

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

**Université A. MIRA-Bejaia**

**Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie**

**Département de Sciences Alimentaires**

**Filière : Sciences Alimentaires**

**Option : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire**



**جامعة بجاية**  
**Tasdawit n Bgayet**  
**Université de Béjaïa**

**Réf : .....**

**Mémoire de Fin de Cycle**  
**En vue de l'obtention du diplôme**  
**Master**

## ***Thème***

**Essai de l'optimisation par la méthodologie de surface de  
réponse, de la production fermentaire de protéase à partir  
de marc de café**

**Présenté par :**

**SAHKI Tassadit & TERRAS Kenza**

**Soutenu le : 15 juin 2020**

**Devant le jury composé de :**

|                             |            |                     |
|-----------------------------|------------|---------------------|
| <b>Mme BOULEKBACHE Lila</b> | <b>PR</b>  | <b>Présidente</b>   |
| <b>Mr BOUKHALFA Farid</b>   | <b>MCA</b> | <b>Encadreur</b>    |
| <b>Mme ADJEROUD Nawal</b>   | <b>MCB</b> | <b>Examinatrice</b> |

**Année universitaire : 2019/2020**

## ***Remerciement***

***Nous remercions d'abord et avant tout le bon dieu tout puissant de nous avoir donné le courage et la force pour réaliser ce travail.***

***Nous désirons remercier notre promoteur Mr BOUKHALFA F., pour sa disponibilité, sa précieuse aide et ses conseils qui nous ont accompagné tout au long de ce travail. Nous lui sommes très reconnaissantes d'avoir cru en nos capacités et d'avoir accordé sa confiance et aussi pour ses qualités scientifiques, pédagogiques et humaines.***

***Nos remerciements vont aussi à Mme BOULKBACHE L., d'avoir accepté volontairement et aimablement de présider ce Jury.***

***Nous tenons à remercier également Mme ADJEROUD N., d'avoir accepté, d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici nos sincères sentiments de gratitude et de respect.***

***Nous remercions aussi nos parents et proches pour leurs aides et encouragements.***

***Sans oublier nos amis et camarades pour le soutiens qu'ils nous ont apporté.***

***À tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail, auxquels nous disons tout simplement merci.***

## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents qui m'ont toujours aidé, soutenu et encouragé  
tout au long de mes études.*

*Mes sœurs : Wissam et Syla.*

*Mes frères : Adnane, Bilal et Nassim.*

*Mon mari Massi ainsi que ma belle-famille.*

*Ma grand-mère ainsi que ma famille maternelle.*

*Ma cousine Samia et son mari Hamza et bien sur leur fille Sérine pour  
leur patience et soutien.*

*Mes très chères amies : Hayette, Radia, Lahna, Farida, Dyhia, Liza,  
Sara, Assia, Souad, Fariza, Ahlem, Wassila, Meriem et Linda.*

*Ma cousine Linda et sa famille.*

*Mes amis : Farouk et Lyamine.*

*Et je dédie spécialement ce travail à mes deux meilleurs amis Dounia et  
Toufik qui ont été toujours à mes côtés pour leurs nombreux conseils,  
leurs soutiens et leurs amitiés.*

*Ma collègue Kenza ainsi que toute sa famille.*

*A tout ceux que j'estime beaucoup.*

**TASSADIT**

## Dédicace

*Je dédie ce travail en premier lieu aux êtres, les plus chers au monde : mes parents.*

*Quoi que je fasse je ne pourrai jamais leurs rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivée là C'est bien grâce à eux que dieu les bénisse, et leurs accorde longue vie et les protège.*

*Que ce travail vous soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde et infinie reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi, j'espère que je serai toujours à la hauteur de vos espérances.*

*Je dédie aussi ce modeste travail*

*A mes sœurs Fatiha et Louiza*

*A mes frères Hamza, Mouhend, Alloul*

*A ma belle-sœur Chabiha et à mes beaux-frères Hichem et Idir*

*A mes nièces Alice et Céline et a toute ma famille*

*A mes amis Nassima, Dyhia, Lahna, Louiza, Assia, Sarah, Donia, Hayat, Ali, Aissa, Lamin, Rofiada, Yanis, Lydia, Yifethin, Boba, Iman, Souhila, Rima, Zaina, Maya, lilia, Halima, Nadjat, Zozo, Lili, Faiza, Chahira, Asma, Kahina, Samira, Halim, Sonia, Kamel et à ma collègue et sa famille.*

*Et je dédie spécialement ce travail à mon cher ami Yanis qui m'a encouragé durant tout mon parcours universitaire.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

**KENZA**

# SOMMAIRE

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| Liste des abréviations..... | <i>i</i>   |
| Liste des figures.....      | <i>ii</i>  |
| Liste des tableaux.....     | <i>iii</i> |
| Introduction.....           | <b>1</b>   |

## Partie I : Synthèse bibliographique

### I-1 Le Café

|  |          |
|--|----------|
| I-1.1 L'utilisation du marc du café..... | <b>5</b> |
|--|----------|

### I-2 Les enzymes

|  |          |
|--|----------|
| I-2.1 Les enzymes protéolytiques.....                | <b>6</b> |
| I-2.2 Les sources de protéase.....                   | <b>7</b> |
| I-2.3 Les domaines d'applications des protéases..... | <b>7</b> |

### I-3 Les *Bacillus subtilis*

|   |          |
|---|----------|
| I-3.1 Le bacille <i>Bacillus subtilis</i> ..... | <b>9</b> |
|---|----------|

### I-4 Les plans d'expériences

|   |           |
|---|-----------|
| I-4.1 Terminologie.....                           | <b>10</b> |
| I-4.2 Les types de plan d'expérience.....         | <b>11</b> |
| I-4.3 Le plan de la surface de réponse (RSM)..... | <b>11</b> |
| I-4.4 Le plan de Box-Behnken.....                 | <b>11</b> |
| I-4.5 Le modèle mathématique postulé.....         | <b>12</b> |

## **Partie II : Partie expérimentale**

|   |    |
|---|----|
| II-1.1 Le matériel végétal .....  | 13 |
| II-1.2 Le matériel biologique.....  | 13 |
| II-1.3 La mise en évidence de l'activité enzymatique et sélection des souches protéolytiques<br>..... | 14 |
| II-1.4 L'identification du microorganisme.....  | 14 |

### **II-2 La caractérisation physico-chimiques du marc de café**

|  |    |
|--|----|
| II-2.1 Le taux d'humidité .....                        | 14 |
| II-2.2 La détermination de la matière sèche .....      | 16 |
| II-2.3 La détermination de potentiel d'hydrogène ..... | 16 |
| II-2.4 La détermination de l'acidité titrable .....    | 17 |
| II-2.5 Le taux de cendres .....                        | 17 |
| II-2.6 Le dosage de l'azote total.....                 | 17 |
| II-2.7 Le dosage de protéines .....                    | 18 |
| II-2.8 Le dosage des sucres totaux .....               | 19 |
| II-2.9 Le dosage des sucres réducteurs.....            | 19 |

### **II-3 L'optimisation des conditions de production d'enzyme par fermentation submergée**

|  |    |
|--|----|
| II-3.1 Le choix des paramètres et leurs niveaux..... | 20 |
| II-3.2 Le choix des paramètres d'optimisation .....  | 21 |

### **II-4 L'étude statistique**

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

### **III-1 Le matériel biologique**

|   |    |
|---|----|
| III-1.1 L'isolement et identification .....                           | 24 |
| III-1.2 La mise en évidence de l'activité enzymatique .....           | 25 |
| III-1.3 L'orientation vers l'identification de la souche isolée ..... | 25 |

## **III-2 La caractérisation physico- chimique de la poudre de café**

|  |    |
|--|----|
| III-2.1 Le taux d'humidité .....                       | 28 |
| III-2.2 La matière sèche .....                         | 29 |
| III-2.3 Les cendres totales .....                      | 29 |
| III-2.4 Le potentiel d'hydrogène .....                 | 30 |
| III-2.5 L'acidité titrable .....                       | 30 |
| III-2.6 La teneur en sucres totaux et réducteurs ..... | 31 |
| III-2.7 La teneur en protéines .....                   | 32 |
| III-2.8 Teneur en azote total .....                    | 32 |

## **III-3 L'optimisation de la quantité en substrat et temps d'incubation**

### **III-4 Le plan d'expérience Box-Behnken**

|  |           |
|--|-----------|
| III-4.1 L'analyse des résultats .....                      | 36        |
| III-4.2 Le coefficient de détermination $R^2$ .....        | 37        |
| III-4.3 Le modèle globale et le manque d'ajustement.....   | 38        |
| III-4.4 L'effet des facteurs .....                         | 39        |
| III-4.5 Le modèle mathématique .....                       | 41        |
| III-4.6 Les paramètres optimaux et leurs validations ..... | 41        |
| <b>Conclusion.....</b>                                     | <b>43</b> |

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## Liste des abréviations

- **AE** : Activité Enzymatique.
- **AFNOR** : Association Française de Normalisation.
- **ANOVA/ MANOVA**: Analyse de la Variance /Analyse de variance multivariée.
- **API** : Appareillage et Procédé d'Identification.
- **ARN** : Acide Ribonucléique.
- **BBD** : Box-Behnken Desing.
- **SBA** : Sérum Bovine Albumine.
- **DNS** : 3-5 Di- Nitrosalycilate de Sodium.
- **JMP** : John's Macintosh Project
- **H<sub>2</sub>S** : Sulfure d'Hydrogène.
- **ISO** : Organisation Internationale de Standardisation.
- **MSR** : Méthodologie de Surface de Réponse.
- **Ox** : Oxydase.
- **pH** : Potentiel d'Hydrogène.
- **Prot** : Protéine.
- **SR** : Sucre Réducteur.
- **ST** : Sucre Totaux.
- **TCA** : Acide Tri-Chloroacétique.
- **VF** : Gélose Viande-Foie.
- **VP** : Voges-Proskauer.

## Liste des figures

| Figures   | Page      |
|---|-----------|
| <b>Figure 01</b> : Photographie de culture sur la gélose au lait en boîte de Pétri.   | <b>24</b> |
| <b>Figure 02</b> : Photographie de la souche cultivée sur milieu Chapman dans le microscope optique.  | <b>24</b> |
| <b>Figure 03</b> : Photographie de la culture <i>Bacillus subtilis</i> sur le milieu gélose au lait.  | <b>25</b> |
| <b>Figure 04</b> : Photographie de test catalase pour la souche de <i>Bacillus subtilis</i> .   | <b>26</b> |
| <b>Figure 05</b> : Photographie de <i>Bacillus subtilis</i> dans un tube de VF.   | <b>26</b> |
| <b>Figure 06</b> : Le taux des sucres totaux et réducteurs dans le marc de café.  | <b>31</b> |
| <b>Figure 07</b> : L'effet de la concentration en marc de café sur l'activité enzymatique, teneur en sucres totaux, réducteurs et protéines au bout de six jours. | <b>33</b> |
| <b>Figure 08</b> : L'effet du temps d'incubation sur les teneurs en protéines et l'activité enzymatique à 5g de marc de café.                                     | <b>34</b> |
| <b>Figure 09</b> : Le plan de prédiction réel de l'activité enzymatique.  | <b>37</b> |
| <b>Figure 10</b> : Les surfaces de réponses obtenues des différentes interactions.  | <b>40</b> |

## Liste des tableaux

| Tableaux  | Page      |
|---|-----------|
| <b>Tableau I</b> : Composants principaux du marc du café.   | <b>4</b>  |
| <b>Tableau II</b> : Composition minérale et en polyphénols du marc de café.                                   | <b>4</b>  |
| <b>Tableau III</b> : Les différents niveaux des paramètres choisis pour l'optimisation.                       | <b>22</b> |
| <b>Tableau IV</b> : La matrice d'expérience donnée par le plan BBD.   | <b>22</b> |
| <b>Tableau V</b> : Les résultats obtenus de l'étude des caractères biochimiques de <i>Bacillus subtilis</i> . | <b>27</b> |
| <b>Tableau VI</b> : Composition physico-chimique de la poudre de café.  | <b>28</b> |
| <b>Tableau VII</b> : Les résultats des valeurs réels et prédite par l'application du plan Box-Behnken.        | <b>36</b> |
| <b>Tableau VIII</b> : L'analyse de la variance et le manque d'ajustement du BBD.                              | <b>38</b> |
| <b>Tableau IX</b> : L'estimation des coefficients de régression du modèle polynomial.                         | <b>39</b> |
| <b>Tableau X</b> : Les conditions optimales pour la production de l'enzyme.                                   | <b>41</b> |
| <b>Tableau XI</b> : Les conditions optimales appliquées pour la production d'enzyme.                          | <b>41</b> |



# Introduction

## ***Introduction***

---

Le café est l'une des denrées alimentaires les plus consommées au monde et l'un des aliments nutraceutiques qui présentent des bienfaits pour la santé humaine. De nos jours, le café est l'un des principaux produits du commerce mondial, c'est la deuxième marchandise échangée entre les pays, après le pétrole (**Belguidoum, 2014**). Il possède aussi des inconvénients en plus des avantages parmi celle-ci on trouve la fertilité de la femme, la fertilité masculine, action sur la grossesse comme la fausse couche et la naissance prématurée, action sur la vésicule biliaire, sur les ulcères, maladies cancéreuses, maladie cardiovasculaires et enfin sur le système nerveux centrale (**Bonnin, 2016**).

La production annuelle mondiale se situe aux alentours de 6,5 millions de tonnes par an. Le Brésil est considéré comme le plus grand producteur et le premier exportateur de café avec 30% de production mondiale (**Trad, 2016**).

Les grains de café après torréfaction et broyage, donnent la poudre de café, utilisée pour l'extraction d'un délicieux breuvage, de saveur et d'onctuosité très apprécié. Cette poudre après cette opération, devient ce que nous appelons le marc de café, dont malgré son utilisation dans le monde de l'agriculture pour la fertilisation des sols, et également dans le cosmétique, ou comme produit ménager, d'énormes quantités de ce sous-produit sont jetées comme résidu inutile causant ainsi des problèmes pour l'environnement et des pertes d'économie (**Lecomte, 1899**).

Le marc de café est composé de plusieurs éléments possédant des propriétés physiques, chimique et bioactives, dont multiples voies de valorisation et d'utilisation sont possible avec ce sous-produit, parmi celles-ci se trouvent la production d'éthanol, de biodiesel, de combustibles, ou également comme peut être utilisé comme substrats, pour la production de différents enzymes industriels, en se basant sur des cultures à microorganismes (**Zouli, 2019**).

Tous les êtres vivants, dépendent pour leurs existences de catalyseurs biologiques, appelés enzymes. Certaines enzymes sont directement utilisées pour fabriquer des composés chimiques, tandis que d'autres jouent un rôle dans la décomposition et la modification de ces composés. Il n'est pas donc surprenant que les industriels se trouvent parmi les premiers à reconnaître et exploiter l'énorme potentiel des enzymes (**Charnock et McCleary, 2005**).

Actuellement, la concurrence est très forte dans le monde des enzymes industrielles et les prix de ces produits de hautes technologies sont à la baisse entraînant des réductions majeures dans les coûts de production. La capacité de l'industrie à produire des enzymes à faible coût est nécessaire pour maintenir sa compétitivité (**Meunier, 1999**), et pour cela il est entendu que si

## ***Introduction***

---

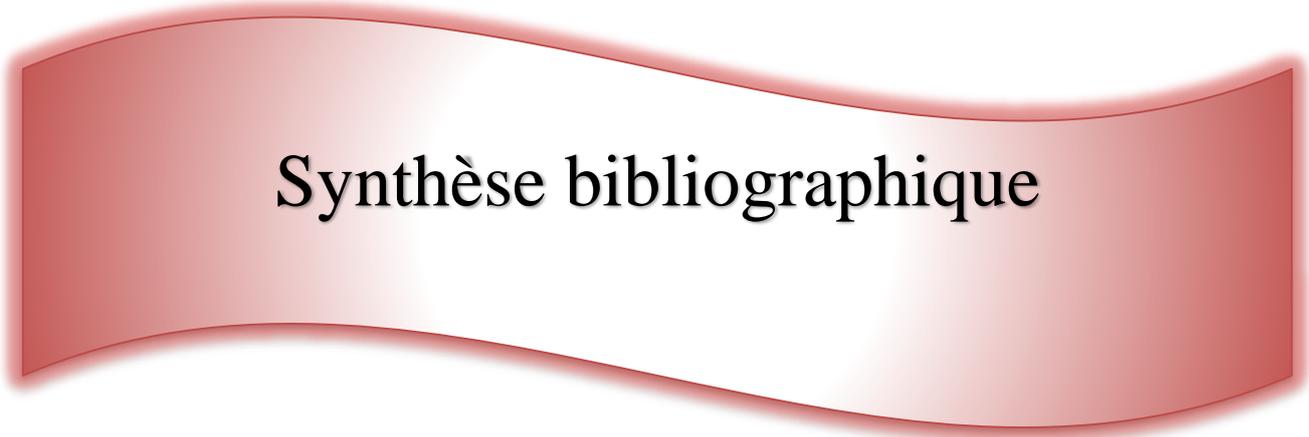
les réactions peuvent être accélérées, les procédures de production peuvent être mises en œuvre en beaucoup moins de temps, à des températures et des pressions plus basses ou avec des matières premières moins chères, dont la plus grande partie du marché de ces biocatalyseurs est liée aux enzymes de type hydrolytique comme les protéases, les lipases et les cellulases.

Les enzymes industriels sont d'une part d'origine animale et végétale et d'autre part d'origine microbienne (**Rao et al., 1998**). L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. C'est pourquoi la production d'enzymes à partir des microorganismes est privilégiée par les producteurs, vu qu'elle est facile à gérer avec des résultats plus constants, et peuvent être utilisées dans plusieurs domaines tels que le domaine pharmaceutique et médical, dont leurs activités peuvent être influencées par des paramètres physiques et chimiques.

Notre étude s'inscrit dans cette optique en fixant comme objectif la valorisation du marc de café par voie fermentaire en utilisant le microorganisme *Bacillus subtilis*. La méthodologie de surface de réponse (MSR) dont le plan d'expérience Box Behnken est utilisé afin d'optimiser les conditions de croissance (T, pH, concentration en peptone) et de production fermentaire de protéase par la souche sélectionnée.

Le plan adopté pour explorer cette étude est subdivisé en deux grandes parties, dont la première est une synthèse bibliographique mettant au point le marc de café, son utilisation et sa composition, les protéases et leurs domaines d'applications ainsi que leurs sources, des généralités sur *Bacillus subtilis* et enfin des notions sur les plans d'expériences.

La deuxième partie expérimentale mettant au point le matériel et les méthodes utilisées pour l'isolement, l'identification, la purification de la souche utilisée, la préparation du sous-produit et les différents dosages biochimiques et des activités enzymatiques, ainsi que la présentation des résultats obtenus et leurs discussions.



# Synthèse bibliographique

## I-1 Le café

Le café est l'une des boissons les plus populaires et les plus appréciés dans le monde. Sa composition varie selon la variété de café, le mode de production des grains de café vert et les conditions de leur torréfaction. Par conséquent l'analyse des constituants du café suscite encore aujourd'hui de nombreuses études, qui se justifient par les effets physiologiques de cette boisson (**Houessou, 2007**).

Le café est classé comme suit :

Règne : *Plantae*

Division : *Angiospermae*

Classe : *Dicotyledonae*

Sous-classe : *Euasterids I*

Ordre : *Gentianales*

Famille : *Rubiaceae*

Sous-famille : *Ixoroideae*

Genre : *Coffea L.*

Aujourd'hui il existe environ 80 espèces différents dans le genre *coffea*. Seules deux types essentiels de caféiers sont cultivés : Arabica qui donne le café Arabica et Canéphora (qui donne le café robusta) (**Belguidoum, 2014**). L'espèce Arabica est la plus ancienne et la plus cultivée. Le robusta fut découvert plus tardivement, vers le XIXème siècle (**Bonnin, 2016**).

L'industrie du café, en raison de son grand marché, est responsable de la production d'une grande quantité de résidu, dont le marc de café et la peau d'argent de café sont les plus générés (**Lina et al., 2014**).

Le marc de café est la matière résiduelle obtenue lors du traitement de la poudre de café avec de l'eau chaude ou de la vapeur pour la préparation du café instantané (**Lina et al., 2014**).

La composition du marc de café (**Tableau I et II**) est essentiellement faite de polysaccharides, de lipides, de protéines, de minéraux et de polyphénols (**Zamora et al., 2015**).

**Tableau I** : Composition biochimique du marc de café (**Carassou, 2015**).

| Compositions  | Quantités (%) |
|---------------|---------------|
| ❖ Glucides    | 45,3          |
| Mannose       | 46,8          |
| Galactose     | 30,4          |
| Glucose       | 19            |
| Arabinose     | 3,8           |
| ❖ Lipides     | 9,3 – 16,2    |
| Triglycérides | 84,8          |
| Sitostérol    | 10 – 14       |
| Stigmastérol  | 4 – 5         |
| Campestérol   | 3 – 4         |
| ❖ Protéines   | 14            |

**Tableau II** : Composition du marc de café en minéraux et polyphénols (**Carassou, 2015**).

| Composants | Quantités (mg/kg) |
|------------|-------------------|
| ❖ Minéraux | 6800              |
| Potassium  | 8824 ± 4662       |
| Phosphore  | 1534 ± 503        |
| Magnésium  | 2201 ± 1341       |
| Calcium    | 349 ± 122         |
| Fer        | 46 ± 21           |
| Manganèse  | 27 ± 10           |
| Cuivre     | 25 ± 12           |
| Azote      | 156 ± 4           |
| Carbone    | 3379 ± 6          |

Le marc de café contient également d'autres éléments d'intérêts tels que des antioxydants. En effet, d'autres polyphénols (**13-18mg d'acide gallique**) sont présents ainsi

que de la caféine, parmi ces polyphénols, les principaux sont les flavonoïdes, l'acide protocatechnique, celui-ci étant plus important dans le marc de café arabica que celui de robusta (**Bravo et al., 2013**).

Le carbone est l'élément majoritaire du marc de café (49,7%), suivie ainsi de l'azote où sa quantité peut atteindre 2,3%. Le rapport entre le carbone et l'azote est de valeur qui est égale à 22% (**Carassou, 2015**).

### **I-1.1 L'utilisation du marc du café**

De multiples voies de valorisation et d'utilisations sont possibles avec le marc de café, parmi celles-ci se trouvent :

#### ➤ **Enrichissement des sols**

Le marc de café à une très forte teneur en azote, il contient aussi du potassium et du phosphore en plus faible quantité. La libération d'azote dans le sol est progressive, ce qui permet à la plante d'absorber l'élément en fonction de ses besoins. Le potassium, rapidement disponible et assimilé par les plantes, développe leur résistance et améliore la circulation de la sève. Le phosphore contribue au développement des racines des fleurs et des fruits. Le marc de café contient aussi du magnésium, impliqué dans les fonctions vitales de la plante comme la photosynthèse (**Guy Deloeuvre, 2000**).

#### ➤ **Production de biocarburants**

La production de biocarburant nécessite au préalable le séchage du marc de café. En effet, éliminer l'humidité est nécessaire afin d'obtenir des solvants de qualité dans la production de biocarburant (biodiesel, bioéthanol. etc.) (**Gomez-de la Cruz et al., 2015**).

#### ➤ **Substrat pour la culture de micro-organismes et de champignons comestibles**

Le marc de café peut être utilisé comme substrat pour la production de caroténoïde grâce à la culture de levure. Les caroténoïdes sont utilisés dans les industries agroalimentaires (colorant), cosmétiques et pharmaceutiques et sont donc des composés d'intérêts (**Pétrick et al., 2014**). Il peut aussi servir de substrat pour la culture de champignons comestibles sans ajout de supplément nutritionnel (**Leifa et al., 2001**).

La haute teneur en protéines et en humidité du marc de café explique certainement ce phénomène, car ce sont deux paramètres essentiels à la croissance de micro-organismes et de champignons (**Mussatto et al., 2011**).

➤ **Industrie alimentaire**

De nombreux constituants du marc de café peuvent être utilisés dans l'industrie de l'alimentation. En effet, le marc de café peut, par exemple, être utilisé pour la fabrication de spiritueux à saveur de café (**Sampaio et al., 2013**). Les polyphénols présents dans le marc de café sont aussi des composés d'intérêt pour l'industrie alimentaire. Ensuite, sa composition en protéine donne la possibilité de l'utiliser dans l'alimentation humaine (**Vega et al., 2015**).

## **I-2 Les enzymes**

Les enzymes sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants ou elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (**Arnaud et al, 1993 ; Simon et Meunir, 1970**). Elles sont des catalyseurs biologiques de nature protéique. Les catalyseurs augmentent la vitesse d'une réaction lente ou imperceptible sans subir aucune transformation en ce qui concerne leurs structures initiales. Elles sont constituées des milliers d'acides aminés liés en une chaîne linéaire. Ces acides aminés diffèrent dans leur nature chimique, sont liés entre eux par des liens covalents appelés liens peptidiques. L'enzyme permet l'activation ou l'accélération de réactions chimiques (**Mamo et Gessesse, 1999**).

Les principaux facteurs du milieu qui contrôlent le fonctionnement des enzymes sont la température, le pH et l'activité de l'eau (**Feillet, 2000**).

Les enzymes digestives participent à la digestion des aliments. Synthétisées par le système digestif, elles ont pour rôle de transformer des molécules complexes en molécules simples, facilement assimilables par l'organisme. Pour cela, elles clivent des liaisons chimiques spécifiques, chaque enzyme possédant son propre substrat. Elles sont principalement de trois types : protéolytiques (qui clivent les protéines) ; glycolytiques (qui clivent les glucides) ; lipolytiques (qui clivent les lipides) (**Le Moullac, 1995**).

### **I-2.1 Les enzymes protéolytiques**

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des

protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites extracellulairement comme intracellulairement (**Kumar et al., 2008**).

Les protéases sont largement distribuées dans la population microbienne, à savoir bactéries, actinomycètes, et champignons. Bien que les protéases soient largement répandues dans la nature, les microorganismes constituent une source préférée de ces enzymes et représentent environ les deux tiers de la production commerciale dans le monde (**Kandasamy et al., 2016**).

## II-2.2 Les sources de protéase

Les protéases sont extraites aussi bien des plantes que des animaux ou des microorganismes comme les bactéries, les levures et les moisissures (**Rao et al., 1998**).

### ➤ Protéases d'origine végétale

La papaïne, la bromélaïne, la kératinase et la ficine représentent une partie des protéases d'origine végétale les plus répandues. La bromélaïne est extraite de tige de l'ananas (*Ananas comosus*), la papaïne en provenance de latex de fruit de papaye (*Carica papaya*) (**Rao et al., 1998**) et pour la ficine, elle est issue de la figue (*Ficus glabrata*) (**Scriban, 1993**).

### ➤ Protéases d'origine animale

Une grande partie de protéases animales sont synthétisées par le pancréas sous forme d'un précurseur qui peut s'activer de façon autocatalytique dans des conditions bien déterminés (**Rao et al., 1998**). Parmi ces protéases ; la présure, la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine sont les plus produites.

### ➤ Protéases d'origine microbienne

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques (résistance thermique, gamme de pH élevé) désirées pour leurs applications industrielles (**Sandhya et al., 2005**). Les protéases peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries (**Devi et al., 2008**).

## I-2.3 Les domaines d'application de protéase

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Les principaux secteurs industriels employant des protéases sont :

➤ **Industrie alimentaire**

Les industries alimentaires constituent aujourd'hui le principal domaine d'application des technologies enzymatiques, qui à partir d'un nombre limité de types de réactions catalysées donnent lieu à une grande diversité d'application (**Aviron-Violet et al., 1982**). Les principales industries alimentaires utilisant les protéases sont : Fromageries, boulangeries, préparation de produits à base de soja.

➤ **Industrie pharmaceutique et médicale**

La grande diversité et spécificité des protéases a été exploitée pour le développement des agents thérapeutiques efficaces. L'administration orale de protéase d'*Aspergillus Oryzae* améliore la digestion suite à la déficience de certains enzymes lytiques (**Rao et al., 1998**).

Les protéases sont impliquées dans des nombreuses fonctions des cellules eucaryotes, de plus elles jouent un rôle critique dans la virulence des agents pathogènes (**Colwell et Grigorova, 1989**).

Une élastotérase provenant de *Bacillus subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles d'abcès et de plaies profondes (**Kudrya et Simonenko, 1994**). Enfin une asparaginase provenant d'*Escherichia coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie (**Gupta et al., 2002 ; Rao et al., 1998**).

➤ **Détergents**

A l'heure actuelle, les protéases sont ajoutées comme des ingrédients clés dans la formulation des détergents pour usage domestiques (détergents à lessive, détergents à vaisselles), les produits de nettoyage pour usage industriels et les produits de nettoyage cosmétique et médical (nettoyage des lentilles cornéennes et les appareils dentaires). Cependant, le marché le plus important au niveau de détergent est celui des détergents à lessive (**Kumar et al., 2008**). La plupart des protéases ajoutées dans les détergents sont produites par des souches de *Bacillus* (**Gupta et al., 2002**).

➤ **Tanneries**

Les protéases sont utilisées en tannerie depuis le début du siècle dernier pour leurs capacités à libérer les poils et la laine (**Laxman et al., 2005**). Les trois traitements de la peau à tanner (le reverdissage, le délainage le confitage) sont susceptibles de solutions enzymatiques

de protéases produites par *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefasciens*. De cette façon, on économise de vastes quantités de chaux, de sulfure de sodium, de solvants divers et surtout de sels chromiques toxiques, réduisant ainsi considérablement la pollution des eaux et le travail des décharges (Rao et al., 1998).

➤ **Autres applications**

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines (Ichida et al., 2001 ; Dalev, 1994). La protéase neutre de *Bacillus subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (Aviron-Violet et al., 1982).

### I-3 Les *Bacillus subtilis*

#### I-3.1 Le bacille *Bacillus subtilis*

Le genre *Bacillus* est ubiquiste dans la nature, il appartient à la famille des *bacillaceae*, ordre des Bacillales, classe de Bacilli, phylum des firmicutes (Zhang et al., 2009).

La classification taxonomique des bactéries du genre *Bacillus* a été auparavant classée selon leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques ainsi que leur capacité à sporuler (Bron et al., 1999) alors qu'aujourd'hui la classification se base sur l'analyse comparative des séquences de base de l'ARN ribosomal 16S (Maughan et Auwera, 2011).

Les *Bacillus subtilis* se trouvent principalement dans le sol est également connu sous le nom de bacille du foin et de bacille des Graminées. C'est un organisme en forme bâtonnet qui peut former une endospore résistante et protectrice et peut résister à des conditions environnementales extrêmes. Ces espèces sont des aérobies obligatoires ou des anaérobies facultatifs et comprenant à la fois des espèces libres et pathogène (Gaurav et al., 2015).

Le *Bacillus subtilis* est une bactérie modèle par ces caractéristiques remarquables incluant la Transformabilité de son génome, possède diverses applications, parmi ces applications : la production des enzymes. Cette souche est très utilisée pour la production de deux enzymes importantes industriellement : l'amylase et la protéase (Bouhairi, 2017).

Les espèces du genre *Bacillus* sont les plus dominantes pour la production d'enzyme et de métabolites secondaires, elles représentent la source du choix et le plus important

producteur industriel d'enzymes alimentaires, de vitamines, et des antibiotiques, de fais de leur capacité à sécréter des grandes quantités de (20-25g/L) de ces derniers (**Schallmey et al., 2004**).

#### **I-4 Les plans d'expériences**

Un plan d'expériences est une méthode pour planifier ou organiser les expériences scientifiques et industrielles dans le but d'obtenir un maximum d'informations avec un minimum d'expérimentations par rapport à l'objectif que l'on s'est fixé. Les plans d'expériences sont appliqués dans différents domaines des sciences : Agronomie, biologie, calcul numérique, chimie, électronique, marketing, mécanique.... Et cela, à tous les niveaux, depuis la recherche fondamentale jusqu'à la satisfaction du client (**Pierre, 2005**).

Un plan d'expérience est constitué par un ensemble de combinaisons entre les niveaux des facteurs à tester (essais élémentaires), constituant une structure de données optimale pour l'obtention d'un modèle de bonne qualité statistique avec un nombre minimal d'essais (**Linder, 2005**). Il correspond aussi à l'ensemble des expériences proposées dans le but d'obtenir un maximum d'information en un minimum d'expériences (**Tinsson, 2010**).

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les tests qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles (**Goupy, 2006**).

La compréhension de la méthode des plans d'expérience s'appuie sur deux notions essentielles :

- Espace expérimental ;
- Modélisation mathématique des grandeurs étudiées (**Goupy, 2006**).

##### **I-4.1 Terminologie**

**Réponse** : C'est une grandeur mesurée à chaque essai, qui représente la grandeur d'intérêt (**Goupy, 2006**).

**Facteurs** : Variables quantitatives ou qualitatives qui sont obligatoirement contrôlés, susceptible d'agir sur la réponse observée (**Tinsson, 2010**).

**Domaine d'un facteur** : Présente l'ensemble de toutes valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut (**Goupy, 2006**).

**Niveau** : C'est la valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai (**Goupy, 2006**).

**Domain d'étude** : C'est la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour faire ses essais (**Goupy, 2006**).

**Matrice d'expérience** : Définit comme un objet mathématique qui représente l'ensemble des expériences à réaliser soit sous forme codée ou bien normée (**Droesbeke et al., 1997**).

#### I-4.2 Les types de plan d'expérience

Il existe différents types des plans d'expériences, qui peuvent être regroupés en deux grandes familles qui sont :

- Plans de criblage : plans à un facteur à la fois, plans factoriels fractionnaires, plans sursaturés et plans factoriels complets.
- Plans de modélisation : plans factoriels complets, plans non conventionnels, plans composites centrés, plans de Doehlert, plans de Box-Behnken, plans de Roquemaure, plans D-optimaux, plans de mélange et plan de Plackett-Burman (**Goupy, 1999**).

#### I-4.3 Le plan de surface de réponse

Les plans d'expériences sont utilisés pour régler les paramètres, dans le but d'atteindre un optimum entre les niveaux des facteurs présentés et étudiés (**Faucher, 2006**).

Le plan de surface de réponse correspond à une présentation géométrique de la réponse d'un processus physique spatio-temporel aléatoire à des variables stimuli, il est développé dans différents domaines scientifiques tel que : la biologie, la chimie, les sciences humaines et l'agronomie (**Rguig, 2005**).

Il existe plusieurs types des plans qui permettant la construction des surfaces de réponse (**Faucher, 2006**), parmi ces plans, le plan de Box-Behnken, les plans composites et en dernier le plan de Doehlert (**Goupy et Creighton, 2009**).

#### I-4.4 Le plan de Box-Behnken

Le plan de box-Behnken est une fraction d'un plan factoriel complet  $3^m$  qui permet d'estimer un modèle du second ordre dans laquelle toutes les variables ne prennent que trois niveaux (-1,0, +1) (**Geoffrey Vining et Kowalski, 2010**).

Les plans Box-Behnken à trois facteurs contient 15 points expérimentaux, dont 12 essais sont situés au milieu de chaque arête de cube avec trois essais répétés au centre du domaine qui prennent des coordonnées (0, 0,0) (**Goupy et Creighton, 2006**). Leurs principaux

avantages résident à éviter que les points d'expériences ne soient aux sommets d'un cube ou un hyper cube, mais placées à la même distance du centre du domaine (**Kimouche, 2008**).

#### I-4.5 Le modèle mathématique postulé

Le modèle mathématique utilisé avec le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est un modèle du second degré classique :

$$\eta = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \left( \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \right)$$

Où :

- $\eta$  : l'estimation de la valeur de la réponse étudiée ;
- $X_i X_j$  : variables associées au facteur ;
- $\beta_{ij}, \beta_i, \beta_0$  : coefficients du polynôme (**Faucher, 2006**).

A red, wavy banner with a gradient and a drop shadow, containing the text "Partie expérimentale".

## **Partie expérimentale**

### **II-1.1 Le matériel végétal**

L'étude menée est réalisée sur un marc de café *Coffea arabica* récupéré au niveau de la cafétéria du foyer de Campus Targua Ouzmour, université de Bejaia.

Une quantité de 500g de marc de café est hérité et nettoyé afin de débarrasser tout autres déchets, puis séché dans une étuve à 40°C jusqu'à l'obtention d'une poudre bien séchée qui subira un broyage et un tamisage pour avoir une poudre homogène qui sera utilisée comme un milieu de base de la fermentation pour la production de protéase.

### **II-1.2 Le matériel biologique**

Les microorganismes de ce travail ont été isolés à partir de marc de café dont les *Bacillus subtilis* étaient l'objectif (Silva et al., 2013).

Les *Bacillus* sont parmi les microorganismes les plus étudiés pour la production d'enzyme d'intérêt industriel. Le genre *Bacillus subtilis* constitue le micro-organisme de choix pour la production d'enzymes protéolytiques (Silva et al., 2013). De ce fait, la souche de sélection de la présente étude sera *Bacillus sp.*

#### **II-1.2.1 L'isolement du microorganisme**

Le criblage et l'isolement des souches productrices de protéase ont été effectués à partir d'un échantillon de marc du café, dans lequel une solution mère a été préparée par l'addition de 1g de la poudre avec 9mL d'eau physiologie, suivie d'une agitation puis filtration pour récupérer le filtrat qui représente la solution mère. Des dilutions décimales de  $10^{-1}$  à  $10^{-8}$  sont réalisées.

Un volume de 0.1mL de chaque dilution est ensemencé dans des boites de pétri sur gélose nutritif ordinaire par la technique de stries puis incubé a 37°C pendant 24h (Ghani et al., 2013).

#### **II-1.2.2 La purification du microorganisme**

Les colonies isolées sont repiquées aseptiquement sur milieu gélose au lait écrémé puis incubées à 37°C pendant 48h dont le but est l'acquisition des souches pures (Gitishree Das et Presad, 2010).

### **II-1.3 La mise en évidence de l'activité enzymatique et sélection des souches protéolytiques**

Les isolats sont repiqués aseptiquement sur milieu gélosé au lait puis incubé à 37°C pendant 48h. Ce test d'activité protéolytique est basé sur la propagation des protéases secrétées par ces souches dans le milieu de culture, et la dégradation de la caséine du lait autour de la colonie. Ce fait s'explique par l'observation directe d'un halo translucide (anneau de protéolyse) autour de la colonie (Machehalek et Yakhlef, 2015).

### **II-1.4 L'identification du microorganisme**

#### **II-1.4.1 L'identification macroscopique**

L'identification macroscopique des *Bacillus subtilis* sélectionnées a été réalisée par un examen à l'œil nu des cultures sur milieux géloses Chapman (Dalarras, 2014) qui permet la détermination des caractères cultureux sur la surface (la vitesse de croissance, la forme, formation de gouttelette ou pas).

#### **I-1.4.2 L'identification microscopique**

L'examen microscopique a été effectué par le prélèvement des colonies (bien isolées) à l'aide d'une anse de platine stérile, puis transférées sur une lame.

La coloration de Gram est réalisée par un frottis de bactéries qui va être disposé sur une lame de verre et soigneusement séché à l'air. Etai taché pour 1min en solution cristal violet, 1min dans une solution d'iode, lavé pendant 10 pèches éthanol et enfin, contre-coloré à la safranine. la lame de verre a été examinée sous immersion dans l'huile à un grossissement de  $\times 100$  (Hiremath et Bannigidad, 2011).

L'observation microscopique a été réalisée au microscope optique (objectif  $\times 40$  et  $\times 100$ ). Ce type d'identification est basé sur l'étude morphologique (couleur, différenciation...) et des spores (forme, couleur, texture des bordures) (Machehalek et Yakhlef, 2015).

#### **I-1.4.3 L'orientation vers l'identification de la souche isolée**

- **La recherche des enzymes de type respiratoire**
- **Test d'oxydase**

Le test de l'oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. Il consiste à déposer sur une lame porte-objet propre, un disque (Ox) et l'imbiber

avec une goutte d'eau distillée ou de l'eau physiologie stérile. Prélever une partie de la colonie à étudier à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque.

Une coloration violette foncée apparaît immédiatement sur le disque en quelques secondes puis vire au noir : Test oxydas (+) (**Delarras, 2014**).

➤ **Test de catalase**

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée en eau et en oxygène qui se dégage. Comprendre à prendre une lame porte-objet propre, déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée et émulsionner un peu de la colonie : suspecte ou de la culture obtenue sur gélose. Le dégagement des bulles de gaz indique la présence de la catalase : Test catalase (+) (**Delarras, 2014**).

➤ **Type respiratoire**

L'ensemencement est effectué sur une gélose viande-foie (VF) préalablement régénérée au bain-Marie bouillant pendant 20 minutes et lorsque la température est redescendue à 40°C 45°C, cet ensemencement est effectué soit à l'aide d'une pipette Pasteur de bas en haut en spirale, soit en déposant à la surface du tube maintenu à 45°C la suspension de la bactérie à étudier puis à mélanger, le tube étant maintenu verticalement. Les tubes sont ensuite refroidis sous l'eau au robinet après 24h à 37°C.

La lecture consiste à étudier le niveau du tube où une croissance bactérienne est visible.

- Croissance sur toute la hauteur du tube : type respiratoire aéro- anaérobie
- Croissance dans la zone supérieure du tube : type respiratoire aérobie stricte.
- Croissance dans la zone profonde du tube : type respiratoire anaérobie stricte.
- Croissance dans la zone intermédiaire : type respiratoire micro- aérobie (**Denis et al., 2016**).

#### **II-1.4.4 L'identification biochimique**

L'identification de la souche isolée s'effectue par le système API (Appareillage et procédé d'Identification). Ce système est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries. Comprend 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydrates. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

Les différents tests sont : test de nitrate réductase, test d'indole, citrate, VP. H<sub>2</sub>S Gélatine (Delarras, 2014).

## II-2 La caractérisation physico-chimiques du marc de café

Pour mieux connaître la composition du marc de café (*coffea arabica*) et estimer les principaux constituants nutritifs, une étude physicochimique est nécessaire.

### II-2.1 Le taux d'humidité

La teneur en eau dans la poudre du marc de café étudié est évaluée selon la méthode décrite par Adil et al (2007). Une prise d'essai de 3g de la poudre est séchée dans une étuve ventilée à une température 103°C ± 2°C jusqu'à un poids constant. L'humidité est alors calculée selon la formule suivante :

$$H (\%) = [(P_f - P_s) / P_f] \times 100$$

D'où :

H (%) : taux d'humidité en pourcentage ;

P<sub>f</sub> : poids frais de l'échantillon avant le séchage ;

P<sub>s</sub> : poids sec de l'échantillon après séchage.

### II-2.2 La détermination de la matière sèche

La matière sèche constitue la partie d'un produit végétal qui reste une fois que l'eau a été totalement extraite. La teneur en matière sèche est évaluée selon la méthode décrite par AFNOR (1986). Cette dernière est calculée par la formule suivante :

$$\text{Matière sèche \%} = 100 - \% \text{ Humidité}$$

### II-2.3 La détermination du potentiel d'hydrogène (pH)

La valeur de potentiel d'hydrogène (pH) est mesurée avec un pH-mètre selon la méthode décrite par **AFNOR (1982)**.

Une prise d'essai de 1g est dissoute dans un volume de 50mL d'eau distillée, et l'ensemble est laissée sous agitation pendant 30 minutes. Une fois filtré, la mesure est réalisée en trois répétitions.

### II-2.4 La détermination de l'acidité titrable

La mesure de l'acidité de la poudre du Marc du café étudié est réalisée selon la méthode décrite par **Ilkay et Aziz (2011)**.

Une prise d'essai de la poudre est mélangée avec de l'eau distillée, et l'ensemble est met sous reflux réfrigérant pendant 30 minutes avant d'être filtré. Le titrage est réalisé à température ambiante avec une solution de NaOH à (0,1N) sous agitation après avoir ajouté de la phénolphtaléine. Le titrage est arrêté lors de l'apparition d'un virage de couleur.

L'acidité titrable est calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Acidité (g/100g)} = (N_b \times V_b \times M) / V_a \times P$$

D'où :

M : Masse molaire de l'acide citrique (192,13 g/mol) ;

V<sub>a</sub> : Volume en millilitres de la prise d'essai ;

V<sub>b</sub> : Volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé ;

N<sub>b</sub> : Normalité de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé (0,1 N) ;

P : Nombre de proton (3).

### II-2.5 Le taux de cendres

Le taux de cendres ou matières minérales totales représente la partie d'un produit qui reste une fois que la matière organique a été totalement extraite. Elle est déterminée selon la méthode décrite par la Norme Internationale **ISO2171 (2007)** par incinération à 550°C de 5g de l'échantillon dans un four à moufle. Et le taux de cendre est déterminé selon la formule :

$$\text{Teneur en cendre (g/100g)} = ((P_v + E) - P_v) / \text{Prise}$$

D'où :

$P_v$  : poids de creusets vide avant l'incinération ;

$P_v+E$  : poids des creusets avec l'échantillon après l'incinération.

### II-2.6 Le dosage de l'azote total

Le dosage de l'azote total est effectué selon la méthode décrite par **Kjeldahl (1889)**. Cette méthode se déroule en trois étapes : minéralisation, distillation et le titrage (**Flouzat, 2012**).

Une prise de 10 mg de la poudre de marc du café sont introduits dans un matras de minéralisation, ensuite, 10mg de catalyseurs (sulfate de cuivre et sulfate de potassium) est ajoutée, puis l'ajout de 20mL d'acide sulfurique concentré ,le mélange va être chauffer à froid pendant 15 minutes jusqu'à l'apparition d'une vapeur blanche d'anhydride sulfurique, l'ensemble est laissé au chauffage à chaud pendant 4-5 heures ,après décoloration complète la solution est refroidit, la dernière étape est de compléter jusqu'à un volume de 250mL avec l'eau distillée.

La distillation aura lieu par le prélèvement de 20 mL de la solution minéralisée additionné de la soude qui est suivie par la distillation.

Le dégagement d'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique qui contient un indicateur coloré (bleu de méthylène et rouge de méthylène).

On utilise pour cela l'équation suivante pour le dosage de l'azote totale :

$$N = 14 \times N_A \times V_A \times d / V_0$$

Avec :

$N_A$  : Normalité de l'acide ;

$V_A$  : Volume, en mL de l'acide versé ;

$V_0$  : Volume en mL de la prise d'essai ;

$d$  : dilution de la fraction considérée.

### **II-2.7 La teneur en protéines**

Le dosage des protéines totales est réalisé selon la méthode de **Bradford (1976)**. Cette méthode colorimétrique permet de déterminer la concentration d'une solution protéique.

Une prise d'essai de 1g de la poudre est diluée dans 50mL d'eau distillé. L'ensemble est agité pendant 30 minutes, avant d'être filtrée. Un volume de 100µL est additionné de 3mL de bleu de Coomassie (**Annexe I**), et l'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un témoin.

La teneur en protéines de la poudre est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée en utilisant la protéine du sérum bovin albumine (SBA) dans les mêmes conditions opératoires (**Annexe I**).

### **II-2.8 Le dosage des sucres totaux**

La teneur en sucres totaux est déterminée selon la méthode de **Dubois (1956)**, en utilisant le réactif du phénol.

Elle consiste à diluer 1g de marc du café dans 50mL de l'eau distillé, suivie d'une agitation pendant 45 minutes à une température ambiante, puis on récupère le filtrat après qu'il subit une filtration, ensuite 2mL de sels de CAREZ I et II (**Annexe II**) sont ajoutés et en fin, on possède à la filtration après avoir laissé décanter pendant 30 minutes.

Pour le dosage, 1mL de filtrat est additionné avec 1mL de phénol à 5% et de 3mL d'acide sulfurique, le mélange est laissé à l'abri de lumière.

Les absorbances sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre à 550nm contre un témoin (D-glucose).

### **II-2.9 Le dosage des sucres réducteurs**

La teneur en sucre réducteur est déterminée par une méthode colorimétrique en utilisant le réactif de DNS (3-5 Di- Nitrosalicylate de Sodium) (**Miller, 1958**).

Une prise d'essai de 1g de marc de café est mélangée dans 50mL de l'eau distillé suivie d'une agitation pendant 45min à une température ambiante, ensuite exécuter une filtration pour avoir un extrait.

200uL de l'extrait est prélevé, additionné à 300uL de réactif DNS (**Annexe III**), après chauffage à 100°C pendant 5min au bain marie, 1,5 mL de l'eau distillé est ajouté, puis une filtration est réalisée suivie d'une conservation à l'abri de lumière.

La densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 530nm et les concentrations en sucres réducteurs sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalon du D-glucose (**Annexe III**).

### **II-3 L'optimisation des conditions de production d enzyme par fermentation submergée**

#### **II-3.1 Choix des paramètres et leurs niveaux**

Avant de procéder à l'optimisation, une étude préliminaire a été effectuée afin de pouvoir sélectionner la concentration optimale de l'enzyme et la période d'incubation pour la production de protéase.

Les enzymes industrielles sont obtenues par fermentation en milieu solide ou par fermentation submergée ou en milieu liquide. La fermentation submergée est plus adaptée pour le développement bactérien qui est très largement utilisée.

La culture submergée des bactéries est le meilleur choix de *Bacillus subtilis* pour leur production à grand échelle, en raison de son utilisation potentielle (**Tong-Cune Zhang et al., 2013**).

Le milieu de culture est préparé à différentes concentration de poudre de marc de café à savoir (1g, 2g, 3g, 4g, 5g et 6g), les cultures sont établies dans des Erlenmeyers qui contiennent un volume de 50mL d'eau distillé, puis stérilisées à 120°C pendant 20min. Les milieux sont ensuiteensemencés par 500 µL de la suspension bactérienne de *Bacillus subtilis*.

La fermentation est ainsi effectuée à 37°C pendant une période allant de deux jours jusqu'à neuf jours. À la fin de chaque test, plusieurs dosages sont effectués : dosage des protéines, sucres totaux et réducteurs, ainsi que la détermination de l'activité enzymatique.

#### **➤ La mesure de l'activité protéolytique**

Une adaptation de la méthode d'**Anson** a été utilisée. Le mélange comprenant 2mL de la solution à tester, 2mL d'acide acétique à 0,2M et 2mL de substrat (marc de café), est mis à incuber pendant une heure à 37°C. La réaction est arrêtée par l'addition de 3mL d'acide trichloracétique (TCA). Après précipitation par le TCA, le mélange est laissé au repos 30

minutes à une température ambiante, puis centrifugé. L'activité protéolytique est mesurée sur le surnageant par l'accroissement de densité optique à 280nm par heure corrigé des blancs substrats et enzymes (**Valin et al., 1967**).

### **II-3.2 Le choix des paramètres d'optimisation**

La méthodologie des surfaces de réponses (MSR) permet d'établir un modèle de régression polynomiale d'ordre 2. Concernant le choix des facteurs, nous nous sommes basés sur les résultats du plan de criblage mais également sur des critères expérimentaux (**Goupy, 2005**).

#### **II-3.2.1 Le choix de la température**

La température d'incubation est l'un des facteurs qui influence la croissance des microorganismes et donc la production de métabolite.

Le choix des températures pour une production maximale de protéase, est fait en se basant sur les études effectuées par (**Pant et al, 2015 ; Qureshi et al, 2011**), qui rapportent que les températures optimums de la production de protéase par *Bacillus subtilis* sont comprises entre 25°C et 55°C, avec un optimum de 35°C.

#### **II-3.2.2 Le choix du pH**

Le pH est un facteur qui affecte le développement des bactéries ainsi que leurs activités enzymatiques.

D'après les études réalisées par (**Puvanakrishnan et al, 2019 ; Latif et al, 2018 ; Pant et al, 2015 ; Qureshi et al, 2011**), le pH optimal pour une production maximale de protéase par *Bacillus subtilis* varie entre 3 et 12, avec un optimum de 7,5.

#### **II-3.2.3 Le choix de la source d'azote**

De nombreuses études indiquent qu'une source d'azote est nécessaire pour produire de la protéase à partir de sous-produits végétaux.

D'après (**Pant et al, 2015 ; Qureshi et al, 2011**), une quantité en source d'azote organique ou inorganique influence la production de protéase, est-elle été meilleure avec une concentration de 0,75% (m/v).

La peptone est utilisée comme source d'azote pour la poudre de marc de café étudié, avec une teneur de 0,50%(m/v) à 1% (m/v) avec une teneur optimale de 0,75% (m/v).

Les trois facteurs retenus pour le plan de Box-Behnken sont le temps (t), la température (T°) et la teneur en peptone.

Après avoir identifié les paramètres optimaux de production de protéase, l'optimisation est réalisée par un plan de Box-Behnken (X1, X2, X3), et à trois niveaux (-1, 0, +1), qui est utilisé pour étudier l'influence de ces éléments sur la production de l'enzyme. Les niveaux bas, moyen et haut de chaque variable sont montrés dans le tableau suivant :

**Tableau III** : Les différents niveaux des paramètres choisis pour l'optimisation.

| Paramètres                | Niveau bas -1 | Niveau centré 0 | Niveau haut +1 |
|---------------------------|---------------|-----------------|----------------|
| <b>X1 (pH)</b>            | 3             | 7,5             | 12             |
| <b>X2 (T°)</b>            | 25            | 35              | 45             |
| <b>X3 (% peptone m/v)</b> | 0,50          | 0,75            | 1              |

Dans ce travail nous avons choisi le plan de Box-Behnken. Ce choix est notamment motivé par le faible coût demandé : 15 expériences doivent être réalisées.

La matrice d'expérience du plan Box-Behnken est représentée dans le tableau qui suit :

**Tableau IV** : La matrice d'expérience donnée par le plan BBD.

| N° d'essai | pH  | T° | Peptone % (m/v) |
|------------|-----|----|-----------------|
| 1          | 3   | 35 | 1               |
| 2          | 12  | 25 | 0,75            |
| 3          | 3   | 25 | 0,75            |
| 4          | 7,5 | 45 | 1               |
| 5          | 7,5 | 45 | 0,5             |
| 6          | 3   | 45 | 0,75            |
| 7          | 7,5 | 35 | 0,75            |
| 8          | 12  | 35 | 0,5             |
| 9          | 12  | 45 | 0,75            |
| 10         | 7,5 | 35 | 0,75            |
| 11         | 7,5 | 35 | 0,75            |
| 12         | 12  | 35 | 1               |
| 13         | 7,5 | 25 | 0,5             |
| 14         | 3   | 35 | 0,5             |
| 15         | 7,5 | 25 | 1               |

**II-4 L'étude statistique**

Les résultats obtenus sont exprimés par une moyenne plus ou moins un écart-type. L'analyse de ces résultats est réalisée par le logiciel STATISTICA, basé sur l'analyse de la variance (ANOVA/MANOVA).

D'autre part, les résultats expérimentaux du plan d'expérience de Box-Behnken sont traités par logiciel JMP plus précisément le JMP10 (qui est un logiciel de statistique dans lequel une partie est consacrée aux plans d'expérience) (**Goupy, 2006**).

A horizontal banner with a wavy, ribbon-like shape, colored in a gradient of red and pink. The text is centered within the banner.

## **Résultats et Discussion**

### III-1 Le matériel biologique

#### III-1.1 L'isolement et l'identification

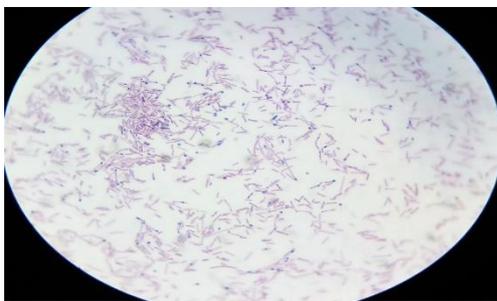
*Bacillus subtilis* est un microorganisme très utilisé pour la production des enzymes importantes industriellement, parmi ces enzymes les protéases (Bouhairi, 2017).

La culture et l'isolement de la souche étudiée, sur le milieu gélose au lait, a donné les résultats suivants :



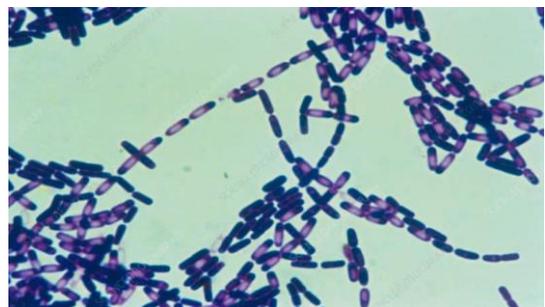
**Figure 01** : Photographie de culture sur la gélose au lait en boîte de Pétri.

Les colonies incubées à 37°C pendant 48h, observée à l'œil nu (observation macroscopique) ont une forme ronde à irrégulière avec des bords qui varient de l'aspect ondulé, les colonies ont une couleur blanchâtre au crème avec une surface lisse.



**A**

**A** : milieu Chapman



**B**

**B** : Coloration de Gram

**Figure 02** : Photographie de la souche cultivée sur milieu Chapman sous microscope optique.

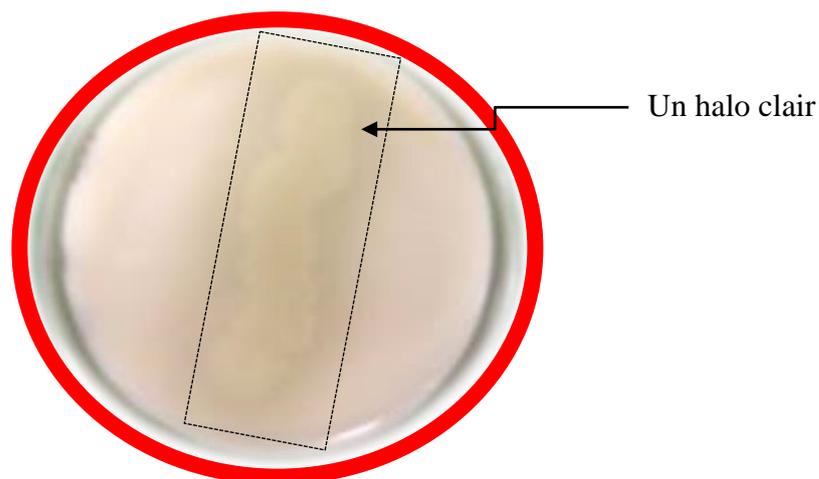
L'observation microscopique, montre la présence des endospores, les cellules sont de morphologie bacilliforme, et la bactérie à Gram positif mobile grâce à des ciliatures péritriches.

Les résultats des examinations microscopiques et macroscopiques de la souche correspondent bien à celle de *Bacillus subtilis* d'après l'étude de (Bouhairi, 2017).

### III-1.2 La mise en évidence de l'activité enzymatique

Les enzymes sont des macromolécules sélectives, qui ont un pouvoir catalytique, qui peuvent accélérer de façon spécifique les réactions chimiques de la cellule à des taux de plus de  $10^{16}$  fois. Elles sont les protéines responsables des transformations biochimiques au sein des cellules des organismes vivants, au centre de l'organisation du métabolisme et aussi de la régulation des processus physiologiques (Charbonneau, 2014).

Le résultat de test de la mise en évidence de l'activité protéolytique, réalisé en boîte de Pétri sur une gélose au lait est présente dans la figure suivante :



**Figure 03** : Photographie de la culture *Bacillus subtilis* sur le milieu gélose au lait.

L'apparition d'un halo translucide autour de la colonie indique que la caséine de lait est dégradée qui veut dire qu'il y a une activité protéolytique.

### III-1.3 L'orientation vers l'identification de la souche isolée

#### III-1.3.1 Le test oxydase

Après avoir déposé sur la lame en disque (Ox) où on a étalé une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur. L'apparition d'une coloration violette est due à la production par la bactérie d'une enzyme oxydase intracellulaire, D'après (Bouhairi, 2017 ; HamLaoui et al, 2006)

montrent que *Bacillus subtilis* est une bactérie qui possède une oxydase positive et aussi une oxydase négative, elle dépend d'une colonie à une autre.

### III-1.3.2 Le test catalase

Le test de catalase de *Bacillus subtilis* est présent dans la figure suivante :



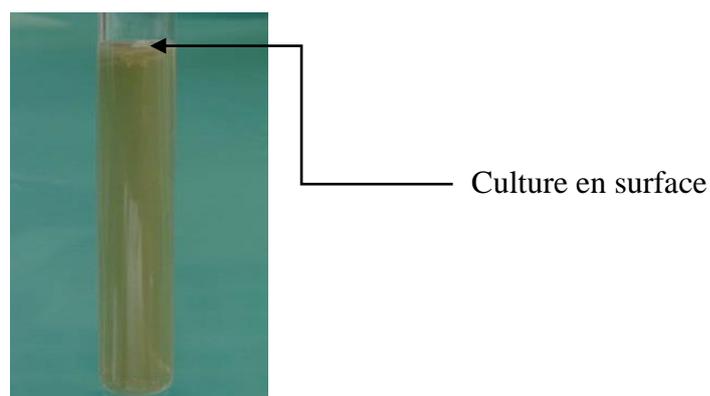
**Figure 04** : Photographie de test catalase pour la souche de *Bacillus subtilis*.

L'ajout de l'eau oxygéné à la colonie de *Bacillus subtilis* permet le dégagement des bulles de gaz qui indique la présence d'une enzyme qui est la catalase.

D'après **De Vos et al. (2009)** et **Stolp (1988)** décrit que le genre *Bacillus* est une catalase (+), ce qui confirme que la bactérie *Bacillus subtilis* possède une catalase (+).

### III-1.3.3 Le type respiratoire

Les résultats obtenus de l'étude de type respiratoire de la souche étudié sont représentés dans la figure suivante :



**Figure 05** : Photographie de *Bacillus subtilis* dans un tube de VF.

Nous remarquons une croissance bactérienne sur la surface extérieure de tube ce qui indique que *Bacillus subtilis* est une bactérie aérobie stricte. Selon **Stolp (1988)** confirme que cette dernière est une souche aérobie stricte.

D'après les études menées par **HamLaoui et al. (2006)**, les différentes caractéristiques de *Bacillus subtilis* sont présentes dans le tableau suivant :

**Tableau V** : Les résultats obtenus de l'étude des caractères biochimiques de *Bacillus subtilis* (Galerie API).

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| Catalase                        | +        |
| Oxydase                         | Variable |
| Réduction de nitrate en nitrite | +        |
| Indole                          | -        |
| Citrate                         | +        |
| Culture anaérobie               | -        |
| Gélatinas                       | +        |
| Lécithine                       | -        |
| Caséine                         | +        |
| Mobilité                        | +        |

### III-2 La caractérisation physico-chimique de la poudre de café (marc de café)

Les résultats obtenus lors de la caractérisation physico-chimique de la poudre de café, sont représentés dans le tableau :

**Tableau VI** : La composition physico-chimique de la poudre de café.

| Compositions         | Valeurs |
|----------------------|---------|
| Humidité (%)         | 19,98   |
| Matière sèche (%)    | 82,96   |
| Cendre (%)           | 0,68    |
| Ph                   | 3,98    |
| Acidité titrable (%) | 0,92    |
| Sucres totaux (%)    | 31,88   |
| Sucres réducteurs    | 19.07   |
| Protéines(%)         | 3.59    |
| Azote total (%)      | 6,61    |

#### III-2.1 Le taux d'humidité

La teneur en humidité est l'un des paramètres de qualité les plus importants de la poudre de café (**Adnan et al., 2017**).

D'après les résultats obtenus, le taux d'humidité dans la poudre de café est en moyenne de 19,88%. Cette valeur est inférieure à celle publiée par **Gomes Correa et al. (2014)**, estimé en moyenne de 56,7%.

Selon l'étude de **d'Hussein et al. (2019)**, la valeur d'humidité du marc de café est de 7,47%, relativement inférieure à celle de notre étude.

**Silva et al. (2018)**, ont surpris d'après leur expérience que la teneur en eau est de 7,43% qui est inférieure à celle de notre échantillon.

Le marc de café présente une forte teneur en humidité lorsqu'une biomasse est utilisée comme combustible, la réduction de la teneur en eau entraine une augmentation du pouvoir calorifique du produit final rend la conversion d'énergie plus efficace (**Gomes Correa et al., 2014**).

### **III-2.2 La matière sèche**

La matière sèche est celle qui reste après un séchage d'un produit qui est constituée de matières minérales et de matière organiques.

Le taux de la matière sèche dans la présente étude, est de 82,96%, proche à celle rapporté par **Dias et al., (2015)** (84,58%).

Selon l'étude menée par **Sikka et al (1985)**, la teneur en matière sèche dans la poudre de café est de 22,45% qui sont inférieure à celle de notre échantillon, et d'après une étude réalisée par **Guy Marcel et al (2011)**, la valeur de la matière sèche est de 90,9% qui est relativement supérieur à celle de notre échantillon. Reste inférieure à celle rapporté par **Campbell et al (1976)**, qui est en moyenne de 91,1%.

### **III-2.3 Les cendres totales**

Les cendres totales sont les résidus de la combustion de la matière sèche. Correspond à la fraction minérale ou matière minérale (**Tramoy et al., 2011**).

Les résultats de la présente étude, montrent que la teneur en cendres totales de marc de café est de 0,68%, cette valeur est inférieure par rapport à celle rapporté par **Guy Marcel et al (2011)** qui est de 1,8%.

D'une autre part, si on compare la valeur de notre expérience à celle obtenue par **Gomes Corrêa et al (2014)** qui est en moyenne de 0,6% on trouve qu'elle est très proche à la teneur obtenus dans notre échantillon.

Le taux des cendres totales présentes dans la poudre de café dans la présente étude est inférieure à celle trouvé par **Mussatto et al (2010)** qui est de 1,6%. D'après **Silva et al (2018)** le pourcentage des cendres est de 1,71% qui est supérieur à celle de notre échantillon.

La variation de la teneur en cendre pourrait s'expliquer par la différence entre les variétés et les mélanges de la poudre de café, il est également possible d'associer la composition

minérale de marc de café à l'état nutritionnel de la plantation de café et sa localisation (**Pigozzi et al., 2018**)

### **III-2.4 Le potentiel d'hydrogène (pH)**

Lorsqu'on introduit des acides ou des bases, seule ou en mélange, dans l'eau pure, les réactions d'échange de protons conduisant à un état d'équilibre qu'on peut caractériser par la quantité de protons hydratés. On utilise à cet effet le pH de la solution, grandeur mesurable expérimentalement, pour désigner l'activité des ions  $H^+$  ou plutôt  $H_3O^+$ . Le pH est un facteur déterminant dans la régulation de nombreuses réactions chimiques, microbiologiques et biochimiques (**Aichatou, 2016**).

D'après les résultats de l'analyse réalisé, le pH de notre échantillon est acide en moyenne de 3,9832, la valeur obtenue est inférieure à celle rapporté par **cruz et Cordovil (2015)** qui est en moyenne de 6,4. Selon Guy, le pH est de 6,2 qui est supérieur à celle de notre échantillon **Scully et al., 2016**, ont envisagé que les valeurs de pH de la poudre de café sont respectivement entre 5,02 et 5,49 qui sont relativement supérieure à celle trouvé dans notre étude.

Le pH de marc de café est un indicateur important de la qualité, cependant, un pH bas peut réduire l'activité enzymatique et d'autres bioprocédés de saccharification et de fermentation (**Scully et al., 2016**).

### **III-2.5 L'acidité titrable**

L'acidité totale titrable est une mesure de tous les protons acides d'un échantillon, y compris les protons non dissociés, qui peuvent être neutralisés par l'ajout d'une base forte (**Rao et Fuller, 2018**).

D'après les résultats obtenus, la teneur en acidité titrable présent dans le marc de café est de 0,9256%, cette valeur est très proche à celle rapporté par **Borém et al., (2016)** qui est en moyenne de 0,97%. Selon une étude réalisée par **Flambeau et al., (2018)** l'acidité titrable dans la poudre de café varient entre 1,23% et 1,66% qui est supérieur à celle de notre échantillon.

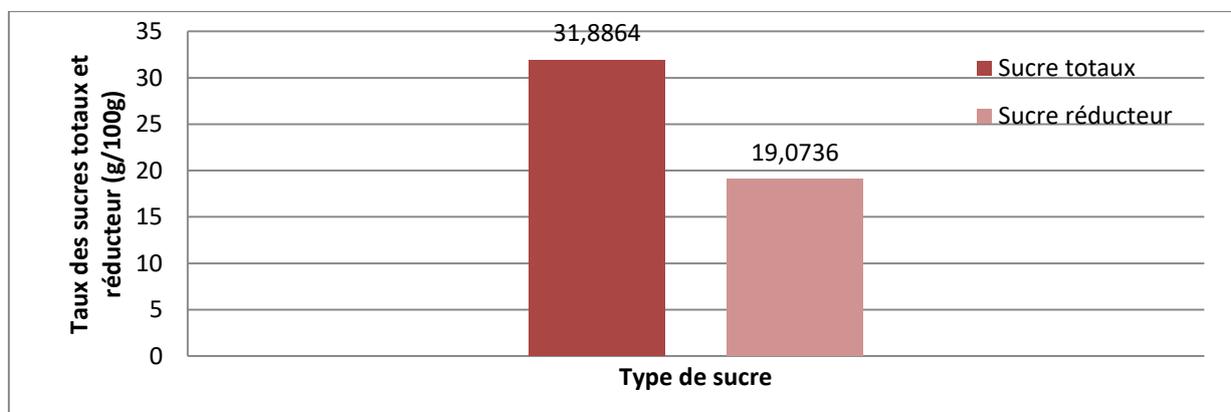
La concentration d'acides dans la poudre de café est largement influencée par les espèces, les conditions de croissance, les méthodes de traitement, le degré de torréfaction et la méthode de brassage. La torréfaction réduit efficacement l'acidité de marc de café qui est due

aux acides organiques tels que les acides acétiques, citrique et chlorogénique (Scully *et al.*, 2016).

### III-2.6 Le teneur en sucres totaux et réducteurs

Les glucides sont les éléments les plus abondants dans le marc de café. En effet, la poudre de café est riche en cellulose (homopolymère de glucose) et en hémicellulose (constituée de mannose, galactose et arabinose) (Mussato *et al.*, 2010).

Les résultats des dosages des sucres totaux et réducteurs sont introduits dans la figure suivante :



**Figure 06** : Le taux des sucres totaux et réducteurs dans le marc de café.

Selon les résultats obtenus de l'étude réalisée, la teneur en sucre totaux et réducteur dans le marc de café sont respectivement en moyenne de 31,88% et 19,07%, est supérieure à celle trouvé par Dias *et al.*, 2015, qui est de 9,7% pour les sucres totaux et de 9,63% pour les sucres réducteurs.

La valeur des sucres totaux dans notre expérience est inférieure à celle rapporté par Ballesteros *et al.*, 2017, qui est en moyenne de 39%. D'après une étude menée par Haile et Kang (2019), le taux des sucres réducteurs présents dans la poudre de café est de 12,4% qui sont inférieur à celle de notre échantillon.

Les conditions de traitement et le séchage peut modifier la composition chimique, la qualité physiologique et sensorielle de la poudre de café. Le marc de café traité par la méthode humide présente des niveaux de sucre total et réducteur inférieurs (Taveira *et al.*, 2015).

### III-2.7 Le dosage des protéines

Les protéines sont des macromolécules constituées d'un enchaînement d'acide aminé unis par des liaisons peptidiques. La structure des protéines, peut être définie selon quatre niveaux : structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire (**Takehiko, 1994**).

Selon les résultats obtenus de l'étude réalisée, le marc de café contient une teneur significative en protéines qui est en moyenne de 3,59%, cette valeur est légèrement inférieure à celle retrouvés par **Gomes Corrêa et al. (2014)** qui est de 4,5%.

La teneur en protéine dans notre échantillon est relativement inférieure à celle rapporté par **Guy Marcel et al. (2011)** qui est de 10,9%.

D'une autre part, si on réfère aux travaux effectués par **Mussatto et al (2010)**, la valeur des protéines est de 13,5% donc, supérieur à celle de notre échantillon. Selon **Hussein et al (2019)**, la teneur en protéine trouvé dans la poudre de café est en moyenne de 8,97% qui est supérieur à celle obtenue dans notre analyse.

La teneur en protéine est plus élevée dans le marc de café car ils peuvent être calculé à partir de la teneur totale en nitrogène de l'échantillon, elle peut avoir été surestimée en raison de la présence d'autres substances azotées comme les caféines, trigoneline, les amines libres et les acides aminés (**Mussatto et al., 2010**).

### III-2.8 Le dosage de l'azote total

L'azote est un élément indispensable à toutes formes de vie. Quatrième élément constitutif de la matière vivant en masse, l'azote entre dans la structure des acides aminés constitue les protéines, des acides nucléiques constituent l'ADN et de certains pigments assimilateurs comme la chlorophylle. C'est également un élément chimique abondant à la surface de la terre. Entrant dans la composition chimique de certains minéraux et sels minéraux comme le nitrate de sodium, nitrocalcite et sal-ammoniac (**Muriel et al., 2014**).

Les résultats obtenus à partir de l'étude menée, montrent que la composition de marc de café en azote est de 6,61%, cette valeur est supérieure à celle rapporté par **Guy (2010)** qui est de 2%. Selon une étude réalisée par **Silva et al (2018)**, la poudre de café contient en moyenne de 2,01% en azote qui est relativement inférieur à celle de notre échantillon.

La valeur retrouvée dans la présente étude est supérieure à celle rapporté par **Rodrigues et al (2010)** qui est de 2,14%. **Limousy et al (2013)**, ont montré d'après leur expérience que la teneur en azote est de 2,3% qui est inférieur à celle de notre échantillon.

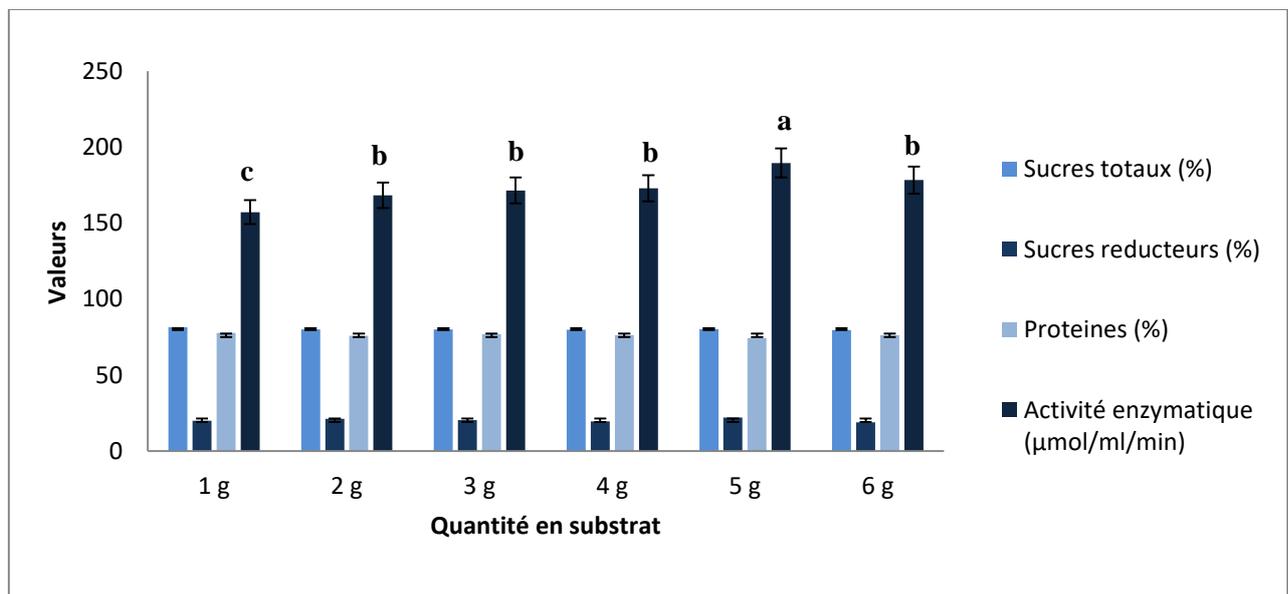
Des différences dans la teneur en azote comparé à celle de notre échantillon, peuvent se produire selon la variété de grains utilisés et les processus de torréfaction et d'extraction qui ont été soumis (**Mussatto et al., 2010**).

### III-3 L'optimisation de la quantité en substrat et temps d'incubation

Les études préliminaires sont effectuées afin de choisir la meilleure concentration en substrat (marc de café), et le temps d'incubation pour la production d'enzyme par fermentation.

#### ➤ L'effet de la quantité en substrat

A partir des résultats de la présente étude, les teneurs en sucres réducteurs, totaux, protéine et l'activité enzymatique en fonction de la concentration de marc de café sont introduit dans la figure suivante :



**Figure 07** : L'effet de la quantité en marc de café sur l'activité enzymatique, teneur en sucres totaux, réducteurs et protéines au bout de six jours.

D'après les résultats obtenus et la figure précédente, qui établit une relation entre la teneur en protéine, sucre réducteur, totaux et l'activité enzymatique en fonction de la concentration en marc de café, on remarque que l'augmentation de l'activité enzymatique est proportionnelle à l'augmentation de la concentration en poudre de café.

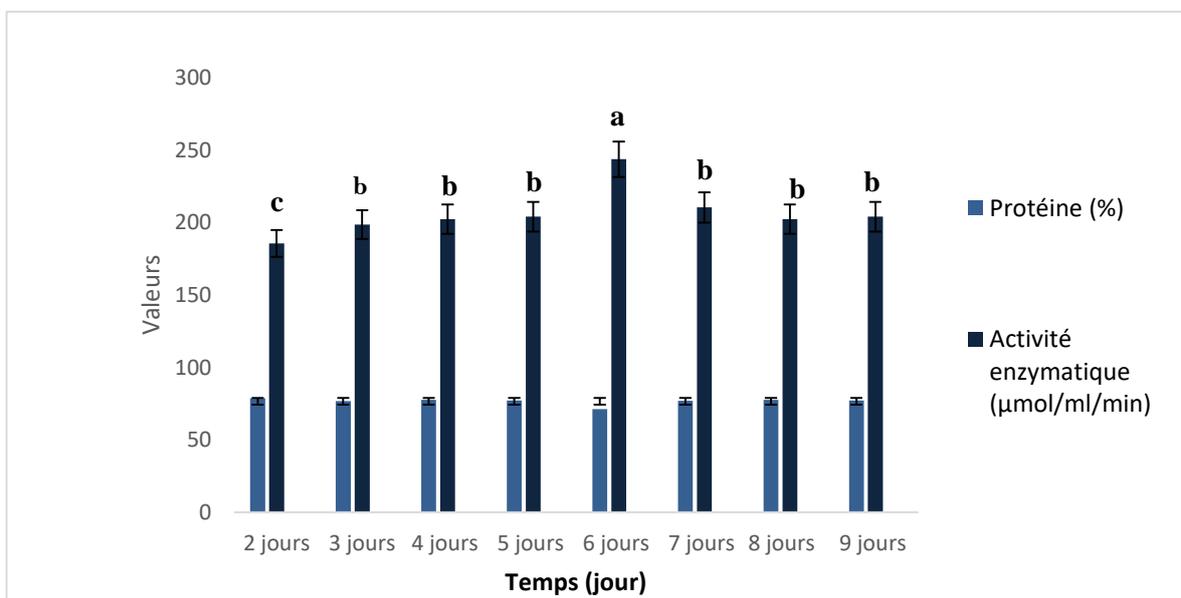
Une augmentation significative de l'activité enzymatique atteignant le niveau le plus élevé (189,61g/50mL) à 5g de la concentration en poudre de café, tandis que la teneur en protéine à ce niveau diminue jusqu'à atteindre la plus faible teneur qui est en moyenne de 74,31%.

D'après **Gaurav et al., (2015)**, qui ont réalisé une étude consiste à purifié et caractériser la protéase alcaline de *Bacillus subtilis* et d'optimiser les conditions pour une production maximale de protéase extracellulaire, la production d'enzyme à partir de microorganisme est fortement influencé par la concentration en substrat, la température et le pH. L'analyse statistique réalisé montre une différence significative entre les teneurs en sucres réducteur, totaux, protéine, et l'activité enzymatique ( $p < 0,05$ ).

#### ➤ L'effet du temps d'incubation

La période d'incubation affecte considérablement la production d'enzyme et varie de 24h à une semaine selon le type de microorganisme et d'autres conditions de culture telles que la taille de l'inoculum, l'état métabolique de pH cellulaire et la température (**Sharma et al., 2017**).

Les résultats menés par notre étude sont présents dans la figure suivante :



**Figure 08** : L'effet du temps d'incubation sur les teneurs en protéines et l'activité enzymatique pour 5g de marc de café.

D'après les résultats obtenus, l'activité enzymatique augmente et atteint un pic maximal de 243,73μmol/mL/min au bout de 6<sup>ème</sup> jours, accompagné d'une diminution de la

teneur en protéine jusqu'à atteindre la valeur la plus faible qui est de 71,05%. L'activité enzymatique diminue avec la prolongation du temps d'incubation, contrairement à la teneur en protéine qui augmente à partir de 7<sup>ème</sup> jours.

En général, le temps nécessaire d'incubation pour la production optimale de protéase par des bactéries ou des champignons peut aller jusqu'à 48h-9jours (**Sharma et al., 2017**).

Parmi les paramètres nutritionnels et culturaux qui entre dans la production de protéase par *Bacillus subtilis* on a la source de carbone, d'azote, le temps d'incubation et la température. La période d'incubation est directement liée à la production d'enzymes et d'autres métabolites dans une certaine mesure (**Imtiaz et al., 2013**).

L'analyse statistique réalisée montre une différence significative entre la teneur en protéine et l'activité enzymatique ( $p < 0,05$ ).

### III-4 Le plan d'expérience Box-Behnken

#### III-4.1 L'analyse des résultats

Les résultats des expériences réalisés par le plan Box-Behnken (BBD) au bout de six jours à une quantité de 5g de marc de café sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau VII** : Les résultats des valeurs réels et prédites par l'application du plan Box-Behnken.

| Tests | pH  | Température | %en<br>peptone | AE Réels | AE Prédites |
|-------|-----|-------------|----------------|----------|-------------|
| 1     | 3   | 35          | 1              | 285,318  | 294,135     |
| 2     | 12  | 25          | 0,75           | 119,207  | 122,340     |
| 3     | 3   | 25          | 0,75           | 127,6    | 126,328     |
| 4     | 7,5 | 45          | 1              | 115,346  | 109,661     |
| 5     | 7,5 | 45          | 0,5            | 127,094  | 134,64      |
| 6     | 3   | 45          | 0,75           | 117,81   | 114,676     |
| 7     | 7.5 | 35          | 0,75           | 348,007  | 348,007     |
| 8     | 12  | 35          | 0,5            | 325,798  | 316,980     |
| 9     | 12  | 45          | 0,75           | 133,265  | 134,536     |
| 10    | 7,5 | 35          | 0,75           | 348,007  | 348,007     |
| 11    | 7,5 | 35          | 0,75           | 348,007  | 348,007     |
| 12    | 12  | 35          | 1              | 242,374  | 246,786     |
| 13    | 7,5 | 25          | 0,5            | 118,613  | 124,297     |
| 14    | 3   | 35          | 0,5            | 258,17   | 253,757     |
| 15    | 7,5 | 25          | 1              | 127,006  | 119,46      |

D'après les résultats obtenus par le BBD, l'activité enzymatique varie entre  $115.34\mu\text{mol/mL/min}$  et  $348\mu\text{mol/mL/min}$ , ce qui montre l'influence des paramètres optimisés qui sont la température, la concentration en peptone et le potentiel d'hydrogène.

Ces résultats sont en accord avec les études réalisées par (Jabeur et al, 2020 ; Ben Mefteh et al, 2019 ; Siala et al, 2012 ; Anbu et al, 2008), qui confirme l'influence des paramètres optimisés sur la production des protéases.

Les résultats de l'analyse effectuée révèlent que les valeurs prédites par le BBD ainsi que les valeurs réelles sont proches.

### III-4.2 Le coefficient de Détermination $R^2$

Selon Goupy, (2006) le  $R^2$  est un paramètre qui nous indique la validité du modèle étudié, le coefficient de détermination de ce modèle est égale à 1 ( $R^2 = 0,99$ ), et la valeur du coefficient de détermination ajustée est de  $R^2_{\text{ajustée}} = 0,99$ . Les résultats obtenus confirment que les valeurs réelles sont très proches des valeurs prédites (Latif et al., 2018).

Le graphe (figure 09), confirme que la courbe des valeurs observés en fonctions des valeurs prévues, à parfaitement l'allure d'une droite, on constate l'accord étroit qui, existe entre les résultats expérimentaux et les valeurs théoriques prévues par le modèle polynomial.

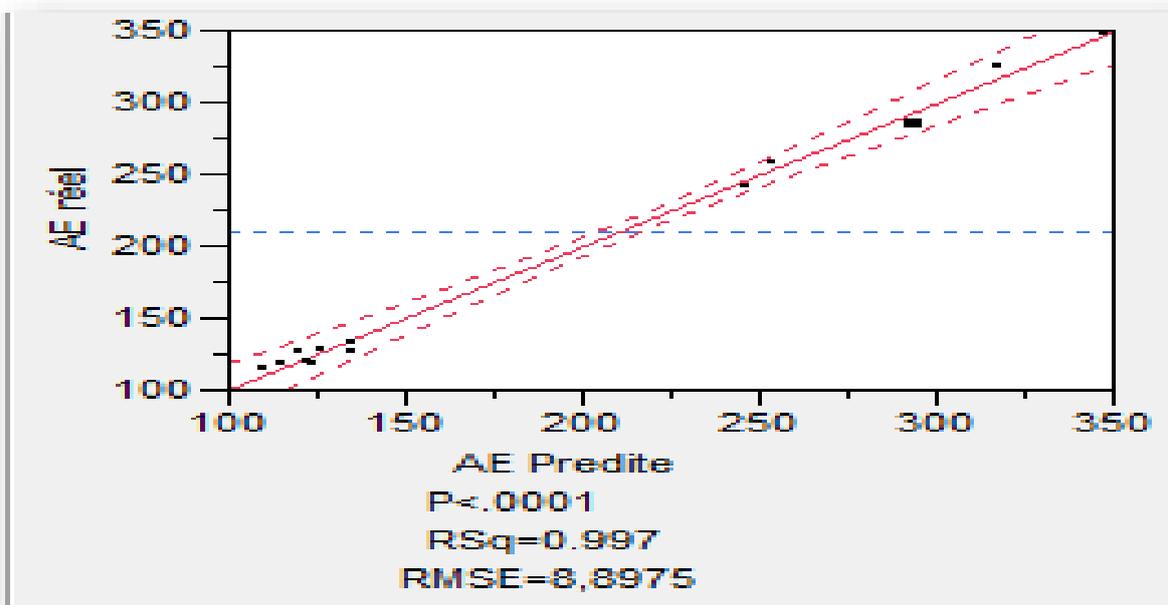


Figure 09 : Le plan de prédiction réel de l'activité enzymatique.

## III-4.3 Le modèle globale et le manque d'ajustement

Tableau VIII : L'analyse de la variance et le manque d'ajustement du BBD.

| Paramètre               | Degrés de liberté | Somme des carrée | Moyenne des carrés | Rapport f | P-value |
|-------------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------|---------|
| Défaut d'ajustement     | 3                 | 395,82812        | 131,943            | 196,0453  | <0,001* |
| Erreur pure             | 2                 | 0,0000           | 0,000              | /         | /       |
| Erreur totale           | 5                 | 395,82812        | /                  | /         | /       |
| RMSE                    | 8,8975            | /                | /                  | /         | /       |
| Coefficient de Variance |                   | /                | /                  | /         | /       |

Les résultats de la présente étude montrent après analyse statistiques, que le modèle est significatif avec ( $p < 0,001$ ), et par cela la validité du modèle est confirmée. Ce modèle pourrait probablement fonctionner pour la production d'enzymes protéolytiques à partir de marc de café.

## III-4.4 L'effet des facteurs

L'effet des facteurs est représenté par les coefficients de régression dans le tableau suivant :

**Tableau IX** : L'estimation des coefficients de régression du modèle polynomial.

| Terme                         | Estimation | Erreur Standard | Rapport r | P-Value |
|-------------------------------|------------|-----------------|-----------|---------|
| Constante                     | -2537,483  | 93,04998        | -27,27    | <0,001* |
| <b>Linéarité</b>              |            |                 |           |         |
| X <sub>1</sub>                | 39,723852  | 5,746466        | 6,91      | 0,0010* |
| X <sub>2</sub>                | 133,33338  | 3,596649        | 37,07     | <0,001* |
| X <sub>3</sub>                | 1095,5377  | 131,4036        | 8,34      | 0,0004* |
| <b>Interactions</b>           |            |                 |           |         |
| X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> | 0,1324889  | 0,098861        | 1,34      | 0,2379  |
| X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> | -24,57156  | 3,954447        | -6,21     | 0,0016* |
| X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> | -2,0141    | 1,779501        | -1,13     | 0,3090  |
| <b>Quadratique</b>            |            |                 |           |         |
| X <sub>1</sub> <sup>2</sup>   | -1,670031  | 0,228662        | -7,30     | 0,0008* |
| X <sub>2</sub> <sup>2</sup>   | -1,897184  | 0,046304        | -40,97    | <0,001* |
| X <sub>3</sub> <sup>2</sup>   | -580,382   | 74,08655        | -7,83     | 0,0005* |

X<sub>1</sub> : pH, X<sub>2</sub> : Température, X<sub>3</sub> : Teneur en peptone

➤ **L'effet linéaire**

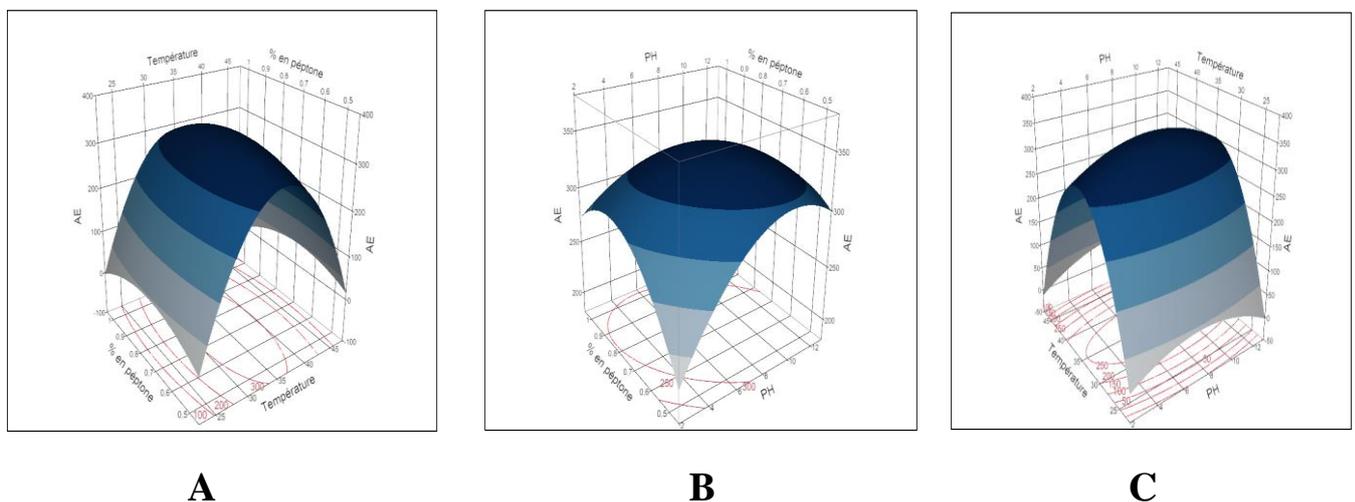
Les résultats obtenus, montrent que les trois facteurs possèdent une influence significative sur l'activité enzymatique. Ces résultats montrent également que le facteur X<sub>2</sub> (température) présente le *p*-value le plus faible (< 0,001\*), ce qui met en évidence le grand impact et l'influence que possède ce facteur (X<sub>2</sub>) sur l'activité de l'enzyme. Ces résultats sont en accord avec la majorité des travaux réalisés par (Dissanayaka et Rathnayake, 2019 ; Nisha et Divakaran, 2014 ; Dhital et al, 2013) dont le but est d'optimiser la production d'enzymes.

Selon **Buchon et al, (2000)** la température influence la production d'enzymes extracellulaires en modifiant les propriétés physiques de la membrane cellulaire des microorganismes.

➤ **L'étude des interactions**

Les résultats obtenus à partir de l'étude menée montrent que l'interaction entre le pH et la source d'azote (peptone) possède une grande influence sur la l'activité enzymatique, le coefficient de ce couple ( $X_1X_3$ ) (**figure B**) est significatif avec un  $p$ -value qui est égale à ( $0,0016^* < 0,001$ ).

Les résultats des différentes surfaces de réponses sont représentés dans les figures suivantes :



**Figure 10** : Les surfaces de réponses obtenues des différentes interactions.

**A** : Surface de réponse d'interaction (température( $X_2$ ), % en peptone( $X_3$ )) ;

**B** : Surface de réponse d'interaction (pH ( $X_1$ ), % en peptone ( $X_3$ )) ;

**C** : Surface de réponse d'interaction (Température( $X_2$ ), pH ( $X_1$ )).

Les résultats de l'analyse de la surface de réponse obtenus, démontre qu'il existe bien une relation étroite entre l'augmentation du pH ainsi que la concentration en source d'azote (peptone), une augmentation de ces deux paramètres est suivie d'une forte activité enzymatique.

Au-delà de leurs valeurs optimales, qui sont respectivement de 8,03 et 0,71% (w/v), on remarque une diminution de l'activité enzymatique, ce dernier est maximal pour un pH acide avoisinant 8. Dès lors, on constate que la bactérie isolée est de nature basophile, est par cela on en déduit que l'enzyme est stable à des valeurs de pH plus ou moins basique ; la source d'azote

est importante dans les milieux de fermentation, qui favorise la production d'enzymes ou de métabolites à des niveaux supérieurs (Gul et al., 2015), ajoutée à une concentration qui est égale à 0,71%, la peptone stimule la production enzymatique qui est traduite par une forte activité (Gaurav et al., 2018).

### III-4.5 Le modèle mathématique

Les résultats obtenus sont résumés sous forme d'une équation polynomiale du second degré, donnée en variables naturelles :

$$Y = -2537,483 + 39,72\text{pH} + 133,33T + 1095,53N - 24,57\text{pH} N - 1,67\text{pH}^2 - 1,89T^2 - 580,382N^2$$

### III-4.6 Les paramètres optimaux et leurs validations

Les conditions optimales proposées par le modèle, ainsi que la valeur prédite de l'activité enzymatique, sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau X** : Les conditions optimales pour la production de l'enzyme.

| Paramètres  | Estimation   |
|---|--------------|
| pH  | 8,0391504407 |
| T (°C)  | 35,042144696 |
| % en peptone  | 0,7128278025 |
| Activité Enzymatique prédite par le BBD<br>( $\mu\text{mol/mL/min}$ ) | 348,79916    |

Dans le cadre d'une approche expérimentale, l'application exacte avec ces estimations s'avère être difficile. Afin de y remédier de légères modifications doivent être apportées :

**Tableau XI** : Les conditions optimales appliquées pour la production d'enzyme.

| Paramètres   | Estimations |
|--------------|-------------|
| pH           | 8,04        |
| T (°C)       | 35          |
| % en peptone | 0,71        |

L'activité enzymatique obtenue après optimisation des paramètres est de 346.007  $\mu\text{mol/mL/min}$ , cette valeur est proche de celle prédite par le logiciel (BBD) qui est de 348.79  $\mu\text{mol/mL/min}$ , ce qui confirme la validation du modèle.



**Conclusion**

## ***Conclusion***

---

L'exploitation des déchets agricoles dans une économie circulaire s'est rapidement développée ces dernières années. Dans le même sens, l'industrie alimentaire a tendance à exploiter différents sous-produits pour recycler les ingrédients afin de valoriser et d'ajouter de la valeur économique aux déchets.

Parmi tous, le marc de café a été largement considéré pour sa réutilisation, qui nécessite un bon plan de gestion (**Gigliobianco et al., 2020**).

La possibilité d'utiliser le marc de café comme substrat pour la production de protéase a été étudié en utilisant l'approche méthodologie de surface de réponse.

Les microorganismes sont connus pour jouer un rôle essentiel dans la technologie de production d'enzymes intracellulaires et extracellulaires à l'échelle industrielle (**Gaurav et al., 2015**). L'espèce *Bacillus subtilis* peut être utilisée pour la production à grand échelle de protéase pour répondre aux besoins actuels du secteur industriel.

Au cours de cette étude, une identification et purification d'une souche protéolytique appartenant au genre *Bacillus* est réalisé.

L'analyse physico-chimique du marc de café a établi la composition suivante : Humidité 19,98%, matière sèche 82,96%, cendre totale 0,68%, pH 3,98, acidité titrable 0,92%, sucre totaux 31,88%, sucre réducteurs 18,34%, protéines 3,59%, azote total 6,61%, ce qui explique la sélection de ce sous-produit comme substrat pour les essais de bio-fermentation, mais un supplément important est ajouté qui est la source d'azote (peptone).

Les résultats des tests préliminaires pour la production de protéase par fermentation submergée ont permis de fixer la concentration du substrat (marc de café) à 5g et le temps d'incubation de la fermentation à six jours.

Les paramètres de croissance optimaux pour la culture de l'organisme sont également déterminés dans cette étude dans le but d'une production maximale de protéase à savoir : le potentiel d'hydrogène (pH), la concentration en peptone (source d'azote) et la température d'incubation, en utilisant le plan d'expérience Box-Behnken. Ce plan a permis d'optimiser la production enzymatique et de réduire le nombre d'expérience à réaliser.

Les résultats de l'optimisation confirment que le modèle est significatif avec des valeurs réelles qui sont très proches de celles prédites avec un coefficient de corrélation  $R^2$  égale à 0,99.

La présente étude montre que les conditions optimales pour la production de protéase par l'application de plan d'expérience BBD sont la température d'incubation qui est en

## ***Conclusion***

---

moyenne de 35°C, le pH de 8,04 et la concentration en peptone de 0,71 (mg/mL), pour une activité protéolytique maximale de l'ordre de 348,79 $\mu$ mol/mL/min.

Les résultats obtenus de cette étude encourageront certainement, les projets visant à exploiter les déchets alimentaires, comme le marc de café, qui aboutissant généralement à la poubelle, ils pourraient être collectés pour produire un extrait à valeur ajoutée.

A la lumière de cette investigation, dans l'objectif de développer et de compléter la présente étude, il serait souhaitable de :

- Optimiser d'autres facteurs influençant la production d'enzyme tel que la concentration d'inoculum, dont l'objectif est d'élargir l'application du modèle Box-Behnken.
- Effectuer d'autres études sur d'autres sous-produits moins chers afin d'élaborer de nouveaux produits à valeur économique.
- Isoler et caractériser d'autres souches capables de produire de nouvelles enzymes autres que la protéase.
- Purifier les protéases afin d'augmenter leur activité.



- **Adil I H., Cetin H, Yener M. et Bayindirli A. (2007).** Subcritical (carbone dioxyde + éthanol) extraction of polyphenols from Apple and peach pomacs, and determination of the antioxydant activistes of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*. 43(1) : p 55-63.
- **Adnan A., Hörsten D. V., Pawelzik E. et Mörlein D. (2017).** Rapid prediction of moisture content in intact green coffee beans using near infrared spectroscopy. *Les Aliments*. 6(5) : p 38.
- **AFNOR (1982).** Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes jus de fruits. Ed. AFNOR, p 325.
- **AFNOR (1986).** Les dossiers de la normalisation ISSN (2). P 8297-4827.
- **Aichatou M. N. (2016).** Mesures, modélisation, prédiction des propriétés physico-chimiques dans les aliments à l'aide d'un modèle thermodynamique application aux produits carnés et aux produits laitiers. Travail de diplôme en vue de l'obtention du grade de docteur d'université. Filière des sciences des aliments, Ecole doctorale science de la vie, santé, agronomie, environnement. P 177.
- **Anbu P., Annadurai G., Lee J-F. et Hur B-K. (2018).** Optimization of alkaline protease production from shewanella oneidensis MR-1 by response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 84(1).
- **Arnaud A., Berset C., Bocquet J., Bouix M., Cerisier Y., Cuvelier G. F., Nettancourt D. D., Engasser G. M., Galzy P., Goursaud J., Guerrini M., Guiraud J. P., Iwena A., Jupin C., Lebeault J-M., Leveau J-Y., Martial J., Mawas C., Normand-Plessier F., Pierrarnd S., Paurque J., Rougel P. J., Richard H., Steenbrugge H., Teoule E., Thomas D. et Vandecasteele J-P. (1993).** Biotechnologies. Technique et documentation Lavoisier, Paris, France : 4<sup>ème</sup> éd, Scriban R. p 904.
- **Asia L., Iqbal M. et Asgher M. (2018).** Ethyl Methane Sulfonate Chemical Mutagenesis of Bacillus subtilis for enhanced production of protease. *Organic and Medicinal Chemistry International Journal*. 5(3) : p 555664.
- **Aviron-Violet P., Baret J. L., Bertrand C, Blazy B. et Bouvier F. (1982).** *Les enzymes : Production et utilisation industrielles*. Paris : Bordas. P 23.



- **Ballesteros L. F., Cerqueira M. A., Teixeira J. A., Mussatto S. I. (2017).** Production and physicochemical properties of carboxymethyl cellulose films enriched with spent coffee grounds polysaccharides. *International Journal of Biological macromolecules*.106(2018) : p 647-655.
- **Belguidoum K. (2014).** Analyse par HPLC-UV et HPLC-DAD-MS du café du marché algérien pour sa composition nutraceutique et mise en évidence de la présence de l'acrylamide, un cancérigène et gérotoxique potentiel dans le café torréfié, Travail de diplôme pour l'obtention du grade de Docteur en sciences chimiques, Faculté des Mathématiques, Informatique et Sciences de la matière, Université de 08 Mai 1945 Guelma. P 131.
- **Bonnin A. L. (2016).** *Autour du café*, Travail de diplôme pour l'obtention du grade de Docteur en pharmacie, faculté de Pharmacie, Université d'Angers. p 211.
- **Borèm F. M., Figueiredo P. L., Ribeiro F. C., Taveira G. H. S., Giomo G. S. et Salva T. J. G. (2016).** The relationship between organic acide sucrose and the quality of speciality coffees. *African Journal of Agricultural Research*. 11(8) : p 710-717.
- **Bouhairi S. (2017).** *Bacillus subtilis* : caractères et applications. Travail de diplôme pour l'obtention du grade de Docteur en pharmacie, faculté de Médecine et de PHarmacie, Université MOHAMMED V-RABAT. P 85.
- **Bradford M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*. 72 : p 248-254.
- **Bravo J., Monente C., Juaniz I. et De Pena M. P. (2013).** Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*. 50 : p 610-616. [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres).
- **Bron S., Meima R., van Dijn J., Wipat A. et Harwood C. (1999).** Molecular biology and genetics of *Bacillus Sp.* Manual of industrial microbiology and biotechnology. ASM Press, Washington, DC. p 392–416.
- **Buchon L., Laurent P., Gounot A. M., Michel J. F. G. (2000).** Temperature dependance of extracellular enzymes production by psychotropic and psychrophilic bacteria. *Biotechnology Letters*. 22(9) : p 1577-1581.

### ᄒ

- **Campbell T. W., Bartley E. E., Bechtle R. M. et Dayton A. D. (1976).** Coffee grounds. I. Effects of coffee grounds on ration digestibility and diuresis in cattle, on in vitro rumen fermentation, and on rat growth. *Journal of Dairy Science*. 59(8) : p 1452-1460.
- **Carassou F. (2015).** *Une récupération spécifique du marc de café aurait-elle une plus-value pour la communauté ? Cas de l'ILE de MONTREAL*, Travail de diplôme pour l'obtention du grade de maître en environnement, Université de SHERBOOKE. P 94.
- **Charbonneau D. (2014).** Eléments structuraux essentiels à la thermostabilité de nouvelles enzymes lipolytiques. Thèse de doctorat en biophysique et biologie cellulaires. Université du Québec à Trois-Rivières. p 218.
- **Colwell R.R. et Crigorova R. (1989).** *Methods in microbiology*. (Ed) St E dimundsburt press limited. Great Britain. P 133-138.
- **Cruz S. et Cordovil MdS C. (2015).** Espresso coffee residues as a nitrogen amendment for small-scale vegetable production. *Society of Chemical Industry* : p 7.

### ᄒ

- **Dalev P. G. (1994).** Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresour. Technol.* 48 : p 265–267.
- **Damhan S., Scully., Amit K., Jaiswal, et Nissreen Abu-Ghannam. (2016).** An Investigation into spent coffee waste as a renewable source of bioactive compounds and industrially important sugars. *Bioengineering*. 3(33) : p 13.
- **Delarras C. (2014).** *Pratique en microbiologie de laboratoire*. Paris. P772.
- **Denis F., Cattoir V., Martin C., Ploy M-C., Poyart C. (2016).** *Bactériologie médicale*. Paris. P 640.
- **Devi M. K., Banu A. R., Gnanaprabhal G. R., Pradeep B. V. et Planiswamy M. (2008).** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*. 1(7) : p 1-6.

## Références bibliographiques

---

- **De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N., Ludwig W., Rainey F., Schleifer K. et Whitman W. (2009).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> ed., The Firmicute. Springer. New York. Volume 3. P 63-67.
- **Dhital R., Panta O. P. et Karki T. B. (2014).** Optimization of cultural conditions for the production of pectinase from selected fungal strain. *Journal of Food Science and Technology Nepal*. 8 : p 65-70.
- **Dias M., Melo M. M., Schwan R. F., Silva C. F. (2015).** A new alternative use for coffee pulp from semi-dry process to  $\beta$ -glucosidase production by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*. 61(6).
- **Dissanayaka DMSU et Rathnayake IVN. (2019).** Effect of temperature, pH, carbon and nitrogen sources on extracellular protease production by four geobacillus species isolated from maha oya geothermal springs in sri lank. *Applied Microbiology Open Access*. 5(1) : p 1-6.
- **Droesbeke J-J., Fine J., Saporta G. (1997).** *Plans d'expériences : Application à l'entreprise. Association pour la statistique et ses utilisations (France) et société de statistique de France* : TECHNIP, p 509.
- **Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Pebers P. A. et Smith F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28 : p 350-356.



- **Faucher J. (2006).** Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue. Travail de diplôme pour l'obtention du grade de Docteur en Génie électrique et automatique. Institut National Polytechnique de Toulouse, p 157.
- **Feillet P. (2000).** *Le grain de blé : composition et utilisation*. Ed Quae. P 308.
- **Flambeau K. J., Yoon J. (2018).** Characterization of raw and roasted fully washed specialty bourbon cultivar of coffea arabica from major coffee growing areas in rwand. *Food Engineering Progress*. 22(2) : p 89-99.
- **Flouzat L. (2012).** *Bilan azoté dans les procédés de valorisation de la biomasse*, travail de diplôme en vue de l'obtention de grade de docteurs. Université de LORRAINE.



- **Gaurav P., Gyana R., Prakash A., Panchupri M., Pavani JVP., Bera S., Deviram GVNS., Kumar A. (2015).** Production, optimization, and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*. 9(1) : p 50-55.
- **Geoffrey Vining G. et Kowalski S. (2010).** Statistical Methods for Engineers. Cengage Learning. p 648.
- **Ghani M., Ansari A., Aman A., Zohra R. R., Siddiqui N. N et Qader S. A. U. (2013).** Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pakistan Journal of pharmaceutical Sciences*. 26 (4) : p 691-697.
- **Gigliobianco M. R., Camisi B., Peregrina D. V., Censi R., Khamitova G., Angelona S., Caprioli G., Zannoti M., Ferrero S., Giovannetti R., Angeloni C., Lupidi G., Pruccoli L., Tarozzi A., Voinovich D. et Martino P. D. (2020).** Optimization of extraction from spent coffee grounds using the desirability approach. *Antioxidants (Basel)*. 9(5) : p 370.
- **Gitishree D. et Prasad M. P. (2010).** Isolation, purification, and mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *Journals Internationaux de Recherche en Microbiologie*. 1(2) : p 27-31.
- **Gomes corrêa G. L., Pereira Santos G. C., Fonseca B. E., Silva Carvalho A. G. (2014).** Drying of spent coffee grounds in a cyclonic dryer. *Coffee Cience Lavras*. 9(1) : p 67-74.
- **Gomez-de la Cruz F. J., Cruz-Peragon F., Casanova-Pelaez P. J. et Palomar-Carnicero J. M. (2015).** A vital stage in the large-scale production of biofuels from spent coffee grounds: The drying kinetics. *Fuel Processing Technology*. 130 : p 188-196. [www.elsevier.com/locate/fuproc](http://www.elsevier.com/locate/fuproc).
- **Goupy J. (1999).** Plans d'expériences pour surfaces de réponse. Edition : DUNOD. Paris : p 13-15.
- **Goupy J. (2005).** Pratiquer les plans d'expériences. Editions DUNOD
- **Goupy J. (2006).** Les plans d'expériences : Ed : Revue MODULAD.N° 34, p 75-76.
- **Goupy J. et. Creighton L. (2006).** Introduction aux plans d'expérience. Ed : DUNOD ,3ème édition, p 322.

## Références bibliographiques

---

- **Goupy J et. Creighton L. (2009).** Introduction aux plans d'expériences. Ed : DUNOD, 4ème édition, p 370.
- **Gul S., Rahman M., Ajmal M., Kabir A. (2015).** Effects of carbon and nitrogen sources on production of proteases by *Bacillus subtilis* IC-5. *Bangladesh Journal of Botany*. 44(2) : p 285-292.
- **Gupta R., Beg Q. K., Lorenz P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59 : p 15–32.
- **Guy D. (2000).** *Tout savoir sur son jardin*. Laurent poret, p 119.
- **Guy Marcel B. K., Andé K. B, Viviane Z., SérapHin K. (2011).** Potentiel food waste and by-products of coffee in animal feed. *Electronic Journal of Biology*. 7(4) : p 74-80.



- **Haile M. et kang W. H. (2019).** *The harvest and post-harvest management practices impact on coffee quality*, DOI/10(5772) / intechopen.89224.
- **HamLaoui L., Dehoum H et Chebabhi K. (2006).** Contribution à l'étude de la lutte biologique des champignons phytopathogènes par l'utilisation de *Bacillus* sp. Université Mohamed Boudiaf – M'SILA.P20.
- **Hiremeth PS. Et Bannigidad P. (2011).** Automated Gram-staining characterization of bacterial cells using color and cell wal properties. *Indian journal. Génie biomédical et technologie*.7(3) : p257-265.
- **Houessou J. K. (2007).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee: development of analytical methods and study of the roasting process. *Life Sciences [q-bio]*. AgroParisTec.,
- **Hussein A., Ali H., Bareth G. et Farouk A. (2019).** Influence of spent coffee ground as fiber source on chemical. *Rheological and Sensory Properties of Sponge Cake*. 22(6) : p 273-282.



- **Ichida J. M., Krizova L., Lefebvre C. A., Keener H. M., Elwell D. L., Burt Jr E. H. (2001).** Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiological Methods*. 47 : p 199–208.

## Références bibliographiques

---

- **Ilkay T., Aziz E. (2011).** Brix degree and sorbitol / Xylitol leved of anthnic pomegrenate (punica gramatum) juice. *Food Chemestry*. 127 : p 1404-1407.
- **Imtiaz S., Mukhtar H. et Ikram-ul-haq. (2013).** Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* using solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research*. 7(16) : p 1558-1568.
- **ISO (International standard organisaztion) 2171. (2007).** Céréales, légumineuses et produit dérivés-dosage du taux de cendres par incinération. 4. ed. p 11.



- **Jabeur F., Mechri S., Kriaa M., Gharbi I., Bejaoui N., Sadok S. et Jaouadi B. (2020).** Statistical experimental design optimization of microbial proteases production under co-culture conditions of chitin recovery from speckled shrimp metapenaeus monoceros by-product, *BioMed Research International*.



- **Kandasamy S., Muthusamy G., Balakrishnan S., Chinnappan S. (2016).** Optimization of protease production from surface modified coffee pulp waste and corn cobs using *Bacillus Sp. By Solid State Fermentation 3 Biotechnology*, 6 (167).
- **Kimouche K. (2008).** *Etude de quelques plans d'expériences associées aux surfaces de réponse*. Travail de diplôme pour l'obtention du grade de Magister. Université Mentouri Constantine, faculté des sciences exactes. p 75.
- **KJELDAHL J. (1883).** Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für Analytische Chemie*. 22 : p 366-382.
- **Kumar D., Savitri Thakur N., Verma R. et Bhalla T. C. (2008).** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Research Journal of Microbiology*. 3(12) : p 661-672.



- **Laxman R. S., Sonawane A. P., More S. V., Rao B. S., Rele M. V., Jogdand V. V., Deshpande V. V., Rao M. B. (2005).** Optimization and scale up of production of

## Références bibliographiques

---

- alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry*. 40 : p 3152–3158.
- **Lecomte H.** (1899). Le café culture-manipulation production. Paris.P342.
  - **Leifa., F., Pandey., A. et Soccol C.R.** (2001). Solid state cultivation – an efficient method to use toxic agroindustrial residues. *Journal Basic Microbiol.* 40 : p 187-197.
  - **Le Moullac G.** (1995). Adaptation des enzymes digestives à l'alimentation chez la crevette *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Thèse. Ecole pratique des Hautes études, faculté des sciences de la Vie et de la Terre. p 106.
  - **Limousy L., Jeguirim M., Dutournié P., Kriem N., Lajili M. et Said R.** (2013). Gaseous products and particulate matter emissions of biomass residential boiler fired with spent coffee grounds pellets. *Fuel*. 107 : p 323-329. [www.elsevier.com/locate/fuel](http://www.elsevier.com/locate/fuel).
  - **Lina F., Ballesteros., José A., Teixeira., Solange I., Mussatto.** (2014). chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food Bioprocess Technology*. 7 : p 3493-3503.
  - **Linder R.** (2005). *Les plans d'expériences un outil indispensable à l'expérimenteur*. Collection du laboratoire central des ponts et chaussées, ISSN 1636-8584. p 320.



- **Machehalek F. et Yakhlef M.** (2015). *Production de la protéase alcaline par des moisissures isolées de source thermale sur milieu à base de plumes de poulet*. Travail de diplôme en vue de l'obtention du diplôme master, filière science biologiques, université des frères Mentouri Constantin. p 52.
- **Mamo G. et Gessesse A.** (1999). Purification and characterization of two raw-strach-degesting thermostable  $\alpha$ -amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*. p 25.
- **Maughan H., et Van der Auwera G.** (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds pHenotypes to be essential though often misleading. *Infection Genetics and Evolution*, 11 (5), p 789–797.
- **Mefteh B. F., Frikha F., Daoud A., Bouket A. C., Luptakova L., Alenezi F. N., Al-Anzi B. S., Oszako T., Gharsallah N. et Belbahi L.** (2019). Response surface methodology optimization of an acidic protease produced by penicillium bilaiae isolate TDPEF30, a newly recovered endophytic fungus from healthy roots of date palm trees (*Phoenix dactylifera* L.). *Microorganisms*. 7(3) : p 74.

## Références bibliographiques

---

- **Meunier N. (1999).** *Evaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales.* Travail de diplôme en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.SC). Filière B.SC.Biochimie. Université é du Québec INRS-Eau : p168.
- **Miller G. L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 31 : p 426-428.
- **Muriel T., Pierre C., Didier S., Christian B., PHillippe L., Matthieu C. (2014).** *Proposition de nouveaux indicateurs d'efficience d'utilisation de l'azote à l'échelle du système de production agricole et du territoire,* travail de diplôme en vue de l'obtention de grade de docteurs d'agro campus ouest. Filière biologie et agronomie, école doctorale vie-agro-santé (VAS) université européenne de Bretagne. p134.
- **Mussatto S. I., Machado E. M. S., Maritns S. et Teixeira J. A. (2011).** Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *LWT - Food Bioprocess Technol.* 4 : p 661-672.

*N*

- **Nisha N. S. et Divakaran J. (2014).** Optimization of alkaline protease production from *Bacillus subtilis* NS isolated from sea water. *African Journal of Biotechnology.* 13(6) : p 1707-1713.

*P*

- **Panchpurib M. et Prasunaa R. G. (2015).** Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science.* 9 : p 50-55.
- **Pant G., Prakasha A., Pavana J. V. P., Beraa S., Devirama G. V. N. S., Kumara A., Panchuprib M. et Prasunaa R. G. (2015).** Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science.* 9 : p 50-55.
- **Pétrick S., Obruca S., Benesova P. et Marova I. (2014).** Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. *Biochemical Engineering Journal.* 90 : p 307-315. [www.elsevier.com/locate/bej](http://www.elsevier.com/locate/bej).

## Références bibliographiques

---

- **Pierre C. (2005).** Les plans d'expériences partie 1 : Principes généraux, *Revue : Contrôles- Essais- Mesures* p 69-72.
- **Pigozzi M. T., Passos F. R. et Mendes F. G. (2018).** Quality of commercial coffees : Heavy Metal and Ash Contents. *Journal of Food Quality*. 2018 : p 7.
- **Puvanakrishnan R., Sivasubramanian S. et Hemalatha T. (2019).** *Microbial Technology : concepts and Applications*, Editeur MJP, p 516.

### Q

- **Qureshi A. S., Bhutto M. A., Khushk I., Dahot M. U. (2011).** Optimization of cultural conditions for protease production by *Bacillus subtilis* EFRI01. *African Journal of Biotechnology*. 10(26) : p 5173-5181.

### R

- **Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. et Deshpande V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (3): p 597-635.
- **Rao N. Z. et Fuller M. (2018).** acidity and antioxidant activity of cold brew coffee. *Scientific Reports*. 8(16030).
- **Rguig M. (2005).** Méthodologie des surfaces de réponse pour l'analyse en fiabilité des plates-formes pétrolières offshore fissurées. Travail de diplôme pour l'obtention du grade de Docteur en Mécanique. Facultés des sciences et des techniques, Université de Nantes, p 139.
- **Rodrigues C. I., Maria R., Maguas C. (2010).** Comparing total nitrogen and crude protein content of green coffee beans (coffee Spp). FROM different geographical origins. *Coffee Science, Lavrad*. 5(3) : p 197-205.

### S

- **Sampaio A., Dragone G., Vilanova M., Oliveira J. M., Teixeira J. A. et Mussatto S I. (2013).** Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee grounds. *LWT - Food Science and Technology*. 54 : p 557-563. [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt).

## Références bibliographiques

---

- **Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G. et Pandey A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 40 : p 2689-2694.
- **Schallmeyer M., Singh, A., & Ward., O. P.** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, (2004) ; 50(1), 1-17.
- **Scriban R. (1993).** Biotechnologie. 4eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier.Paris. p 30-695.
- **Siala R., Frikha F., Mhamdi S., Nasi M. et Sellami A. (2012).** Optimization of acide protease production by *Aspergillus niger* II on shrimp peptone using statistical experimental design. *The Scientific Word Journal*. 2012(3) : p 11.
- **Sikka S. S., Bakshi M. (1985).** Evaluation in vitro of spent coffee grounds as a livestock feed agriculture wastes. 13(1985) : p 315-317.
- **Silva C. F., Vilela D. M., Cordeiro C. D. S., Ferreira W. (2013).** Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29(2) : p 235-247.
- **Silva J. P., Méndez G. L., Lombana J., Marrugo D. G. et Correa-Turizo R. (2018).** PHysicochemical characterization of spent coffee grounds (coffee arabica L) and its antioxidant evaluation, Advance. *Journal of Food Science and Technology*. 16(SPL) : p 220-225.
- **Simon J., Charnock., Barry V., McCleary (2015).** Les enzymes : applications industrielles et analytiques. *Extrait de revue des œnologues*. 116. p : 1-5.
- **Simon P. et Meunier R. (1970).** *Microbiologie industrielle et génie biochimique*. Masson et Cie, paris, France. p 567.
- **Sharma K. M., Kumar R., Panwar S. et Kumar A. (2017).** Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15(1) : p 115-126.
- **Solange I., Mussatto., Livia M., Cameiro., Doño P. A., Silva Inês C., Roberto José A., Teixeira (2010).** A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. 83(2011) : p 368-374.
- **Sumantha A., Larroche C., Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: à perspective. *Food Technology and Biotechnology*. 244 : p 211–220.

## Références bibliographiques

---

- **Stolp H. (1988).** Ecologie microbienne : organismes, habitats, activités. Cambridge University Press. p 308.

### J

- **Takehiko Y. (1994).** Chimie enzymatique et biologie moléculaire des amylases et des enzymes apparentées : CRC Press. p 224.
- **Taveira J. H. D. S., Borém F. M., Da Rosa S. D. V. F., Oliveia P. D., Giomo G. R., Isquierdo E. P. et Fortimats V. A. (2015).** Post-harvest effects on beverage quality and physiological performance of coffee beans. *African Journal of Agricultural Research*. 10(12) : p 1458-1466.
- **Tinsson W. (2005).** La notion de plan d'expérience, in Plans d'expérience : construction et analyses statistiques : p 3-37.
- **Tramoy M., Thibault J., Poillot M., Mignotte B., Barety D., Souverbie É., Alexandre S., Asdrubal M. (2011).** *La photosynthèse*, Educagriéditions. p 132.

### V

- **Valin C., Roussel J., Obled A. (1967).** Isolement d'une fraction protéique à activité protéolytique du muscle de bovin. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*. 7(4) : p 475-483.
- **Vega R. C., Pina G. L., Castaneda H. A. V. et Oomah D. (2015).** Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Food Science and Technology*. 45: p 24-36.

### Z

- **Zamora A. J., Pastoriza S. et Henares J. A. R. (2015).** Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*. 61: p 12-18.
- **Zhang L., Wang Y., Dai J., Tang Y., Yang Q., Luo X. et Fang C. (2009).** *Bacillus korlensis* sp. nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from a sand soil sample in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ; 59 (7), p 1787–1792.

## ***Références bibliographiques***

---

- **Zhang T-C., Ouyang P. K., Kaplan S., Skarnes B. (2013).** *Proceedings of the 2012 international conference on applied biotechnology (ICAB2012)*. New York Dordrecht London. p 645.
- **Zouli S. (2019).** Approche d'étude sur les perspectives de la valorisation du marc de café. Travail de diplôme en vue de l'obtention du diplôme de master. Filière écologie et environnement. Université des frères Mentourie Constantine. P : 28.

## **Annexe I : Dosage des protéines Bradford (1976).**

### **1. Composition du réactif de Bradford**

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| BBC G-250 .....                | 100mg  |
| Ethanol à 95% .....            | 50 mL  |
| Acide phosphorique à 85% ..... | 100 mL |

- ❖ Agitation
- ❖ Compléter à 1000 mL avec l'eau distillée.
- ❖ Conservation à 4 °C et à l'abri de la lumière.

### **2. Préparation de Tampon Phosphate à pH=7**

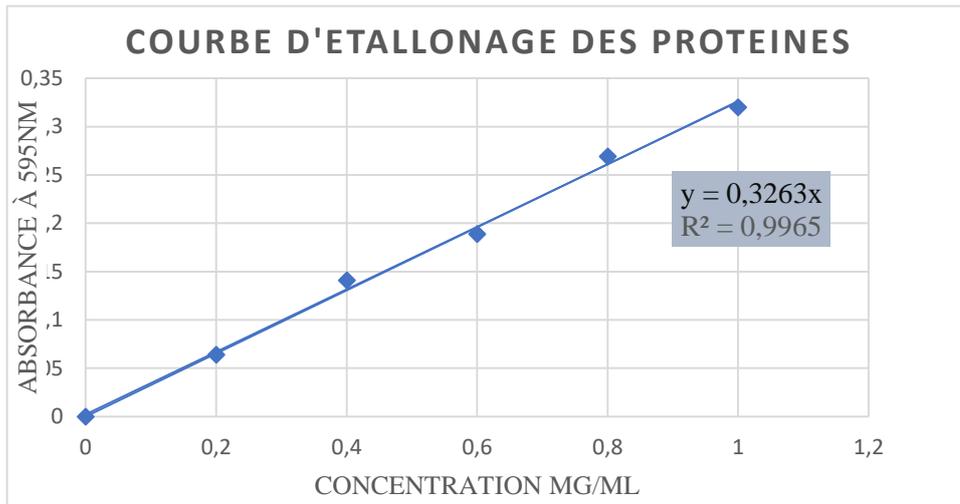
|                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 0,5g                |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 0,26g               |
| Eau distillé .....                    | 25mg pour chaqu'un. |

### **3. Elaboration de la courbe d'étalonnage**

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) (1mg/mL), le protocole suivie est résumé dans le tableau suivant.

**Tableau I** : Préparation de la gamme d'étalonnage de la BSA.

| Facteurs de dilution  | 0 (blanc)          | 0,2   | 0,4   | 0,6   | 0,8   | 1     |
|-----------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Volume SM (µl)        | 0µl                | 20µl  | 40µl  | 60µl  | 80µl  | 100µl |
| Tampon phosphate (µl) | 100µl              | 80µl  | 60µl  | 40µl  | 20µl  | 0µl   |
| Réactif (mL)          | 2Ml                | 2Ml   | 2mL   | 2Ml   | 2mL   | 2mL   |
| Mise à l'obscurité    | Pendant 15 minutes |       |       |       |       |       |
| Absorbance (595nm)    | 0                  | 0,064 | 0,141 | 0,189 | 0,269 | 0,32  |



## Annexe II : Dosage des sucres réducteurs

### 1. Réactif de DNS :

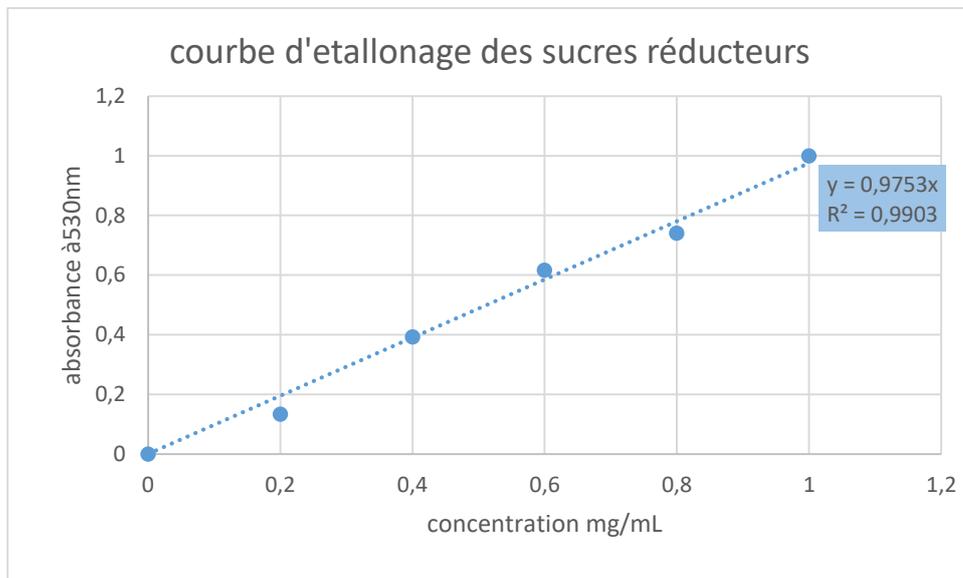
- ❖ DNS .....1g
- ❖ La soude .....1,5g
- ❖ Tartrate double de sodium-potassium .....30g
  - ❖ Compléter à 100mL d'eau distillé
  - ❖ Mélanger
  - ❖ Filtrer
  - ❖ Conserver à l'abri de lumière

### 2. Courbe d'étalonnage :

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de D-glucose (25mg de glucose dilué dans 25mL d'eau distillé), le protocole suivie est résumé dans le tableau suivant :

**Tableau II :** Préparation de la gamme d'étalonnage de glucose.

| Facteurs de dilution    | 0(blanc)                              | 0,2   | 0,4   | 0,6   | 0,8   | 1     |
|-------------------------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Volume SM (µl)          | 0µl                                   | 20µl  | 40µl  | 60µl  | 80µl  | 100µl |
| Eau distillé (µl)       | 100µl                                 | 80µl  | 60µl  | 40µl  | 20µl  | 0µl   |
| Réactif de DNS (mL)     | 1mL                                   | 1mL   | 1mL   | 1mL   | 1mL   | 1mL   |
| Mise dans un bain marie | à 100 °C pendant 5 minutes            |       |       |       |       |       |
| Laisser refroidir       | 2,5mL d'eau distillé pour chaque tube |       |       |       |       |       |
| Laisser reposer         | Pendant 15 minutes                    |       |       |       |       |       |
| Absorbance (530nm)      | 0                                     | 0,134 | 0,393 | 0,616 | 0,740 | 1,000 |



### Annexe III : Dosage des sucres totaux

#### 1. Sel de CAREZ I

- ❖ Acétate de zinc trihydraté.....23,8g
- ❖ Acide acétique glaciale.....3g
- ❖ Eau distillé.....100mL
- ❖ Mélanger

#### 2. Sel de CAREZ II

- ❖ Ferrocyanure de potassium.....10,6g
- ❖ Eau distillé.....100mL
- ❖ Mélanger

## Résumé

Ce travail est consacré à l'optimisation des paramètres influençant la production des protéases à partir du marc de café par fermentation en utilisant *Bacillus subtilis*. Au cours de cette étude une souche microbienne est isolée, purifiée et identifiée comme *Bacillus sp.* Cette dernière est ensemencée sur le marc de café dont la caractérisation physicochimique a révélé des taux d'humidité, de cendre totale, un pH, une acidité titrable, de sucres totaux, et sucres réducteurs, une teneur en protéine et en azote total de l'ordre 19,98%, 0,68%, 3,98, 0,92%, 31,88%, 19,07%, 3,59%, 6,61%, respectivement. L'étude préliminaire de l'influence de la concentration du substrat et de temps d'incubation sur la production de ces enzymes a démontré que l'activité enzymatique est obtenue avec une concentration de poudre de 5g pour un temps de fermentation de six jours. L'application du model BBD à trois facteurs (pH, température d'incubation et concentration en peptone) avec les trois niveaux (-1, 0, +1) a révélé que la meilleur activité enzymatique (348,799  $\mu\text{mol/mL/min}$ ) est obtenue avec les conditions optimales de pH, de température et de concentration en peptone de l'ordre de 8,04, 35°C, 0,71 (mg/mL) respectivement qui est proche à celle de l'activité enzymatique expérimentale (346.007  $\mu\text{mol/mL/min}$ ).

**Mots clés :** Marc de café, optimisation, Box-Behnken, protéases, enzyme, fermentation, activité enzymatique, *Bacillus subtilis*.

## Abstract

This work is dedicated to the optimization of parameters influencing the production of proteases by bio-fermentation using *Bacillus subtilis* from coffee grounds. During this study a microbial strain is isolated, purified and identified as *Bacillus*. The latter is seeded on the coffee grounds, of which the physicochemical characterization reveals levels of humidity, total ash, pH, titratable acidity, total sugars, reducing sugars, a content of protein and total nitrogen of the order of 19.98%, 0.68%, 3.98, 0.92%, 31.88%, 19.07%, 3.59% and 6.61% respectively. Preliminary study of the influence of substrate concentration and incubation time on the production of these enzymes demonstrated that the enzymatic activity is obtained with a powder concentration of 5g for a fermentation time of six days. The application of the three-factor BBD model (pH, incubation temperature and peptone concentration) with the three levels (-1, 0, +1) revealed that the best enzyme activity (348.799  $\mu\text{mol/mL/min}$ ) is obtained with the optimum conditions of pH, temperature and peptone concentration of the order of 8.04, 35°C, 0.71 mg/mL, respectively, which is close to the experimental enzymatic activity (346.007  $\mu\text{mol/mL/min}$ ).

**Keywords:** Coffee grounds, optimization, Box-Behnken, proteases, enzyme, fermentation, enzymatic activity, *Bacillus subtilis*.

## المخلص

تم تخصيص هذا العمل لتحسين المعلمات التي تؤثر على إنتاج البروتياز من القهوة المطحونة عن طريق التخمير، باستخدام *Bacillus subtilis*. خلال هذه الدراسة، تم عزل سلالة جرثومية وتنقيتها، وتحديدتها على أنها *Bacillus sp*، بزرع الأخير على حبوب القهوة، وقد أظهر التوصيف الفيزيائي الكيميائي مستويات الرطوبة، والرماد الكلي، ودرجة الحموضة، والحموضة القابلة للمعايرة، والسكريات الكلية، والسكريات المختزلة، والبروتين، ومحتوى النيتروجين الكلي في لتر، الطلب 19.98%، 0.68%، 3.98%، 0.92%، 31.88%، 19.07%، 3.59%، 6.61%، على التوالي. أظهرت الدراسة الأولية لتأثير تركيز الركيزة، ووقت الحضانة على إنتاج هذه الإنزيمات أن النشاط الإنزيمي يتم الحصول عليه بتركيز مسحوق يبلغ 5 جم لمدة تخمير ستة أيام، أظهر تطبيق نموذج BBD ثلاثي العوامل (الأس الهيدروجيني، ودرجة حرارة الحضانة، وتركيز البيبتون) بالمستويات الثلاثة (-1، 0، +1) أنه تم الحصول على أفضل نشاط إنزيمي 348.799 ميكرو لتر/مل/دقيقة، باستخدام الظروف المثلى للأس الهيدروجيني، ودرجة الحرارة، وتركيز البيبتون بترتيب 8.04، 35 درجة مئوية، 0.71 (ملغ/ مل) على التوالي، وهو قريب من النشاط الأنزيمي التجريبي (346.007).

**الكلمات المفتاحية:** القهوة المطحونة، التحسين، BOX-Behnken، البروتياز، الإنزيم، التخمير، النشاط الأنزيمي، *Bacillus subtilis*.