15] qui coupent la liaison  $\alpha$  (1-4) reliant les deux résidus d'acides galacturoniques, et les pectinases lyases [EC 4.2.2.10] qui catalysent l'hydrolyse aléatoire produisant des insaturés méthyloligogalacturonates par transélimination de glycosidiques liens (Spinnler, 2013)





PE: pectin esterase, PG: polygalacturonase, PMG: polymethylgalacturonase, PGL: polygalacturonate lyase, PMLG: polymethylgalacturonate lyase,

**Figure N°4** : illustration schématique représentant les sites de clivage dans les différents types d'enzyme pectinolytique (Combo et *al.*, 2011)

### IV.3. Importance industrielle d'enzymes fongiques et leurs applications potentielles applications

#### IV.3.1. Les cellulases

Les cellulases sont impliquées dans plusieurs industries tel que la papèterie ou la forme brute de l'enzyme est utilisée pour la bio-modification des propriétés de la fibre par contre les cellulases pures sont appliquées pour réduire la viscosité de la pâte, améliorer les propriétés d'éclat et de résistance des fibres, la capacité de blanchiment des pâtes kraft, et le désencrage des déchets de papier (Kuhad et *al.*, 2010). Dans l'industrie agroalimentaire les cellulases sont utilisées pour l'extraction et la clarification des jus de fruits et de légumes afin d'améliorer la texture et la stabilité en diminuant la viscosité (Carvalho et *al.*, 2008), Dans le secteur agricole l'application de la cellulase permet de lutter contre les maladies des plantes en dégradant la paroi cellulaire des pathogènes (Verma et *al.*, 2016 ; Yadav et *al.* 2016b), en outre l'addition des cellulases sur les résidus de culture accélère le taux de désintégration de la paille ce qui améliore la fertilité du sol (Han et He, 2010), dans l'industrie des détergents, des cellulases sont utilisées comme additif dans les détergents liquides pour le linge, elles éliminent les saletés dans les espaces interfibrillaires et maintiennent la qualité des vêtements, les textiles et lessives (Karmakar and Ray, 2011), dans l'industrie textile les cellulases sont appliquées dans les étapes

de traitement par voie humide pour obtenir des textiles à base de cellulose améliorés. Actuellement le biopolissage et le biostonage des jeans a été réalisé avec succès, en outre les cellulases acides améliore la douceur du tissu (Karmakar and Ray, 2011).

Dans l'industrie du vin et brasserie, l'utilisation de cellulases pendant le processus de maltage et de fermentation augmente considérablement la stabilité et la viscosité du vin. Dans l'industrie de l'alimentation animale, le prétraitement des céréales et de l'ensilage agricole avec des cellulases améliore la valeur alimentaire, la digestibilité des graminées et les valeurs énergétiques (Vazquez-Montoya et al., 2020). Dans l'industrie du bioéthanol *Aspergillus niger* MK543209- cultivé sur les déchets du papier produit des cellulases qui contribuent à la production des biocarburants (Darwasha et al., 2020). Dans l'industrie pharmaceutique, les cellulases agissent comme des biocatalyseurs qui pourrait aider à libérer des composés thérapeutiques, des aides digestives contenant des cellulases utilisés pour le traitement des troubles métaboliques, un prébiotique à base des fibres non digestibles dépolymérisé par les cellulases stimule la croissance des bactéries bénéfiques dans le tractus intestinal (Karmakar et Ray 2011).

### **IV.3.2. Les pectinases**

Les pectinases fongiques sont d'importantes enzymes industrielles, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. flavus*, et bien d'autres espèces du même genre et même d'autres genres de mycètes tel que *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* et *Trichoderma* ont été explorées récemment pour produire des pectinases et se sont révélées appropriées pour la production à l'échelle industrielle de cette enzyme (El-Rahim et al., 2020). Elles jouent un rôle important dans l'extraction du jus de fruit, des huiles végétales, clarification et amélioration de la chromaticité, la stabilité de l'arôme des vins rouges, et la fermentation du café, en outre, l'application dans le bio-blanchiment du papier, rouissage des fibres végétales, le bio-récureage du coton, production de bioénergie, et le traitement d'eaux usées (Kubra et al., 2018).

Dans l'industrie textile, les pectinases sont utilisées dans le processus de dégommeage des fibres végétales telles que le chanvre, le lin et le jute (Sudeep et al., 2020). Dans l'industrie papetière, les pectinases sont impliquées dans la dépolymérisation de l'acide galacturonique ce qui améliore les propriétés physiques du papier (Rebello et al., 2017), Dans les aliments pour volailles, la pectinase est utilisée comme complément enzymatique pour réduire la viscosité des aliments pour volailles (Hoondal et al., 2002). Dans l'industrie alimentaire, l'*Aspergillus sp* Produisant l'enzyme pectinase a montré sa capacité à clarifier les jus en raison d'une plus grande

stabilité de la gamme acide à alcaline (Sudeep et *al.*, 2020). Les pectinases d'*A. niger* et de *Mucor circinelloids* est utilisée pour la fermentation du café et pour éliminer les mucilagineux (grains de café) (Rosales et *al.*, 2018 ; Sudeep et *al.*, 2020).

#### **IV.4. Avantages d'enzymes obtenus par fermentation (Coutouly ,1991)**

- Un des principaux avantages réside dans une moins grande dépendance vis-à-vis des approvisionnements dont on peut facilement faire des stocks ;
- Les microorganismes représentent également un potentiel énorme de type d'activité enzymatique ;
- Les microorganismes sont susceptibles de croître dans tous les types d'environnements en particulier les plus extrêmes ;
- Un autre avantage réside dans la possibilité de modifier leur faible temps de génération afin, par exemple, d'augmenter le rendement ;
- Enfin le dernier avantage réside dans leur faible temps de génération ainsi la voie microbiologique permet d'obtenir en un temps plus court une quantité d'enzymes plus importante que celle obtenue à partir de tissus végétaux et animaux.

**Table N°III** : Sommaire récapitulatif le potentiel productif d'enzymes par les champignons sur le rebut d'orange et de Pomme.

Champignon	Substrat	Enzyme produite	Références
<i>Aspergillus JL-15</i>	PO		(Liu et al., 2012)
<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé, épluchures de Citrus d'orange	Pectinases	(Ahmad et al.,2016)
	AP		(Khan et al., 2012)
			(Joshi et al.,2011)
			(El Enshasy et al., 2018)
			(Joshi et al., 2006)
	PO		(Mrudula et Anithraj, 2011)
(Rangarajan et al.,2010)			
<i>A. niger</i> MR 103		(Ketipally et al.,2019)	
<i>Aspergillus niger</i>	AP additionné de Poudre des grains de coton	Pectinase, cellulase, protéase	(Zhong-Tao, et al., 2008)
<i>A. giganteus</i> NRRL 10	Son de blé, épluchures d'orange et de citron	Pectinase	(Ortiz et al.,2017)
<i>A. niger</i> NRRL-567	Marc de pomme induit avec lactose	Cellulase	(Dhillon et al.,2012)
<i>A. niger</i> NRRL599 <i>A. fumigatus</i> P1061, <i>A.foetidus</i> NRRL337	Marc de pomme	B-glucosidase	(Hang et Woodans, 1994)
		B-fructofuranosidase	( Hang et Woodans, 1995)
<i>A. Oryzae</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Penicillium atrovirens</i>	Résidu d'orange	Pectinases et cellulases	(Adeleke et al.,2012)
<i>Trichoderma longi</i> , <i>A. niger</i> , <i>S. cerevisiae</i>		Cellulases	(Omojasola et Jilani, 2008)

## **II. Matériel et méthodes**

Notre étude expérimentale a été menée sur deux volets différents mais complémentaires : le premier volet a été effectué au niveau de l'entreprise d'AGRANA Fruit ou on a récupéré les déchets de fruits, au niveau du second volet, dans le laboratoire LMA de l'université de Bejaïa, nous avons procédé à la détermination des propriétés physicochimiques des résidus, et aux fermentations.

### **II.1. Présentation de l'organisme d'accueil**



Notre étude expérimentale a élu domicile chez l'Entreprise portant l'appellation « AGRANA Fruit ». Il s'agit, à vrai dire, d'une société née d'un accord d'association entre une société par action (SPA) du groupe BATOUCHE avec le groupe autrichien AGRANA Fruit. Ce dernier, considéré comme le leader mondial des préparations de fruits destinées à l'industrie agroalimentaire, possède 42 usines à travers le monde, dont une unité installée à la zone d'activités Taharacht dépendant de la ville d'Abou, wilaya de Bejaïa.

En 2018, AGRANA Fruit s'installe sur le marché Algérien en rachetant 49% des parts de la société SPA ELAFRUIT. Rappelons que ce groupe autrichien est le premier producteur international de concentrés de jus et de préparations à base de fruits pour les industriels de jus, de yaourts, de glaces et de pâtisserie.

L'entreprise répond aux exigences du marché des produits laitiers, des boissons, des glaces et des pâtisseries et vient par ailleurs d'être certifié FSSC 22000, une certification internationalement reconnue qui complète les référentiels ISO existants en matière de sécurité des aliments.

Les différentes préparations produites par cette usine sont :

- ✓ Préparations en morceaux, comme la préparation pêche morceau, la préparation mangue morceau, la préparation abricot morceau...etc.
- ✓ Préparations pulpes, comme la pulpe de fraise
- ✓ Préparations purées, comme la purée de citron et la purée de cerise
- ✓ Compote de pomme
- ✓ Préparation céréales miel
- ✓ Préparation fraise biscuit
- ✓ Compound pêche abricot, compound cherbet.

Ce sont des produits alimentaires intermédiaires qui sont destinés à la fabrication des produits laitiers comme les yaourts de SOUMMAM, DANONE, HODNA... etc., des boissons comme le jus ROUIBA et le jus RAMDY, des pâtisseries et des glaces.

## **II.2. Matériel biologique utilisé**

- *Aspergillus niger* : Le champignon nous a été fourni par le laboratoire des énergies renouvelables de l'université de Bejaia, il s'agit d'une souche pure repiquée sur gélose PDA, l'activité pectinolytique et cellulolytique de la souche sont testées sur des milieux sélectifs (gélose à la pectine et CMC comme unique source de carbone).

### **II.2.1. Vérification de la pureté**

#### **II.2.1.1. La macromorphologie**

L'examen macroscopique est réalisé selon la méthode d'Anisa et *al.*, (2013) :

- Les caractéristiques culturelles ;
- Les structures de fructifications.

#### **II.2.1.2. La micromorphologie**

La souche a fait l'objet d'une observation microscopique en utilisant la méthode de scotch. Cette étude a pour but la détermination des structures et la fragmentation ou non du mycélium, ainsi que la présence ou non des spores et leur forme. Un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants.

## **II.3. Traitement des résidus par séchage**

200g de chaque coproduit frais sont pesés avant d'être séchés à l'étuve par échange convectif à une température avoisinant  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ , la température a été sélectionnée suivant (Gurpreet, et *al.*, 2012) pour le rebut de pomme et pour celui d'orange (Ishtiaq et *al.*, 2016), La cinétique du séchage est établie en pesant les coproduits à des intervalles d'une heure jusqu'à obtention d'un poids constant (Mkaouar et Kechaou, 2015). La biomasse séchée est ensuite broyée et tamisée pour obtenir une poudre.

Par la suite, nous avons réalisé un broyage à l'aide d'un moulin à café, puis un tamisage (tamis 0.5mm). Ainsi, la poudre obtenue a été conservée à température ambiante à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

### **II.3.1. Les analyses physicochimiques et microbiologiques des résidus avant et après séchage**

D'immenses quantités de résidus sont générées au cours de chaque production. En outre, ces résidus sont de nature très périssable, d'où l'intérêt de recourir à leur séchage. Ce faisant, pour mettre en relief l'effet du séchage sur les caractéristiques physicochimiques et microbiologiques des résidus, d'où l'intérêt d'effectuer un suivi physicochimique et microbiologique en trois temps : avant le séchage, juste après et après trois mois pour voir l'effet de ce dernier à long terme.

### **II.3.2. Échantillonnage des résidus**

Une fois les fruits triés et lavés (brossage pour les oranges), ils sont introduits dans la machine de coupe, puis au broyage, ensuite les transférer à travers un tapis à la Turborafineuse qui fait passer la purée à travers un tamis de 0,5 mm et le reste sort d'un tube, A l'aide d'une louche stérile. On prélève une quantité suffisante dans des flacons stériles pour les analyses microbiologiques.

### **II.3.3. Analyses physicochimiques des résidus**

Il s'agit de procéder à un suivi de mesures, taux d'humidité, pH, corps solides, activité de l'eau avant et après séchage et après trois mois de stockage.

### **II.3.4. Analyses microbiologiques des résidus**

Un poids de 10g de matière fraîche et de poudre des résidus a été ajouté à 90 ml de solution eau physiologique est filtré à travers un papier filtre stérile pour éliminer les particules solides 1 ml de filtrat a été utilisé pour préparer des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-4}$ . L'inoculum a été déposé sur les boîtes de Pétries puis coulées par le différents milieux, PCA VRBL.VRBG. et YGC agar pour rechercher et dénombrer respectivement les bactéries mésophiles aérobies, coliformes, entérobactéries, levures et moisissure.

Les plaques de gélose ont été incubées à 37°C pendant 48 h et 72h heures pour les bactéries et à 25°C pendant 5 jours pour les levures et moisissures.

Le dénombrement est réalisé par la méthode comptage des colonies en milieu solide (**Guiraud JP, 2003**) selon la formule suivante :

$$\text{nombre de colonies/g} = \frac{\Sigma C}{(n1 + 0.1n2)d}$$

$\Sigma C$  : La somme des colonies retenues sur les boites dénombrables

$n1$  : Le nombre de boites retenues pour la première dilution.

$n2$  : Le nombre de boites retenues pour la deuxième dilution.

$d$  : Le facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

## II.4. Propriétés biochimiques des résidus d'oranges et de pommes

### II.4.1. Taux d'humidité

La teneur en humidité des poudres de la pomme et d'orange ainsi que sur la matière fraîche est déterminée (Protocole RAGT Énergie MON-ANA-21 & Norme ISO 1813, 2016). 10g de chaque résidu sont pesés sont placés dans l'étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant les échantillons sont refroidies dans un dessiccateur. Le pourcentage d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Le pourcentage d'humidité} = \frac{(m2-m3)}{(m2-m1)} * 100$$

Où :

$m1$  : le poids du creuset vide

$m2$  : le poids du creuset incluant l'échantillon avant séchage

$m3$  : le poids du creuset incluant l'échantillon après séchage

### II.4.2. Taux de matière sèche (MS)

Le taux de matière sèche est déterminé (131-CNIPT, 2010). Il est calculé selon la relation suivante :

$$\%MS = 100 - \%d'Humidité$$

### II.4.3. Taux de cendres totales

Ce paramètre permet de nous renseigner sur la contenance en éléments minéraux de la matière analysée, il est déterminé suivant le protocole RAGT Énergie MON-ANA-19 & Norme ISO 18122 (2018). Une prise d'essai de 2g de la poudre d'orange et de la pomme sont introduites dans un four à moufle pour incinération à 500°C pendant 4h et demi. L'essai est effectué en triplicata, le pourcentage en cendres est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Le pourcentage en cendres} = \frac{(m3-m1)}{(m2-m1)} * 100$$



Où :

**m1** : le poids du creuset vide

**m2** : le poids du creuset incluant l'échantillon

**m3** : le poids du creuset après incinération

#### **II.4.4. Potentiel d'hydrogène**

- Sur matière fraîche mesuré selon (NF V 05-108,1997)
- Sur les poudres

Le pH est directement mesuré sur la suspension obtenue par macération de 1g des poudres d'orange et de pomme séparément dans 50ml d'eau distillée pendant 30 minutes. La valeur du pH est déterminée par un pH mètre (HANNA210) à température ambiante en rapport avec la norme (AFNOR, 1981).

#### **II.4.5. Teneur en sucres totaux**

La teneur en sucres totaux est déterminée suivant la méthode colorimétrique à l'antrone décrite par Bachelier et *al.*, (1966).

La teneur en sucres est estimée selon la méthode de Kubrak et *al.*, (2012). Un volume de 50µl des macérations est complété jusqu'à 0.5ml avec de l'eau distillée, l'ensemble est mélangé avec 1ml d'antrone à 0.2% dissout dans l'acide sulfurique purée. Les tubes sont incubés au bain marie à 100°C pendant 10min. Après refroidissement, des mesures d'absorbances sont enregistrés à 620nm.

La teneur en sucres totaux dans les poudres est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions en utilisant le glucose comme substrat.

#### **II.4.6. Détermination de la teneur en sucres réducteurs**

Ce dosage est effectué selon la méthode colorimétrique décrite par Miller, (1959). Dans un tube à hémolyse 1ml d'échantillon est mélangé avec 1ml de DNS, homogénéisé puis chauffé à 100°C pendant 10min, refroidie dans un bain de glace puis 10ml d'eau distillée sont ajoutée pour arrêter la réaction. Des mesures d'absorbances sont enregistrées à 540nm. La détermination des sucres réducteurs dans les poudres est réalisée en se référant à une courbe d'étalonnage (Annexe III).

### II.4.7. Dosage de l'azote total et de la teneur en protéines totales

La teneur en azote total est déterminée selon la méthode de Kjeldhal 1883 décrite dans (Zeitschrift für Analytische Chemie, 2021). La première étape consiste en une minéralisation. Une prise d'essai de 1g des poudres introduites séparément dans des matras aux quelles 7,35g du catalyseur et 20ml d'acide sulfurique sont ajoutés. Les échantillons sont chauffés à des températures ascendantes à partir de 100°C jusqu'à 400°C pendant quatre heures.

La seconde étape repose sur le principe de la distillation, après avoir dilué les échantillons dans 100ml d'eau distillée, une prise d'essai de 20ml sont introduites dans le matras de distillation. Un bécher contenant 15ml d'acide borique et quelques gouttes d'indicateur coloré est placé dans le distillateur, l'opération prend 3minutes.

Le titrage de l'ammoniac piégé dans l'acide borique concentré par une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à N/50 représente la dernière étape de l'analyse (Annexe A, II).

La teneur en protéines totales présente dans la poudre de pomme et d'orange est déterminée en multipliant la teneur en azote total par le facteur 6,25.

### II.4.8. Détermination de l'acidité titrable

Le principe de la mesure repose sur la méthode titrimétrique avec pH mètre (HANNA210) (Ctifel N°42, 2016). L'acidité titrable est déterminée en neutralisant les acides contenus dans 1g d'échantillon macéré, par une solution de soude déci-normale (N/10) jusqu'au pH=8,1.

L'acidité est exprimée en milliéquivalents pour 100g (milli/100g) de la poudre d'orange et de la pomme respectivement.

$$\text{Acidité (meq/100 g)} = \frac{(100 \cdot V_s \cdot C)}{V_0}$$

V<sub>0</sub> : volume en ml de la prise d'essai (10 ou 5 ml)

V<sub>s</sub> : volume en ml de la solution de soude utilisée pour le dosage (valeur lue)

C : concentration exacte, en moles par litre, de la solution de soude (0,1N)

L'acidité des résidus de pomme et d'orange est exprimée usuellement en g/l d'acide dominant dans le fruit (acide malique pour la pomme et citrique pour l'orange) :

Acidité malique= Acidité totale(meq/100g) \*0.67

Acidité citrique anhydre= Acidité totale (meq/100g) \* 0.64

### **II.4.9. Dosage des polyphénols et flavonoïdes**

La récupération des polyphénols de la poudre d'orange et de la pomme repose sur le principe d'extraction conventionnelle par solvant (ECS) suivant le protocole décrit par Li et *al.*, (2006).

Le dosage des polyphénols totaux est déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et *al.*, 1999).

1g de poudre est macéré dans 50ml d'éthanol à 80% pendant une heure chacun puis filtrés. La procédure est répétée sur le retentât, les deux filtrats issus de la première et la deuxième extraction sont mélangés puis le solvant d'extraction est évaporé jusqu'à l'obtention d'un extrait sec.

L'extrait sec est ensuite redissous dans d'éthanol à 80%.

Un volume de 200µl d'extrait sont additionné de 800µl d'une solution de NaCO<sub>3</sub> à 10% et à 1ml du Folin-Ciocalteu dilué, le mélange est incubé 30min à l'ombre. Des mesures d'absorbance sont enregistrées à 765nm en utilisant un spectrophotomètre (VIS-7220). Les teneurs en phénols totaux sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique (Annexe III). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG /g d'ES).

La méthode au AlCl<sub>3</sub> (Kosalec et *al.*, 2004) a été adoptée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits. 1 ml d'extraits est ajoutée à 1 ml d'AlCl<sub>3</sub> à 2% l, le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 30 minutes, l'absorbance est lue à 430 nm.

La quantification des flavonoïdes est réalisée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine (Annexe III) les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQuercétine/g d'ES).

### **II.5. Test qualitatif**

Le criblage a été effectué sur milieu Agar-CMC et pectine-Agar, les milieux de cultures utilisés sont ceux décrit par (Kasana et *al.*, 2008), il s'agit d'une solution Mandel et Weber (Annexe I) additionnée de 0.5% (p/v) de CMC pour l'activité cellulolytique et de pectine à 0.5% pour l'activité pectinolytique, le pH est ajusté à 5. L'agar à 1.7% permet une bonne diffusion d'enzymes sécrétées.

### **II.5.1 Test d'activité cellulolytique :**

La mise en évidence de cette activité est effectuée sur milieu sélectif à base de CMC à 0.5% (Annexe I), comme unique source de carbone comme (Herculano et *al.*, 2011), les boîtes sontensemencées par un disque central incubées à  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 3 à 4 jours, 4ml de Lugol (Roussos et Raimbault., 1982) sont additionnés à chaque boîte et laisser agir pendant 10min. les boîtes sont en suit lavées abondamment avec de l'eau distillée puis avec une solution d'NaOH à 1M.

Une zone claire apparait témoignant la présence d'une activité cellulolytique dont le diamètre est mesuré à l'aide d'une règle ainsi que l'IC est déterminé par le rapport entre le diamètre de la zone d'hydrolyse et le diamètre de la colonie fongique (Elfiati et *al.*,2019)

### **II.5.2. Test d'activité pectinolytique**

Cette mise en évidence est décrite par Anisa et *al.*, (2013). Le milieu sélectif à base de 0.5% de pectine est utilisé (Annexe I). Chaque boîte estensemencée par un disque central puis incubée pendant 3 à 4 jours à  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ . La révélation est effectuée par une solution d'iode et iodure de potassium (Lugol), les biotes sont inondés à raison de 4ml pendant 10min. les boîtes sont ensuite lavées avec une solution d'NaOH à 1M. L'hydrolyse enzymatique des substances pectiques est caractérisée par un halo clair autour de la colonie productrice.

### **II.6. Test quantitatif**

Les bouillons de fermentation sont sous forme d'une solution Mandel et Weber, 1969) répartie à raison de 50ml par flacon de 250ml, chacune est additionnée de 0.5% (p/v) de pectine et de CMC séparément en tant qu'inducteurs de production d'enzymes recherchées, le pH est ajusté à 5 et les milieux sont stérilisés à  $121^\circ\text{C}$  pendant 15min.

L'ensemble est ensuite inoculé par deux disques prélevés à la périphérie d'une culture de 7 jours sur milieu PDA d'*Aspergillus niger*, les cultures sont incubées et agitées à 150rpm (agitateur type GFL série 3033) pendant 7 jours à  $28^\circ\text{C}$ .

Le dosage des activités CMCcase, FPase et pectinases est effectué après une centrifugation (Rotina380R, Allemagne) d'un volume des cultures à 7000g pendant 20 min à  $4^\circ\text{C}$ . L'extrait enzymatique est conservé à  $4^\circ\text{C}$  jusqu'au dosage enzymatique. La méthode suivie est celle décrite par (Lakshmikant,1990).

## II.7. Mesure des activités cellulase et pectinolytique des extraits bruts de fermentation

- **Mesure de l'activité cellulase**

L'activité de CMCase est estimée par la mesure des sucres réducteurs libérés selon la méthode de (Miller, 1959). Dans des tubes à hémolyse, 450µl d'une solution CMC à 1% sont équilibrés à 50°C pendant 10 minutes.

50µl de l'extrait enzymatique brut sont additionnés à la solution de CMC, après incubation à 50°C pendant 30 minutes, la réaction est arrêtée en ajoutant 750µl du DNSA. Le mélange réactionnel est porté à ébullition pendant 5 minutes à 100°C, puis refroidi dans un bain glacial. Les témoins ont été préparés de la même façon que les échantillons cependant la solution de DNSA a été ajoutée avant de mettre l'enzyme. 2ml d'eau déminéralisée sont ajoutés dans chaque tube.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose libérée. Cette concentration est déterminée par référence à une courbe étalon établie avec des concentrations variables (0-0,2-0,4-0,6-0,9-1,2 mg/ml) à partir d'une solution mère à 2 g/l. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 550 nm (Annexe III).

L'absorbance = Absorbance de l'enzyme – Absorbance du témoin enzyme.

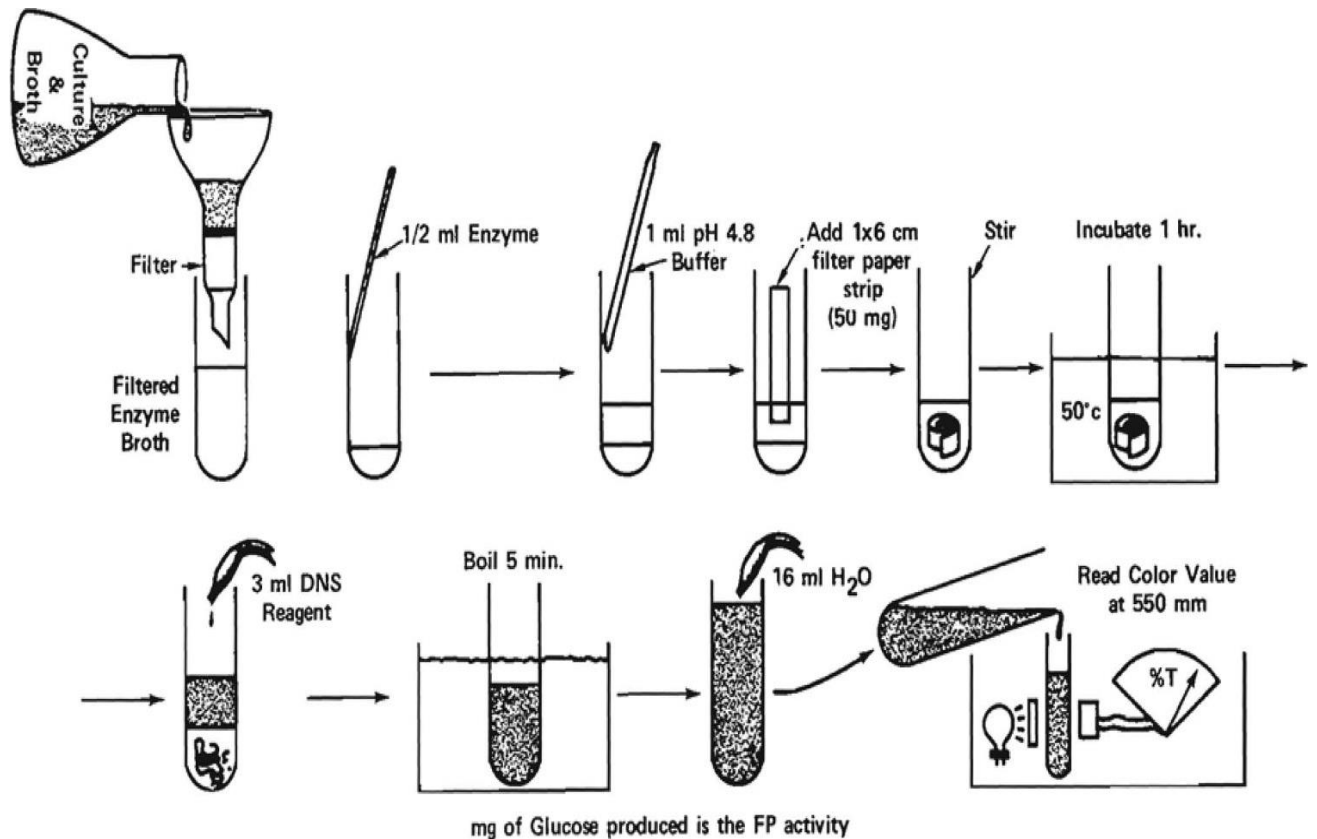
Les absorbances des échantillons sont converties en mg de glucose libéré à l'aide de la courbe d'étalonnage.

$$\text{Activité CMCase} = \frac{\text{mg de glucose libéré} / 0.18016 \text{ mg}/\mu\text{mol}}{\text{VE (ml)} * \text{temps d'incubation}} = \text{UI/ml}$$

Une unité d'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme requise pour libérer un µmol de sucres réducteurs à partir du substrat approprié par minute dans les conditions de l'essai (Camassola et Dillon., 2012).

- Mesure de l'activité FPase

La quantité des sucres réducteurs libérés par l'activité papier filtre a été estimée par la méthode de Miller (1959).



**Figure N°5** : Schéma représentant les étapes de dosage de l'activité FPase selon la méthode de Miller 1959 (Eveleigh et *al.*,2009).

Dans un tube à essai 25mg du papier Whatman N°1 (soit une bande de 1cm\*3cm) sont équilibrés à 50°C pendant 10min avec 500µl d'une solution tampon citrate (50mM, PH4,8) puis 0,25ml d'extrait enzymatique brut sont additionnés, le mélange réactionnel est ainsi incubé (60min à 50°C). La réaction est arrêtée en ajoutant le DNSA. Le mélange réactionnel est ensuite porté à ébullition pendant 5min à 100°C puis refroidi dans un bain d'eau glacée, le mélange est laissé 20min afin de sédimenter les solides. 500µl du mélange sont dilués dans 1ml d'eau déminéralisée, les valeurs d'absorbances sont enregistrées à 550nm contre l'eau déminéralisée. Le témoin enzyme a été préparé de la même façon que les échantillons. La quantité de sucres réducteurs a été déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage à partir d'une solution mère de 10g/l établie avec des concentrations variables en glucose de 1 à 6,7 mg/ml.

- **Mesure de l'activité pectinolytique**

L'activité enzymatique est déterminée par la méthode de Miller 1959 décrite par Ketipally et al., (2019). Brièvement, un mélange contenant 1ml d'une solution de pectine à 1,2% préparée dans un tampon citrate de sodium à pH 5 et 1ml d'extrait enzymatique. Le mélange est placé dans un bain marie à 100°C pendant 20min (témoin enzyme). L'échantillon ainsi que le témoin sont incubés à 35°C pendant 3h. 200µl de ce dernier sont homogénéisés avec 300µl du réactif de DNSA et le tout est vortexé pendant 10min. Le mélange est ensuite bouilli pendant 5min. Après refroidissement 1,5 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'activité enzymatique est mesurée au spectrophotomètre à 530nm.

L'activité enzymatique représente la quantité d'enzyme dans 1ml qui libèrerait des sucres réducteurs équivalent à 1mg d'acide galacturonique, la teneur en ce dernier est déterminée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions opératoires (Annexe III).

La formule suivie pour l'activité enzymatique est celle décrite par Mohandas et al., (2018)

$$\text{Activité pectinase} = \frac{[\text{acide monogalacturonique}] * D * 1000}{VE(ml) * 212.15/\text{temps d'incubation}} = UI/ml$$

Où : D est le facteur de dilution, 212.15µg/mol est la masse moléculaire de l'acide galacturonique.

## **II.8. Mise en œuvre des fermentations solides et liquides avec les coproduits de pomme et d'orange**

Le taux d'humidité relative est représenté par la quantité d'eau libre des coproduits (Lanouari et al., 2015), il est déterminé la veille de la fermentation.

### **II.8.1. Production d'enzymes cellulolytique et pectinolytique par FMS**

La fermentation est effectuée dans des flacons de 250ml, 15g de la poudre de pomme sont utilisé comme seule source de carbone, humidifié à 1 :3 (w/v) par une solution minérale Mandels et weber (Joshi et al, 2006). 5g de poudre d'orange par flacon sont humidifié à 1 :2 (v/w) par la même solution minérale, tous les flacons sont stérilisés à 121°C pendant 15min, (Mrudula S et Anitharaj R,2011). Après refroidissement les milieux son inoculés par deux disques d'une culture de 7jours d'*A niger* sur milieu PDA, les cultures sont incubées à 29 ± 1°C pendant 7 jours.

## **II.8.2. Production d'enzymes cellulolytique et pectinolytique par SmF**

Les cultures en milieu liquide sont effectuées dans des flacons de 250ml à raison de 50ml d'une solution minérale Mandels et weber additionnée de 2,5g de résidu d'orange par flacon pour la production d'enzymes hydrolases à base de résidu de d'orange (Omojasola et Jilani., 2008) et 8g de poudre de pomme pour la production de cellulases et de pectinases à base de résidu de pomme (Joshi et *al.*, 2006), le pH est ajusté à 5. Les deux milieux sont stérilisés à 121°C pendant 15min et après refroidissement les milieux de cultures sont inoculés par des disques d'une culture puis incubés à  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  sous agitation à 180rpm pendant 7 jours.

## **II.9. Suivi des paramètres de la SmF**

### **II.9.1. Évolution du pH**

Les valeurs du pH sont déterminée chaque 24h par mesure directe à l'aides d'un pH-mètre.

### **II.9.2. Évaluation du taux de protéines totaux**

L'évolution de la teneur en protéines est évaluée chaque 24h par la méthode de Lowry et *al.*, (1951).

Un volume de 20 $\mu\text{l}$  du surnageant résultant est diluée dans 380 $\mu\text{l}$ d'eau distillée au quelle 2ml du réactif de Gornall sont ajoutés puis incubé à l'abri de la lumière pendant 10min, 200 $\mu\text{l}$  du Folin-Ciocalteu sont additionnée, agitée et remis à incubation pendant 30min à l'abri de la lumière.

Les mélanges sont ensuite centrifugés à 3000rpm pendant 10min, l'absorbance est ensuite mesurée à 750nm en utilisant un spectrophotomètre (VIS-7220 G) contre un témoin.

La teneur en protéines des deux poudres est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée en utilisant la BSA (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dans les mêmes conditions opératoires (Annexe III).

### **II.9.3. Évolution des activités enzymatiques des extraits**

Un volume est récupéré de la culture SmF est répartie dans des tubes Falcon.

Quant aux cultures FMS un volume du tampon citrate (pH 4,8 ; 0.05Mm) est ajouté à la culture puis laissé sous agitation pendant 1h à température ambiante, l'effluent résultant est répartie à son tour dans des tubes Falcon.

Les tubes sont centrifugés à froid (4°C) à 7000rpm pendant 20min. Le surnageant est référé à l'extrait enzymatique brut, à partir duquel l'activité CMCCase et pectinase sont dosées.

## **II.10. Analyses sur substrats fermentés**

Dosage des protéines, sures réducteurs, et polyphénols totaux.



### III. Résultats et discussion

#### III.1. Procédés de fabrication d'une purée à base d'orange et de pomme

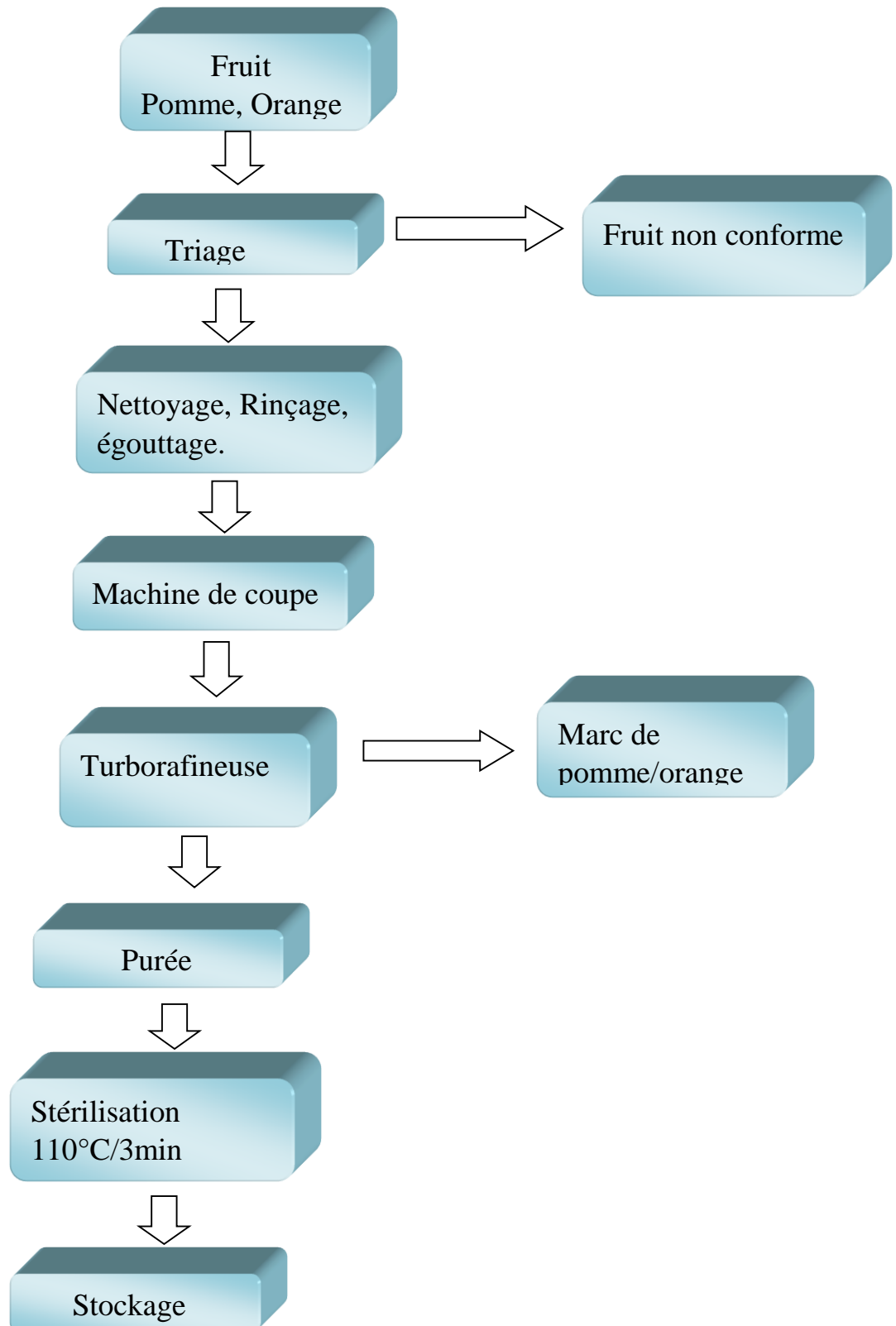


Figure N°6 : diagramme représentant le procédé de transformation purée pomme et orange.

### III.2. Effet du séchage

Étant donné la nature très périssable des résidus, on a opté pour le séchage et le suivi de la caractérisation physicochimique et microbiologique des marcs de pommes et écorces d'orange à l'état frais, poudre et après 3 mois de conservation, pour voir son impact à long terme.

### III.3. Les résultats d'analyse physicochimique sur résidus frais et secs

Les résultats de la teneur en humidité, pH, corps solides et activité de l'eau de la matière fraîche, de la poudre (après le séchage) et après 3 mois de stockage, sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau IV** : représentant l'effet du séchage sur quelques propriétés physicochimiques du résidu.

Résidus	Matière fraîche		La poudre		Après stockage de 3 mois	
	Orange	Pomme	Orange	Pomme	orange	Pomme
Taux d'humidité(%)	79%	71.5%	7.5%	5.76%	12.66	7.85%
Matière sèche (%)	21%	28.5%	89.5%	94.24%	7.85%	92.15%
Ph	4.2	4.6	4.41	4.60	4.28	4.34
Taux des corps solide (g/kg)	22	17.5	14	10	11	9
Activité de l'eau $a_w$	Nd	0.9	0.16	0.11	0.22	0.12

Les résultats ont montré que les valeurs de la teneur en humidité des résidus frais étaient de 79 % et 71.5% pour l'orange et la pomme respectivement. Ils ont d'abord diminué à 5.75 % après séchage puis ont légèrement augmenté à 7.8 % et 12.5 en raison de l'humidité gagnée au cours des trois mois de stockage. Ces valeurs sont proches de celles trouvées par (Rozier et Bolinot 1985), puis par Leyral et Vierling (1997) dans leurs études sur certains produits alimentaires séchés.

Les résultats de l'étude de (Wang et al., 2007) sur le marc de pommes, enregistrent une humidité initiale de 69%, après le séchage de l'échantillon, la teneur finale varie (2,94–4,28 %). Ces valeurs restent inférieures à nos résultats. Ce qui est éventuellement dû au degré de la température utilisée ou le type de l'étuve.

L'un des objectifs du séchage consiste à diminuer la teneur en humidité en dessous de 8% pour prévenir la croissance microbologique (Barbosa-Cánovas et Vega-Mercado, 1996). En effet,

nos résultats sont effectivement inférieurs à 8%. Donc, ce séchage pourra réduire les risques d'altération microbiologique.

Le séchage conduit également à la réduction du taux des corps solides solubles totaux (SST). Ces résultats obtenus peuvent être justifiés par l'évaporation des corps volatils pendant le séchage.

L'activité de l'eau pour les poudres étaient dans (0.11-0.22) en dessous de 0.3 ce qui peut empêcher selon (Ramaswamy et Marcotte, 2006) les réactions enzymatiques, le brunissement et l'oxydation des lipides.

Le séchage a donc un effet significatif sur les paramètres physicochimiques en particulier la teneur en eau qui joue un rôle important dans la préservation du matériel végétal ainsi que la réduction de la masse et le volume. Cela amène vers l'optimisation du coût de revient transport et du stockage, d'où l'augmentation des profits.

### III.4. Analyses microbiologiques sur résidus frais et secs

- **Sur le marc de pomme**

Les données relatives aux charges microbiennes ont subi une transformation correspondant aux logarithmiques charges microbiennes exprimées en Unité Formant Colonie par gramme (UFC/g) dans le tableau V :

**Tableau V** : tableau représentant les résultats des analyses microbiologiques effectués sur les marcs de pomme

	Matière fraîche	Après séchage	après 10 j de stockage	après 90j de stockage
<b>FTAM (UFC/ml)</b>	<b>5.35.10<sup>8</sup></b>	<b>13.10<sup>3</sup></b>	<b>2.6. 10<sup>3</sup></b>	<b>&lt;20</b>
<b>Coliformes</b>	<b>2.510<sup>3</sup></b>	<b>13.10<sup>6</sup></b>	<b>3 .10<sup>3</sup></b>	<b>&lt;20</b>
<b>Entérobactéries</b>	<b>1.10<sup>5</sup></b>	<b>6.10<sup>3</sup></b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
<b>Levures et moisissures</b>	<b>1..10<sup>3</sup></b>	<b>610</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>

Les résultats ont montré que les valeurs de la FTAM, entérobactéries, levures et moisissure étaient plus élevées dans le marc frais par rapport à ceux qu'on a séché avant et après le stockage (Tableau 1) à 8.78, à 5 et à 3 log UFC/g, respectivement.

Cependant, on a observé une augmentation de la charge des coliformes après séchage à 7,11 log UFC/g. Cette contamination pourrait se produire pendant le processus de séchage. Après 90 jours de stockage, les levures et moisissures ont été éliminées et les valeurs logarithmiques

de la FTAM et coliformes sont réduites alors que les entérobactéries ont presque gardé la même valeur.

- **Résidus d'orange :**

Une charge microbienne plus élevée dans l'écorce d'orange frais par rapport à ceux séchés avant et après le stockage

**Tableau VI :** Analyses microbiologiques faites sur les résidus d'orange

	<b>Matière fraîche</b>	<b>Séchage j0</b>	<b>Après 10j</b>	<b>Après 90j</b>
<b>FTAM</b>	<b>5.3 10<sup>8</sup></b>	<b>3 10<sup>3</sup></b>	<b>2.1 10<sup>3</sup></b>	1.8.10 <sup>2</sup>
<b>Coliformes</b>	<b>7.4 10<sup>4</sup></b>	<b>2.83 10<sup>3</sup></b>	<b>1.7 10<sup>3</sup></b>	<20
<b>Entérobactérie</b>	<b>6 10<sup>3</sup></b>	<b>1.1 10<sup>4</sup></b>	<b>Nd</b>	Nd
<b>Levures et moisissures</b>	<b>1.3 10<sup>3</sup></b>	<b>610</b>	<b>Nd</b>	Nd

Dans l'ensemble, la population microbienne moyenne était plus faible dans les résidus d'orange séchés. Après stockage de 3 mois, la majorité des flores sont éliminées. Cela indique une bonne hygiène, pratiques de séchage, de stockage et de manipulation.

L'élimination ou l'abaissement des flores peut être attribuée à la diminution, à la fois, de la teneur en eau et de l'activité de l'eau des échantillons.

Pendant la période de stockage, il y a eu une légère diminution de la FTAM dans les échantillons séchés, indiquant qu'après séchage les micro-organismes peuvent conserver leur viabilité quelle que soit l'activité d'eau (Ntuli *et al.*, 2017).

Le séchage, qui est donc nutritionnellement et microbiologiquement sûr, peut être utilisé pour conserver les résidus.

### **III.5. Propriétés biochimiques des poudres**

L'ensemble des propriétés biochimiques des deux poudres sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau IV** : Propriétés biochimiques du résidu d'orange et de pomme.

Caractère biochimique	Poudre d'orange	Poudre de pomme
Humidité%	7.5 ± 0.11	5.76 ± 0.03
Matière sèche%	92.5 ± 0.11	94,24 ± 0.03
Cendres totales%	3,92 ± 0.29	1,575 ± 0.40
PH	4,41	4,60
Sucres totaux (mg/g)	285.76 ± 4.77	272.25 ± 0.53
Sucres réducteurs (mg/g)	84,1 ± 0,07	95,51 ± 0,01
Taux de protéines(mg/g)	5.24 ± 0,03	8.9 ± 0,007
Acidité titrable (meq/100g)	1,6 ± 0,45	0,5025 ± 0,23
Polyphénols totaux (mg E. AG/g d'ES)	25,5 ± 0,01	36,46 ± 0,02
Flavonoïdes totaux (mg E. Quercitine/g d'ES)	4,113 ± 0,001	7,001 ± 0,01
Azote total (mg/ g)	10,696 ± 0,06	11,27 ± 0,03

### III.5.1. Taux d'humidité

La quantité d'eau libre dans les poudres correspond à l'humidité relative de nos échantillons, elle est responsable de plusieurs phénomènes d'altération biologique **Lanouari et al., (2015)**.

La teneur en humidité relative est de 7,5%±0,11 pour la PO et de 5,76% ±0,03 pour l'AP. Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par **Sudha et al., (2006)** qui ont trouvé un taux d'humidité équivalent à 10.8± 0.03% sur l'AP ; **Zhou et al., (2011)** ; **Ali et al., (2010)** ont rapporté une valeur égale à 2.31% après séchage à 80°C et 12.5 ±0.5% sur la PO et après un séchage au soleil.

### III.5.2. Teneur en matière sèche (MS)

Le pourcentage de matière sèche évalué pour nos échantillons est de 92.5% ± 0.11 pour la PO et 94.24%± 0.035 pour l'AP. **Sudha et al., (2006)** ; **Shalini et Gupta., (2010)** ont trouvés 89.2% et 26.4% sur l'AP respectivement, par contre la teneur en MS citée par **Zhou et al.,**

(2011) est de 97.69% dans la PO, cette valeur est supérieure à la nôtre. **Dhillon et al., (2013)** ont trouvé 29.5% sur l'AP et 22.1% sur la PO. Toutes les valeurs qui présentent un écart important par rapport à celles trouvées dans notre étude présentent %MS évaluée à partir d'un échantillon frais.

### **III.5.3. Teneur en cendres totales**

Son dosage donne un indice sur la quantité totale de minéraux dans le substrat analysé. Le taux de cendres totales dans les deux poudres de  $3.92\% \pm 0.299$  dans la PO et  $1.575\% \pm 0.40$  dans l'AP. Les teneurs en cendre totales enregistrées sur ce dernier par (**Villas-Boas et al., (2003)** ; **Sudha et al., (2006)** ; **Shalini et Gupta., (2010)**) sont respectivement 2.06%,  $0.50 \pm 0.05$  % et 0.38% la première valeur citée est supérieure à celle de notre échantillon cependant que les deux autres sont inférieures par rapport à celle qu'on a trouvées. **Zhou et al., (2011)** ; **Ali et al., (2010)** ; **Huang et al., (2014)**, ont rapportés des valeurs égales à  $1.2 \pm 0.1\%$ , 3,5% et 4,14% sur la PO respectivement, **Dhillon et al., (2013)** ont cité une teneur qui varie entre 0.5% et 6.1% pour AP et  $5.9 \pm 0.3\%$  dans la PO.

La valeur nutritionnelle et la qualité d'un aliment sont des facteurs en relation de à la teneur en cendres totales dans ce dernier.

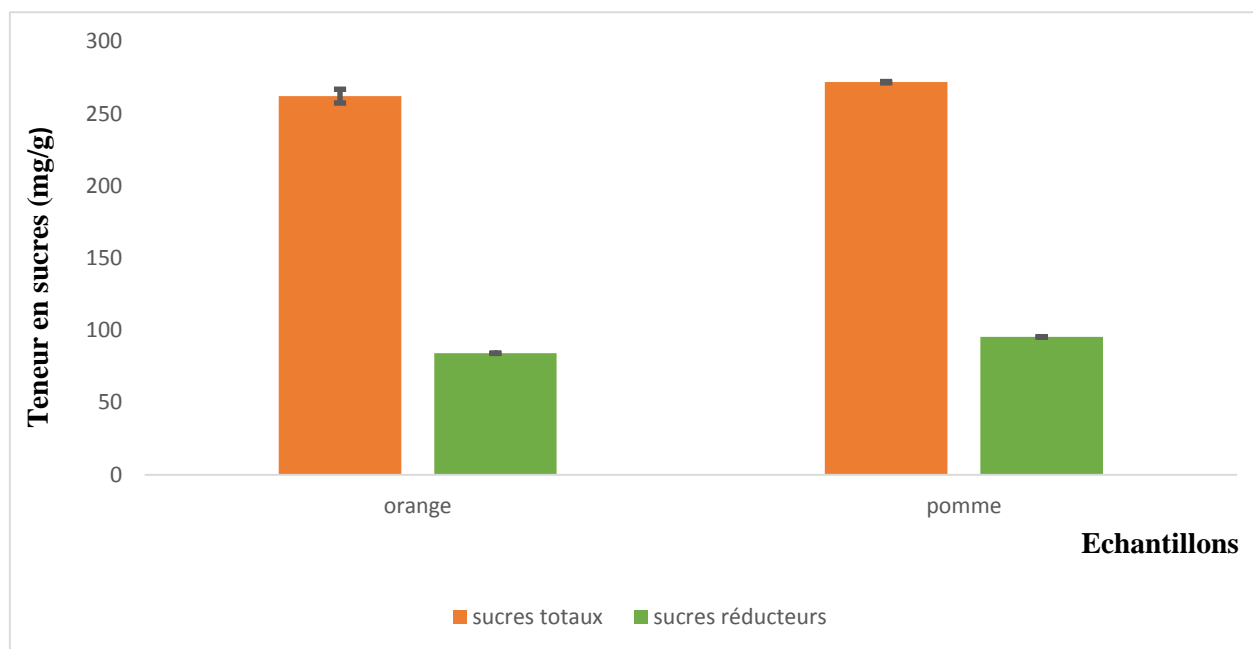
### **III.5.4. Valeur du pH**

La réalisation de la mesure du pH montre que nos échantillons ont un pH similaire acide, il est de 4.25 et 4.56 sur la PO et l'AP respectivement, **Dhillon et al., (2012)** ; **Carson et al., (1994)** mentionnent des inférieurs ( $3.43 \pm 0.1$  et 4.3) sur l'AP. Ces résultats corroborent avec ceux de l'acidité titrable, notre échantillon d'AP n'est pas acide en comparant avec les résultats de ces auteurs. **Garau et al., (2007)** ; **Huet, (1984)** qui rapportent un pH de 4.06, et une valeur entre 2.18 à 5.30 retrouvé dans les jus d'une variété de citrus analysée, notre mesure est proche de celle retrouvée par ces auteurs.

### **III.5.5. Teneur en sucres totaux et réducteurs**

Les teneurs en sucres totaux et réducteurs présentes dans la PO et l'AP sont respectivement  $25.87\% \pm 4.77$ ,  $27.22\% \pm 0.53$ , et  $8.41\% \pm 0.07$ ,  $9.55\% \pm 0.02$ . Les résultats des dosages des

sucres totaux et réducteurs sont représentés dans la figure N°7:



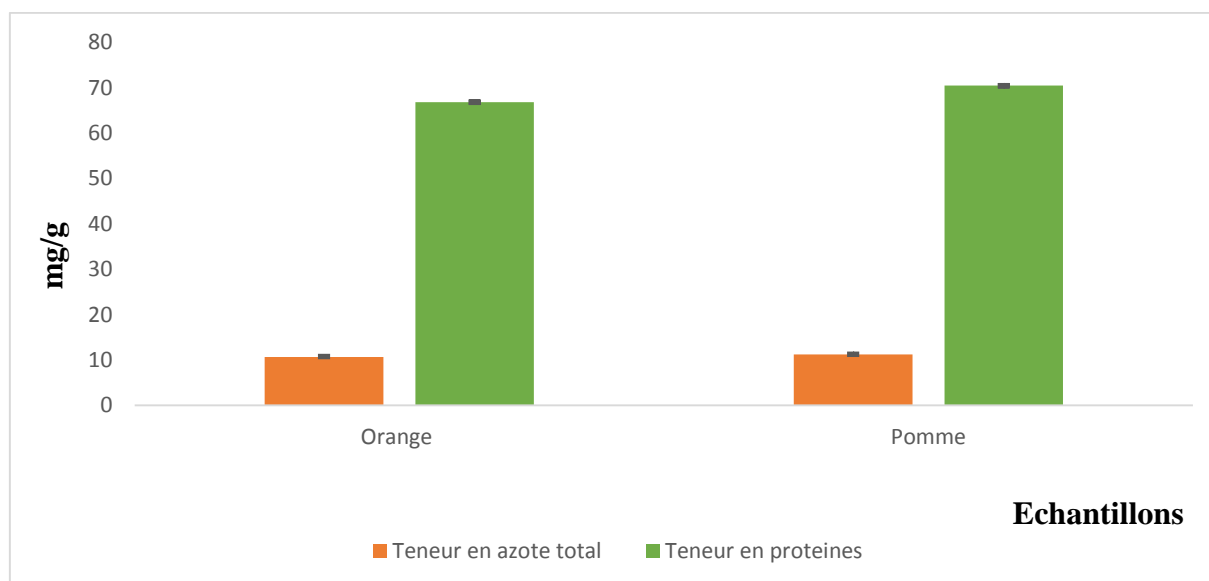
**Figure N°7 :** Teneur en sucres réducteurs et totaux des deux poudres

Les teneurs en sucres totaux retrouvées dans nos échantillons sont supérieures à celles trouvées par **Shalini et Gupta., (2010)** ; **Ali et al., (2010)** qui ont rapporté 3.6% et 14±1.3% pour l'AP et la PO respectivement, avec une teneur en sucres simples qui varie entre 9.5-22% dans l'AP, et est de 10±1.0% dans la PO. La teneur en sucres simples retrouvée dans notre échantillon de PO est légèrement inférieure à celle qu'ils ont évoquée.

Une valeur égale à 16.05±0.45 a été enregistrée par **Zhou et al., (2011)** dans le résidu d'orange ; **Dhillon et al., (2012)** ont rapporté une teneur en sucres réducteurs qui varie entre 10.8% et 15% dans le résidu de pomme.

### III.5.6. Teneur en protéines et en azote total

Les teneurs en protéines et en azote retrouvés dans nos échantillons sont respectivement 6.62%±0.067, 1.06%± 0.067 dans la PO et 7.046%±0.0287, 1.13%±0.0023 dans l'AP. Les résultats des dosages d'azote total et du taux de protéines dans les deux résidus sont illustrés dans les figure N°8 :



**Figure N°8 :** Teneurs en azote total et en protéines des deux poudres

Les teneurs en protéines évoqués par **Zhou et al., (2011)** ; **Dhillon et al., (2012)** sont  $0.77\% \pm 0.1$  et  $12.2\%$  pour la PO et elle varie de  $2.9$  à  $5.7\%$  pour l'AP. **Sudha et al., (2007)** ; **Li et al., (2015)** ont mentionné des teneurs en protéines égales à  $2.06\% \pm 0.05$  et  $6.25 \pm 0.03\%$ , celles en azote total sont respectivement  $0.33\% \pm 0.05$  et  $1.0048\% \pm 0.03$  sur l'AP et la PO. La teneur en l'azote total varie de  $0.08$  à  $0.1\%$  sur le résidu d'orange selon **Liu et al., (2012)**. Cependant, **Ortiz et al., (2016)** ont apporté les teneurs en protéines et en azote suivantes  $5.37\%$  et  $0.87\%$  sur la PO et  $1.97\%$ ,  $0.31\%$  sur l'AP.

Les teneurs en protéines mentionnées par **Villas-Boas., et al., (2003)** ; **Shalini et Gupta., (2010)** sont de l'ordre de  $4.1\%$  et  $4\%$  sur l'AP. Des teneurs similaires ( $3.9$ – $5.7$ ) % était rapportée par **Dhillon et al., (2012)** sur le même résidu.

### III.5.7. Acidité titrable

L'acidité des fruits joue un rôle clé dans les critères d'évaluation de l'acceptabilité commerciale des fruits et, avec des niveaux de sucre appropriés, et fournit un goût typique. Selon **Liu et al., (2012)** les acides carboxyliques, en particulier les acides citrique, malique, sont majoritairement abondants dans l'AP et la PO

Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé que l'acidité titrable de la PO est de  $1,6 \pm 0,45$  meq/100ml et  $0,5 \pm 0,24$  meq/100ml pour l'AP. **Shalini et Gupta, (2010)** ont rapportés une teneur égale à  $0.42\%$  sur l'AP. Cette valeur est légèrement inférieure à la nôtre. Quant à **Ali et al., (2010)** ils rapportent  $84 \pm 2.5$  mg/100g en acide ascorbique pour la PO. Les valeurs d'acidité obtenues par **Huet (1962)** sur plusieurs variétés d'écorces d'orange fluctue de  $4.4$  à  $10.6\%$



### III.5.6. Teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux

Les composés phénoliques sont largement répandus dans les plantes. Ils offrent d'importantes qualités sensorielles et nutritionnelles qui sont responsables des couleurs, des arômes et des goûts de nombreuses plantes. Récemment, les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, ont eu beaucoup d'attention, en raison de leurs activités antioxydante et de leurs capacités de piégeages des radicaux libres, qui ont potentiellement des implications bénéfiques sur la santé humaine **Li et al., (2006)**.

Le dosage a été effectué afin de mettre en évidence la richesse des résidus d'oranges et de pomme en composés bioactifs (composé phénoliques). La teneur en polyphénols présente dans nos échantillons est de  $25,5 \pm 0,0165$  mg E. AG/g d'ES dans la PO et  $36,46 \pm 0,024$  mg E. AG/g d'ES dans l'AP. Quant à la teneur en flavonoïdes, elle est estimée de  $4,113 \pm 0,0019$  mg E. Quercitine/g d'ES dans l'PO, et  $7,001 \pm 0,0123$  mg E. Quercitine/g d'ES dans l'AP. Le taux de phénols totaux dans ce dernier a été déterminé par **Sudha et al., (2007)** par différentes méthodes d'extraction, l'extraction par simple eau distillée à donner 4.65mg/g tandis que l'extraction par méthanol a donné un rendement en phénols égale à 5.51mg/g, la teneur en phénols dans l'AP rapportée par ces auteurs était de 10.16 mg/g. Les résultats annoncés par **Escarpa, et Gonzalez., (1998)** varient entre  $100.7\% \pm 2.4$  et  $104.6\% \pm 3.1$  dans l'AP.

La teneur en flavonoïdes rapportés par ces auteurs fluctue entre  $96.3\% \pm 4$  et  $104.9\% \pm 2.3$  ces teneurs sont mesurées par HPLC à partir de différentes variétés d'AP restent beaucoup plus importantes à celle de nos échantillons. La richesse en flavonoïdes (principalement hespéridine et la naringine) de ce résidu a été étudié par **Manthey et Grohmann., (2001)** ils ont rapporté une teneur en naringine égale à  $628 \pm 8$  µg /ml et  $1672 \pm 28$  µg/ml en hespéridine, cette teneur fluctue de 2.42- 4.02% selon **Huet (1962)** qui a extrait cette molécule à partir de différentes variétés d'écorces d'orange. **Lagha-Benamrouche et al., (2017)** apportent l'abondance des variétés de résidus d'orange en ces composés.

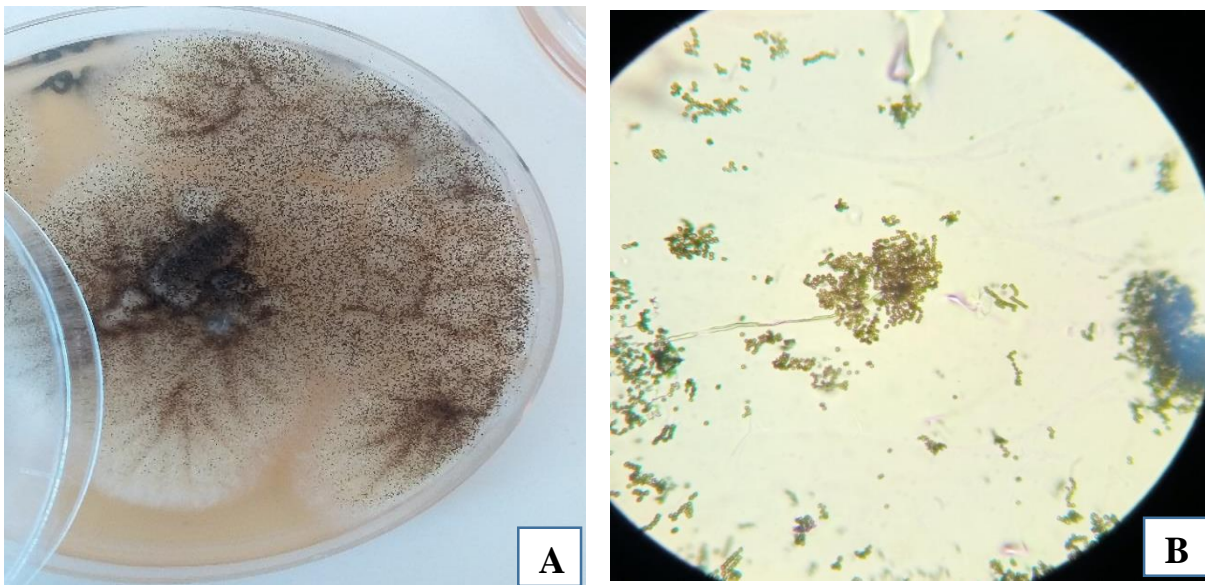
Selon **Li et al., (2013)** la teneur en composés phénoliques peut être affectée par l'effet du séchage, la méthode et la température d'extraction et par la concentration du solvant d'extraction ainsi que la durée d'extraction. Dans leur travail, ils ont rapporté une valeur égale à  $73.59 \pm 5.43$  mg E. AG/100 g de matière fraîche d'écorce d'orange extraite avec l'éthanol à 72% (v/v).

La variabilité de la teneur en un paramètre biochimique d'un fruit à l'autre repose sur différents paramètres tel que la prévenance géographique, les conditions climatiques et les caractéristiques

édaphiques du sol, comme elle pourrait aussi bien être attribuée aux différents facteurs écologiques, voir même l'âge des plantes est le facteur génétique (Doukani et tabak, 2015).

### III.6. Vérification de la pureté d'*A niger*

**III.6.1. Macromorphologie** Sur milieu PDA, le mycélium d'*A niger* a envahi très rapidement le milieu, il apparait d'abord blanc puis jaune et enfin granuleux et noir à la maturation. Les colonies atteignent un diamètre de 3-4cm au bout de 10 jours (Figure A).



« A » observation à l'œil nu

« B » observation au microscope  
optique G\*40

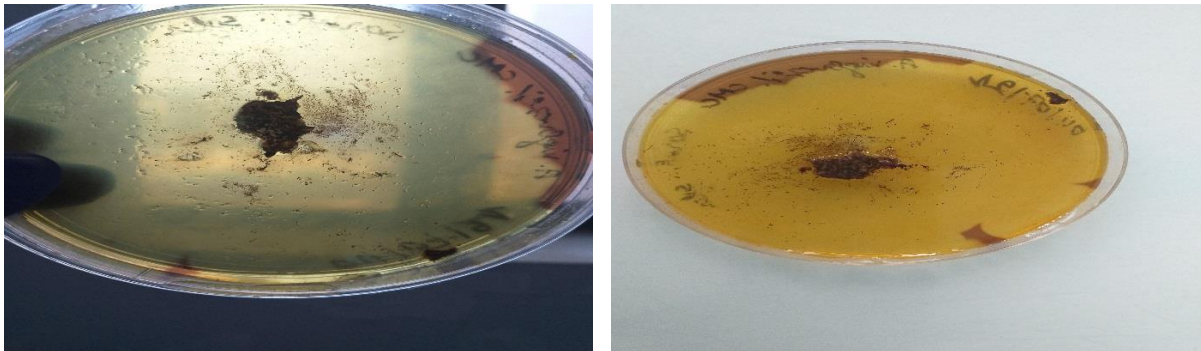
**Figure N °9** : les différentes observations effectuées sur *A niger*

### III.6.2. Micromorphologie

L'observation microscopique à l'objectif 40 a montré la présence d'un hyphe cloisonné avec présence abondante de spores en amas formant ainsi la tête *Aspergillaire* noire caractéristique d'*A niger* (Figure B).

### III.7 Activité enzymatique

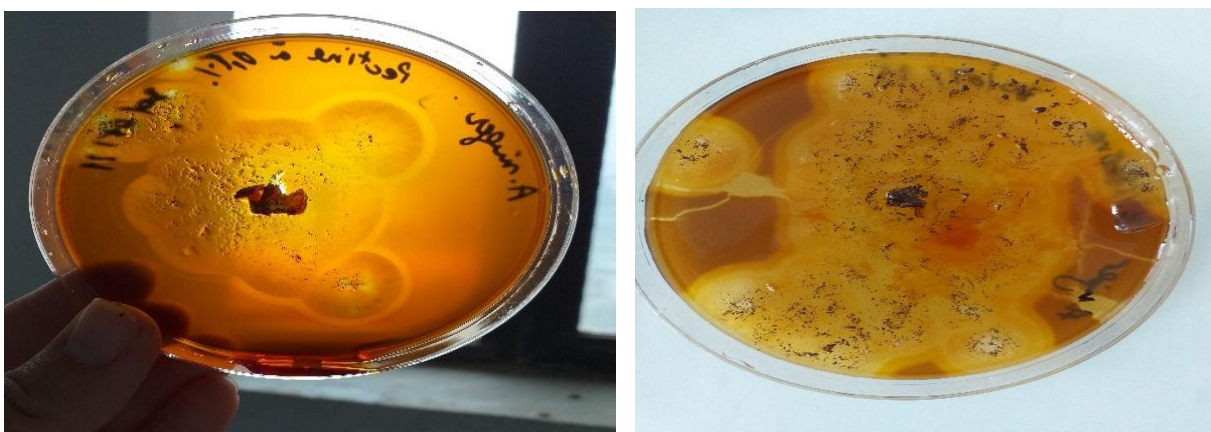
#### III.7.1 Test qualitatif de l'activité cellulolytique



**Figure N°10** : photographie révélatrice de l'activité CMCase sur gélose sélective

L'indice cellulolytique (IC) d'*A niger* utilisé dans cette étude est estimé de 1.030. **Herculano et al., (2011)** ont mesuré des IC de 1.04, 1.05, 1.07 avec *A niger*5863, *A parasiticus*5865, *A niger*5929 respectivement. Ces résultats sont obtenus à partir d'une gélose à l'extrait de malt additionné de CMC comme seule source de carbone. La colonie mycélienne envahit presque totalement la boîte au bout du 3<sup>ème</sup> jour, ensuite celle-ci est imbibée avec Lugol qui interagit avec la cellulose native en formant un complexe maron foncé révélant ainsi une zone d'hydrolyse claire **Coronado-Ruiz et al., (2018)**. ce même travail a été déjà réalisé par **Kasana et al., (2008)** ; **Hankin et Anagnostakis, (1977)** pour le screening des souches cellulolytique.

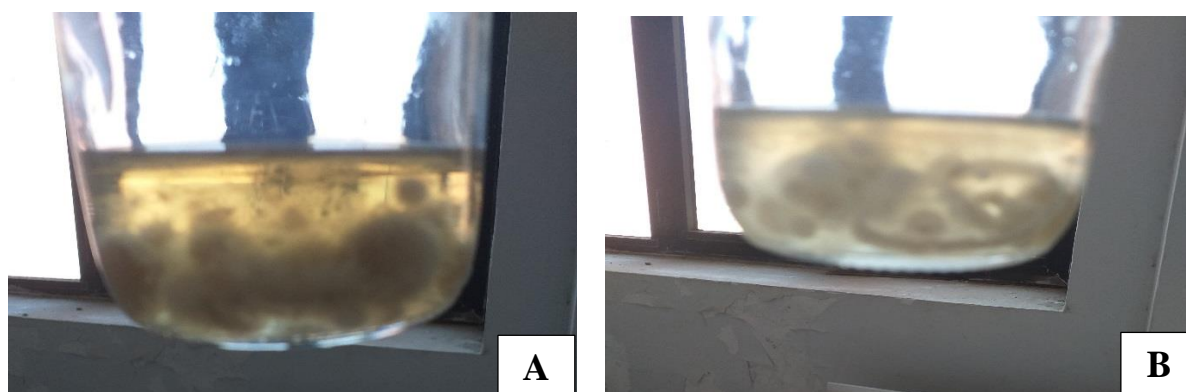
#### III.7.2. Test Qualitatif de l'activité pectinase



**Figure N°11** : Photographie révélatrice de l'activité pectinase d'*Aspergillus niger* sur gélose sélective après coloration.

Le résultat de la coloration avec Lugol montre l'apparition de zones pâles entourant les colonies fongiques témoignant ainsi de la présence d'une hydrolase extracellulaire dégradant la pectine, seule source de carbone contenant dans le milieu. Un résultat similaire été rapporté par **Anuradha et al., (2010)** en utilisant le rouge de ruthénium ;(**Jahan et al., (2017)**) et **Salehghamari et al., (2019)** en utilisant une solution d'iodide de potassium (Lugol).

### II.7.3. Test quantitatif



**Figure N°12** : photographie représentant la culture liquide d'*A niger* afin de mettre en évidence l'activité pectinase (A) et CMCCase (B)

**Tableau N°VIII** : Résultats de l'analyse quantitative

	Mandels et weber- CMC		Mandels et weber- pectine
Enzyme	CMCase	FPase	Pectinase
Activité (UI/ml)	2.40	36.02	1389.99

La culture d'*A niger* sur milieu Mandel et weber nous a permis de vérifier l'aptitude de ce champignon à produire des cellulases et de pectinases en milieu liquide à base de CMC et de pectine comme seule source de carbone.

Nous avons obtenu une activité endoglucanase (CMCase) estimée à 2.40UI/ml, les cellulases totales était de 36.02UI/ml par contre une activité pectinase importante estimé de 1389.99UI/ml. Alors que **Anuradha et al., (2010)** ont trouvé 17.8UI/ml en cultivant *A awamori* MTCC 9166 sur bouillon Czapek additionné de 1% de pectine, cette valeur est bien inférieure à la nôtre ; **Jahan Net al., (2017)** ont trouvé 540UI/ml dans leur analyse quantitative, cette activité est donnée par *Bacillus licheniformis* KIBE-IB3 cultivé sur 1% de pectine.

L'analyse quantitative de **Adeleke et al., (2012)** qui ont réalisé un screening pour la sélection de souches produisant une pectinase et une cellulase sur résidu d'orange à donner une activité endoglucanase de 15.31UI/ml, 13.11UI/ml et 13.02UI/ml qui sont supérieur à nos résultats, et

une activité polygalacturonase de 11.58UI/ml, 12.12UI/ml, et 10.17UI/ml par *Penicillium otrovenetum*, *A flavus*, *A oryzae* respectivement.

**Sudeep et al., (2020)** rapportent une activité Pase égale à 112UI/ml sur bouillon Hankin à 0.5% de pectine par *Aspergillus spp.*

Les résultats obtenus nous ont mené à la production de ces enzymes par SmF et FMS en se basant sur la capacité productrice d'*Aspergillus niger* sur milieu liquide.

**Tableau N°IX :** Résultats de la mesure des activités enzymatiques d'extraits de la FMS

Enzyme	FMS à base de pomme			FMS à base d'orange		
	CMCase	FPase	Pectinase	CMCase	FPase	Pectinase
Activité (UI/ml)	63,18	/	1389.99	Cas de contamination		

Les résultats de la fermentation en milieu solide sont présentés dans le tableau IX. Le dosage des activités est réalisé au 7<sup>ème</sup> jour de la culture après addition du tampon citrate puis mise en agitation pendant 30min avant de centrifuger à (7000rpm pendant 20min à 4°C). Le surnageant correspond à l'extrait enzymatique brute.

L'activité endoglucanase obtenue en FMS au 7<sup>ème</sup> jour est estimée à 63UI/ml contre une activité pectinase de 1389.9UI/ml, alors l'activité FPase n'est pas enregistrée sur le résidu de pomme. Les FMS à base de résidu d'orange est contaminé par le genre *Penicillium*. Les activités CMCase, FPase enregistrées par **Basal et al., (2012)** sont 1UI/ml  $\pm$  0.003 et 1.9  $\pm$  0.001 UI/ml respectivement, elles sont obtenues par la culture en FMS d'*A niger NS2* sur la PO pendant 96h. **Maldonado et Saad, (1998)** rapportent une activité pectine estérase égale à 720UI/l par culture FMS sur bagasse de canne à sucre additionné de pectine après 72h.

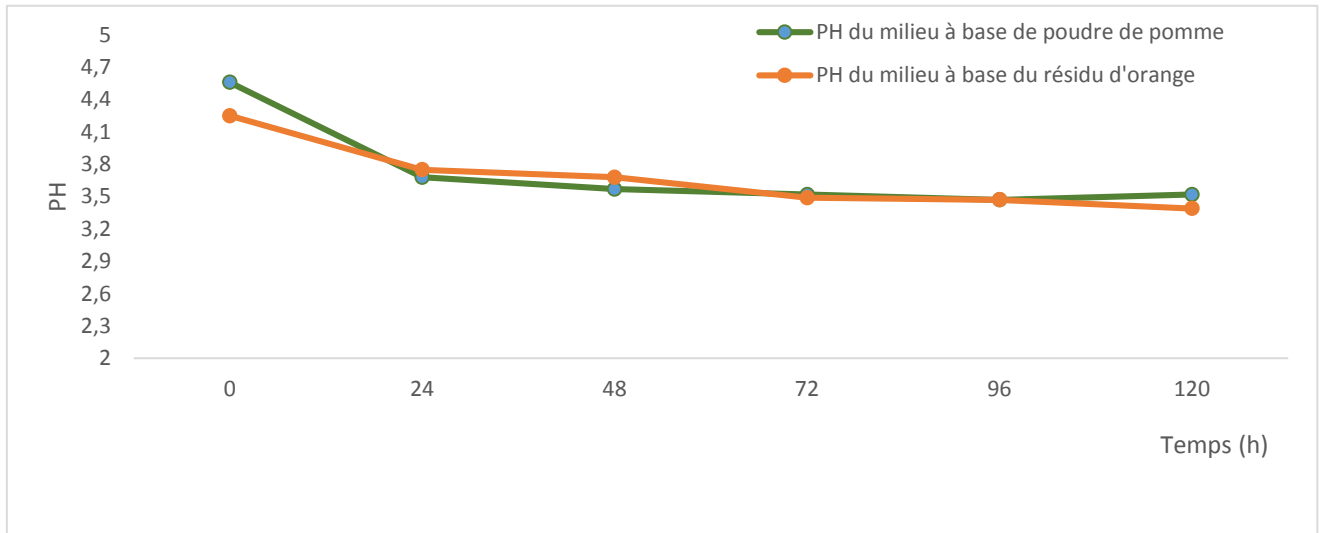
**Khan et al., (2012)** ont également apporté une activité pectinase maximale obtenue par culture FMS d'*A niger ATCC16404* à base d'un mélange de déchet (paille de blé, mosambi ou *citrus limetta*, orange, citron avec un rapport de 9 :1 :1) égale à 5.38UI/ml à 65% d'humidité.

**Dhillon et al., (2012)** ont réalisé une FMS par *A niger NRRL-567* sur milieu à base d'AP, et ont rapporté une activité FPase de 133.68  $\pm$  5.44 IU/g après 48h d'incubation en utilisant l'alcool de veratryle et le CuSO<sub>4</sub> comme inducteur et une activité CMCase estimée à 172.31  $\pm$  14.21 IU/g en utilisant le lactose comme inducteur de production de la FPase. Selon ces auteurs l'utilisation des inducteurs a pour but d'améliorer le rendement de production, néanmoins l'utilisation de CuSO<sub>4</sub> et l'alcool de veratryle est peu commune ce qui peut expliquer l'absence d'activité FPase dans notre expérience.

### III.8. Suivi des paramètres de fermentation

#### III.8.1. Évolution du pH des milieux de fermentation submergée

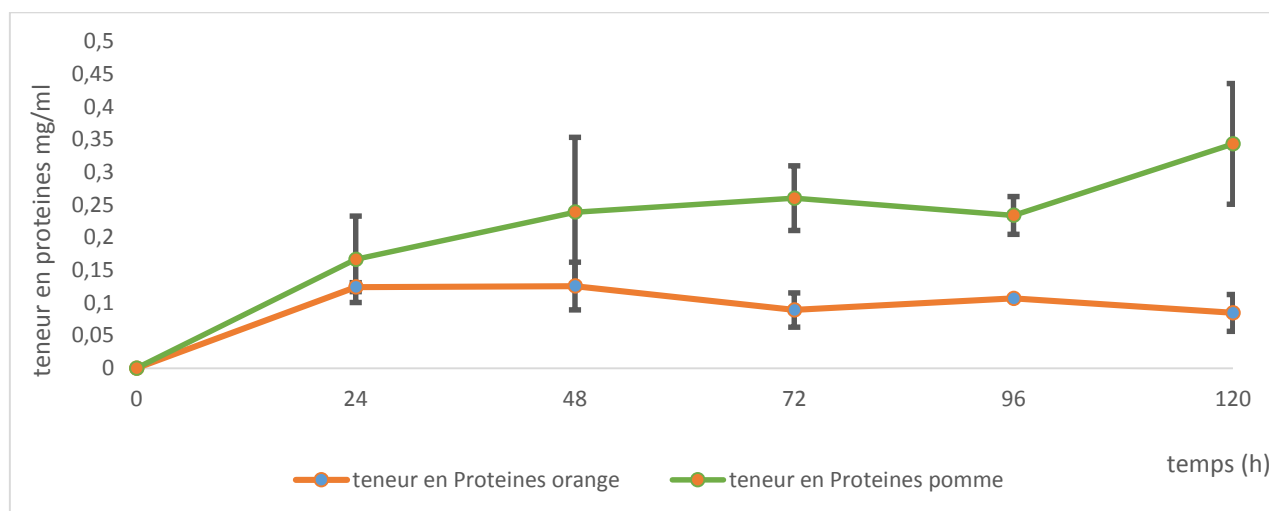
Ce paramètre nous a permis de suivre indirectement l'évolution de la croissance et de la production d'enzymes, son évolution est présenté dans la figure N°13:



**Figure N°13 :** Évolution du pH des milieux de fermentation

Le pH des milieux de fermentations submergées est suivi, il est mesuré chaque 24h, directement dans la culture submergée. Les valeurs du pH initiales des milieux de cultures était de 4.50 et 4.18 pour l'AP et la PO respectivement. Au cours de la multiplication active du mycélium, les valeurs du pH diminuent très rapidement jusqu'à 3.47 pour l'AP et 3.39 pour la PO. cette diminution est expliquée par les activités métaboliques du champignon et la sécrétion d'enzymes extracellulaires acides (cellulases, pectinases) **Roussos et Annibal, (1984)**, la variation du pH dépend fortement du microorganisme, dans le cas de champignons tel que *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* et *Rhizopus sp*, il peut diminuer fortement et atteindre des valeurs en dessous de 3 en particulier *A niger* (**Raimbault, 1998**)

### III.8.2. Évaluation des protéines totales au cours de la fermentation submergée



**Figure N°14 :** Évolution de la teneur en protéines au cours des SmF

La cinétique de la synthèse des protéines par *A niger* est établie au cours des fermentations submergées chaque 24h sur les extraits bruts. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure N°14.

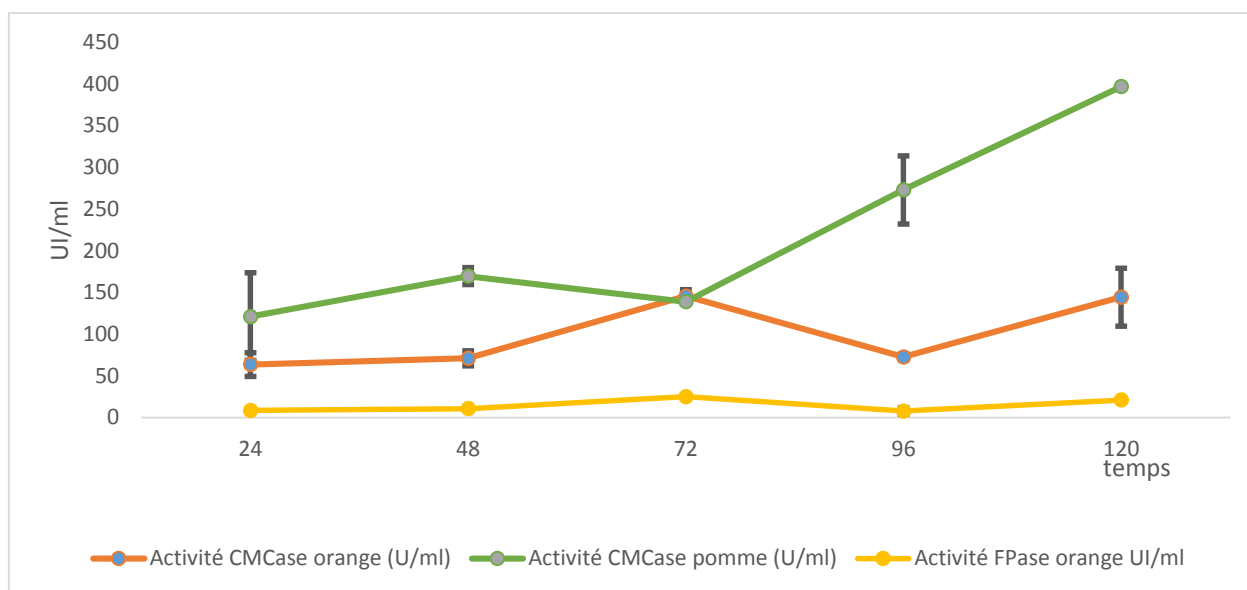
La teneur en protéines varie relativement de la même manière pour les deux extraits obtenus à partir des cultures à base de PO et l'AP jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour ou la concentration en protéines prend la même allure pour l'extrait à base de PO. Une teneur maximale de 0.125mg/ml enregistrée sur la PO est enregistrée au bout de 48h, tandis qu'elle augmente considérablement dans l'extrait à base d'AP au 5<sup>ème</sup> jour pour atteindre une valeur égale à 0.343mg/ml. Cette augmentation est expliquée par **Bensmira, (2006)** par la synthèse protéique entre autre les enzymes, ce qui corrobore avec l'augmentation de l'activité CMCCase dosée à partir du même résidu.

La diminution de la teneur en protéines sur le résidu d'orange à la 120<sup>ème</sup>h est expliquée par l'action protéolytique des protéases libérées au cours de la lyse cellulaire (**Kalisz et al., 1987**).

### III.8.3. Évolution des activités enzymatiques des extraits bruts

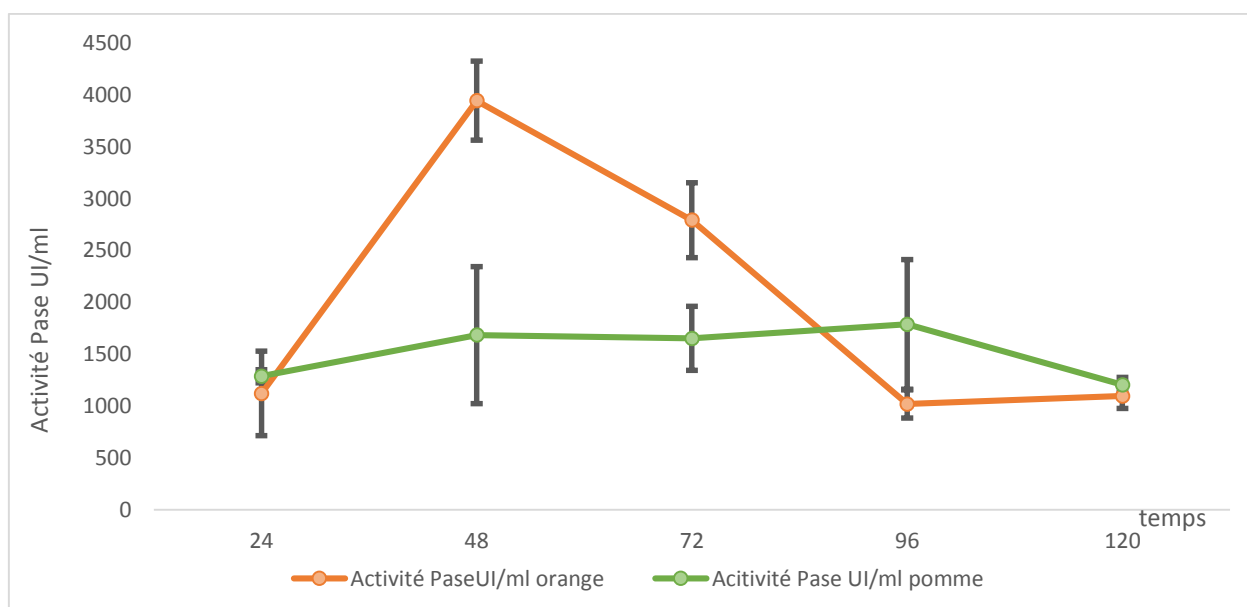
Les activités CMCCase, FPase, et pectinase obtenues de la culture d'*A niger* sur milieux liquides à base de PO et l'AP sont illustrées dans les figures N°15 et 16 :

- Activités endoglucanases (CMCase) et FPase



**Figure N° 15 :** Représentation graphique de la production des CMCase et FPase en fonction du temps sur les deux milieux.

- Activité pectinase



**Figure N° 16 :** Représentation graphique de l'activité pectinase en fonction du temps

La production des cellulases est suivie du 1<sup>er</sup> au 5<sup>ème</sup> jours, des prélèvements effectués chaque 24h. La cinétique de production des carboxyméthyl cellulases et FPase est illustrée dans la figure N°15. L'extrait brut à base de PO présente les mêmes fluctuations d'activités CMCase et FPase avec une activité maximale de 141.81UI/ml et de 25.03UL/ml enregistrée au bout de



72h respectivement. L'activité FPase minimale notées est de 7.87 UI/ml au dernier jour des fermentations.

L'activité endoglucanase (CMCase) enregistrée à partir de l'extrait enzymatique à base d'AP atteint 396.66UI/ml au 5<sup>ème</sup> jour de la culture, cette dernière s'avère meilleur sur le résidu de pomme.

L'évolution de l'activité pectinase est illustrée dans la figure N°16. Elle semble meilleure dans l'extrait enzymatique à base de PO, avec une activité maximale égale à 3945.79UI/ml après 48h. Le maximum d'activité enregistré sur l'extrait à base d'AP était 1787.13UI/ml au 4<sup>ème</sup> jour de la culture. L'endurance de l'activité pectinase sur le milieu à base d'AP est probablement due à la présence de cette enzyme dans les écorces, ce qui peut signifier que cette enzyme est peu ou pas du tout sécrété sur milieu à base d'AP. Le nombre d'unités enzymatiques qu'on a dosé représente les enzymes initialement présentes dans les rébus qui interviennent dans le murissement du fruit notamment que le séchage du résidu a été effectué à 60°C.

L'étude menée par **Djioua, (2010)** a montré une activité pectinmethylestérase (PME) estimée de 1150UI/min/mg dans la purée du Mango et une activité polygalacturonase qui augmente après traitement thermique à 50°C pendant 30min par rapport à l'échantillon témoin. Cette étude confirme la présence abondante d'enzymes dans la chaire et dans les parois des fruits.

**Beldman et al., (1984)** rapportent que les préparations cellulolytiques commercialisées de *T viride* contiennent une activité FPase égale à 39UI/g et une CMCase estimée de 370UI/g tandis que les préparations pectinolytiques commercialisées d'*A niger* renferment 740UI/g en pectinesterase et 420UI/g en polygalacturonase. Par contre **Zhong et al., (2009)** apportent une activité CMCase et pectinase qui varient entre 919-1208 UI/g, et 11713–21168 UI/g obtenus par culture FMS d'*A niger* sur milieu à base d'AP additionné de poudre des grains de Cotton ; *A foetidus* NRRL 337 a montré une activité beta glucosidase égale 900UI/kg d'AP à 30°C pendant 96h cette activité est également rapportée par **Hang et Woodans, (1994)**.

**Vázquez-Montoya et al., (2019)** mentionnent un profil de la cinétique d'activité endoglucanase (CMCase) similaire au sien. Le suivi a été établie sur culture SmF de *P funiculosum* sur milieu à base de ragout de Moringa. Une activité égale à 1683.27 ± 109.14 U/l est enregistrée.

**Zhou et al., (2011)** rapportent une activité Pase égale à 167.5UI/ml à 28°C par culture SmF d'*A niger* GJ-2 à base de PO, dans la même étude une coculture d'*A niger* GJ-2 et

*Saccharomyces cerevisiae* J1 à 37°C a montré un effet synergique entre les deux souches par conséquent une activité deux fois plus importante estimée à 512.7UI/ml. Une activité égale à 104.8UI/ml par la culture en SmF d'*A niger* à 30°C, ce résultat est rapporté par **Ali et al., (2010)**. La culture d'*A niger* sur mélange à base d'AP, farine de soja, son de blé et de maïs par culture sur milieu solide à permet de donner une activité PASE estimée de 900UI/ml après le 7<sup>ème</sup> jour, (**Begovic et Ostrovers'nik,1997**).

Les conditions de cultures tels que le pH, la durée d'incubation, la concentration en sucres, l'agitation et la température d'incubation sont des paramètres qui influent sur la culture et la production enzymatique d'un microorganisme **Al- jazairi et al., (2015)**.

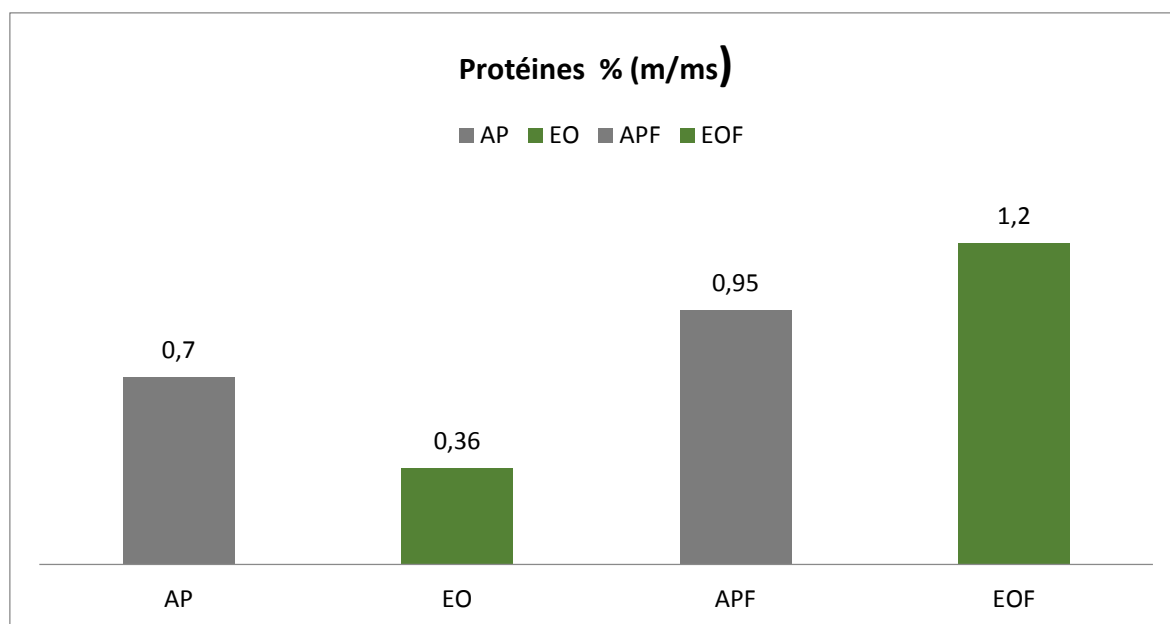
### **III.9. Caractérisation physicochimique du substrat fermenté**

Les paramètres physico chimiques du marc de pommes et résidus d'orange, après 5 jours de fermentation FMS par *Aspergillus niger*, sont illustrés dans la figure N°17. Après cette incubation, on a constaté que le mycélium s'est mieux développé sur les résidus d'orange que la pomme. Cela est peut-être dû à la viscosité élevée du marc de pomme qui peut affecter négativement la dissolution de l'oxygène limitant la vitesse de croissance comme l'explique Ahmad et Hollande (1995).

Pour mieux évaluer le rendement de la fermentation pour l'enrichissement en protéines et l'amélioration de la digestibilité des résidus, le substrat fermenté est séché dans le four pasteur à 60° jusqu'à ce qu'il ait une teneur en humidité final de l'ordre de 4.88% et 5.2% pour les résidus d'orange et de pomme respectivement. Puis, un dosage pour les protéines, les sucres réducteurs et polyphénols totaux est effectués.

#### **III.9.1. Dosage des protéines des résidus d'orange et de pomme avant et après fermentation par *Aspergillus Niger***

Les résultats de dosage de protéines dans les résidus avant et après fermentation sont représentés dans la figure N° 17 :



AP : marc de pomme, APF : marc de pomme fermenté, EO écorce d'orange, EOF : écorce d'orange fermenté.

**Figure N°17** : : Histogramme montrant les pourcentages de protéines des marcs de pomme et écorces d'orange avant et après 6 jours de la culture FMS

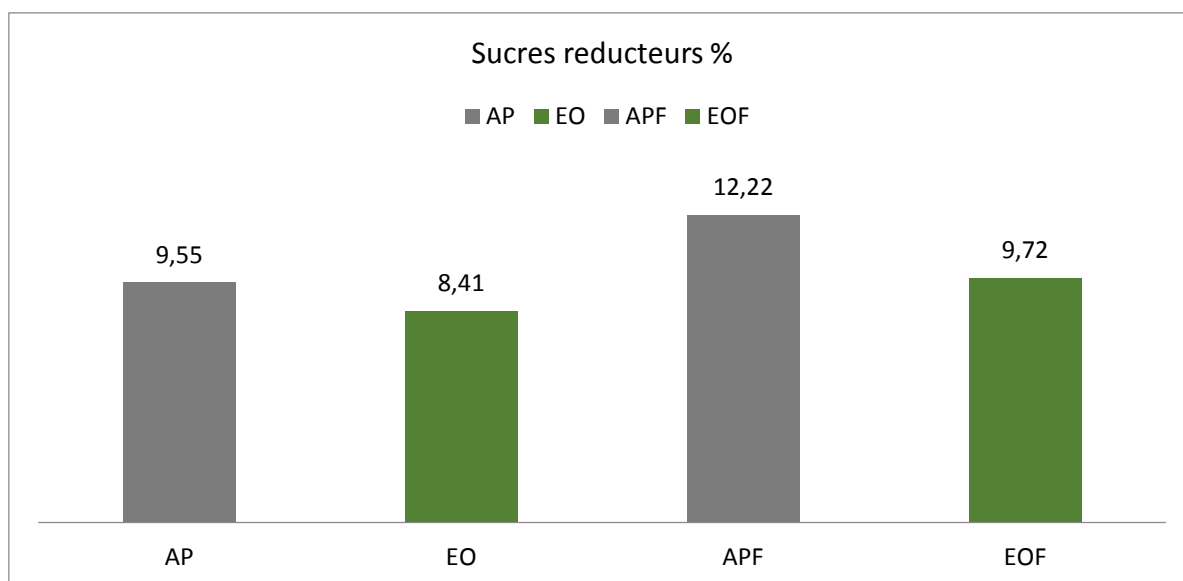
D'après les résultats obtenus, on constate que la fermentation par *Aspergillus niger* a un effet sur la teneur en protéine. Cette fermentation FMS augmente le pourcentage de protéines pour un rapport au début de 0.36% et 0.7% m/ms pour les résidus d'orange et le marc de pomme respectivement avant fermentation jusqu'à 1.2% et 0.94% après fermentation.

L'origine de cet enrichissement émane de la sécrétion des enzymes cellulolytiques et pectinolytiques de nature protéique ainsi que des protéines provenant de la lyse cellulaire du mycélium. En effet, selon Anupama et Ravindra (2000), les cellules d'algues, de champignons, de levures et de bactéries sont composées de 60% de protéines de haute qualité.

Avec une augmentation de 150% enregistrée l'EOF supérieur à celle APF est donc plus intéressante que la pomme pour une valeur de 24.3%, indique qu'EO (écorce d'orange) serait le substrat le plus approprié pour la croissance d'*Aspergillus niger* afin de produire des protéines.

### III.9.2 Dosage des sucres réducteurs des résidus d'orange et de pomme avant et après fermentation par *Aspergillus Niger*

Les résultats de dosages de sucres réducteurs dans les résidus avant et après fermentation sont représentés dans la figure N°21 :



AP : marc de pomme, APF : marc de pomme fermenté, EO écorce d'orange, EOF : écorce d'orange fermenté.

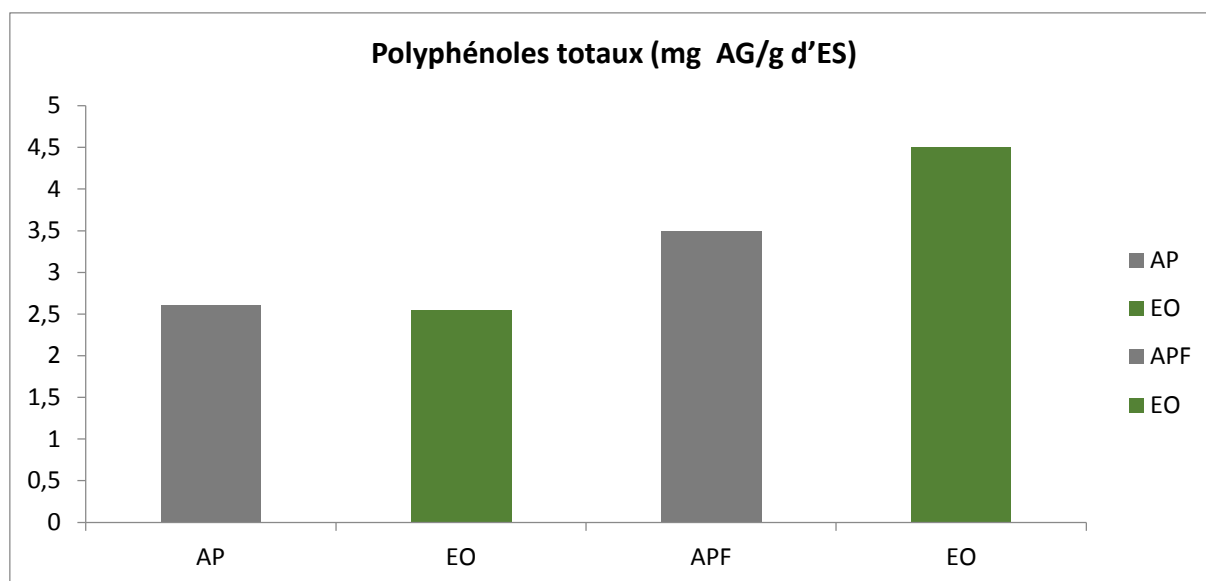
**Figure N°18 :** Histogramme montrant les pourcentages des sucres réducteurs des marcs de pomme et écorces d'orange avant et après 6 jours de culture FMS

En tenant de la caractéristique du substrat fermenté par *Aspergillus niger*, il résulte donc une légère augmentation des sucres réducteurs totaux, ce qui explique que les niveaux élevés des polysaccharides y compris la cellulose, ont été dégradés. Cela conduit, en effet, à l'augmentation de la digestibilité des résidus (Villas-Bôas et al., 2003)

Des sucres réducteurs, due éventuellement à l'utilisation du champignon qui, cette légère augmentation au niveau serait avantage puisque'il évite tout risque d'alcoolémie chez le bétail après son ingestion.

### III.9.3. Dosage des polyphénols dans les résidus d'orange et de pomme avant et après fermentation par *Aspergillus Niger*

Les résultats des dosages sont représentés dans la figure N°19 :



AP : marc de pomme, APF : marc de pomme fermenté, EO écorce d'orange, EOF : écorce d'orange fermenté.

**Figure N°20** : Histogramme montrant les concentrations des polyphénols des marcs de pomme et d'écorces d'orange avant et après culture

Les résultats indiquent que la fermentation par *Aspergillus Niger* produit de l'effet sur la teneur en polyphénols. En effet, cette fermentation augmente les concentrations des polyphénols qui sont de 25,5 (mg EQ. AG/g d'ES) et 26,1 (mg EQ. AG/g d'ES) pour les résidus d'orange et le marc de pomme respectivement avant fermentation qui augmentent jusqu'à 4.52 mg EQ et 3.54 mg AG/g d'ES.

Selon (Zaidi et *al.*, 2009), une fraction importante des composés phénoliques, solubilisés par les solvants, sont fortement liés à la cellulose, soit 2/3 des composés phénoliques totaux. Donc, cette augmentation des concentrations après culture peut être due à la libération des polyphénols liés à la cellulose ou autre type de polysaccharides ou encore de lipide, suite à leur dégradation par des cellulases, lipases, estérases ou autres glucanases produites par le champignon *Aspergillus Niger*.

En somme, l'ensemble des résultats obtenus de l'enrichissement des protéines, le dosage des sucres réducteurs et polyphénols totaux avant et après fermentation favorisent l'amélioration de la valeur nutritionnelle du marc de pomme et écorce d'orange ainsi que leur digestibilité dans en cas d'utilisation dans l'alimentation bétail.

## **Conclusion et perspectives**

Le présent travail a pour objectif d'abord, la détermination des propriétés biochimiques des sous-produits agricoles majeurs, générés par la SPA AGRANA FRUIT, qui sont : le marc de pomme et l'écorce d'orange, et ensuite, les valorisés à travers des fermentations à l'état solide et submergée par le champignon *A. niger*. À travers la croissance de ce dernier sur ces résidus s'exprime la possibilité de les recyclés par fermentation solide et submergée afin de produire des enzymes hydrolases exo-cellulaires.

Un séchage à 60°C a été effectué pour accroître la conservation de ces sous-produits qui sont de nature très périssable.

Les résultats obtenus, après analyse microbiologique des résidus effectuée avant le séchage, ensuite, après le séchage, et enfin, après trois mois de conservation, montrent l'effet important du séchage sur l'élimination ou la diminution de la charge microbienne en particulier la FTAM, les levures et moisissures.

L'analyse physico-chimique des poudres des résidus indiquent un potentiel de conversion en produits comestibles par les animaux étant une source riche en glucides, en minéraux et en composés phénoliques. Ainsi, leur richesse en éléments nutritifs notamment, en fibres insolubles principalement : la cellulose et la pectine qui peuvent servir d'inducteurs de production de cellulases, pectinases et d'enzymes alliées est un atout. Par contre, elles sont pauvres en protéines et matières azotées.

Ces sous-produits agricoles ont été utilisés par la suite comme substrats pour la culture du champignon filamentueux : *Aspergillus niger*, par fermentation liquide et solide dans le but de produire des enzymes à activités cellulolytiques et pectinolytiques, et ce après culture sur milieu solide MW (contenant la CMC, pectine) et en utilisant le Lugol comme indicateur de dégradation.

La caractérisation des sous-produits après fermentation par la souche *Aspergillus niger* est réalisée par la mesure de leur teneur en protéine, puis à une extraction des composés phénoliques. Des résultats satisfaisants notamment pour les polyphénols ont été obtenus.

L'application de la technologie d'extrusion et de fermentation pourrait améliorer efficacement la valeur nutritionnelle du marc de pommes et l'écorce d'orange et promouvoir l'utilisation efficace de ces derniers.

Les applications biotechnologiques sur des sous-produits agroalimentaires sont intéressantes non seulement du point de vue de leur nature de substrat à faible coût, mais aussi dans la résolution des problèmes liés à l'élimination des résidus, source de pollution.

Plusieurs variables opérationnelles doivent être considérés et optimisés afin d'utiliser efficacement ces sous-produits dans les bioprocédés tels que : type de souche, conception du réacteur, aération, pH, humidité et additifs. En effet, ces quelques exemples de variables sont cruciaux pour la viabilité économique lors de l'utilisation du marc de pommes et les résidus d'orange comme substrat pour la biotechnologie.

Les résultats modestes et préliminaires obtenus durant ce travail, peuvent servir comme départ pour des nouvelles perspectives afin d'ouvrir de récentes pistes de recherches dans le domaine de la production d'enzymes à l'échelle industrielle :

- Optimisation des paramètres de production de cellulases et de pectinases (pH, % d'humidité, additifs...);
- Estimation du rendement en enzymes à partir de ces résidus ;
- Réaliser des fermentations en coculture pour une hydrolyse complète du substrat carboné ;
- Caractérisation complète de l'enzyme : PH, température optimums ;
- Purification des enzymes produites destinée à usage pharmaceutique ;

Ainsi la présente étude indique de nouvelles pistes de recherches dans le domaine de valorisation des résidus agroalimentaires dans l'alimentation bétail par exemple.

# **Références bibliographiques**



**-A-**

**Ackar, Jozinović, A., Babić, J., Miličević, B., Balentić, JP, & Šubarić, D. (2018).** Résoudre le problème de la mauvaise expansion des extrudés de maïs enrichis en sous-produits de l'industrie alimentaire. *Sciences alimentaires innovantes et technologies émergente*, 47, 517-524.

**Adeleke, AJ, Odunfa, SA, Olanbiwonninu, A., & Owoseni, MC (2012).** Production de cellulase et de pectinase à partir d'écorces d'orange par des champignons. *Nature et Science*, 10 (5), 107-112. 524.

**AFNOR (NF), (1981).** Recueil de normes française des produits dérivés des fruits et légumes.

**Ahmad, MN, & Holland, CR (1995).** Cinétique de croissance d'une protéine unicellulaire dans des fermenteurs discontinus. *Journal of Food Engineering*, 26 (4), 443-452.

**Ahmed, I., et al., (2016).** Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2015.11.003>

**Alarcon-Rojo, A. D., Lucero, V., Carrillo-Lopez, L., & Janacua, H. (2019).** Use of apple pomace in animal feed as an antioxidant of meat. *South African Journal of Animal Science*, 49(1), pp131-139.

**Al-Jazairi, M., Abou-Ghorra, S., Bakri, Y., & Mustafa, M. (2015).** Optimization of  $\beta$ -galactosidase production by response surface methodology using locally isolated *Kluyveromyces marxianus*. *International Food Research Journal*, 22(4).

**Anand G., Yadav S., Gupta R., Yadav D., (2020).** Chapitre 14 • Pectinases: from microbes to Industries in *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*: pp287-312, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819001-2.00014-0>

**Anisa S.K., Ashwini S., Girish K, (2013).** Isolation and Screening of *Aspergillus* spp. for Pectinolytic Activity, *Electronic Journal of Biology*, Vol. 9(2):37-41

**Anupama, and Ravindra, P. (2000).** Value-added food: single-cell protein. *Biotechnol. Adv.* 18: pp459-479.

**Anuradha, K., Padma, P. N, Venkateshwar S, Reddy G, (2010).** Fungal isolates from natural pectic substrates for polygalacturonase and multienzyme production, *Indian J Microbiol* 50: pp 339-344. DOI: 10.1007/s12088-010-0054-5

**-B-**

**Bachelier, G., et Gavinelli, R., (1966).** Dosage global des glucides du sol Par les méthodes colorimétriques A l'antrone et a l'orcinole, *Cah. ORSTO/ti. sér. Pédol.* vol. IV, 3.

**Bampidis, V. A., & Robinson, P. H., (2006).** Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 128(3-4), 175-217

**Bansal, N., Tewari, R., Soni, R., & Soni, S. K., (2012).** Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste management*, 32(7), 1341-1346.

**Barbosa-Cánovas, G. V., & Vega-Mercado, H. (1996).** *Dehydration of foods*. Springer Science & Business Media

**Beldman G, F. M. Rombouts, A. G. J. Voragen and W. Pilnik, (1984).** Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass. *Enzyme Microb. Technol.*, 1984, vol. 6 : pp 503-506.

**Bensmira, S., & Meraihi, Z. (2006).** Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (sol et sebkha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel (Doctoral dissertation, Université Mentouri Constantine).

**Boumendjel, A., Boumendjel, M., & Ladjama, A. (2015).** Etude des activités pectinase, lyase et  $\alpha$ -amylase dans une souche locale d'*Aspergillus species*.

-C-

**Camassola, M., & Dillon, A. J. P. (2012).** Cellulase determination: modifications to make the filter paper assay easy, fast, practical and efficient. *Open Access Scientific Reports*, 1(1), 1-4.

**Carson, J., Collins, J.L., Penfield, M.P., (1994).** Unrefined, Dried Apple Pomace as a Potential Food Ingredient, Volume 59, No. 6, JOURNAL OF FOOD SCIENCE-1213

**Carvalho LMJ, De Castro IM, Da Silva CAB (2008).** A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merrill) by micro- and ultra-filtration. *J Food Eng* 87(4):447-454.

**Chandrasekaran, M., & Bahkali, A. H. (2013).** Valorization of date palm (*Phoenix dactylifera*) fruit processing by-products and wastes using bioprocess technology—Review. *Saudi journal of biological sciences*, 20(2), 105-120.

**Combo, A. M. M., Aguedo, M., & Paquot, M. (2011).** Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(1), 153-164.

**Coutouly G. (1991).** Genie enzymatique une introduction. Masson et Doin. Paris, p 243

**CTFL N°42, (2016).** Les points sur les outils de mesure de la qualité sur fruits et légumes. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, p8.

-D-

**Demiray, E., Kut, A., Karatay, S. E., & Dönmez, G. (2021).** Usage of soluble soy protein on enzymatically hydrolysis of apple pomace for cost-efficient bioethanol production. *Fuel*, 289, 119785

detect cellulase activity of microorganisms. *Journal of General Microbiology*.

**Dhillon, G. S., Kaur, S., Brar, S. K., & Verma, M. (2012).** Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 38, 6-13.

**Dhillon, GS, Brar, SK, Kaur, S., & Verma, M. (2013).** Criblage de déchets agro-industriels pour la bioproduction d'acide citrique par *Aspergillus niger* NRRL 2001 par fermentation à l'état solide. *Journal de la science de l'alimentation et de l'agriculture*, 93 (7), 1560-1567.

**Dhillon, G. S., Kaur, S. and Brar, S. K. (2013).** Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 789-805.

**Djioua, T., (2010).** Amélioration de la conservation des mangues 4ème gamme par application de traitements thermiques et utilisation d'une conservation sous atmosphère modifiée. *Sciences agricoles*. Université d'Avignon, Français. [\(NNT : 2010AVIG0628\)](#). [\(tel-00544995\)](#)

**Doukani, K., & Tabak, S. (2015).** Profil Physicochimique du fruit "Lendj" (*Arbutus unedo* L.). *Nature & Technology*, (12), 51.

**Downes, F. P., & Ito, K. (2001).** Compendium of methods for the microbiological examination of foods Washington (676 p.). USA: American Public Health Association.

**Duchiron, F., Copinet, L. E. (2019).** Fermentation en milieu solide (FMS), Fermentation en milieu solide dans : *TECHNIQUE DE L'INGENIEUR*, Réf BIO620V2, p 15.

**-E-**

**El Enshasy, HA, Elsayed, EA, Suhaimi, N., Abd Malek, R., & Esawy, M. (2018).** Optimisation des bioprocédés pour la production de pectinase à l'aide d'*Aspergillus niger* dans un système de culture immergé. *BMC biotechnologie* , 18 (1), 1-13.

**Elfiati, D., Susilowati, A., Modes, C., & Rachmat, HH (2019).** Identification morphologique et moléculaire des champignons cellulolytiques associés aux espèces locales de raru. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* , 20 (8).

**Abd El-Rahim., W.M, Moawad, H., Hashem, M.M., Gebreil, G.M., & Zakaria, M. (2020).** Producteurs de pectinase et de laccase fongiques hautement efficaces parmi les isolats de la liqueur de rouissage du lin. *Biocatalyse et biotechnologie agricole* , 25 , 101570.

**Ertunç F. (2019).** Coat protein variability of Apple mosaic virus isolates from different plant hosts. *Int J Agric for Life Sci*; 3:247–51.

**Escarpa, A., & Gonza'lez, M. C. (1988).** High performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of Chromatography*, 823, pp 331–337.

**Eveleigh D E, Mandels M, Andreotti R. and Roche C (2009),** Measurement of saccharifying cellulase in *Biotechnology for biofuels* 2:21, p8.

**-G-**

**Garau, M. C., Simal, S., Rossello, C., & Femenia, A. (2007).** Effect of air-drying of orange (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) by-products. Food chemistry, temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity

**Ghose T.K. (1987).** Measurement of cellulose activities. *Pure and Appl. Chem*, vol.59.

**Gonelimali, F. D., Szabó-Nótin, B., & Máté, M. (2021).** Optimal drying conditions for valorization of industrial apple pomace: Potential source of food bioactive compounds. *Progress in Agricultural Engineering Sciences*, 17(S1), 69-75.

**González-García, L. Argiz, P. Míguez, B. Gullón (2018),** Exploring the production of Bio-Succinic acid from Apple Pomace using 1 an Environmental approach, *Chemical Engineering Journal*

**Gouveia L et Passarinho P.C, (2017).** Chapter 4 Biomass Conversion Technologies: Biological/Biochemical Conversion of Biomass, Bioenergy Unit, Laboratório Nacional de Energia e Geologia, pp 99-111. DOI 10.1007/978-3-319-48288-0\_4

**Grigoraş Cristina- Gabriela. (2012)** Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs. Sciences agricoles. Université d'Orléans,

**Guillou, M. (2013).** Vers des agricultures doublement performantes qui concilient compétitivité et respect de l'environnement.

**Guirand JP, (2003).** Microbiologie Alimentaire. Edition : Dunod. Paris.

**Gurpreet S.D, Surinder K, Satinder K.B, Mausam V, (2012).** Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation, *Industrial Crops and Products* 38, pp 6– 13

**Gustafsson, J.; Landberg, M.; Bátori, V.; Åkesson, D.; Taherzadeh, M.J.; Zamani, (2019)** Development of Bio-Based Films and 3D Objects from Apple Pomace. *Polymers*, 11, 289

**-H-**

**Han W, He M (2010).** The application of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw decomposition. *Bioresour Technol* 101(10):3724–3731

**Hang, YD et Woodams, EE (1994).** Le marc de pomme : un substrat potentiel pour la production d'-glucosidase par *Aspergillus foetidus*. *LWT-Science et technologie alimentaires* , 27 (6), 587-589.

**Hang, YD et Woodams, EE (1995).** Production de -Fructofuranosidase par les espèces *Aspergillus* à partir de marc de pomme. *LWT-Science et technologie alimentaires* , 28 (3), 340-342.

**Hankin, L., & Anagnostakis, SL (1977).** Milieu solide contenant de la carboxyméthylcellulose pour détecter l'activité cellulase Cx des micro-organismes. *Microbiologie* , 98 (1), 109-115.

**Herculano P N, Lim D M M, Fernandes M J S, Neves R P, Souza-Motta. C M, & Porto, ALF (2011).** Isolement de champignons cellulolytiques à partir de déchets de ricin (*Ricinus communis* L.). *Microbiologie actuelle* , 62 (5), pp1416-1422.

**Hoondal, G., Tiwari, R., Tewari, R., Dahiya, NBQK et Beg, Q. (2002).** Les pectinases alcalines microbiennes et leurs applications industrielles : une revue. *Microbiologie appliquée et biotechnologie* , 59 (4), 409-418.

**Huet, R. (1962).** Les flavonoïdes d'agrumes. *Fruits*, 17(6), 251-256.

**-I-**

**Issar, K., Sharma, P. C., Gupta, A. (2017).** Utilization of apple pomace in the preparation of fiber-enriched acidophilus yoghurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), e13098.

**-J-**

**Jahan, N., Shahid, F., Aman, A., Mujahid, TY, & Qader, SAU (2017).** Utilisation de pectine de déchets agricoles pour la production de polygalacturonase d'importance industrielle. *Heliyon* , 3 (6), e00330.

**JORA n°01.** Loi n° 01 - 19 du 12 décembre 2001 relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets *Journal Officiel de la République Algérienne*, pp. 11-27

**Joshi V K, Parmar M and Rana N S, (2006).** Pectin Esterase Production from Apple Pomace in Solid-State and Submerged Fermentations, *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2), pp 253–256

**Joshi VK, Parmar M, Rana N, (2011).** Purification and characterization of pectinase produced from apple pomace and evaluation of its efficacy in fruit juice extraction and clarification. *Int J Nat Prod Res* 2: 189-197.

**Joshi, VK et Sandhu, DK (1996).** Préparation et évaluation d'un sous-produit d'alimentation animale issu de la fermentation à l'état solide de marc de pomme. *Technologie des bioressources* , 56 (2-3), 251-255.

**-K-**

**Kalisz, HM, Wood, DA et Moore, D. (1987).** Production, régulation et libération de l'activité protéinase extracellulaire chez les champignons basidiomycètes. *Transactions de la British Mycological Society*, 88 (2), 221-227.

**Karmakar M, Ray RR (2011).** Current trends in research and application of microbial cellulases. *Res J Microbiol* 6(1): p41

**Kasana R C, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A, (2008).** A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine in *Curr Microbiol* 57: pp 503–507, DOI 10.1007/s00284-008-9276-8

**KC, S., Upadhyaya, J., Joshi, DR, Lekhak, B., Kumar Chaudhary, D., Raj Pant, B., ... & Raghavan, V. (2020).** Production, caractérisation et application industrielle de l'enzyme pectinase isolée de souches fongiques. *Fermentation*, 6 (2), 59.

**Ketipally, R., Kumar, GK et Ram, MR (2019).** Production de polygalacturonase par *Aspergillus nomius* MR103 en fermentation à l'état solide à partir de déchets agro-industriels. *Journal of Applied and Natural Science* , 11 (2), 305-310.

**Khairnar, Y., Krishna, VK, Boraste, A., Gupta, N., Trivedi, S., Patil, P., ... & Mishra, D. (2009).** Etude de la production de pectinase en fermentation immergée à l'aide de différentes souches d'*Aspergillus niger*. *Journal international de recherche en microbiologie* , 1 (2), 13.

**Khan, A., Sahay, S., & Rai, N. (2012).** Production and optimization of Pectinase enzyme using *Aspergillus niger* strains in Solid State fermentation. *Research in Biotechnology*, 3(3).

**Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. and Vladimir-Knez EICS, (2004).** Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.* 54: pp 65-72.

**Koser, S., Anwar, Z., Iqbal, Z., Anjum, A., Aqil, T., Mehmood, S., & Irshad, M. (2014).** Utilization of *Aspergillus oryzae* to produce pectin lyase from various agro-industrial residues. *Journal of radiation research and applied sciences*, 7(3), 327-332.

**Koyani, R. D., & Rajput, K. S. (2015).** Solid state fermentation: comprehensive tool for utilization of lignocellulosic through biotechnology. *J Bioprocess Biotech*, 5(258), 1-15.

**Kubra, K. T., Ali, S., Walait, M., & Sundus, H. (2018).** Potential applications of pectinases in food, agricultural and environmental sectors. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci*, 6, 23-34.

**Kubrak, OI, Rovenko, BM, Husak, VV, Storey, JM, Storey, KB et Lushchak, VI (2012).** Le nickel induit une hyperglycémie et une glycogénolyse et affecte le système antioxydant dans le foie et le muscle blanc du poisson rouge *Carassius auratus* L. *Ecotoxicologie et sécurité environnementale*, 80 , 231-237.

**Kuhad, R. C., Mehta, G., Gupta, R., & Sharma, K. K. (2010).** Fed batch enzymatic saccharification of newspaper celluloses improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, 34(8), 1189-1194.

-L-

**Lachapelle, J. (2004).** Microscopie, méthodes d'examen, colorations. *Revue du Cercle de Mycologie de Bruxelles*, 4, 35-71.

**Lagha-Benamrouche, S., Addar L., H Boudershem, H., Tani S., Madani, K., (2017).** Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles, *Nature & Technology*. <http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

**Lakshmikant, (1990).** Cellulose degradation and cellulase activity of five cellulolytic fungi, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 6, pp 64-66.

**Lanouari S, Nasser B, El Haddoury J, & Bencharki B. (2015).** Caractérisation physico-chimique des graines de blé tendre (*Triticum aestivum*) sous traitement herbicide par l'acide 2, 4-dichlorophénoxyacétique [Physicochemical characterization of the seeds of bread wheat

(Triticum aestivum) under herbicide treatment with 2, 4- dichlorophenoxyacetic acid]. International Journal of Innovation and Applied Studies; 10(2), p 604.

**Leyral, G. (1997).** Microbiologie et toxicologie des aliments.

**Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006).** Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182-188.

**Liu, M. Q., Guan, R. F., Dai, X. J., Bai, L. F., & Pan, L. (2012).** Optimization of solid-state fermentation for acidophilic pectinase production by *Aspergillus niger* JI-15 using response surface methodology and oligogalacturonate preparation. *American J. Food Technol*, 71, 656-667.

**Liu, Y., Heying, E. et Tanumihardjo, SA (2012).** Histoire, distribution mondiale et importance nutritionnelle des agrumes. Examens complets de la science alimentaire et de la sécurité alimentaire, 11 (6), 530-545.

**Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL et Randall, RJ (1951).** Mesure des protéines avec le réactif Folin phénol. Journal de chimie biologique , 193 , 265-275.

**-M-**

**Maintinguer, S.I., (2017).** Potential of bio hydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. *Waste Manag.* 59, 181-193

**Mandels M, Weber J, (1969).** The production of cellulases. In: **Hajny. G. et al.,** Cellulases *Microbiol.* 62. pp1416-1422.

**Miller, GL (1959).** Utilisation du réactif acide dinitrosalicylique pour la détermination du sucre réducteur. *Chimie analytique*, 31 (3), 426-428.

**Min, B., Bae, IY, Lee, HG, Yoo, SH et Lee, S. (2010).** Utilisation de matières enrichies en pectine à partir de marc de pomme comme substitut de graisse dans un système alimentaire modèle. *Technologie des bioressources* , 101 (14), 5414-5418.

**Mkaouar, 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, 26-30.

**Mohandas, A., Raveendran, S., Parameswaran, B., Abraham, A., Athira, RS, Kuruvilla Mathew, A., & Pandey, A. (2018).** Production de pectinase à partir de *Bacillus sonorensis* MPTD1. *Technologie alimentaire et biotechnologie*, 56 (1), 110-116.

**Mrudula, S., & Anitharaj, R. (2011).** Pectinase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. *Global journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(2), 64-71.

**-N-**

**Ngadi, M. O., & Correia, L. R. (1992).** Kinetics of solid-state ethanol fermentation from apple pomace. *Journal of food engineering*, 17(2), 97-116

**Ngadi, M. O., & Correia, L. R. (1992).** Solid state ethanol fermentation of apple pomace as affected by moisture and bioreactor mixing speed. *Journal of food science*, 57(3), 667-670 a. No 2, pp 221-227

**Norme CODEX STAN 296 (2009).** Pour les confitures, gelées et marmelade, pp. 2-3.

**Norme ISO 4832 (2006).** Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour le dénombrement des coliformes - méthode par comptage des colonies.

**Norme ISO 4833-1 (2013).** Microbiologie alimentaire - Méthode horizontale pour démembrement des microorganismes

**Ntuli V., Mekibib S. B., Molebatsi N., Makotoko M., Chatanga P., Asita.O. A., (2013).** Microbial and Physicochemical Characterization of Maize and Wheat Flour from a Milling Company, Lesotho. *Int. Journal of Food Safety*, 15: 11-19.

nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and*

**-O-**

**Omojasola, P. F., & Jilani, O. P. (2008).** Cellulase production by *Trichoderma longi*, *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* cultured on waste materials from orange. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(20), 2382-2388.

**Ortiz, G. E., Ponce-Mora, M. C., Nosedá, D. G., Cazabat, G., Saravalli, C., López, M. C., ... & Albertó, E. O. (2017).** Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(2), 197-211.

**-P-**

**Paganini, C., Nogueira, A., Silva, N. C., & Wosiacki, G. (2005).** Utilization of apple pomace for ethanol production and food fiber obtainment. *Ciência e Agrotecnologia*, 29(6), 1231-1238.

**Dhevagi, P., Ramya, A., Priyatharshini, S., Geetha Thanuja, K., Ambreetha, S., & Nivetha, A. (2021).** Industrially Important Fungal Enzymes: Productions and Applications. In *Recent Trends in Mycological Research* (pp. 263-309). Springer, Cham.

**Pirmohammadi, R., Rouzbehan, Y., Rezayazdi, K., Zahedifar, M. (2006)** *Chemical composition, digestibility and in situ degradability of dried and ensiled apple pomace and maize silage.* *Small Ruminant Research.*, 66, (1-3), 150-155.

**Praloran J C, (1971).** Les agrumes techniques agricoles et production tropicale. Ed Maisonneuve et Larose, Paris, 561p.

**Protocole RAGT Énergie MON-ANA-19 & Norme ISO 18122, (2018).** Procédure analytique de la mesure du taux de cendres- fiche 18, Réf. : 010367-18, pp 1-2.

**Protocole RAGT Énergie MON-ANA-21 & Norme ISO 18134, (2016).** Protocole analytique de mesure de l'humidité à l'étuve selon l'ISO 18134-1- fiche 16, pp 1-2.

**-R-**

**R. G. BATES and R. A. DURST, (1985).** Definition of pH scales, standard reference values, measurement of pH and related terminology, *pure & App. Chem.*, Vol. 57, No. 3, pp 534-535.

**Raimbault.M.(1998).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation.

**Ramade, F. (2008).** *Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité.* Dunod

**Ramaswamy, H., & Marcotte, M. (2006).** Thermal processing. *Food processing: principles and applications.* *CRC Press, New York*, 67-168.

**Rangarajan, V., Rajasekharan, M., Ravichandran, R., Sriganesh, K., & Vaitheeswaran, V. (2010).** Pectinase production from orange peel extract and dried orange peel solid as substrates using *Aspergillus niger*. *Int J Biotechnol Biochem*, 6(3), 445-453.

**Reddy P L and Sreeramulu A, (2012).** Isolation, identification and screening of Pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 1(3): 1-10.

- Rivas, B., Torrado, A., Torre, P., Converti, A., & Domínguez, J. M. (2008).** Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2380-2387.
- Robinson, T., Chandran, B., & Nigam, P. (2002).** Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw. *Water research*, 36(11), 2824-2830.
- Rosales, E., Pazos, M., & Sanromán, M. Á. (2018).** Fermentation à l'état solide pour les applications alimentaires. Dans *Développements actuels de la biotechnologie et de la bio-ingénierie* (pp. 319-355). Elsevier.
- Roussos, S. (1982).** Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. I : " screening" des souches cellulolytiques.
- Roussos, S., Hannibal, L. (1984).** Valorisation biotechnologique de la bagasse par la production au niveau pilote d'enzymes de champignons filamenteux. Compte Rendu Final d'une Recherche. *ORSTOM*. 1-48.
- Rozier JVC, Bolinot F. (1985).** Bases Microbiologiques de l'Hygiène desAliments, pp188-189.

-S-

- Salehghamari, E., Nasrollahzadeh, Z., Tahmaseb, M., & Amoozegar, MA (2019).** Enzyme pectinase de *Streptomyces coelicoflavus* GIAL86 isolée du lac salé de Meyghan, Arak, Iran. *Journal international de biologie aquatique* , 7 (2), 106-111.
- Schiever, S., Patil, S.B. (2008).** Pectin-rich fruit wastes as biosorbents for heavy metal removal: Equilibrium and kinetics. *Bioresource Technology.*, 99, (6), 1896-1903
- Seyis, I., Aksoz, N. (2005).** Xylanases production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen sources. *Food Technology and Biotechnology.*,43, (1), 37-40
- Shalini, R., & Gupta, D. K. (2010).** Utilization of pomace from apple processing industries: a review. *Journal of food science and technology*, 47(4), 365-371.
- Singh, R. S., Chauhan, K., Kaur, K., & Pandey, A. (2020).** Statistical optimization of solid-state fermentation for the production of fungal inulinase from apple pomace. *Bioresource Technology Reports*, 9, 100364.
- Singleton V., L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R., M., (1999).** Analysis of total phenols and otheroxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol*, Vol. (299), p 152.
- Spinnler H., (2013).** Enzymes d'intérêt pour la fabrication d'aliments. Dans : *Biotech pour les systèmes agricoles et alimentaires* Réf : BIO650, V1. [en ligne] disponible sur : <https://www-techniques-ingenieur-fr.snd11.arn.dz/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/procedes-biochimiques-et-chimiques-en-agroalimentaire-42431210/enzymes-d-interet-pour-la-fabrication-d-aliments-bio650/>(consulté le 23/06/2020)
- Sun, H., Ge, X., Hao, Z. et Peng, M. (2010).** La production de cellulase par *Trichoderma* sp. sur marc de pomme en fermentation à l'état solide. *Journal africain de biotechnologie* , 9 (2).
- Sudha M L et al., (2006).** Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making *Food Chemistry* 104 : pp 686–692
- Suman, V., & Raju, K. J. (2016).** Studies on the production and optimization of pectinase by *Aspergillus Niger* NCIM 616 using mixed substrate under solid state fermentation. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences (JCBPS)*, 7(1), 256.



**Sun, J., Hu, X., Zhao, G., Wu, J., Wang, Z., Chen, F. et Liao, X. (2007).** Caractéristiques du séchage infrarouge en couche mince de marc de pomme avec et sans pré-séchage à air chaud. *Food Science and Technology International*, 13 (2), 91-97.

-T-

**Tripodo, M. M., Lanuzza, F., Micali, G., Coppolino, R., & Nucita, F. (2004).** Citrus waste recovery: a new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. *Bioresource Technology*, 91(2), 111-115.

-V-

**Vázquez-Montoya, EL, Castro-Ochoa, LD, Maldonado-Mendoza, IE, Luna-Suárez, S., & Castro-Martínez, C. (2020).** La paille de Moringa comme inducteur de production de cellulase et source de champignons cellulolytiques. *Revista Argentina de microbiologia*, 52 (1), 4-12.

**Verma, P., Yadav, AN, Khannam, KS, Kumar, S., Saxena, AK et Suman, A. (2016).** Diversité moléculaire et caractéristiques multiples favorisant la croissance des plantes des bacilles associés à la rhizosphère du blé (*Triticum aestivum* L.) de six zones agro-écologiques diverses de l'Inde. *Journal de microbiologie de base*, 56 (1), 44-58.

**Villas-Bôas, SG, Esposito, E., & de Mendonca, MM (2003).** Bioconversion du marc de pomme en un substrat enrichi nutritionnellement par *Candida utilis* et *Pleurotus ostreatus*. *Journal mondial de microbiologie et de biotechnologie*, 19 (5), 461-467.

-W-

**Wang, X., Kristo, E., & LaPointe, G. (2019).** The effect of apple pomace on the texture, rheology and microstructure of set type yogurt. *Food Hydrocolloids*, 91, 83-91.

**Wang, X.; Chen, Q.; Lü, X. (2014)** Pectin Extracted from Apple Pomace and Citrus Peel by Subcritical Water. *Food Hydrocoll.*, 38, 129–137.

**Wang, Z., Sun, J., Liao, X., Chen, F., Zhao, G., Wu, J., & Hu, X. (2007).** Mathematical modeling on hot air drying of thin layer apple pomace. *Food Research International*, 40(1), 39-46.

-Y-

**Yadav, S.; Malik, A.; Sharma, D.; Islam, R.U. (2016).** Pathera, A. Development of Dietary Fibre Enriched Chicken Sausages by Incorporating Corn Bran, Dried Apple Pomace and Dried Tomato Pomace. *Nutr. Food Sci.* 46, 16–29

-Z-

**Zaidi F., Hassissen N., Alloach H., kichou M., Ourdani S., Rezki K., Bellal M. M., Grongne T J F et Youyou A. (2009).** Les composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants. *Revue Méd. Vét.* 160, 2, 67-73.

**Zeitschrift für Analytische Chemie, (2021).** Herausgeber Dr. C. Remigius Fresenius. 22. année, éditions C.W. Kreidels Verlag. pp. 366-382 1883, J. Kjeldahl « Nouvelle méthode de détermination de l'azote dans les corps organiques » Illustration du catalogue C. Gerhardt GMBH & CO, GERMANY.

**Zheng, Z., Shetty, K. (2000).** *Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes.* *Process Biochemistry.*, 35, (8), 825-830

**Zhou J-M et, Ge X.Y, Zhang W.G, (2011).** Improvement of polygalacturonase production at high temperature by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* / *Bio resource Technology* 102: pp 10085–10088



## Annexe I : Milieux de cultures

### 1. Milieu sélectif CMC-agar (R. kasana., et al, 2008)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	1,4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	300mg
MgSO <sub>4</sub> .....	300mg
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	5mg
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....	1,6mg
COCl <sub>2</sub> .....	20mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1,4mg
CMC.....	5g
Agar.....	17g
Eau distillée .....	1 litre.
PH final .....	5

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

### 2. Milieu sélectif CMC-agar (Anisa S K., et al,2013).

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	1,4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	300mg
MgSO <sub>4</sub> .....	300mg
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	5mg
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....	1,6mg
COCl <sub>2</sub> .....	20mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1,4mg
Pectine.....	5g
Agar.....	17g
Eau distillée .....	1 litre.
PH final .....	5

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

**Milieu Mandels et weber (Mandels et weber, 1969)**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	1,4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	300mg
MgSO <sub>4</sub> .....	300mg
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	5mg
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....	1,6mg
COCl <sub>2</sub> .....	20mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1,4mg
Eau distillée .....	1 litre.

La solution Mandels et weber à 0.5% de CMC servira de milieu pour l'analyse quantitative de l'activité CMCCase et la FPase, et à 0.5% de pectine pour la révélation de la pectinase sur milieu liquide, le PH final est ajusté à 5 puis les deux milieux sont stérilisés à 121°C pendant 20minutes.

Gélose pomme de terre, dextrose, agar (PDA) (saint- germain. ,2013)

Pomme de terre.....	250g
Glucose.....	20g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1 litre

pH finale 5

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20min.

**Gélose PCA :**

- Hydrolysate enzymatique de la caséine .....	5,0 g/l
-Extrait de levure.....	2,5 g/l
-Glucose.....	1,0 g/l
-Agar.....	15 g/l

pH du milieu à 25°C : 7,0 ± 0,2

**Gélose VRBL :**

-Extrait de viande.....	7,000 g/l
-Extrait de levure.....	3,000 g/l
-Lactose.....	10,000 g/l
-Chlorure de sodium.....	5,000 g/l

- 
- Sels biliaires.....1,500 g/l
  - Rouge neutre.....0,030 g/l
  - Cristal violet.....0,002 g/l
  - Agar.....15,000 g/l

pH du milieu à 25°C :  $7,4 \pm 0,2$

**Gélose Saboraud Dextrose Agar + chloramphénicol :**

- Glucose monohydraté.....40,00 g/l
- Peptone (viande et caséine).....10,00 g/l
- Chloramphénicol.....0,05 g/l
- Agar bactériologique.....15,00 g/l

pH du milieu à 25°C:  $5,6 \pm 0,2$

**Eau peptonée :**

- Peptone.....10,0 g/l
- Chlorure de sodium.....5,0 g/l

pH :  $7,2 \pm 0,2$

## Annexe II : Réactifs, tampons

### Réactif DNS (Ghose T K, 1987)

DNS.....	10g
NaOH.....	16g
Tartrate double de sodium et de potassium.....	300g
Eau distillée .....	1 litre

Le tartrate est ajouté par petites quantités avec un Léger chauffage (50°C) si nécessaire pour éviter la formation des grumeaux insolubles. La solution est préparée dans l'obscurité puis filtrée et conservée à l'abri de la lumière dans un flacon couvert d'aluminium.

### Tampon citrate de sodium (Ghose T K, 1987).

- **Tampon citrate (1 M, pH 4.5) :**

Acide citrique.....	210g.
Eau distillée.....	750ml.
NaOH.....	50-60g jusqu'à avoir un PH de 4,3.

Diluer le mélange dans 1000ml d'eau distillée puis vérifier le PH, si nécessaire le NaOH est ajouté jusqu'à un PH de 4,5. La solution résultante est un tampon à 1M.

- **Tampon citrate (50 mM, pH 4.8) :**

Diluer le premier tampon (1 M, pH 4.5) par l'ajout de 19 fois le volume en eau distillé, ajuster le pH à 4,8 avec la soude si nécessaire.

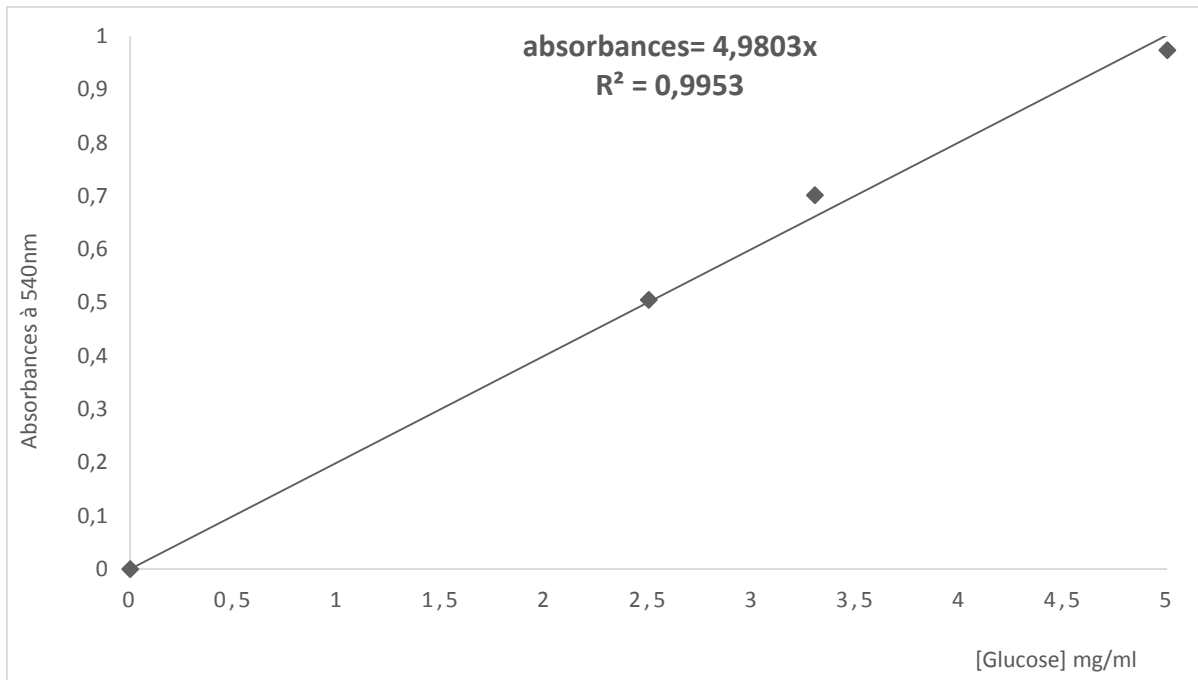
### Solution de Lugol bactériologique (Iodo-iodure de potassium)

I <sub>2</sub> .....	1g
KI.....	2g
Eau distillée .....	300 ml

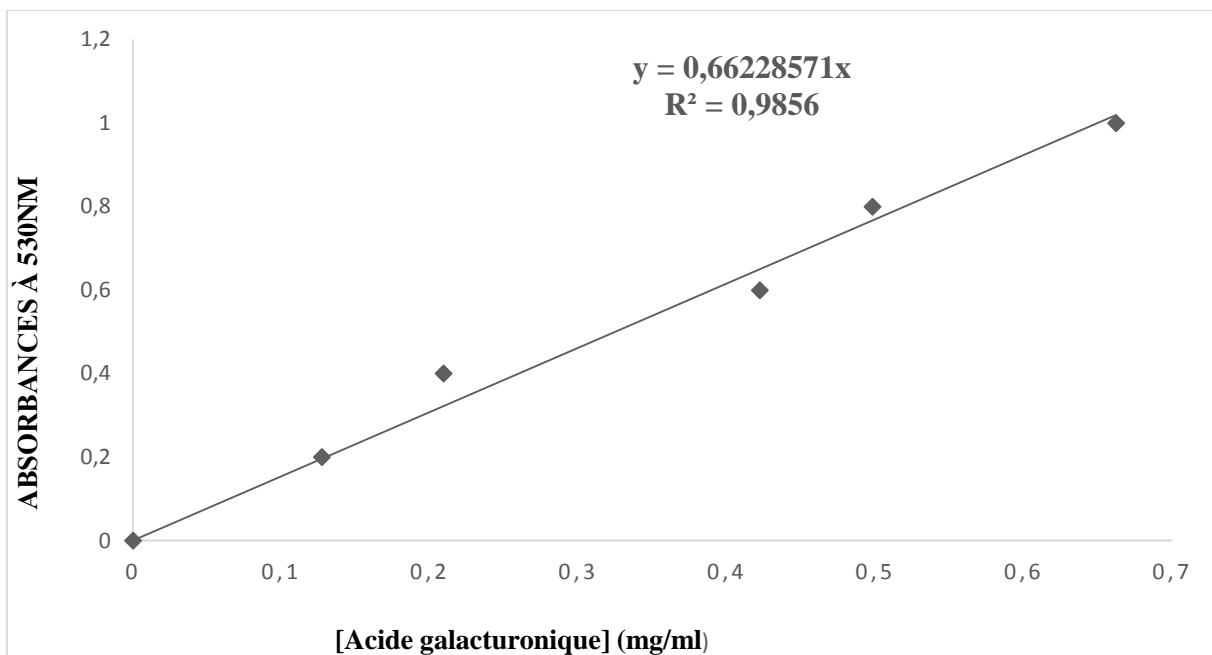
### Dosage de l'azote total : Préparation du catalyseur

Sélénium.....	1,5g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	40g
CuSO <sub>4</sub> .....	10g

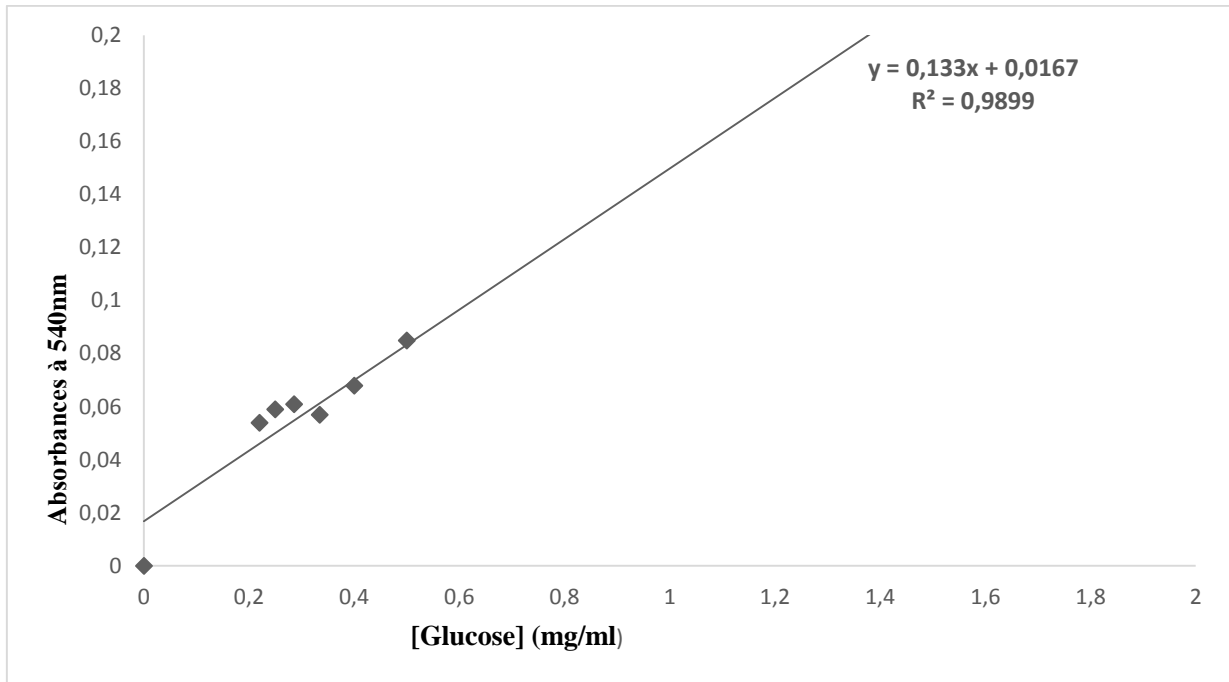
## Annexe III : Courbes d'étalonnages



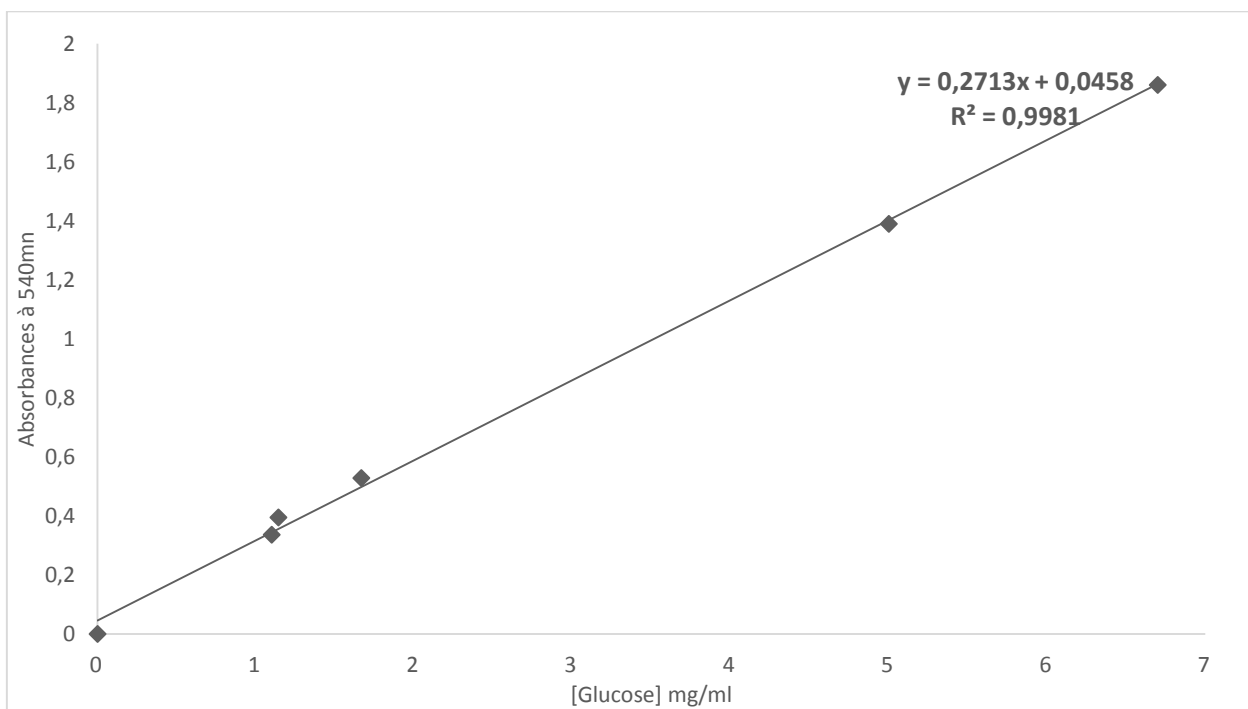
**Figure N°20 :** Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs pour le dosage de la contenance des poudres en ces derniers



**Figure N°21 :** Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs pour le dosage de l'activité pectinase



**Figure N°22** : Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs pour le dosage de l'activité CMCase



**Figure N°23** : Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs pour le dosage de l'activité FPase



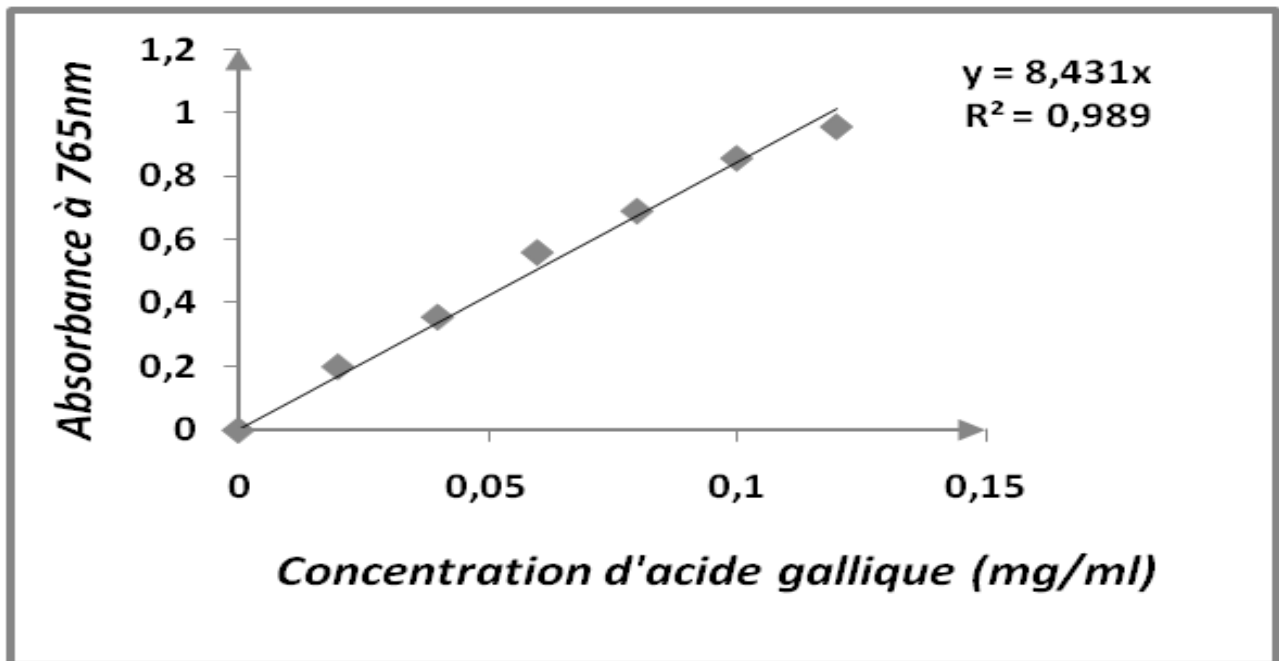


Figure N° 24 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux

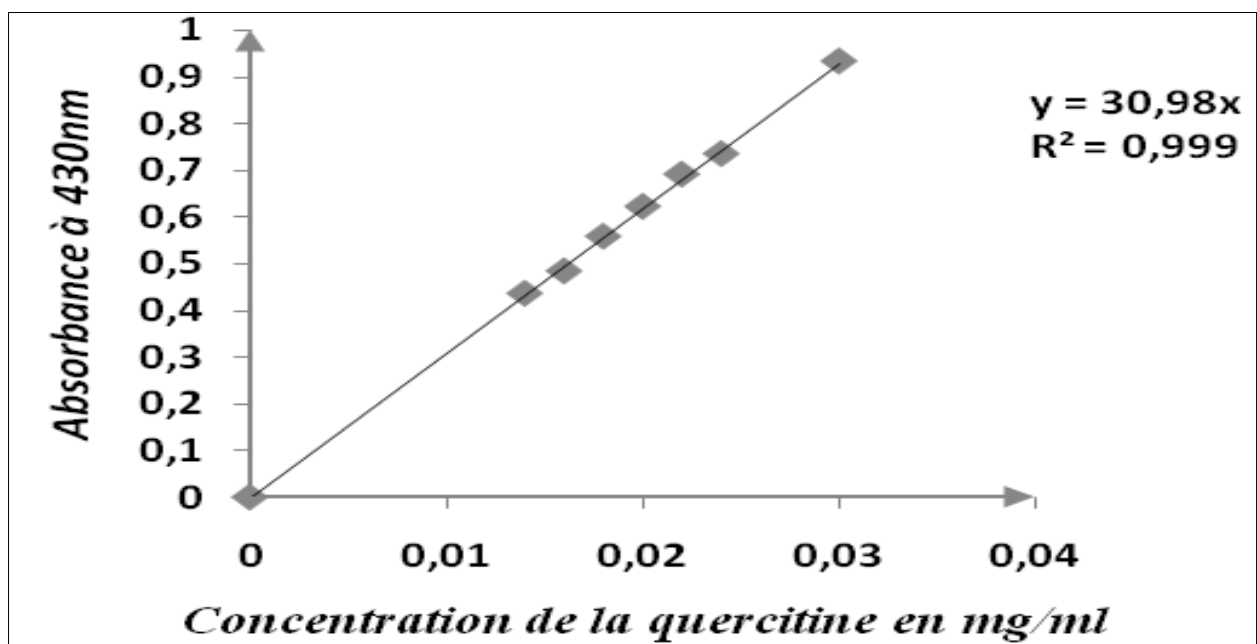
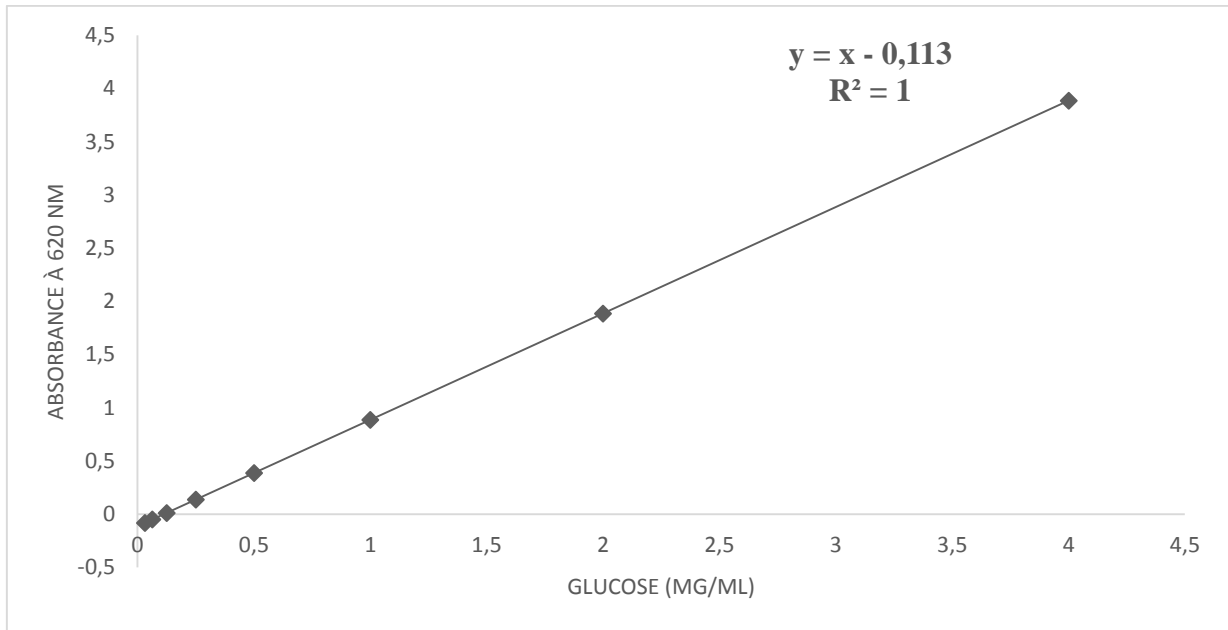


Figure N° 25 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes



**Figure N° 26 :** Courbe d'étalonnage des sucres totaux

#### Annexe A : Dosage de l'azote total



**Figure 28 :** Photographie représentant les trois étapes du dosage de l'azote total

#### Annexe B : Appareillage, verrerie et consommable

Étuve (Nuve incubateur)

pH-mètre (HANNA 210)

Réfractomètre

Agitateur (GFL série 3033)

Dessiccateur manuel

Nacelles

Spectrophotomètre UV-visible (Schimadzu UV mini-1240)

Centrifugeuse (ROTINA 380R)

Microscope optique (Euromex iscope série 110-240V),

Tubes à essai

Micropipettes

Boîtes de pétries

Burette

Agitateur

Plaque agitatrice (Velp scientifica)

Bain marie (Gesllschaft fua labortechik)

## Résumé

La présente étude a pour but de recycler et valoriser les résidus d'orange et de pomme générés par la SPA Agrana fruit, l'analyse biochimique des deux résidus a révélé leur richesse en sucres, et en oligoéléments cela leur procure la propriété d'être hautement fermentescibles, la mise en œuvre des FMS et SmF a été réalisée dans le but de produire des pectinases (Pase) et des cellulases à partir de ces déchets. Le champignon *Aspergillus niger* a été utilisé dans cette étude. L'analyse qualitative a révélé un IC de **1.03** et une zone claire de **4.8cm** pour la l'activité CMCCase et Pase, l'activité de cette dernière dans le test quantitatif ainsi que celles des CMCCase et FPase sont respectivement **1389.99UI/ml**, **2.4UI/ml** et **36.02UI/ml**. La cinétique de production des deux enzymes a été établie en cultures submergées. Certains paramètres de culture tel que le PH, la teneur en protéines a été suivies en même temps que la production de cellulases et de Pase. Un taux d'humidité de 75% en FMS pour le marc de pomme a permis de donner une activité Pase de **1364.37U/ml**, CMCCase égale à **63.18U/ml** par conséquent pas d'activité FPase sur le rebut de pomme. En culture submergée le maximum d'activités Pase, CMCCase, FPase enregistrées à partir de la PO et l'AP sont **6783.44UI/ml** ; **1787.14UI/ml**, **141.81UI/ml** ; **384.94UI/ml** et **25.029UI/ml**, respectivement. La FPase n'est pas produite à partir du déchet de pomme.

**Mots clés** : marc de pomme, résidu d'orange, *Aspergillus niger*, cellulases, pectinases, valorisation.

## Abstract

The present study aims to recycle and valorize the orange and apple residues generated by SPA Agrana fruit, the biochemical analysis of the two residues revealed their richness in sugars, and trace elements that provides them the property of being highly fermentable, the implementation of SSF and SmF was carried out with the aim of producing pectinases (Pase) and cellulases from these waste. The fungus *Aspergillus niger* was used in this study. The qualitative analysis revealed a CI of **1.03** and a clear zone of **4.8cm** for CMCCase and Pase activity. On the other hand, the quantitative test on Pase, CMCCase and FPase activities gave **1389.99IU/ml**, **2.4IU/ml** and **36.02IU/ml** respectively. The production kinetics of both enzymes were established in submerged cultures. Some culture parameters such as PH, protein content was followed along with the production of cellulases and Pase. A moisture content of 75% in SSF for apple pomace gave an estimated Pase activity of **1364.37U/ml**, CMCCase equal to **63.18U/ml** therefore no FPase activity on apple pomace. In submerged culture the maximum Pase, CMCCase, FPase activities recorded from OP and AP are **6783.44IU/ml**; **1787.14IU/ml**, **141.81IU/ml**; **384.94IU/ml** and **25.029IU/ml**, respectively. FPase is not produced from the apple waste.

**Keywords**: apple pomace, orange waste, *Aspergillus niger*, cellulases, pectinases, recovery.

