

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université A. MIRA-Bejaia**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**  
**Filière : Sciences biologiques**  
**Spécialité : Génie Biologique**



**Réf : .....**

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

**MASTER**

*Thème*

**Optimisation par le plan d'expérience  
Box-Behnken de la production d'une  
pectinase à partir des écorces d'agrumes**

Présenté par :

**HALHAL Yuba & HADROUG Salma**

Soutenu le : 22/06/2017

Devant le jury composé de :

<b>M<sup>r</sup> BOUKAROUI</b>	<b>PR</b>	<b>Président</b>
<b>M<sup>r</sup> BOUKHALFA</b>	<b>MAA</b>	<b>Encadreur</b>
<b>M<sup>me</sup> ARKOUB</b>	<b>MCB</b>	<b>Examinatrice</b>

**Année universitaire : 2016/2017.**

# Dédicaces

*Je remercie Dieu tout puissant d'avoir pu achever ce modeste travail que je dédie :*

*À mes chers parents, en témoignage de ma reconnaissance, pour leurs compréhensions et leurs soutiens, et plus particulièrement à ma mère, pour laquelle, ni ces quelques lignes, ni ces quelques mots ne seront suffisant pour définir la gratitude que je lui dois et l'immense reconnaissance que je porte envers elle, pour ses encouragements, ses conseils, je ne pourrai jamais la remercier assez.*

*Je le dédie aussi à ma seule et unique sœur Dalicia, à laquelle je souhaite la réussite dans l'avenir.*

*À ma binôme M<sup>lle</sup> Hadroug, sans oublier mes amis qui m'ont aidé, que ce soit de près ou de loin (Nacer-Eddine, Malika, Saïda, Anis, Merieme.Y, Khadija), est bien d'autres que j'estime, merci à eux, à leurs soutiens et leur compréhension.*

*Et à notre promotion 2016/2017 de Génie biologique.*

**YUBA**



# Dédicace

*À mes chers parents, ma mère et mon père, pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard, pour leur patience, leur amour et leur encouragement.*

*Que ce travail leur apporte joie et fierté;*

*À mes chers frères Larbi, Mounir et ma sœur Sarah et à toute ma famille;*

*À tous mes professeurs, particulièrement notre encadreur M<sup>r</sup> F.BOUKHALFA que je ne remercierai jamais assez. Permettez moi de vous dire, monsieur, que ce travail est le vôtre, vous serez toujours en ma mémoire, un symbole de sagesse et de bravoure;*

*À mon binôme M<sup>r</sup> HALHAL;*

*À mes très chers amis pour leurs aide et soutiens.*



SALMA



# *Remerciement*

*On tient à remercier par le biais de ce travail dieu le tout puissant, pour la patience dont il nous a fait usage, le courage ainsi que la volonté pour la réalisation de ce document.*

*La première personne que nous tenons à remercier, est notre encadreur **Mr BOUKHALFA.F**, en le remercie de nous avoir pris sous son aile, de nous avoir orienté, ainsi que pour sa patience, sa confiance, pour ses bonnes explications et ses conseils, qui nous ont guidé et éclairé dans nos recherches afin d'accomplir au mieux ce modeste travail.*

*Nous adressons toute notre gratitude à notre président de jury Monsieur **BOUKEROUI**, ainsi que l'examinatrice madame **ARKOUB**, pour avoir accepté de juger notre modeste travail.*

*Nous tenons également à remercier M<sup>elle</sup> **Belhemiche**, pour tous ces conseils, son soutien, ainsi que sa contribution à la réalisation de ce travail.*

*Merci également à tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici notre profonde reconnaissance.*

*Enfin nos remerciements sont adressés plus particulièrement à nos familles et nos amis(es) qui ont su nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tout au long des années.*

# Sommaire

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction** ..... 1

## **CHAPITRE I: RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE**

I. Agrumes.....	3
I.1. Généralités sur les agrumes.....	3
I.2. Intérêts nutritionnels .....	3
I.3. Commerce des agrumes .....	3
I.4. Production d'agrumes .....	4
I.5. Orange.....	5
II. Enzymes.....	6
II.1. Généralités sur les enzymes.....	6
II.2. Enzymes industriels .....	6
II.3. Enzymes pectinolytiques .....	7
II.4. Applications des enzymes pectinolytiques .....	7
II.5. Champignon pectinolytique.....	8
III. Plans d'expériences .....	9
III.1. Définition d'un plan d'expérience.....	9
III.2. Terminologie .....	10
III.3. Plans de surfaces et de réponse (RSM) .....	11
III.4. Plans de Box-Behnken .....	11
III.5. Modèle mathématique postulé : .....	12

## **CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES**

I. Matériel végétal .....	13
I.1. Échantillonnage et traitement.....	13
I.2. Matériel biologique .....	13

I.2.1. Isolement et purification du microorganisme .....	13
I.2.2. Mise en évidence de l'activité pectinolytique.....	14
II. Caractérisation physico-chimiques de la poudre d'écorce d'orange .....	14
II.1. Taux d'humidité .....	14
II.2. Taux de matière sèche (MS).....	15
II.3. Taux de cendres totales.....	15
II.4. Potentiel d'hydrogène (pH) .....	15
II.5. Acidité titrable .....	16
II.6. Teneur en sucres totaux .....	16
II.7. Teneur en sucres réducteurs .....	17
II.8. Teneur en protéines .....	17
II.9. Dosage de l'azote total .....	17
III. Dosage de l'activité enzymatique .....	18
IV. Optimisation des paramètres pour la production d'enzyme.....	19
IV.1. Étude préliminaire.....	19
IV.2. Choix des paramètres d'optimisation.....	20
IV.2.1. Choix de la température .....	20
IV.2.2. Choix du pH.....	20
IV.2.3. Choix de la source d'azote .....	20
V. Étude statistique .....	22

### **CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION**

I. Matériel biologique.....	23
I.1. Isolement et identification.....	23
I.2. Mise en évidence de l'activité enzymatique .....	24
II. Caractérisation physico-chimiques de la poudre d'écorce d'orange étudiée .....	25
II.1. Taux d'humidité .....	26
II.2. Matière sèche.....	26
II.3. Cendres totales.....	27
II.4. Potentiel hydrogéné (pH).....	27
II.5. Acidité titrable .....	28
II.6. Dosages des sucres totaux et réducteurs .....	28
II.7. Dosage des protéines .....	30
II.8. Dosage de l'azote total .....	30

III. Études préliminaires .....	31
III. Plans d'expérience Box-Behnken .....	34
III.1. Analyse des résultats .....	34
III.2. Coefficient de détermination $R^2$ .....	34
III.3. Modèle globale et le manque d'ajustement.....	35
III.4. Effet des facteurs .....	36
III-5. Modèle mathématique.....	37
III-6. Paramètres optimaux et leurs validations.....	38
<b>Conclusion</b> .....	39

### **Références bibliographique**

### **Annexes**

## *Liste des abréviations*

- AE: Activité Enzymatique.
- BBD: Box-Behnken Desing.
- BSA: Serum Bovine Albumin.
- DNS: 3,5-Acide Dénitrosalicilique.
- DADRP : Direction de l'agriculture, du développement rural et de la pêche (Bejaïa).
- FAOstat : Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database.
- MADRP : Ministère de l'agriculture, du développement rural et de la pêche (Alger).
- PDA: Potato Dextrose Agar.
- PEO : Poudre d'Ecorce d'Orange.
- Prot: Protéine.
- MRS : Méthodologie de surface de réponse.
- SR : Sucre Réducteur.
- ST : Sucre Totaux.
- USD : Dollar américain.

## *Liste des figures*

<i>Figures</i>	<i>Titres</i>	<i>Pages</i>
<b>Figure N°1</b>	Principales régions productrices d'agrumes dans le monde (zones orange)	<b>5</b>
<b>Figure N°2</b>	Coupe transversale à travers un agrume	<b>6</b>
<b>Figure N°3</b>	Aspect macroscopique d'une culture d' <i>Aspergillus niger</i> sur milieu MEA	<b>9</b>
<b>Figure N°4</b>	Aspect microscopique des conidies d'une culture d' <i>Aspergillus niger</i>	<b>9</b>
<b>Figure N°5</b>	Plan de Box- Behnken pour trois facteurs	<b>11</b>
<b>Figure N°6</b>	Photographie des cultures sur le milieu PDA en boîte de Petri (Aspect macroscopique)	<b>23</b>
<b>Figure N°7</b>	Photographie de la souche cultivée sur milieu PDA (Aspect microscopique)	<b>23</b>
<b>Figure N°8</b>	Photographie de la culture <i>Aspergillus niger</i> sur milieu solide à base de pectine	<b>24</b>
<b>Figure N°9</b>	Photographie de l'analyse qualitative de l'activité enzymatique après coloration	<b>25</b>
<b>Figure N°10</b>	Taux des sucres totaux et réducteurs dans la PEO	<b>29</b>
<b>Figure N°11</b>	Effet de la concentration en PEO sur l'activité enzymatique, teneur en sucres totaux, Réducteurs, Protéines	<b>31</b>
<b>Figure N°12</b>	Effet du temps d'incubation sur les teneurs en sucres totaux, réducteurs, protéines, et l'activité enzymatique	<b>32</b>
<b>Figure N°13</b>	Résultats des valeurs réels et prédite par l'application du plan Box- Behnken	<b>34</b>
<b>Figure N°14</b>	Plan de prédiction réel de l'activité enzymatique	<b>35</b>
<b>Figure N°15</b>	Surfaces de réponses obtenues des différentes interactions	<b>37</b>

## *Liste des tableaux*

<i>Tableaux</i>	<i>Titres</i>	<i>Pages</i>
<b>Tableau I</b>	Applications des enzymes pectinolytiques microbiennes	8
<b>Tableau II</b>	Différents types des plans d'expériences	10
<b>Tableau III</b>	variation en concentration du substrat en fonction du temps d'incubation	19
<b>Tableau IV</b>	variation du temps d'incubation en fonction de la concentration en substrat	19
<b>Tableau V</b>	Différents niveaux des paramètres choisis pour l'optimisation	21
<b>Tableau VI</b>	Matrice d'expérience donnée par le plan BBD	21
<b>Tableau VII</b>	Composition physico-chimique de la poudre d'écorce d'orange	26
<b>Tableau VIII</b>	Analyse de la variance et le manque d'ajustement du BBD	35
<b>Tableau IX</b>	Estimation des coefficients de régression du modèle polynomiale	36
<b>Tableau X</b>	Conditions optimales pour la production de l'enzyme	38
<b>Tableau XI</b>	Conditions optimales appliquées pour la production de l'enzyme	38

## *Liste des figures insérées en annexes*

<i>Figures</i>	<i>Titres</i>	<i>Annexe</i>
<b>Figure B.1</b>	Domaine d'un facteur	<b>B</b>
<b>Figure B.2</b>	Domaine d'étude	<b>B</b>
<b>Figure D.1</b>	Courbe d'étalonnage des protéines	<b>D</b>
<b>Figure E.1</b>	Courbe d'étalonnage des sucres totaux	<b>E</b>
<b>Figure F.1</b>	Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs	<b>F</b>
<b>Figure G.1</b>	Courbe d'étalonnage de l'Acide galactorunique	<b>G</b>

## *Liste des tableaux insérés en annexe*

<i>Tableaux</i>	<i>Titres</i>	<i>Annexe</i>
<b>Tableau B.1</b>	Matrice d'expérience à deux facteurs.	B
<b>Tableau D.1</b>	Préparation de la gamme d'étalonnage de la BSA.	D
<b>Tableau E.1</b>	Préparation de la gamme d'étalonnage de Glucose.	E
<b>Tableau F.1</b>	Préparation de la gamme d'étalonnage de Glucose en utilisant la DNS	F
<b>Tableau G.1</b>	Préparation de la gamme d'étalonnage de l'Acide galacturonique.	G
<b>Tableau I.1</b>	Plan et résultats de l'optimisation de l'activité enzymatique par le BBD	I

La filière fruitière des agrumes a connue une importante progression au cours de ces dernières décennies, ce marché dont l'enjeu économique pèse lourd à l'échelle mondiale est dominé principalement entre 2013 et 2014 par le Brésil, la chine, l'inde, les États Unis, L'union européen, le Mexique, L'Egypte, la Turquie et l'Afrique du sud, avec environs 140 millions de tonnes, dont 60 % étaient des oranges (**Bustamante et al., 2016**). L'essentiel de la production mondiale est consommé frais, l'autre partie est destiné aux industries dont 70% des fruits traités sont utilisés pour la fabrication des jus d'orange et 20% pour les jus de citron (**Valenti et al., 2017**).

Durant ce processus, des pertes colossales sont infligées aux industriels, car juste environ 50% du poids des oranges fraîches est transformé en jus, et le reste des fruits sont considérés comme des sous-produits (**Rodriguez-Lopez et al., 2013**).

La valorisation ainsi que la bonne gestion de ces sous-produits, constitués principalement d'écorces (albedo, falavedo), la pulpe restantes après extraction du jus et les pépins, est un moyen qui permettra non seulement d'évité la pollution de l'environnement, mais également de diminuer les pertes économiques imposées à ces industries (**Puértolas et Barba, 2016**).

L'avènement des nouvelles biotechnologies, est le précurseur de la valorisation de ces sous-produits par l'utilisation des procédés de bio-fermentation à l'élaboration de nouveau produit entre autres les enzymes à savoir ; les pectinase, amylases, cellulases et les tannases en se basant sur l'utilisation des microorganismes tel que *Aspergillus sp*, *Rhizopusstolonifer*, *Aletranaria mali*, *fusariumoxysporum*.

La production des enzymes pectinolytiques par fermentation est guidée par le biais de plusieurs paramètres à savoir la température, le pH, la concentration en substrat, la charge microbienne ainsi que d'autres facteurs.

De ce fait, la nécessité d'optimisation de la production s'impose plus que nécessaire, par l'utilisation de l'approche mathématique, dans le but de minimiser le nombre des essais et de réduire les expériences.

Cette méthode est un ensemble de technique statistique et mathématique de conception des expériences, qui permet de construire un model expérimental et d'évaluer l'effet des facteurs séparément et simultanément (**Shu et al., 2013**), afin de déterminer le maximum de production et d'activité enzymatique, dont s'inscrit l'objectif de la présente étude qui consiste à l'optimisation de

la production des enzymes pectinolytiques à partir des écorces d'orange en appliquant la méthodologie de surface de réponse (RMS), par le plan d'expérience Box-Behnken (BBD).

Le plan adopté pour explorer cet objectif est subdivisé en deux grandes parties, dont la première est une synthèse bibliographique mettant au point le fruit d'agrumes, son aspect nutritionnel et son utilisation, les enzymes et leurs implications dans divers domaines ainsi que des notions de plans d'expériences et leurs diversités.

La deuxième partie expérimentale mettant au point le matériel et les méthodes utilisées pour l'isolement, l'identification, 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 avant de finaliser par une conclusion et perspectives.

## I. AGRUMES

### I.1. Généralités sur les agrumes

Les agrumes sont les espèces de trois genres principaux du groupe *citrinae* dans la famille des Rutacées : *Citrus* (la majorité des agrumes), *Fortunella* (les Kumquats) et *Poncirus*.

Chaque genre se décline en espèces (par exemple *Citrus limon*, le citronnier...) et en variétés (*Citrus limon* 'Eureka') (**Bénédicte et Bachés, 2011**).

Certains agrumes sont cultivés en Asie depuis plusieurs millénaires, les plus anciennes références manuscrites connues dont le *shu jing*, ont cité que la culture des agrumes couvrent plusieurs millions d'hectares, elle s'est intensifiée au cours du temps à l'échelle mondiale environ entre le 19<sup>ème</sup> et 20<sup>ème</sup> siècle. Les agrumes sont originaires d'Asie subtropicale et plus particulièrement d'une zone allant du nord-est de l'Inde jusqu'au nord de l'Indonésie, en passant par le Myanmar (Birmanie) et le sud de la Chine. La première importation d'agrumes en zone méditerranéenne remonterait au III<sup>e</sup> siècle av. J.-C (**Jacquemond et al., 2013**).

### I.2. Intérêts nutritionnels

Les agrumes sont généralement consommés frais, appréciés par la majorité de la population. Ce sont des fruits riches en minéraux tel que le Fe, Ca, K, Mg, et en composés phénoliques, ainsi qu'en flavonoïdes possédant une très grande activité anti-oxydante. Les nombreuses études épidémiologiques réalisées ont montré qu'une très grande consommation en agrumes (orange, citron...), a le pouvoir de réduire les risques cardio-vasculaires, ainsi que plusieurs différents types de cancer (**Gorinstein et al., 2001**), et présente aussi plusieurs autres activités antimicrobiennes, et anti-inflammatoires (**Hamdan et al., 2013**).

D'autres études ont montré l'abondance des agrumes en vitamine C, dont il a été démontré qu'un verre de jus d'orange peut couvrir 20 à 80% des besoins du corps humain en vitamine C. Cette vitamine dont le rôle est de capter les radicaux libres, comme le radical hydroxyle et peroxyde d'hydrogène (**Ramful et al., 2011 ; Magwaza et al., 2017**).

### I.3. Commerce des agrumes

#### ➤ Le fruit

Les agrumes sont considérés comme le deuxième groupe de fruits le plus important consommés dans le monde, incluant les oranges, mandarines, et les pamplemousses...etc (**Sharma et al., 2016**). Plus de 115 millions de tonnes d'agrumes sont produites annuellement, et environ 30

millions de tonnes sont exclusivement exploités par les industries de production de jus et confiture, générant ainsi 50% de déchets du tonnage des fruits mis en œuvre, comprenant les écorces, les pépins et la pulpe (**Choi et al., 2015 ; Naz et al., 2016**).

L'enjeu économique des agrumes a connu un grand essor, il ne cesse de croître, en passant de 5295.106336 millions (USD) en 2009 à 25131.463918 millions (USD) en 2013, le revenu brut de cette culture pèse lourd dans l'économie mondiale (**FAOstat, 2017**).

#### ➤ **Le sous-produit**

Les sous-produits sont élaborés principalement par les industries de production du jus qui génèrent environ 8 à 20 millions de tonnes (**Aboagye et al., 2016**). La production de jus à partir d'agrumes, et plus principalement l'orange et le pamplemousse, engendre une perte équivalente à la moitié du poids du fruit, et par conséquent des sous-produits sont générés, à savoir les écorces et les pépins. Les sous-produits d'agrumes ont connu une valorisation ancestrale comme dans l'alimentation des bétails (**Lagha-Benamrouche et al., 2013**).

Les écorces obtenues sont une source de mélasse, pectine, limonène, ainsi qu'une source intéressante de plusieurs composés, comme les composés phénoliques dont la flavone polyméthoxylée et la flavanone glycosylée. Ces résidus, une fois traités, trouvent plusieurs applications dans différents domaines (alimentaire, pharmaceutique, cosmétique) (**Chen et al., 2012**), et présentent un avenir prometteur et rentable, comme une alternative dans un futur proche à travers leurs récupérations et leurs bonnes gestions par les agro-industries dans la production de bioéthanol (**Awan et al., 2013**).

### **I.4. Production d'agrumes**

#### ➤ **Production mondiale**

Les agrumes (orange, mandarine, citron) sont parmi les fruits les plus abondants dans le monde, la production mondiale en agrumes est considérée comme l'une des plus importantes dans le domaine agricole (**Torquato et al., 2017**). Elle est passée de 6689016 tonnes en 2001 à 12473165 tonnes en 2013, et l'orange quant à elle, occupe le devant dans la production des agrumes, elle compte plus 71909516 tonnes en 2013 (**FAOstat, 2017**).

Les principales régions productrices d'agrumes (zone orange), à savoir le bassin méditerranéen, l'Afrique du sud, Madagascar, la Chine, l'Australie et l'Inde sont montrées dans la figure qui suit :



**Figure N° 1** : Principales régions productrices d'agrumes dans le monde (zones orange) (Liu et al., 2012).

### ➤ Production nationale

La production d'agrumes en Algérie a connu une importante croissance, elle est passée de 10 878 320 quintaux en 2012 à 13 419 940 quintaux en 2015, avec une production d'orange qui est estimée au environs de 10 050 791 quintaux, et les meilleures productions en oranges sont enregistrées dans les wilaya de Chelef et Blida, avec des productions qui sont respectivement de 1 155 520 et 3 079 216 quintaux (MADRP Alger, 2017).

La wilaya de Bejaia est une région qui a une activité agricole très importante, telle que les céréales, le fourrage, les oliviers, ainsi qu'une grande superficie de 2006.98 Ha qui est occupée par le secteur agrumicole dont les productions sont estimées à plus de 206798 quintaux rien qu'entre l'année 2014 et 2015 (DADRP Bejaia, 2017).

## I.5. Orange

Le genre *citrus* renferme plusieurs fruits, parmi eux on retrouve *citrus sinensis* ou bien communément appelé l'orange appartenant à la famille des Rutacées, qui représente 67.8% de la production mondiale, *citrus reticulata* appelé tangerine 17.9%, et *citrus limon* qui est le citron 6.3% (Bampidis et Robinson, 2006).

L'orange est constituée de deux régions bien distinctes, le péricarpe (écorce) ainsi que l'endocarpe (pulpe) avec des sacs à jus. La peau du fruit est composée d'un épiderme de cire avec de nombreuses glandes huileuses aromatiques. Le péricarpe est composé du flavedo (épiderme externe) contenant des cellules parenchymateuses, et l'albedo (mésocarpe) situé sous le flavedo et qui est composé de cellules tubulaires pour constituer la masse tissulaire comprimée dans la zone

intercellulaire (Favela-Hernandez et al., 2016), la structure d'un fruit d'agrumes est détaillée dans la figure qui suit :

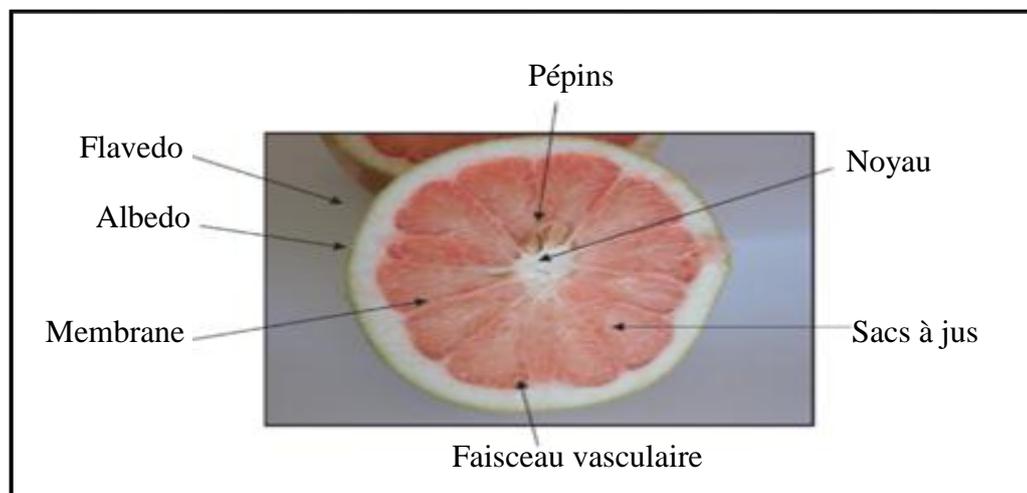


Figure N° 2 : Coupe transversale à travers un agrume (Aruoma et al., 2012).

## II. Enzymes

### II.1. Généralités sur les enzymes

Une enzyme est définie comme étant une protéine à activité catalytique, ou plus spécifiquement, c'est une chaîne, ou bien un ensemble de chaînes formées de polypeptide avec une activité catalytique sous sa forme native, ce copolymère est constitué d'une succession d'acides aminés monomères possédant la même configuration. Au niveau d'une région bien précise, se passe l'activité catalytique en question cette région est appelée « Site actif » qui est lui aussi constitué d'acides aminés, qui sont à leur tour impliqués dans la haute spécificité du complexe « Enzyme + Substrat » (Dugas, 1996).

### II.2. Enzymes industriels

L'introduction des enzymes au sein des processus industriels était un bon moyen qui a permis d'une part de réduire la pollution par la valorisation et l'utilisation des sous-produits, et d'une autre part, il bénéficie ces industries du côté économique en réduisant l'énergie nécessaire à leurs fonctionnements (Pedrolli et Carmona, 2009).

Plusieurs bactéries pathogènes, champignons ainsi que des végétaux, sont connus pour la synthèse d'enzymes pectinolytiques. La plus part des pectinases utilisées en industrie sont produites par des champignons, une grande partie de ces enzymes est essentiellement produite par un procédé de bio-fermentation avec le genre *Aspergillus* (Dinu et al., 2007).

### II.3. Enzymes pectinolytiques

Les enzymes d'origine biologique suscitent beaucoup d'attention dans le monde, en raison de leurs innombrables applications, dont plus d'un quart des enzymes utilisées dans les industries alimentaires sont des pectinases, ces dernières sont synthétisées par des champignons (Patil et Dayanand, 2006), est se caractérisent par leurs pouvoir de dégrader la pectine (Martinez-Trujillo et al., 2011).

Selon Sharma et al., (2011) ces enzymes sont classées en trois groupes, en fonction de leurs modes d'action sur l'acide galacturonique unité fondamentale de la pectine, à savoir :

- Les Protopectinases qui sont des enzymes qui dégradent les protopectines insolubles donnant lieu à des pectines solubles ;
- Les Estérases qui ont pour rôle de de-estérifier les pectines par la suppression des esters méthoxyles ;
- Les Dépolymérases qui agissent au niveau des liaisons  $\alpha$ -(1-4)-glycosidiques de l'acide D-galacturonique (Jayani et al., 2005).

### II.4. Applications des enzymes pectinolytiques

L'utilisation des pectinases en association avec les amylases dans les industries agro-alimentaires à le pouvoir de clarifier les jus et ainsi réduire le temps de filtration de 50% (Saxena et al., 2008). Elles sont utilisées également dans la clarification du vin, ou bien comme complément alimentaire dans l'alimentation animale (Rodriguez-Fernández et al., 2011).

Les pectinases trouvent des applications dans divers domaines tel que : le textile, industries du papier, fermentation du cacao, la confection et la maturité du thé, l'extraction des pulpes à partir des fruits et légumes, ainsi que le traitement des eaux usés (Zeni et al., 2015), les applications des pectinases dans les divers domaines sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau I** : Applications des enzymes pectinolytiques microbiennes (Kumar et Suneetha, 2014).

Domaine	Processus
Production de Jus de fruit	-Clarification des jus.
Cornichons	-Favorise le ramollissement durant le processus de fermentation et de stockage.
Production de Café et Thé	-Accélération du processus de fermentation et l'élimination de la mousse. -Élimination des couches mucilagineuses dans les grains de café.
Textiles	- Dégraissage des fibres végétales. -Utilisé dans l'élimination des impuretés non cellulosiques dans les fibres de cotons.
Traitement des eaux usées	-Élimination des pectines contenues dans les eaux usées des industries agro-alimentaires.
Papier et pulpe	-Dépolymérisation des pectines retrouvées dans le papier, et réduit la demande cationique des solutions de pectine durant le processus de blanchiment.
Amélioration de la chromaticité et la stabilité du vin	-L'ajout des pectinases a pour but de faciliter la macération des fruits avant l'addition des levures, ce qui améliore la couleur ainsi que la turbidité des liquides.

## II.5. Champignon pectinolytique

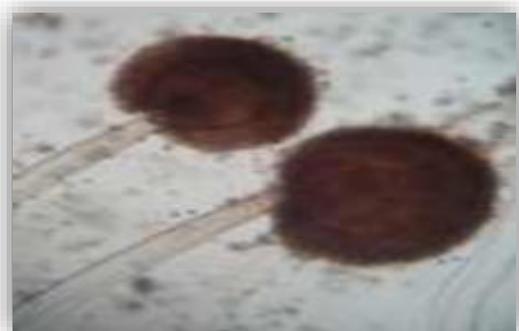
L'*Aspergillus niger* est l'une des espèces les plus utilisées en industries agro-alimentaires ainsi que dans les différentes recherches en vue de leurs innombrables métabolites d'intérêts synthétisés tels que les enzymes : les pectinases, amylases, cellulases et les acides organiques. Avant le développement du microscope le genre *Aspergillus* a toujours été identifié selon sa couleur à savoir, blanc, jaune, noir ou vert, la taxonomie de l'*Aspergillus* est assez complexe, mais le genre est facilement identifiable à l'aide de plusieurs guides taxonomiques, ce genre contient entre 260 et 837 espèces.

L'*Aspergillus niger* est un microorganisme doté d'une croissance très rapide, et qui sporules en donnant naissance à des conidies de couleur noir et globuleuses, ainsi que des conidiophores longs

(15-20 $\mu$ m) avec des parois lisses, l'aspect macroscopique et microscopique d'une culture d'*Aspergillus niger* sur milieu MEA (Malte dextrose agar), est représenté dans les figures suivantes (Akhtar et al., 2014). :



**Figure N° 3** : Aspect macroscopique d'une culture d'*Aspergillus niger* sur le milieu MEA.



**Figure N° 4** : Aspect microscopique des conidies d'une culture d'*Aspergillus niger*.

### III. Plans d'expériences

#### III.1. Définition d'un plan d'expérience

Le plan d'expérience est une technique qui permet de quantifier les effets de divers facteurs sur une réponse dans des domaines expérimentaux bien déterminés dans le but de les optimiser (Fadil et al., 2015). L'élaboration d'un plan d'expérience commence par l'extraction d'un nombre suffisant de combinaisons à partir du domaine d'étude, pour estimer avec une incertitude, à la fois minimale mais aussi homogène, les coefficients du modèle polynomiale en respectant les contraintes qui peuvent être liées à l'étude quel soit technique ou bien économique (Rabier, 2007).

Il existe différents types des plans d'expériences, qui peuvent être regroupés en deux grandes familles (Goupy, 1999) :

**Tableau II** : Différents types des plans d'expériences.

Plans de criblage	Plans de modélisation
Plans à un facteur à la fois	Plans factoriels complets
Plans factoriels fractionnaires	Plans non conventionnels
Plans sursaturés	Plans composites centré
Plans factoriels complets	Plans de Doehlert
/	Plans de Box-Behnken
/	Plans de Roquemore
/	Plans D-optimaux
/	Plans de mélange
	Plan de plaquette et Burmane

### III.2. Terminologie

- **La réponse** : Une réponse consiste à une quantification des performances du système étudié (**Benoits et al., 1994**).
- **Les facteurs** : les paramètres que l'on fait varier au cours des essais et sensés influencer sur la variation de la réponse (les variables que l'on désire étudier) (**Goupy, 2006**).
- **Domaine d'un facteur** : Un facteur varie généralement entre deux bornes à savoir : la borne inférieure et la borne supérieure. dans les plans d'expériences, un facteur varie entre le niveau bas (borne inférieure notée le plus souvent par -1) et le niveau haut (borne supérieure notée le plus souvent par +1), L'ensemble des valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, est appelé domaine d'un facteur ou bien domaine de variation (**Annexe B**) (**Goupy, 2006**).
- **Domaine d'étude** : Un seul facteur est représenté par un axe orienté, et s'il y a deux facteurs, le second est représenté, lui aussi, par un axe gradué et orienté. Ce dernier est disposé orthogonalement au premier, la réunion des domaines de variations de chaque facteur définit le domaine d'étude (**Annexe B**) (**Goupy, 2006**).

- **Interaction** : L'effet pour lequel l'influence apparente d'un facteur sur une variable de réponse dépend d'un ou de plusieurs facteurs. L'interaction indique une incohérence de l'effet principal d'un facteur sur la réponse selon le niveau d'un autre facteur (**Karam, 2004**).
- **Matrice d'expérience** : Une matrice d'expérience (**Annexe B**) définit les essais à réaliser. Le terme essai est l'équivalent de point d'expérience lorsque l'on emploie la représentation en tableau des plans d'expérience. Plusieurs autres appellations existent pour désigner un essai : traitement, combinaison, expérience...etc (**Goupy, 1999**).

### III.3. Plans de surfaces et de réponse (RSM)

Les plans de surface de réponse, ou plans de seconde degré (**Goupy, 2006**), est une méthode d'optimisation qui a pour principal but l'évaluation des relations pouvant exister entre les différentes réponses, ainsi que les facteurs appelés ( $X_1$   $X_2$   $X_3$  ... etc). Plusieurs plans factoriels sont employés par cette technique pour l'analyse des résultats à savoir le plan Box-Behnken et le plan composite centré (**Pengpeng, 2014**).

### III.4. Plans de Box-Behnken

Les points expérimentaux du plan Box-Behnken sont représentés au milieu des arêtes de chacun des côtés d'un cube. C'est un plan qui peut comporter jusqu'à douze essais, auxquels on peut ajouter des points au centre. Un plan avec trois facteurs est illustré dans la figure suivante (**Goupy, 2006**) :

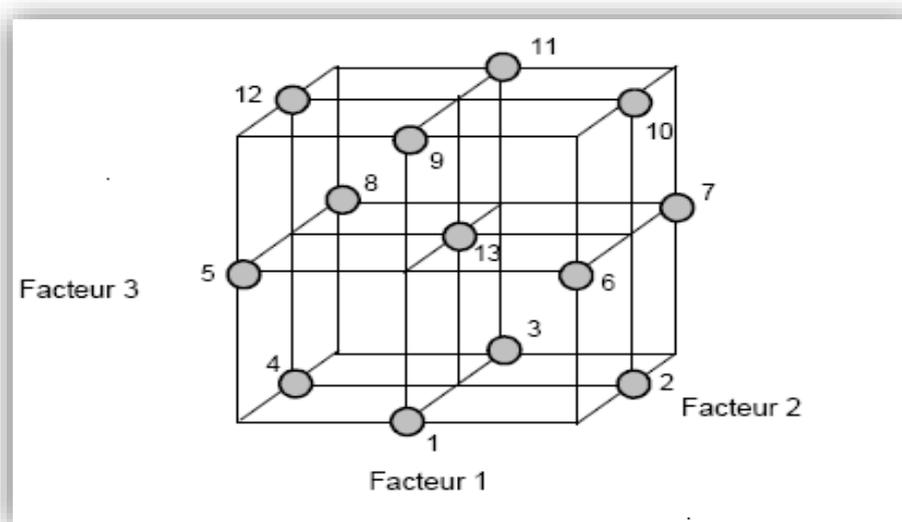


Figure N° 5: Plan de Box- Behnken pour trois facteurs.

### III.5. Modèle mathématique postulé :

Une loi d'évolution générale est donnée lors de l'absence de toute information concernant la fonction qui met en relation la réponse aux facteurs, elle est du type :

$$Y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_n)$$

Etant trop générale, il en est d'usage de prendre un développement limité de Taylor-Marc Laurin. Le développement précédent prend la forme d'un polynôme de degré plus au moins élevé si les dérivés sont considérés comme des constantes, elle s'écrit :

$$Y = a + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum a_{ii} x_i^2 + \dots + e$$

On a :

$Y$  : c'est la réponse ou grandeur d'intérêt ;

$x_i$  : représente un niveau du facteur  $i$  ;

$x_j$  : représente un niveau de facteur  $j$  (**Harris et Hopkinson, 1976**).

$a_0, a_j, a_{ij}, a_{ii}$  : sont les coefficients du polynôme (**Goupy et Creighton, 2001**).

$e$  : L'erreur.

## I. Matériel végétal

### I.1. Échantillonnage et traitement

L'étude menée est réalisée sur un mélange de résidus d'écorces d'oranges (*Citrus sinensis*) récupérés dans la région de Bejaia. La sélection des oranges est faite selon les critères choisis dont l'orange non moisie et saine.

Après la récolte, les écorces complètement débarrassées de feuilles et des pédoncules sont découpées en petits morceaux, et ensuite placées dans une étuve à 40°C pendant 48h. Les écorces totalement séchées sont broyées à l'aide d'un broyeur (IKA-WORKS, TYPE A 11. BASIC) en fine poudre, qui sera stockée dans des bocaux à l'abri de la lumière (Rathod et Annapure, 2016).

### I.2. Matériel biologique

L'*Aspergillus* est l'un des champignons les plus étudiés pour la production d'enzyme d'intérêt industriel. Le genre *Aspergillus niger* constitue le micro-organisme de choix pour la production d'enzymes pectinolytiques (Dinu et al., 2007). De ce fait, la souche de sélection de la présente étude sera *Aspergillus sp.*

#### I.2.1. Isolement et purification du microorganisme

L'isolement de la souche se fait à partir des échantillons de sol récupérés dans la région de Sidi-aiche (Bejaïa) pendant le mois de février. Le sol est prélevé à une profondeur de 10 cm tout en éliminant la couche superficielle. Les échantillons prélevés sont transportés dans des glacières au laboratoire.

Une solution mère est préparée en mélangeant 1g du sol avec 9 ml d'eau physiologique stérile (9g de NaCl dans 1L d'eau distillé). Cette dernière servira également pour la préparation de dilution décimale jusqu'à  $10^{-8}$ .

L'isolement consiste à un ensemencement microbien dont le but est la séparation, afin d'obtenir des colonies distinctes (Guezlane-Tebibel et al., 2010). Les mycéliums sont prélevés et repiqués successivement autant de fois, jusqu'à obtention d'une souche pure.

Les milieux de cultures utilisés pour l'isolement et la purification sont les milieux P.D.A., Sabouroud et Czapeck (Priya et Sashi, 2014 ; Mouria et al., 2013).

Après l'incubation à 30°C pendant cinq jours, des examens macroscopiques et microscopiques sont réalisés afin de vérifier la pureté des souches.

Lors de l'examen macroscopique (observation à l'œil nu), plusieurs critères sont pris en considération, parmi ces critères ; l'aspect des colonies, le relief, la taille ainsi que la couleur.

L'observation microscopique, est réalisé après étalement sous une lame, avec l'objectif x40 ce qui permet de mettre en évidence les éléments importants a identifié tel que les spores (**Diguta, 2010**).

### I.2.2. Mise en évidence de l'activité pectinolytique

L'activité pectinolytique est mise en évidence selon la méthode décrite par **Reddy et Sreeramulu1, (2012)**.

Ce test est réalisé en boîte de Petri contenant un milieu solide (milieu modifié), dont la pectine est utilisée comme seule source de carbone (**Annexe C**). Une foisensemencée, les boîtes sont incubées cinq jours, à une température de 30°C.

## II. Caractérisation physico-chimiques de la poudre d'écorce d'orange

### II.1. Taux d'humidité

La teneur en eau dans la poudre d'écorce d'orange est évaluée selon la méthode décrite par **Doymaz et al., (2004)**. Une prise d'essai de 3g de la poudre est séchée dans une étuve ventilée à une température de 103°C (+/- 2°C) jusqu'à un poids constant. L'humidité est alors calculée selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{P_f - P_s}{P_f - P_0} \times 100$$

D'où :

(H %) : Taux d'humidité.

$P_f$  : poids du creuset contenant l'échantillon, avant étuvage.

$P_s$  : poids du creuset contenant l'échantillon, après étuvage.

$P_0$  : poids du creuset vide.

## II.2. Taux de matière sèche (MS)

La teneur en matière sèche est évaluée selon la méthode décrite par **AFNOR (1986)**. Cette dernière est calculée par la formule suivante :

$$\text{MS \%} = 100 - \% \text{ Humidité}$$

## II.3. Taux de cendres totales

Le taux des cendres est évalué selon la méthode décrite par **Leterme et al., (2006)**. Une prise d'essai 3g de la poudre est incinérée dans un four à moufle pendant 5h à 600°C. Le taux de cendre est calculé par la formule suivante :

$$\text{Teneur en cendre} = \frac{P_{CE} - P_C}{P}$$

D'où :

**P<sub>CE</sub>** : Poids des creusets avec l'échantillon.

**P<sub>c</sub>** : Poids des creusets vide.

**P** : prise d'essai.

## II.4. Potentiel d'hydrogène (pH)

Le potentiel hydrogène de la poudre est évalué à l'aide d'un pH mètre selon la méthode décrite par **AFNOR (1981)**. Une prise d'essai de 1g est dissoute dans un volume de 50 ml d'eau distillée, et l'ensemble est laissée sous agitation pendant 30 minutes. Une fois filtré, la mesure est réalisée en trois répétitions.

## II.5. Acidité titrable

La mesure de l'acidité est réalisée selon la méthode décrite par **Verma et Joshi (2000)**. Une prise d'essai de la poudre est mélangée avec de l'eau distillée, et l'ensemble est mis 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 phénolphthaléine. Le titrage est arrêté lors de l'apparition d'un virage de couleur.

La teneur en acide titrable est exprimée en g d'équivalent d'acide citrique dans 100g de poudre, est calculée selon la formule qui suit :

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

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 valence (3).

## II.6. Teneur en sucres totaux

La teneur en sucres totaux est déterminée par la méthode de **Dubois (1956)**. Une prise d'essai de 1g de la poudre est mélangée avec 50ml d'eau distillé, et laissée sous une agitation pendant 45 minutes à température ambiante. Une fois filtrée, un volume de 10 ml est additionné de sels CAREZ I et CAREZ II (**Annexe E**), qui sera ainsi laissé décanter pendant 30 minutes. Une filtration est réalisée afin de récupérer le filtrat.

Pour un volume de 1 ml du filtrat sont ajoutés respectivement, 1 ml de phénol à 5% et 3 ml d'acide sulfurique, le mélange est mis à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à une température ambiante. L'absorbance est mesurée à 550nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un témoin.

La teneur en sucres totaux dans la poudre (PEO) est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage qui est réalisée en utilisant le glucose (**Annexe E**) dans les mêmes conditions opératoires.

### II.7. Teneur en sucres réducteurs

Le dosage des sucres réducteurs est réalisé selon la méthode décrite par **Miller (1959)**. Une prise d'essai de 1g de la poudre est mélangée avec 50 ml d'eau distillé. Le mélange agité pendant 45 min à température ambiante est filtré.

Un volume de 200µl est alors additionné de 300 µl de DNS (**Annexe F**), et subi un chauffage dans un bain marie à 100°C pendant 5 minutes. Après chauffage, 1.5 ml d'eau distillé, est ajouté au mélange qui sera laissé à l'abri de la lumière pendant 15 min. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La teneur en sucres réducteurs dans la poudre est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant le glucose (**Annexe F**).

### II.8. 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 50 ml d'eau distillé. L'ensemble est agité pendant 30 minutes, avant d'être filtrée.

Un volume de 100 µl est additionné de 3 ml de bleu de coomassie (**Annex D**), 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 BAS dans les mêmes conditions opératoires (**Annexe D**).

### II.9. Dosage de l'azote total

L'azote total est dosé après minéralisation par volumétrie selon la méthode de **Kjeldahl (1889)**. Une prise d'essai de 10 mg de la poudre (PEO) est introduite dans un matras de minéralisation, auquel une pincée du catalyseur sulfate de cuivre et sulfate d'ammonium est ajouté

(Annexe H). À ce mélange 20 ml d'acide sulfurique concentré est ajouté. L'ensemble est chauffé à froid pendant 15 min jusqu'à apparition d'une vapeur blanche d'anhydride sulfurique. L'ensemble est alors laissé au chauffage à chaud pendant 4 à 5 heures.

Après décoloration complète, la solution est refroidie et complétée jusqu'à un volume de 250 ml avec de l'eau distillée. La distillation est alors réalisée juste après la minéralisation en prélevant un volume de 20 ml de la solution minéralisée à laquelle de la soude est ajoutée.

Le dégagement d'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique contenant un indicateur coloré (le bleu de méthylène et le rouge de méthylène), et l'excès d'ammoniac est dosé avec l'acide sulfurique à 0.05N. La teneur en azote est déterminée par la formule suivante :

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

D'où :

$N_A$  : 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 considéré.

### III. Dosage de l'activité enzymatique

L'activité pectinolytique est mesurée selon la méthode de **Juwon et al., (2012)**, par dosage des sucres réducteurs en utilisant la DNS.

Un volume de 1 ml d'une solution de pectine à 1.2 % (m/v) préparé dans un tampon citrate à pH 5, est mélangé avec 1 ml de l'extrait enzymatique récupéré après centrifugation à 10 000g pendant 15 minutes. Le mélange est placé dans un bain marie à 100°C pendant 20 min (témoin enzyme). Le témoin ainsi que l'échantillon sont incubés à 35°C pendant 3h, après incubation 200µl de ces derniers seront additionnés de 300µl de DNS, le mélange est ainsi incubé à nouveau à 100°C pendant cinq minutes, puis 1.5 ml d'eau désilé sont ajouter.

L'activité enzymatique est la quantité d'enzyme dans 1 ml qui libèrerait des sucres réducteurs, équivalent à 1 mg d'acide galacturonique. La teneur en acide galacturonique est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage, réalisé dans les mêmes conditions opératoires (**Annexe G**). L'absorbance est mesuré à 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

## IV. Optimisation des paramètres pour la production d'enzyme

### IV.1. Étude préliminaire

Avant l'optimisation, plusieurs expériences sont réalisées pour déterminer les meilleures conditions de production d'enzymes pectinolytiques, à savoir : la concentration en substrat (PEO) ainsi que le temps d'incubation.

Des flacons contenant différentes concentration en substrat dans un volume de 50 ml d'eau distillé, sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes, et ensuiteensemencés avec des disques de mycéliums (5mm) d'une culture de quatre jours.

La fermentation est ainsi effectuée à 30°C pendant une durée qui s'étend de quatre jours jusqu'à dix jours. À la fin de chaque essai, plusieurs dosages sont réalisés : dosage des protéines, sucres totaux et réducteurs, ainsi que le dosage de l'activité enzymatique.

**Tableau III** : Variation de la concentration du substrat en fonction du temps d'incubation.

	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4
Concentration en substrat (g/50ml)	1	2	3	4
Temps d'incubation (jours)	4	4	4	4

**Tableau IV** : Variation du temps d'incubation en fonction de la concentration en substrat.

	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4	Flacon 5	Flacon 6	Flacon 7
Concentration en substrat (g/50ml)	x	x	x	x	x	x	x
Temps d'incubation (jours)	4	5	6	7	8	9	10

## IV.2. Choix des paramètres d'optimisation

### IV.2.1. Choix de la température

La température d'incubation est l'un des paramètres qui influence sur la croissance des microorganismes, et de se fait la production de métabolites d'intérêt. Le choix des températures pour une production maximale de pectinases, est faite en se basant sur les études réalisées par plusieurs auteurs entre eux **Pedrolli et al., (2009)** ; **Nair et Panda, (1997)** ; **Solis-Pereira et al., (1993)**, qui rapportent que les températures optimums de la production de pectinases par *Aspergillus niger* varient entre 20°C et 40°C, avec un optimum de 30°C.

### IV.2.2. Choix du pH

Le pH est un facteur qui influence sur le comportement d'*Aspergillus niger* pendant le déroulement de la fermentation, et sur la production des enzymes.

D'après les études réalisées par **Kumar et al., (2011)** et **Jin-lan et al., (2009)**, le pH favorable pour une production maximale de pectinases par *Aspergillus niger* varie entre 3 et 7, avec un optimum de 5.

### IV.2.3. Choix de la source d'azote

Plusieurs études rapportent que la source d'azote est indispensable à la production de pectinases à partir de sous-produits végétales. Selon **Darha et al. (2013)**, un apport en source d'azote organique ou inorganique influence la production de pectinases, est-elle serait meilleure avec une concentration de 0.4% (m/v).

Le peptone est utilisé comme source d'azote pour la poudre étudié, avec une teneur de 0.4%(m/v).

Une fois les paramètres optimaux déterminés, l'optimisation est réalisé par un plan factoriel complet à trois facteurs ( $X_1, X_2, X_3$ ), et à trois niveaux (-1, 0, +1), qui est appliqué pour étudié l'influence de ces paramètres sur la production de l'enzyme. Les niveaux bas, moyen et haut de chaque variable sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau V** : Différents niveaux des paramètres choisis pour l'optimisation.

Paramètres	Niveau bas -1	Niveau centré 0	Niveau haut +1
X <sub>1</sub> (pH)	3	5	7
X <sub>2</sub> (T°)	20	30	40
X <sub>3</sub> (% peptone m/v)	0.1	0.4	0.7

Le modèle mathématique polynomial développé pour l'optimisation est un modèle du second degré, et la matrice d'expérience du plan Box-Behnken est représenté dans le tableau qui suit :

**Tableau VI** : Matrice d'expérience donnée par le plan BBD.

N° d'essais	pH	T°	Peptone% (m/v)
1	3	30	0.7
2	7	20	0.4
3	3	40	0.4
4	5	30	0.4
5	7	30	0.7
6	5	40	0.7
7	3	30	0.1
8	7	40	0.4
9	5	40	0.1
10	5	20	0.1
11	5	20	0.7
12	3	20	0.4
13	5	30	0.4
14	5	30	0.4
15	7	30	0.1

## **V. 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'une autre part, les résultats expérimentaux obtenus par le plan d'expérience Box-Benhken sont analysés par le logiciel JMP10.

## I. Matériel biologique

### I.1. Isolement et identification

L'*Aspergillus niger* est un microorganisme saprophyte retrouvé dans le sol, utilisé en industrie de biotechnologie, il est à l'origine de plusieurs enzymes hydrolytiques et oxydatives (Baker, 2006).

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

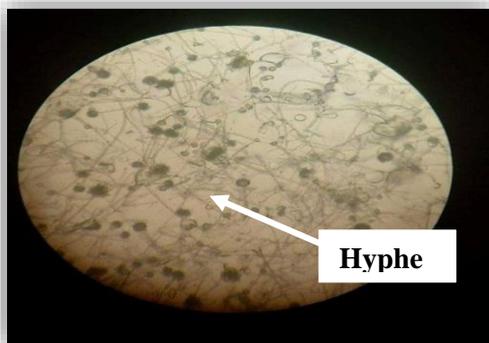


Après 04 jours d'incubation

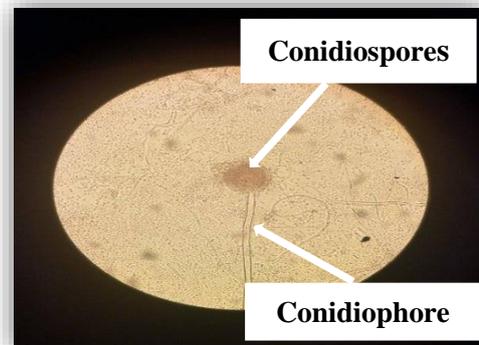


Après 6 jours d'incubation

**Figure N° 6 :** Photographie des cultures sur le milieu PDA en boîte de Petri (Aspect macroscopique).



Observation x40



Observation x100

**Figure N° 7 :** Photographie de la souche cultivée sur milieu PDA (Aspect microscopique).

Les colonies incubées à 30°C pendant une période de quatre jours, observés à l'œil nu (observation macroscopique), ont un aspect blanchâtre qui virent au noir avec prolongation de la durée d'incubation. Tout fois, l'observation du bas des boîtes de Petri montre un aspect pâle avec des nuances jaunâtre, et la présence de fissures dans la gélose.

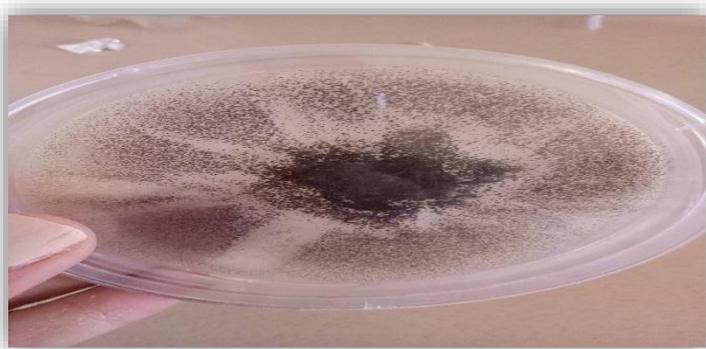
L'observation microscopique, révèle la présence des conidiophores longues et lisses, l'apex à une couleur qui est noir avec une vésicule globuleuse. Les conidies sont également de couleur noir avec une forme globuleuse.

Les résultats des examinations, macroscopique et microscopique, de la souche étudié, correspond bien à celle de *Aspergillus niger* d'après l'étude de (Jin-lan et al., 2009).

## I.2. Mise en évidence de l'activité enzymatique

Les enzymes sont des catalyseurs, qui ont le pouvoir d'accélérer une réaction sans être consommée par elles, et ne font théoriquement que cela. L'équilibre chimique n'est pas déplacé par l'enzyme mais il est atteint plus rapidement en sa présence, de ce fait bien des réactions catalysées par ces enzymes peuvent se dérouler sans elles à un taux mesurable (Jean, 1993).

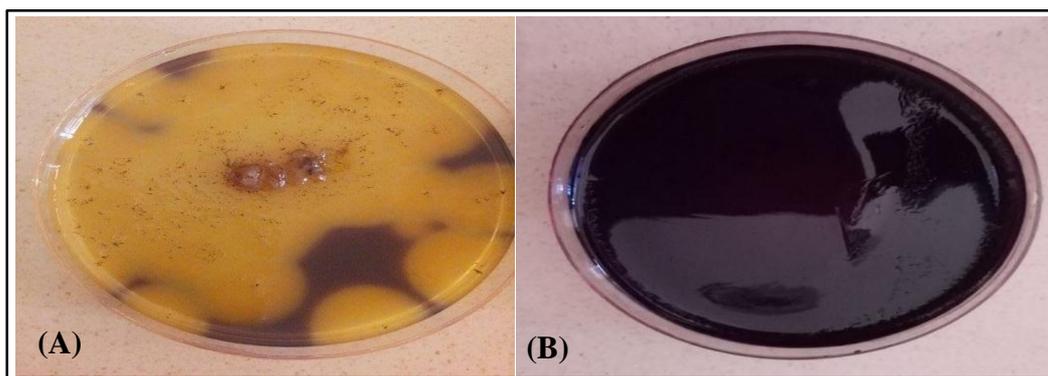
Le résultat du test de la mise en évidence de l'activité pectinolytique, réalisé en boîte de pétri sur un milieu solide (modifier) à base de pectine, est représenté dans la figure suivante :



**Figure N° 8 :** Photographie de la culture *Aspergillus niger* sur milieu solide à base de pectine.

Des spores noires apparaissent et envahissent la surface de la boîte, après le troisième jour d'incubation à 30°C, confirmant ainsi la croissance et le développement de la souche isolée sur le milieu contenant que de la pectine comme seule source de carbone.

Une coloration est réalisée dans le but de confirmer la synthèse d'enzymes pectinolytiques par la souche isolée, les résultats sont représentés dans la Figure qui suit :



**Figure N° 9 :** Photographie de l'analyse qualitative de l'activité enzymatique après coloration.

Des zones d'hydrolyses, claires avec des tailles variables, sont visibles dans la figure (A) qui représente le milieu ensemencé avec la souche, contrairement au témoin représenté dans la figure (B) (non ensemencé), ou aucune zone d'hydrolyse n'est observée. Ce résultat met en évidence la dégradation de la pectine contenue dans le milieu, selon **Akbar et Prasuna, (2012) ; Hitha et Girija, (2012) ; Jansirani et al., (2014)**, ce résultat est traduit par une production d'enzymes pectinolytiques. Les souches qui présentaient des zones d'hydrolyse sont sélectionnées pour les essais d'optimisation.

## **II. Caractérisation physico-chimiques de la poudre d'écorce d'orange étudiée**

Les résultats de la caractérisation physico-chimiques de la poudre d'écorce d'orange étudiée sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau VII :** Composition chimique de la poudre d'écorce d'orange.

Paramètres physico-chimiques	Valeurs exprimées
Humidité (%)	14.22
Matière sèche (%)	85.77
Cendre (%)	3.62
pH	4.83
Acidité titrable (%)	0.19
Sucres totaux (%)	30,66
Sucres réducteurs (%)	18,34
Protéines (%)	0.46
Azote total (%)	1.36

### II.1. Taux d'humidité

La quantité d'eau libre disponible dans un échantillon qui est l'humidité relative, est responsable de plusieurs phénomènes d'altération biologique (**Lanouari et al., 2015**).

Les résultats de l'étude réalisée, montrent un taux d'humidité dans la PEO qui est en moyenne de 14.22 %. Selon une étude menée par **Zhou et al., (2011)** la teneur en eau est en moyenne de 2.31 % qui est relativement inférieure à celle de notre échantillon. **Kumar et Suneetha, (2014)**, ont rapportés dans leurs études une valeur en teneur en eau de 12.4 % qui est légèrement inférieure à celle de notre échantillon.

Selon **Ruiz-Rodrigues et al., (2011)**, la teneur en eau peut varier d'un fruit à un autre par l'influence de plusieurs conditions tels que : la répartition géographique des fruits, les différentes conditions infligés par l'environnement, ainsi que leurs expositions aux différentes conditions pédoclimatiques.

### II.2. Matière sèche

Les résultats de la présente étude, montrent que la teneur en matière sèche dans notre échantillon est de 85.77%, cette valeur est assez élevée, comparée à celle rapporté par **Mahmood, (1998)**, qui est de 20.98% dans les écorces d'oranges.

**Mama et Christakopoulos , (2008)**, rapportent quant à eux une teneur qui varie entre 60% et 65% dans les agrumes en générale, cette dernière reste néanmoins inférieure à celle de notre échantillon.

### II.3. Cendres totales

La valeur nutritionnelle et la qualité des aliments sont deux paramètres proportionnels à la teneur en cendres totales dans ces dernières.

Les résultats de l'analyse réalisée, montrent que la teneur en cendres totales dans notre échantillon est en moyenne de 3.62 %. Cette valeur se rapproche de celles retrouvés par **Huang et al., (2014)** ; **Ali et al., (2010)**, qui sont respectivement de 3.73 % et 3.5%. Selon **Zhou et al., (2011)** la teneur en cendres totales trouvée dans les déchets d'agrumes est de 1.2 % qui est inférieure à celle trouvée dans notre échantillon , et d'après une autre étude menée par **Dhillon et al., (2013)** la teneur en cendres totales est de 5.9 % donc, supérieure à celle de notre échantillon.

La variabilité de la teneur en cendres totale est probablement due à la prévenance géographique des échantillons, les conditions climatiques et les caractéristiques édaphiques du sol, comme elle pourrait aussi bien être attribuée aux différents facteurs écologiques, voir même l'âge des plantes est le facteur génétique (**Doukani et Tabak, 2015**).

### II.4. Potentiel hydrogéné (pH)

L'aptitude de conservation des aliments est déterminée par le pH, il constitue un obstacle auquel les microorganismes doivent se confronter pour assurer leurs proliférations. Un pH de 3 à 6 est très favorable, et assure le bon développement de certains microorganismes tel que : les moisissures et les levures (**Doukani et Tabak, 2015**).

D'après les résultats obtenus, le pH c'est révélé être acide en moyenne de 4,83. La valeur obtenue se situe dans la gamme du pH des agrumes en générale rapportée par **Li et al., (2015)** qui est entre 3 et 5, dû principalement à leurs abondances en acides organiques, et si on la compare aux résultats rapportés par **Garau et al., (2007)** qui est de 4.06, elle s'avère être légèrement inférieure à celle retrouvée dans notre échantillon. D'une autre part si on se réfère aux travaux effectués par **Navarro et al., (2014)** sur les jus obtenus à partir des deux variétés, à savoir l'orange et la clémentine, les valeurs de pH sont respectivement entre 3.46-3.66 et 3.22-3.75 qui sont inférieures à celles de notre échantillon.

## II.5. Acidité titrable

L'acidité des agrumes est un critère qui joue un rôle primordial dans l'acceptabilité commerciale de ces fruits par les consommateurs (**liu et al., 2012**).

Les résultats obtenus à partir de l'étude menée, ont révélé une acidité titrable dans la PEO, qui est en moyenne de 0.19% (d'équivalent en acide citrique). La valeur retrouvée dans la présente étude est inférieure à celle trouvée par **Marcilla et al., (2006)** qui est de 1g pour 100 ml d'équivalent en acide citrique et de 0.86% d'après les résultats de **Roongruangsri et al., (2013)**. Selon **Cheong et al., (2012)**, l'acidité titrable dans une variété malaisienne qui est le pomelo, est en moyenne de 0.94%, qui est à son tour supérieure à celle de notre échantillon.

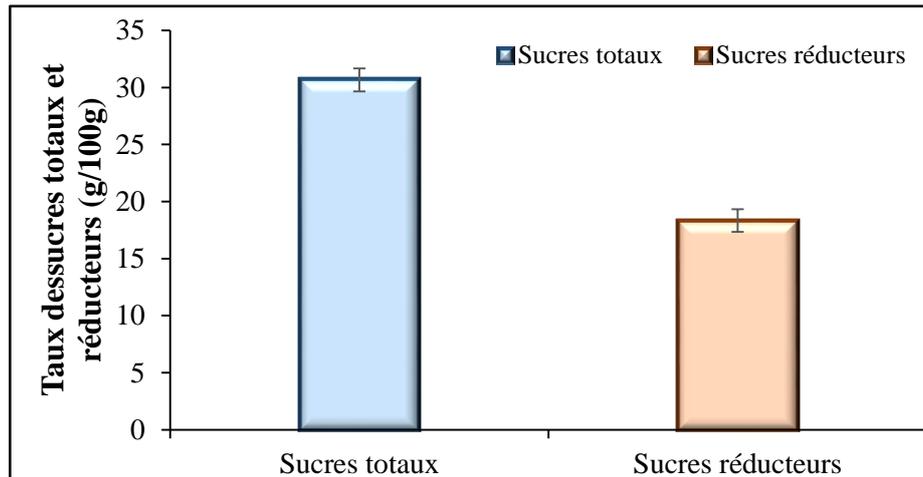
La mesure de l'acidité titrable nous renseigne sur la qualité des acides organiques présents dans un échantillon, ces acides organiques sont des intermédiaires de plusieurs processus métaboliques qui influencent sur la maturation des fruits, ainsi que sur le développement et la croissance des microorganismes au sein du fruit, ces derniers sont responsables à leurs tours de la qualité du produit (**Al-Farisi et al., 2005**). Ces acides sont aussi responsables des propriétés sensoriels des fruits (**Siebert, 1999**).

L'acidité augmente jusqu'à atteindre un pic qui est qualifié de stade de plein murissement, ce qui caractérisent chaque variété avant de baisser et cela quel que soit la variété. La variabilité rencontré dans les résultats pourrait être due à l'augmentation de la teneur en acides organiques en particulier l'acide citrique, malique et oxaloacétique, ou bien l'utilisation de ces derniers comme substrats pour la synthèse de nombreuses enzymes (**N'Ganzoua et al., 2010**).

## II.6. Dosages des sucres totaux et réducteurs

L'abondance en sucres est un critère qui est proportionnel à la qualité ainsi qu'à la flaveur des fruits et légumes. Les sucres sont réparties en deux groupes à savoir les monosaccharides et les disaccharides, dont le glucose et le fructose sont les majeurs constituants retrouvés dans la plus part des fruits, et qui sont à leur tour à l'origine de la douceur de ces derniers (**Ayaz et al., 1999**).

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



**Figure N° 10 :** Taux des sucres totaux et réducteurs dans la PEO.

Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures.  
La barre verticale représente l'écart-type.

La teneur en sucres totaux et réducteurs présente dans la PEO obtenue est respectivement en moyenne de 30,66 % et 18,34% (g/100g), est supérieure à celle trouvée par **Kumar et Suneetha, (2014)** qui est de 14% pour les sucres totaux et de 10% pour les sucres réducteurs. La teneur en sucres réducteurs dans notre échantillon est légèrement inférieure à celle rapportée par **Li et al., (2015)** 19.33 % dans les épiluchures des oranges.

Les teneurs en sucres totaux et réducteurs de notre échantillon sont inférieurs à celles retrouvées par **Giese et al., (2008)**, pour la même variété, qui sont de 19% pour les sucres totaux et de 9% pour les sucres réducteurs.

L'analyse de ces différents résultats, montre qu'il existe des variations, en ce qui concerne les teneurs en sucres totaux et réducteurs. La variabilité de ces résultats selon **Sawaya et al., (1983)** et **Dini et al., (1989)** est liées à plusieurs facteurs qui influences sur la composition des fruits et légumes dont principalement : la prévenance et la localisation géographique, les conditions climatiques, d'autres facteurs sont rapportés tel que le degré ainsi que le stade de maturité, les différences variétales. Tous ces paramètres sont responsables on majeurs parties des différences chimiques qui existes.

Les résultats obtenus dans la présente étude, atteste quant à l'abondance des écorces d'oranges et de leurs richesses en sucres, ce qui justifie la possibilité de leurs utilisations comme substrat carboné pour nous essais de valorisation, dont le but est la production d'une enzyme.

## II.7. Dosage des protéines

Les protéines sont des molécules complexes, qui peuvent être classées dans deux groupes à savoir : les homoprotéines, ne contenant exclusivement que des acides aminés ; les hétéroprotéines, composées d'acides aminés et d'autres composés non protéiques divers généralement qualifiés de groupes prosthétiques (**cheftel, 1985**).

Le taux de protéines dans la présente étude, est en moyenne de 0.46% exprimé en (g/100g). Cette teneur est relativement inférieure à celle rapportée par **Mamma et al., (2008)** et **Osarumwense et al., (2013)** qui sont respectivement de 7,9% et 4,05% dans les épiluchures d'oranges. D'après une étude réalisée par **Da Gama et al., (2015)** sur une autre variété d'orange qui est la lime, la teneur trouvée qui s'élève à 3,33% est elle aussi supérieure à celle de notre échantillon. Malgré les variations qui existent entre les résultats, en remarque que la teneur en protéine est assez faible dans les agrumes.

Les résultats obtenus de l'analyse réalisée sont en accord avec la plus part des travaux qui ont portés sur les agrumes, ce qui confirme la faible teneur de ces fruits en protéines (**Chau et Huang, 2003**).

## II.8. Dosage de l'azote total

Pour la synthèse de leurs protéines, qui représentent environ 10% du poids sec, les microorganismes ont besoin des substances azotées. Quelques bactéries seulement sont capables de fixer l'azote sous sa forme la plus simple, c'est-à-dire l'azote moléculaire (**leclere et al., 1999**).

La teneur en azote total obtenue dans la présente étude, qui est en moyenne de 1.36% reste supérieure à celle rapportée par **Nagy et al., (2014)** qui est de 0,91% dans les épiluchures d'oranges, cette teneur reste néanmoins légèrement inférieurs au résultat obtenus par **Mary et al., (2016)** qui est de 1.59%, dans son étude qui a porté sur la production, caractérisation et l'évaluation des biocarburants à partir de différents déchets dont les écorces d'oranges. D'après **Januskevicius et al., (2012)**, dans une étude qui a porté sur la comparaison des compositions chimiques ainsi que des valeurs énergétiques dans quelques fruits et légumes, la teneur en azote trouvée dans deux variétés d'oranges de prévenance géographique différente à savoir l'Espagne et les Pays Bas était respectivement de 0.18%  $\pm$ 0.48 qui est largement inférieure à celle retrouvé dans notre échantillon et 1.53%  $\pm$ 0.13 qui est proche de celle retrouvé dans notre étude.

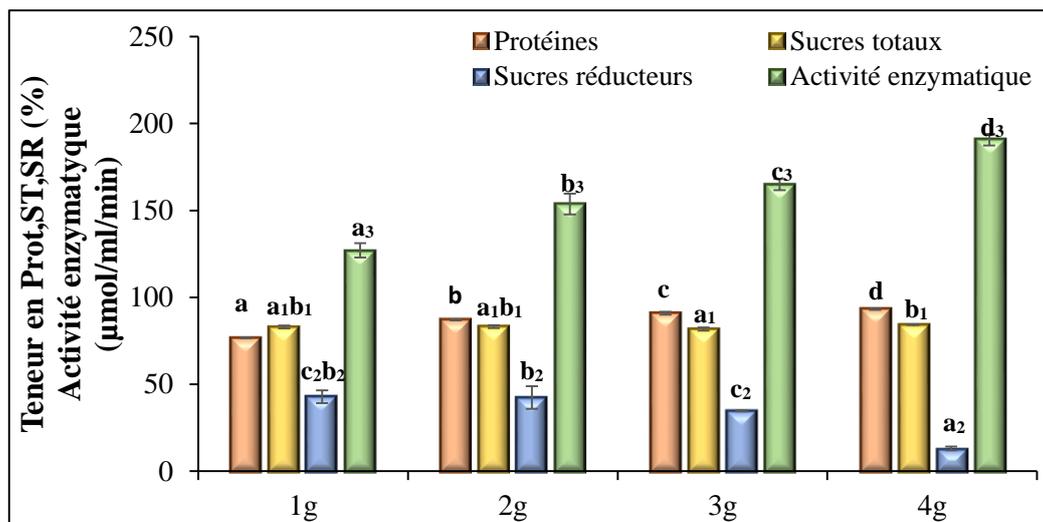
Comparés aux différentes études réalisées, et celles qu'on a cité lors de l'analyse de nos résultats, on remarque qu'il existe bien une certaine différence ainsi qu'une variabilité. Ces corrélations pourraient être dues au type de solvants utilisés lors des analyses réalisées. Selon **Mamma et christakopoulos, (2013)** ces différences entre les agrumes en terme de compositions est dû principalement aux : conditions de leurs croissances, stade de maturité, la variété, les conditions climatiques, et les porte-greffes.

### III. Études préliminaires

Des études préliminaires sont réalisées dans le but de choisir la meilleure concentration en substrat (PEO), et le temps d'incubation pour la production de l'enzyme par fermentation, la fixation de ces deux paramètres est le précurseur de l'optimisation (**Kumar et al., 2011**).

#### ➤ Effet de la concentration en substrat :

Les résultats obtenus des teneurs en protéines, sucres réducteurs et totaux ainsi que l'activité enzymatique en fonction de la concentration en PEO sont présentés dans la figure suivante :



**Figure N° 11 :** Effet de la concentration en PEO sur l'activité enzymatique, teneur en sucres totaux, Réducteurs, Protéines.

Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures.

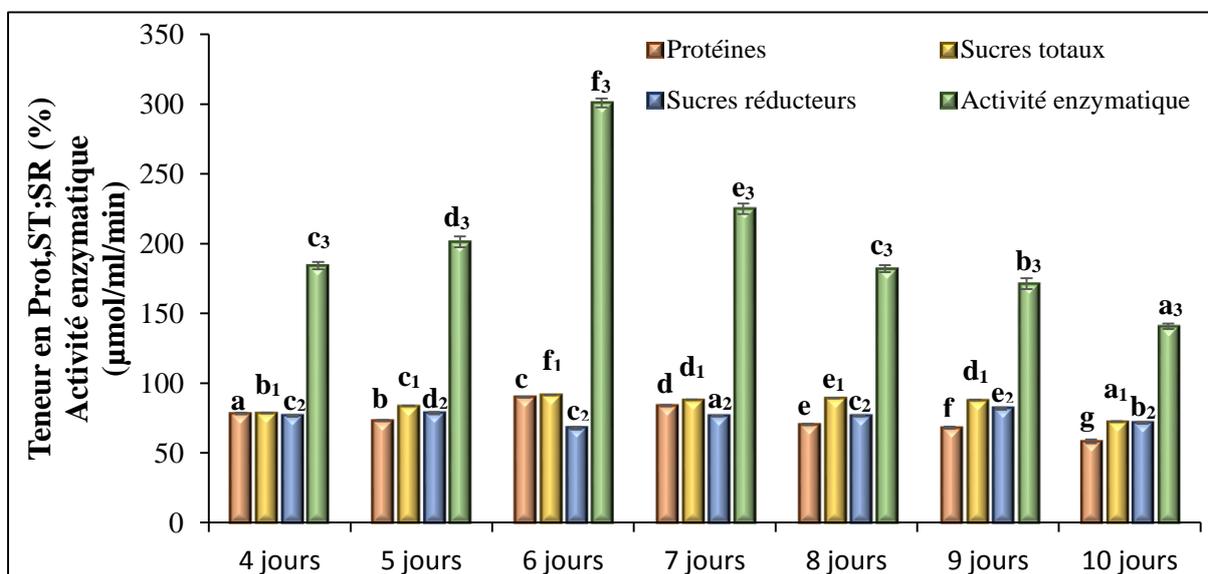
La barre verticale représente l'écart-type.

Les valeurs a,b,c,d, représentent les différences significatives ( $P < 0.05$ ).

Les résultats obtenus, qui mettent en relation les teneurs en protéines, sucres réducteurs, totaux et l'activité enzymatique en fonction de la concentration en PEO, montrent très clairement que l'augmentation de l'activité enzymatique, et le taux des protéines est proportionnel à l'augmentation de la concentration en PEO, ils ont atteint respectivement un maximum 190.67

$\mu\text{mol/ml/min}$  et 93.13% , cette augmentation n'est pas valable pour la teneur en sucres réducteurs qui diminue jusqu'à atteindre la plus faible teneur 13.08%. L'influence de la concentration en substrat est un paramètre non négligeable, **Suhaimi et al., (2016)**, appuie la certitude de cette idée dans son étude qui a portée sur l'optimisation de la production de pectinase par *A.niger*, utilisant un milieu à base de pectine d'orange. De nombreuses études dont celles réalisées par **Darah et al., (2015)** ; **Dhital et al., (2013)** confirment l'importance de ce paramètre sur la production des enzymes ainsi que leurs activités. L'analyse statistique réalisée confirme l'existence d'une différence significative entre les teneurs en protéine, sucres réducteurs, totaux, et l'activité enzymatique ( $P < 0.05$ ).

➤ **Effet du temps d'incubation :**



**Figure N° 12 :** Effet du temps d'incubation sur les teneurs en en sucres totaux, réducteurs, protéines, et l'activité enzymatique.

Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures.

La barre verticale représente l'écart-type.

Les valeurs a,b,c,d,e,f,g représentent les différences significatives ( $p < 0.05$ ).

Les conditions de culture telle que le temps d'incubation, la composition du milieu de fermentation et le genre du microorganisme utilisé, sont des paramètres qui contrôlent l'activité enzymatique ainsi que sa stabilité (**Al-jazairi et al., 2015**).

D'après les résultats de la présente étude, l'activité enzymatique augmente et atteint un pic maximal de  $300.78 \mu\text{mol/ml/min}$  au bout du 6<sup>ème</sup> jour, cette augmentation est accompagnée par la teneur la plus importante en protéines 83.82%, avec une diminution de la teneur en sucres réducteurs 67.75%, contrairement à la teneur en sucres totaux qui n'a pas connue de grandes variations par

rapport à la prolongation du temps d'incubation. Au de la du 6<sup>ème</sup> jour, l'activité enzymatique ainsi que la teneur en protéine diminuent avec la prolongation du temps d'incubation, par contre la teneur en sucres réducteurs, quant à elle augmente à partir du 6<sup>ème</sup> jour. Selon **Suman et Raju, (2017)**, le temps d'incubation est un paramètre qui influence l'activité des pectinases produites par *Aspergillus niger*, elle est maximale au bout du cinquième jour, mais elle entre en phase de déclin si le temps d'incubation est prolongé, **Koser et al., (2014)** confirme aussi l'influence que possède la durée d'incubation sur la production de pectine-lyase par *A.oryzea*.

**Akhter et al., (2011)** ; **Singh et Mandal, (2012)** quant à eux, affirme que la durée d'incubation est un facteur qui joue un rôle important dans la production enzymatique, est que le déclin de cette production après la prolongation du temps d'incubation serait dû à l'épuisement du milieu de fermentation en nutriments.

L'analyse statistique confirme l'existence d'une différence significative entre les teneurs en protéine, sucres réducteurs, totaux et l'activité enzymatique ( $P < 0.05$ ).

La diminution de la teneur en sucres réducteurs, qui est accompagnée par une forte augmentation en protéines ainsi qu'une activité enzymatique élevée, confirme la croissance de la souche dans le milieu de fermentation, ainsi que la production d'une enzyme extracellulaire par *Aspergillus niger* pour une concentration en PEO qui est de 4g au bout du 6<sup>ème</sup> jour d'incubation. Après le 6<sup>ème</sup> jour d'incubation la diminution du taux de protéines et de l'activité enzymatique pourrait probablement être dû à l'appauvrissement du milieu de fermentation en nutriments (**Li et al., 2015**).

### III. Plans d'expérience Box-Behnken

#### III.1. Analyse des résultats

Les résultats des expériences réalisés par le plan Box-Behnken (BBD) sont représentés dans la figure suivante :

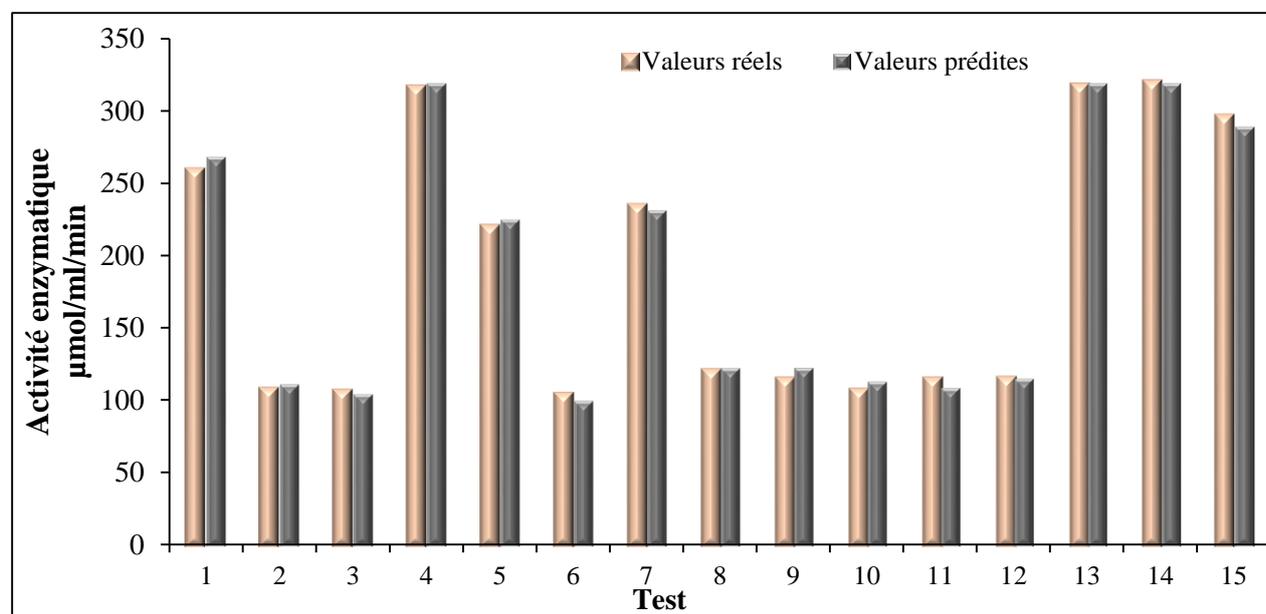


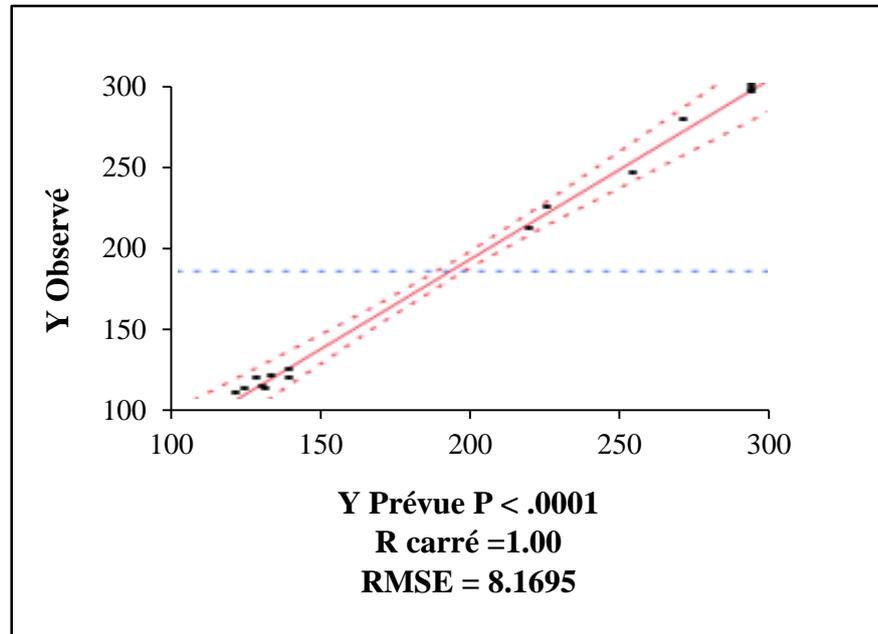
Figure N° 13 : Résultats des valeurs réels et prédites par l'application du plan Box-Behnken.

D'après les résultats obtenus par le BBD, l'activité enzymatique varie entre 107.10  $\mu\text{mol/ml/min}$  et 319.96  $\mu\text{mol/ml/min}$ , ce qui indique 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 **Baladhandayuthan et Thangavelu, (2011)** ; **Ali et al., (2010)** ; **Kaur et kaur, (2014)** ; **Fahmy et al., (2008)**, qui confirme l'influence des paramètres optimisés sur la production des pectinases. Les résultats de l'analyse effectuée montrent que les valeurs prédites par le BBD ainsi que les valeurs réelles sont proches.

#### III.2. 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 ( $R^2 = 1$ ), 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 (**Manohar et al., 2013**).

Le graphe (figure N° 11), 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 N° 14 :** Plan de prédiction réel de l'activité enzymatique.

### III.3. Modèle globale et le manque d'ajustement

**Tableau VIII :** Analyse de la variance et le manque d'ajustement du BBD.

Paramètre	Degrés de liberté	Somme des carrées	Moyenne des carrés	Rapport f	P-value
Défaut d'ajustement	3	327.13068	109.044	33.1638	0.0294*
Erreur pure	2	6.57607	3.288	/	/
Erreur totale	5	333.70674	/	/	/

Les résultats de la présente étude montrent après analyse statistiques, que le modèle est significatif avec ( $P < 0.05$ ), et par cela la validité du modèle est confirmée. Ce modèle pourrait probablement fonctionner pour la production d'enzymes pectinolytiques à partir des écorces d'oranges.

### III.4. Effet des facteurs

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

**Tableau IX** : Estimation des coefficients de régression du modèle polynomial.

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	P-value
Constante	-1560.799	60.29563	-29.89	<.0001*
<b>Linéarité</b>				
X <sub>1</sub>	89.344792	12.64978	7.06	0.0009*
X <sub>2</sub>	103.24446	2.816056	36.66	<.0001*
X <sub>3</sub>	533.04491	65.94046	8.08	0.0005*
<b>Interactions</b>				
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.271	0.204238	1.33	0.2419
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-41.88333	6.807948	-6.15	0.0016*
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-1.525833	1.36159	-1.12	0.3134
<b>Quadratique</b>				
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	-7.891771	1.062891	-7.42	0.0007*
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	-1.732946	0.042516	-40.76	<.0001*
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	-375.5509	47.23958	-7.95	0.0005*

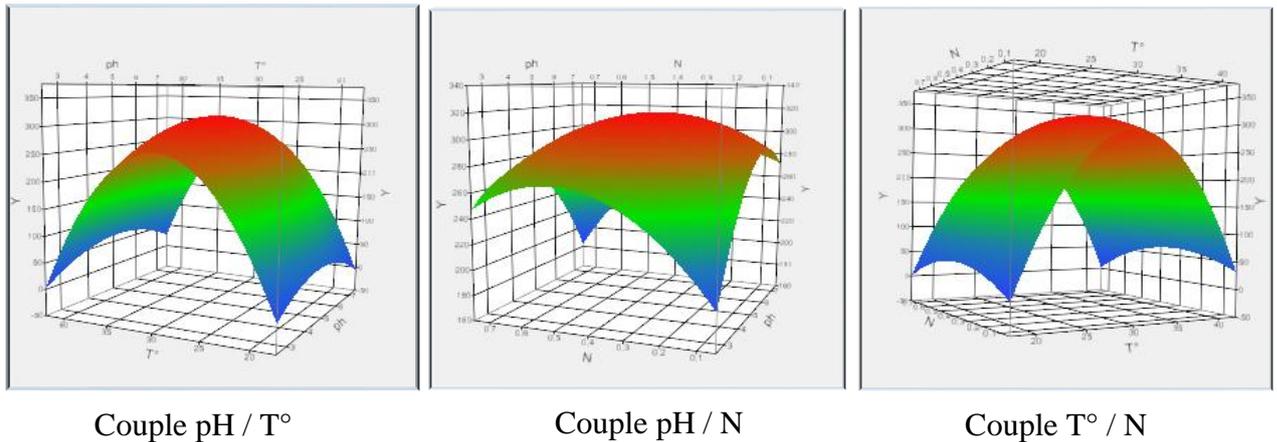
#### ➤ Effet linéaire

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> présente le P-value le plus faible (<.0001\*), ce qui met en évidence le grand impact et l'influence que possède ce facteur sur l'activité de l'enzyme. Ces résultats sont en accord avec la majorité des travaux réalisés par **Baladhandayutham et Viruthagiri, (2010)** ; **Dhital et al., (2013)** ; **Palaniyappan et al., (2009)**, dont le but d'optimiser la production d'enzymes.

Selon **Yadav et al., (2015)**, la température influence la production d'enzymes extracellulaires, on induisant des changements au niveau des propriétés physiques de la membrane cellulaire des microorganismes.

### ➤ Etude 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 ( $X_1X_3$ ) est significatif avec un P-value qui est égale à ( $0.0016^* < 0.05$ ). Les résultats des différentes surfaces de réponses sont représentés dans les figures suivantes :



**Figure N° 15 :** Surfaces de réponses obtenues des différentes interactions.

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 5.22 et 0.35% (w/v), on remarque une diminution de l'activité enzymatique, cette dernière est maximale pour un pH acide avoisinant 5. Dès lors, on constate que le champignon isolé est de nature acidophile, est par cela on en déduit que l'enzyme est stable à des valeurs de pH plus ou moins acides ; l'addition de sources d'azote organique au milieu de fermentation influence positivement sur la production des pectinases (**Kumar et al., 2012**), ajouté à une concentration qui est égale à 0.35%, le peptone stimule la production enzymatique qui est traduite par une forte activité (**Darah et al., 2013**).

### III-5. Modèle mathématique

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

$$Y = -1560.79 + 89.34pH + 103.24T^\circ + 533.04N - 41.88pH^2 - 7.89pH^2 - 1.73T^{\circ 2} - 375.55N^2$$

### III-6. 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** : Conditions optimales pour la production de l'enzyme.

Paramètres	Estimation
pH	5,2288557
T (°C)	30,040358
N (m/v)	0,357084
Activité enzymatique (µmol/ml/min)	318,708

Dans le cadre d'une approche expérimental, l'application exacte de tel estimations s'avère être difficile. Afin de y remédié de légères modifications doivent être apportés :

**Tableau XI** : Conditions optimales appliquées pour la production de l'enzyme.

Paramètres	Estimation
pH	5.20
T (°C)	30
N (m/v)	0,35

L'activité enzymatique obtenue après optimisation des paramètres est de 314.550 µmol/ml/min, cette valeur est proche de celle prédite par le logiciel (BBD) qui est de 318.708 µmol/ml/min, ce qui confirme la validation du modèle.

L'utilisation des sous-produits de valeur non négligeable, que génèrent les agro-industries de production de jus, tel que les écorces par un procédé de bio-fermentation est envisagé dans le but de produire des enzymes.

Les résultats de cette étude, montrent que l'isolement d'une souche susceptible d'utiliser les écorces d'oranges comme substrat carboné est justifié, non seulement en raison des produits synthétisés par la souche comme les enzymes, mais aussi de l'importance que constitue ce sous-produit.

Au cours de ce travail, une souche à activité pectinolytique appartenant au genre *Aspergillus* est identifiée et purifiée.

L'analyse physico-chimique des écorces d'oranges a révélé la composition suivante : Humidité 14.22%, cendre totale 3.62%, pH 4.83, acidité titrable 0.19, sucres totaux 30.66%, sucres réducteurs 18.34%, protéines 0.46%, azote total 1.36%, ce qui explique le choix de ce sous-produit comme substrat pour les essais de bio-fermentation, mais en important un supplément qui est la source d'azote (peptone).

La production des enzymes pectinolytique par *Aspergillus niger*, c'est avérée être meilleure avec une ration biomasse/ concentration en substrat (poudre d'écorce d'orange) de l'ordre de 4g, avec une durée d'incubation de six jours.

Ce travail qui a pour but l'optimisation des conditions de production des pectinase à savoir : le potentiel hydrogène (pH), la concentration en peptone (source d'azote) et la température d'incubation, en utilisant le plan d'expérience BBD. Ce plan a permis d'optimiser la production enzymatique et de réduire le nombre d'expériences à réaliser.

Les résultats de l'optimisation affirment 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 1.

L'étude montre que la production des pectinase est très influencée par les facteurs étudiés à savoir ; la température le ph et la teneur en peptone. Les optimums de ses facteurs établis par le plan sont respectivement de : 5.2, 30°C et 0.35 (w/v), pour une activité enzymatique maximale de l'ordre de 318.708  $\mu\text{mol/ml/min}$ .

Les résultats de ce travail confirment la possibilité de produire des enzymes pectinolytiques par l'utilisation des écorces d'orange comme substrat, dans une approche qui a pour but principal

la valorisation de ces sous-produits. Afin d'améliorer la présente étude, et dans le but de le compléter, il serait intéressant d'envisager :

- la purification de l'enzyme produite.
- Définir les caractéristiques physico-chimiques de cette enzyme tel que : la thermostabilité, est le pH.
- Définir le substrat préférentiel de l'enzyme.

**A**

- **Aboagye, D., Banadda, N., Kiggundu, N., & Kabenge, I.** Assessment of orange peel waste availability in Ghana and potential bio-oil yield using fast pyrolysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (2016).
- **AFNOR (NF), (1981).** Recueil de normes française des produits dérivés des fruits et légumes jus de fruits. Ed. AFNOR ; 325 p.
- **AFNOR.** Les dossiers de la normalisation ISSN, (2), 1986 ; 8297-4827.
- **Akbar, S. and R. Prasuna.** "Exploitation of fruit wastes for pectinase production using *Aspergillus oryzae*." *Int J Pharm Bio Sci*, (2012); **3**(3), 756-765.
- **Akhtar, N., Shoaib, A., Munir, S., Ali, A., & Khurshid, S.** Isolation, identification and enzyme production profile of *A. niger*. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, (2014); **24**(5), 1438-1443.
- **Akhter, N., Morshed, M. A., Uddin, A., Begum, F., Sultan, T., & Azad, A. K.** Production of pectinase by *Aspergillus niger* cultured in solid state media. *International Journal of Biosciences*, (2011); **1**(1), 33-42.
- **Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., & Shahidi, F.** Compositional and sensory characteristics of three native sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of agricultural and food chemistry*, (2005); **53**(19), 7586-7591.
- **Ali, J., Jaffery, S. A., Assad, Q., Hussain, A., Abid, H., & Gul, F.** Optimization of pectinase enzyme production using sour oranges peel (*Citrus aurantium* L.) as substrate. *Pakistan J. Biochem. Mol. Biol*, (2010); **43**, 126-130.
- **Al-Jazairi, M., Abou-Ghorra, S., Bakri, Y., & Mustafa, M.** Optimization of  $\beta$ -galactosidase production by response surface methodology using locally isolated *Kluyveromyces marxianus*. *International Food Research Journal*, (2015); **22**(4)
- **Aruoma, O. I., Landes, B., Ramful-Baboolall, D., Bourdon, E., Neergehen-Bhujun, V., Wagner, K.-H., & Bahorun, T.** Functional benefits of citrus fruits in the management of diabetes. *Preventive medicine*, (2012); **54**, S12-S1.
- **Awan, A. T., Tsukamoto, J., & Tasic, L.** Orange waste as a biomass for 2G-ethanol production using low cost enzymes and co-culture fermentation. *Rsc Advances*, (2013); **3**(47), 25071-25078.

- **Ayaz, F. A., KADIOĞLU, A., & Dođru, A.** Soluble Sugar Composition of *Elaeagnus angustifolia* L. var. *orientalis* (L.) Kuntze (Russian olive) Fruits. *Turkish Journal of Botany*, (1999); 23(5), 349-354.

## **B**

- **Baker, S. E.** "Aspergillus niger genomics: past, present and into the future." *Medical Mycology*(2006);44(Supplement 1): S17-S21.
- **Baladhandayutham, S., & Thangavelu, V.** Optimization and kinetics of solid-state fermentative production of pectinase by *Aspergillus awamori*. *International Journal of ChemTech Research*, (2011); 3(4), 1758-1764.
- **Bampidis, V., & Robinson, P.** Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, (2006); 128(3), 175-217.
- **Benoist D., Tourbier Y., Germain-Tourbier S.(1994).**Plans d'expériences: construction et analyse. Edition : Téchenique & Documentation-Lavoisier.paris:32p.
- **Bénédicte et Michel B.(2011).** Agrumes "comment les choisir et cultiver facilement". Edition: Ulmer.paris :6p.
- **Bradford M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*, (1976);72:248-254.
- **Bustamante, J., van Stempvoort, S., García-Gallarreta, M., Houghton, J. A., Briers, H. K., Budarin, V. L., Matharu, A. S., & Clark, J. H.** Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste. *Journal of Cleaner Production*, (2016); 137, 598-605.

## **C**

- **Camille J., Franck C., Marion H., Coord.(2013).** Les climentier et autre petite agrumes. Edition : Quae. France :17-18p.
- **Chau, C.-F., & Huang, Y.-L.** Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from the peel of *Citrus sinensis*

L. Cv. Liucheng. Journal of agricultural and food chemistry, (2003); 51(9), 2615-2618.

- **Chen, Z.-T., Chu, H.-L., Chyau, C.-C., Chu, C.-C., & Duh, P.-D.** Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. Food chemistry, (2012);135(4), 2119-2127.
- **Cheong, M. W., Liu, S. Q., Zhou, W., Curran, P., & Yu, B.** Chemical composition and sensory profile of pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) juice. Food chemistry, (2012);135(4), 2505-2513.
- **Choi, I. S., Lee, Y. G., Khanal, S. K., Park, B. J., & Bae, H.-J.** A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. Applied Energy, (2015);140, 65-74.

## D

- **Darah, I., Haritharan, W., & Lim, S.** Involvement of Physicochemical Parameters on Pectinase Production by *Aspergillus niger* HFD5A-1. JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY, (2013); 7(4), 2541-2549.
- **Darah, I., Taufiq, M., & Lim, S.-H.** Pectinase production by *Aspergillus niger* LFP-1 using pomelo peels as substrate: An optimization study using shallow tray system, Indian Journal of Biotechnology, (2015); 14, 552-558.
- **Dhillon, G. S., Brar, S. K., Kaur, S., & Verma, M.** Screening of agro-industrial wastes for citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* NRRL 2001 through solid state fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture, (2013); 93(7), 1560-1567.
- **Dhital, R., Panta, O. P., & Karki, T. B.** Optimization of cultural conditions for the production of pectinase from selected fungal strain. Journal of Food Science and Technology Nepal, (2014); 8, 65-70.
- **Dini, A., de Simone, F., Ramundo, E., & Senatore, F.** Oligosaccharides in five different *Vicia faba* L. cultivars. Biochemical systematics and ecology, (1989); 17(7-8), 559-561.
- **Dinu, D., Nechifor, M. T., Stoian, G., Costache, M., & Dinischiotu, A.** Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. Journal of biotechnology, (2007);131(2), 128-137

- **Doukani, K., & Tabak, S.** Profil Physicochimique du fruit "Lendj"(Arbutus unedo L.). *Nature & Technology*, (2015); (12), 53-66.
- **Doymaz, I., Gorel, O., & Akgun, N.** Drying characteristics of the solid by-product of olive oil extraction. *Biosystems Engineering*, (2004); 88(2), 213-219.
- **Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Pebers P.A and Smith F.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, (1956); 28, p: 350-356.

## *F*

- **Fadil,M.,Farah,A.,Ihssane,B.,Haloui,T.,Rachiq,S.** Optimization of parameters influencing the hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. by response surface methodology. *J. Mater. Environ. Sci.*,(2015); 6 (8), 2346-2357.
- **Fahmy, A. S., Fawkia, M., Mohamed, S. A., Abdel-Gany, S. S., & Abd-Elbaky, E. A.** Characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus niger*. *Applied biochemistry and biotechnology*, (2008); 149(3), 205-217.
- **Favela-Hernández, J. M. J., González-Santiago, O., Ramírez-Cabrera, M. A., Esquivel-Ferriño, P. C., & Camacho-Corona, M. d. R.** Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules*, (2016); 21(2), 247.

## *G*

- **Gama, B., Silva, C., Silva, L., & Abud, A.** Extraction and characterization of pectin from citric waste. *Chemical Engineering Transactions*, (2015);44, 259-264.
- **Garau, M. C., Simal, S., Rossello, C., & Femenia, A.** Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) by-products. *Food chemistry*, (2007) ;104(3), 1014-1024.
- **Goupy,J.,Creighton,L.(2001).** Introduction aux plans d'expériences. Edition : DUNOD.paris :12-13p.
- **Giese, E. C., Dekker, R. F., & Barbosa, A. M.** Orange bagasse as substrate for the production of pectinase and laccase by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in submerged and solid state fermentation. *BioResources*, (2008);3(2), 335-345.

- **Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y.-S., Haruenkit, R., Lojek, A., Číž, M., Caspi, A., Libman, I., & Trakhtenberg, S.** Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food chemistry*, (2001) ; 74(3), 309-315.
- **Goupy.J.(1999).** Plans d'expériences pour surfaces de réponse. Edition : DUNOD.paris : 13-15.
- **Goupy.J.(2006).** Les Plans d'expériences. Edition : Revue MODULAD .
- **Guezlane-Tebibel N., Kahlouche B., Athmani-Guemouri S.( 2010).** Microbiologie: Travaux Pratique. Edition :Office des publication Universitaires. Alger :69p.
- **Guowei, S., et al.** "Application of Box-Behnken design in optimization for crude polysaccharides from fruits of *Tribulustertristris L.*" *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*,(2013);5(10): 342-350.

## *H*

- **Hamdan, D. I., Abdulla, R. H., Mohamed, M. E., & El-Shazly, A. M.** Chemical composition and biological activity of essential oils of Cleopatra mandarin (*Citrus reshni*) cultivated in Egypt. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, (2013); 5(5), 83-90.
- **Henri L., Alphonse M., José D.( 1999).** Cour de microbiologie générale. Edition : Doin.paris : 101p.
- **Hermann D.(1996).** Biorganic chemistry "A-Chemical approche to enzyme action". Edition: Springer. New york:171p.
- **Hitha .P .K, D. Girija** Isolation and Screening of Native Microbial Isolates for Pectinase Activity. *International Journal of science and Research*, (2012); 3,632-634.
- **Huang, R., Cao, M., Guo, H., Qi, W., Su, R., & He, Z.** Enhanced ethanol production from pomelo peel waste by integrated hydrothermal treatment, multienzyme formulation, and fed-batch operation. *Journal of agricultural and food chemistry*, (2014); 62(20), 4643-4651.

## *J*

- **Januškevičius, A., Januškevičienė, G., & Andrulevičiūtė, V.** Chemical composition and energetic values of selected vegetable species in Lithuanian supermarkets. *Vet Zoo*, (2012);58, 8-12.
- **Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R.** Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, (2005) ;40(9), 2931-2944.
- **Jean-claude cheftel ; Jean- luis cuq; Denis lourient. (1985).** Protéine alimentaire : Biochimie-propriété fonctionnelle, valeur nutritionnel-modification. Edition, Tec et doc- lavoisier, pris :1p.
- **Jean pelmont.(1993).** Enzyme. Edition, Office des publication universitaire, France:167p.
- **Juwon, A. D., Akinyosoye, F., & Kayode, O. A.** Purification, characterization and application of polygalacturonase from *Aspergillus niger* CSTRF. *Malaysian Journal of Microbiology*, (2012);8(3), 175-183.

## *K*

- **Kalaichelvan, P.** Production and optimization of pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using cassava waste. *Asian Journal of Plant Science and Research*, (2012);2(3), 369-375.
- **Karam,S. (2004).** Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt. Thèse de Doctorat de Electronique des hautes fréquences et optoélectroniques, faculté de des Sciences et Techniques, 14p.
- **Kaur, H., & Kaur, G.** Optimization of cultural conditions for pectinase produced by fruit spoilage fungi. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology*, (2014);851-858.
- **KOÓS, G. N. Á. W. T.** PHYSICAL AND CHEMICAL ANALYSIS OF CANTEEN WASTES FOR SYNGAS PRODUCTION. *Materials Science and Engineering*, (2014); 39(2), 59-67.
- **Koser, S., Anwar, Z., Iqbal, Z., Anjum, A., Aqil, T., Mehmood, S., & Irshad, M.** Utilization of *Aspergillus oryzae* to produce pectin lyase from various agro-industrial residues. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, (2014);7(3), 327-332.

- **KJELDAHL, J** ; Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Z. Anal. Chem.*, (1883); 22 :366-382
- **Kumar, P., & Suneetha, V.** Natural, culinary fruit peels as a potential substrate for pectinolytic enzyme *int. J. Drug Dev. Res.*, (2014); 6, 109-118.
- **Kumar, S., Sharma, H., & Sarkar, B.** Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). *Food Science and Biotechnology*, (2011);20(5), 1289-1298.
- **Kumar, S., Sharma, H., & Sarkar, B.** Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). *Food Science and Biotechnology*, (2011);20(5), 1289-1298.
- **Kumar, P., & Suneetha, V.** Natural, culinary fruit peels as a potential substrate for pectinolytic enzyme *int. J. Drug Dev. Res.*, (2014);6, 109-118.

## *L*

- **Lagha-Benamrouche, S., & Madani, K.** Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, (2013);50, 723-730.
- **Leterme, P., Buldgen, A., Estrada, F., & Londoño, A. M.** Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. *Food chemistry*, (2006); 95(4), 644-652.
- **Lanouari, S., Nasser, B., El Haddoury, J., & Bencharki, B.** Caractérisation physico-chimique des graines de blé tendre (*Triticum aestivum*) sous traitement herbicide par l'acide 2, 4-dichlorophénoxyacétique [Physico-chemical characterization of the seeds of bread wheat (*Triticum aestivum*) under herbicide treatment with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, (2015); 10(2), 604.
- **Li, P.-j., Xia, J.-l., Shan, Y., Nie, Z.-y., & Wang, F.-r.** Effects of surfactants and microwave-assisted pretreatment of orange peel on extracellular enzymes production by *Aspergillus japonicus* PJ01. *Applied biochemistry and biotechnology*, (2015);176(3), 758-771.
- **Li, S.-j., Liu, X.-j., Xie, X.-l., Grierson, D., Yin, X.-r., & Chen, K.-s.** CrMYB73, a PH-like gene, contributes to citric acid accumulation in citrus fruit. *Scientia Horticulturae*, (2015); 197, 212-217.

- **Liu, Y., Heying, E., & Tanumihardjo, S. A.** History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*,(2012);11(6), 530-545.

## M

- **Mamma, D., & Christakopoulos, P.** Biotransformation of citrus by-products into value added products. *Waste and Biomass Valorization*, (2014); 5(4), 529-549.
- **Mamma, D., Kourtoglou, E., & Christakopoulos, P.** Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, (2008); 99(7), 2373-2383.
- **Manohar, M., Joseph, J., Selvaraj, T., & Sivakumar, D.** Application of Box Behnken design to optimize the parameters for turning Inconel 718 using coated carbide tools. *International Journal of Scientific & Engineering Research*,(2013);4(4), 620-644.
- **Magwaza, L. S., Mditshwa, A., Tesfay, S. Z., & Opara, U. L.** An overview of preharvest factors affecting vitamin C content of citrus fruit. *Scientia Horticulturae*, (2017);216, 12-21.
- **Marcilla, A., Zarzo, M., & Del Río, M.** Effect of storage temperature on the flavour of citrus fruit. *Spanish Journal of Agricultural Research*, (2006);4(4), 336-344.
- **Martínez-Trujillo, A., Arreguín-Rangel, L., García-Rivero, M., & Aguilar-Osorio, G.** Use of fruit residues for pectinase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-370. *Letters in applied microbiology*, (2011), 53(2), 202-209.
- **Mary, G. S., Sugumaran, P., Niveditha, S., Ramalakshmi, B., Ravichandran, P., & Seshadri, S.** Production, characterization and evaluation of biochar from pod (*Pisum sativum*), leaf (*Brassica oleracea*) and peel (*Citrus sinensis*) wastes. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, (2016);5(1), 43-53.
- **Miller, G. L.** Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, (1959); 31 426-428.
- **Mouria, B., Ouazzani-Touhami, A., & Douira, A.** Isolement et identification de la mycoflore du compost des déchets urbains solides. *Nature & Technology*, (2013), (9), 13.

## *N*

- **N'ganzoua, K., Camara, B., & Dick, E. (2010).** Evaluation des changements physico-chimiques caractérisant le mûrissement au cours de l'entreposage de trois variétés de bananes *Musa spp.*(AAB, cv. Corne 1; AAA, cv. Poyo et AA, cv. Figue Sucrée). *Sciences & Nature*, 7(2).
  
- **Nair, S. and T. Panda.**"Statistical optimization of medium components for improved synthesis of pectinase by *Aspergillus niger*." *Bioprocess and biosystems engineering*, (1997);**16**(3): 169-173.
  
- **Neeta, R., Anupama, S., Anjuvan, S., & Giridhar, S.** Production of polygalacturonase and pectin methyl esterase from agrowaste by using various isolation of *Aspergillus niger*. *Insight Microbiology*, (2011); 1(1), 1-7.
  
- **Navarro, J. L., Izquierdo, L., Carbonell, J. V., & Sentandreu, E.**Effect of pH, temperature and maturity on pectinmethylesterase inactivation of citrus juices treated by high-pressure homogenization. *LWT-Food Science and Technology*,(2014);**57**(2), 785-788.
- **Naz, S., Ahmad, N., Akhtar, J., Ahmad, N. M., Ali, A., & Zia, M.**Management of citrus waste by switching in the production of nanocellulose. *IET nanobiotechnology*, (2016);**10**(6), 395-399.

## *P*

- **Palaniyappan, M., Vijayagopal, V., Viswanathan, R., & Viruthagiri, T.**Screening of natural substrates and optimization of operating variables on the production of pectinase by submerged fermentation using *Aspergillus niger* MTCC 281. *African journal of Biotechnology*, (2009); 8(4).
  
- **Patil, S. R., & Dayanand, A.**Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology*, (2006); 97(18), 2340-2344.
  
- **Pedrolli, D. B., Monteiro, A. C., Gomes, E., & Carmona, E. C.**Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnology Journal*, (2009); 9-18.

- **Pedrolli, D. B., Gomes, E., Monti, R., & Carmona, E. C.** Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. *Applied biochemistry and biotechnology*, (2008);144(2), 191-200.
- **Pedrolli, D., & Carmona, E.** Pectin lyase from *Aspergillus giganteus*: comparative study of productivity of submerged fermentation on citrus pectin and orange waste. *Applied biochemistry and microbiology*, (2009); 45(6), 610.
- **Peter, O. O., LUCKY, O. O., & Uwumarongie-Ilori, E.** Phytochemical screening, proximate and elemental analysis of *Citrus sinensis* peels (L.) Osbeck. *J. Appl. Sci. Environ. Manage*, (2013); 17(1), 47-50.
- **Priya, V. and V. Sashi .** "Pectinase enzyme producing Microorganisms." *International Journal of Scientific and Research Publications*,(2014);4(3): 2250-3153.
- **Puértolas, E. and F. J. Barba.** "Electrotechnologies applied to valorization of by-products from food industry: Main findings, energy and economic cost of their industrialization." *Food and Bioproducts Processing*,(2016);100: 172-184.

## Q

- **Qiu, P., et al.** "Application of Box-Behnken design with response surface methodology for modeling and optimizing ultrasonic oxidation of arsenite with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>." *Central European Journal of Chemistry*,(2014);12(2): 164-172.

## R

- **Rabier, F. (2007).** Modélisation par la méthode des plans d'expériences du comportement dynamique d'un module IGBT utilisé en traction ferroviaire. Thèse de Doctorat en Génie Mécanique. Ecole doctorale matériaux – structure – mécanique, 181.
- **Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O. I., Bourdon, E., & Bahorun, T.** Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International*, (2011); 44(7), 2088-2099.
- **Rathod, R. P. and U. S. Annapure.** "Antioxidant activity and polyphenolic compound stability of lentil-orange peel powder blend in an extrusion process." *Journal of food science and technology*,(2016) :1-10.

- **Reddy, P. L. and A. Sreeramulu** ."Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district." *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*,(2012); 1(3): 1-10.
- **Rodríguez-Fernández, D., Rodríguez-León, J., De Carvalho, J., Sturm, W., & Socol, C.** The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, (2011);102(22), 10657-10662.
- **Rodriguez-Lopez, A. D., Mayor, L., Galfarsoro, M. M., Martinez-Otalo, J., & Garcia-Castello, E. M.**Pectinmethylesterase extraction from orange solid wastes: Optimization and comparison between conventional and ultrasound-assisted treatments. *Agricultural Sciences*, (2013); 4(09), 45.
- **Roongruangsri, W., Rattanapanone, N., Leksawasdi, N., & Boonyakiat, D.** Influence of storage conditions on physico-chemical and biochemical of two tangerine cultivars. *Journal of Agricultural Science*,(2013);5(2), 70.
- **Ruiz-Rodríguez, B.-M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M.-C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., Pardo-de-Santayana, M., Molina, M., & Tardío, J.** Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International*, (2011) ;44(5), 1244-1253.

## S

- **Sawaya, W., Khalil, J., Safi, W., & Al-Shalhat, A.** Physical and chemical characterization of three Saudi date cultivars at various stages of development. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, (1983);16(2):87-92.
- **Saxena, S., Shukla, S., Thakur, A., & Gupta, R.** Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, (2008) ;55(1) :33-51.
- **Sharma, R., Awasthi, O., & Kumar, K.**Pattern of phenolic content, antioxidant activity and senescence-related enzymes in granulated vs non-granulated juice-sacs of 'Kinnow' mandarin (*Citrus nobilis* x *C. deliciosa*). *Journal of food science and technology*,(2016);53(3), 1525-1530.
- **Siebert, K. J.**Modeling the flavor thresholds of organic acids in beer as a function of their molecular properties. *Food quality and preference*, (1999); 10(2), 129-137.

- **Solis-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., & Gutiérrez-Rojas, M.** Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (1993);39(1), 36-41.
- **Singh, S., & Mandal, S. K.** Optimization of processing parameters for production of pectinolytic enzymes from fermented pineapple residue of mixed *Aspergillus* species. *Jordan J Biol Sci*,(2012);5(4), 307-314.
- **Suhaimi, N., Ramli, S., Malek, R. A., Aziz, R., & Zalina, N.** *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2016, 8 (2): 259-268. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*,(2016);8(2), 259-268.
- **Suman, V., & Raju, K. J.** Studies on the Production and Optimization of Pectinase by *Aspergillus Niger* NCIM 616 using Mixed Substrate under Solid State Fermentation. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences (JCBPS)*,(2016); 7(1), 256.
- **Suresh, B., & Viruthagiri, T.** Optimization and kinetics of pectinase enzyme using *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Indian Journal of Science and Technology*, (2010);3(8), 867-870.

## *T*

- **Torquato, L. D., Pachiega, R., Crespi, M. S., Nespeca, M. G., de Oliveira, J. E., & Maintinguer, S. I.** Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. *Waste management*, (2017); 59, 181-193.

## *V*

- **Valenti, F., Porto, S. M. C., Chinnici, G., Selvaggi, R., Cascone, G., Arcidiacono, C., & Pecorino, B.** Use of citrus pulp for biogas production: A GIS analysis of citrus-growing areas and processing industries in South Italy. *Land Use Policy*,(2017); 66, 151-161.
- **Verma L,R ; et Joshi,V.K. (2000).** *Postharvest Technology of Fruits and Vegetables: Handling, processing, Fermentation, and Waste Management.* Indus Publishing.

## *X*

- **Xia, J.-l., Meng, H., Wang, R.-m., Zhang, C.-g., Xiong, J., Nie, Z.-y., & Qiu, G.-z.** Identification and fermentation optimization of protopectinase-overproducing strain *Aspergillus niger* CD-01 for pectin production. *Journal of Central South University of Technology*,(2009); 16(1), 53-60.

## $\gamma$

- **Yadav, K. K., Garg, N., Kumar, D., Kumar, S., Singh, A., & Muthukumar, M.** Application of response surface methodology for optimization of polygalacturonase production by *Aspergillus niger*. *Journal of environmental biology*, (2015); 36(1), 255.

## Z

- **Zeni, J., Pili, J., Cence, K., Toniazzo, G., Treichel, H., & Valduga, E.** Characterization of novel thermostable polygalacturonases from *Penicillium brasilianum* and *Aspergillus niger*. *Bioprocess and biosystems engineering*, (2015); 38(12), 2497-2502.
- **Zhou, J.-M., Ge, X.-Y., & Zhang, W.-G.** Improvement of polygalacturonase production at high temperature by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, (2011); 102(21), 10085-10088.

## **Annexe A : Matériels**

1. Bec benzène.
2. Boite pétri.
3. Ecouvillon.
4. Pipette paster.
5. Cuve en verre.
6. Microscope photonique : OPTIKA.
7. Etuve : BINDER.
8. Etuve ventilé : POL-EKO APARATURA.
9. Autoclave : pb international.
10. Centrifugeuses : BEIJING ERA BEILI CENTRIFUGE CO, LTD.
11. Bain Marie : TRADE Raypa.
12. Spectrophotomètre : UV mini 1240 SHIMADZU.
13. Four à moufle : Nabertherm.
14. Plaque agitatrice chauffante : VELP SCIENTIFICA.
15. Plaque agitatrice : Heidolph VIBRAMAXE 100.
16. pH mètre : BANTE instruments.
17. Balance analytique : Adventurer.
18. Vortex : VELP scientifica.

## Annexe B : Les plans d'expérience

### 1. Domaine d'un facteur

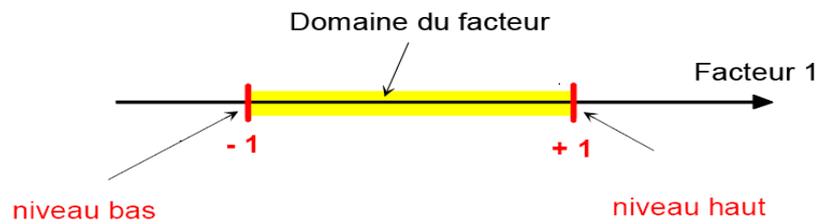


Figure B.1 : Domaine d'un facteur.

### 2. Domaine d'étude

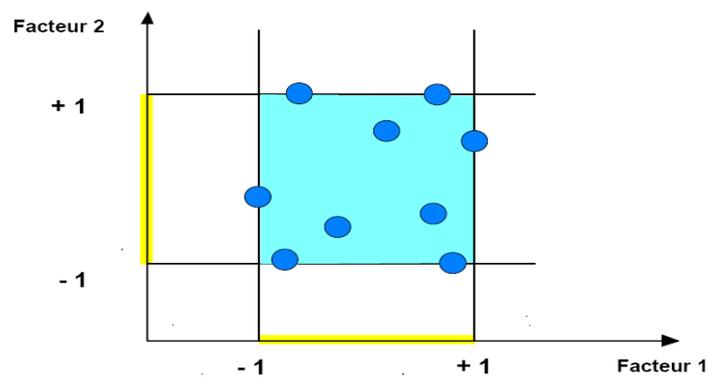


Figure B.2 : Domaine d'étude.

### 3. Matrice d'expérience (Goupy, 2006).

Tableau B.1 : Matrice d'expérience à deux facteurs.

N° essais	Facteur 1	Facteur 2
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1

## **Annexe C : Composition des milieux de culture**

### **1. Milieu Czapek-Dox Agar (modifié) (g/l)**

- Pectine.....10g.
- NaNO<sub>3</sub>.....2g.
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1g.
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0.5g.
- KCl.....0.5g.
- FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0.01g.
- Agar.....20g.
- pH.....5.8.

### **2. Milieu Czapek-Dox Agar g/l**

- Saccharose .....10g.
- NaNO<sub>3</sub>.....2g.
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1g.
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0.5g.
- KCl.....0.5g.
- FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0.01g.
- Agar.....20g.
- pH.....5.8.

## Annexe D: Dosage des protéines Bradford (1976).

### 1. Composition du réactif de Bradford

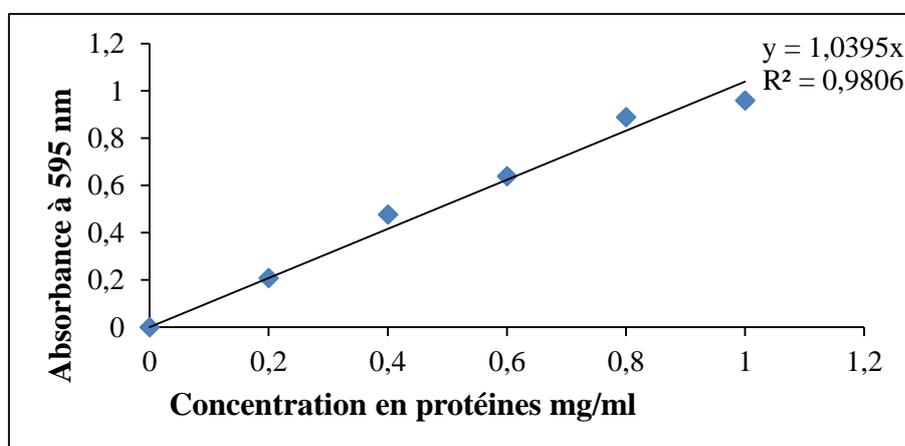
- BBC G-250.....100 mg.
- Ethanol absolu .....50 ml.
- Acide phosphorique à 85%.....100 ml.
- Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée.
- Conservation pendant 3 semaines à 4 °C et à l'abri de la lumière.

### 2. Elaboration de la courbe d'étalonnage

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) (10mg/10ml), le protocole suivie est résumer dans le tableau suivant.

**Tableau D.1** : Préparation de la gamme d'étalonnage de la BSA.

N° du tube	Blanc	1	2	3	4	5
Solutions et réactifs						
Solution de BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif de Bradford (ml)	3					
Absorbance à 595 nm	0	0.209	0.477	0.640	0.889	0.959



**Figure D.1** : Courbe d'étalonnage des protéines.

## Annexe E: Dosage des sucres totaux DUBOIS(1956).

### 1. Composition des solutions CAREZ :

#### ❖ la solution CAREZ I :

- Acétate de zinc trihydraté.....23.8g.
- Acide acétique glaciale .....3g.
- Eau distillé.....100ml.

#### ❖ La solution CAREZ II :

- Ferrocyanure de potassium.....10.6g.
- Eau distillé .....100ml.

### 2. Elaboration de la courbe d'étalonnage

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère (10ml de Glucose / 10 ml d'eau distillé), le protocole suivie est résumer dans le tableau suivant.

**Tableau E.1 :** Préparation de la gamme d'étalonnage de Glucose.

N° du tube Solutions et réactifs	Blanc	1	2	3	4	5
Volume SM (µl)	0	200	400	600	800	1000
Volume eau distillé (µl)	1000	800	600	400	200	0
Volume finale (ml)	1					
Volume phénol (ml)	1					
Volume H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	3					
Absorbance 550 nm	0	0.225	0.435	0.657	0.837	1.033

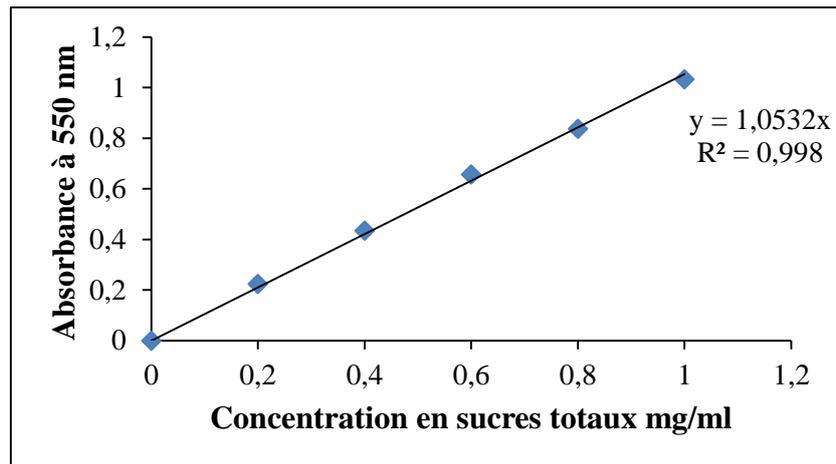


Figure E.1 : Courbe d'étalonnage des sucres totaux.

## Annexe F : Dosage des sucres réducteur (Miller, 1959).

### 1. Composition de DNS

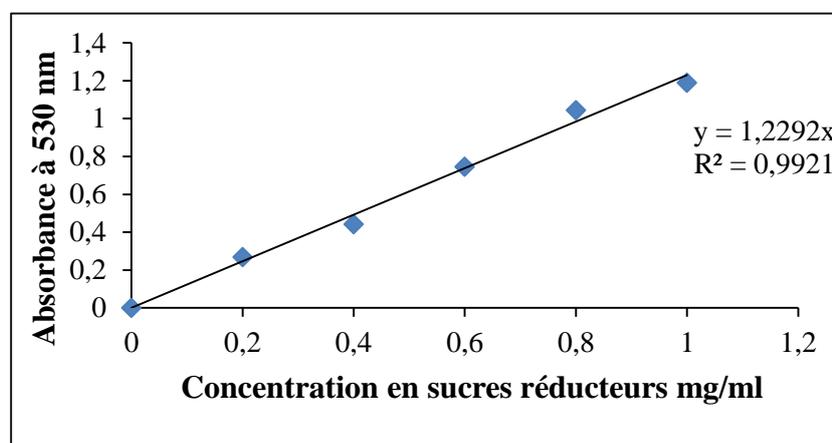
- DNS.....2g.
- Soude.....3.2g.
- Tartrate double sodium potassium.....60g.
- Eau distillé.....100ml.

### 2. Elaboration de la courbe d'étalonnage

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère (10ml de Glucose / 10 ml d'eau désilé), en utilisant de la DNS le protocole suivie est résumer dans le tableau suivant.

**Tableau F.1** : Préparation de la gamme d'étalonnage de Glucose en utilisant la DNS.

N° du tube Solutions et réactifs	Blanc	1	2	3	4	5
Volume SM (µl)	0	200	400	600	800	1000
Volume eau distillé (µl)	1000	800	600	400	200	0
Volume finale (ml)	1					
Volume récupérer (µl)	200					
DNS (µl)	300					
Chauffage 5min à 100°C						
Eau distillé (ml)	1.5					
Absorbance 530 nm	0	0.269	0.442	0.746	1.045	1.019

**Figure F.1** : Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs.

## Annexe G : Dosage de l'activité enzymatique (Arotupin et *al.*, 2012).

### 1. Composition Tampon Citrate de Sodium (pH 5)

- **Solution A:** Acide citrique.
- **Solution B:** Citrate de sodium.

### 2. Elaboration de la courbe d'étalonnage

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère (10ml de l'acide galactorunique / 10 ml d'eau distillé), le protocole suivie est résumer dans le tableau suivant.

**Tableau G.1 :** Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide galactorunique.

N° du tube Solutions et réactifs	Blanc	1	2	3	4	5
Volume SM ( $\mu\text{l}$ )	0	40	80	120	160	200
Volume eau distillé ( $\mu\text{l}$ )	200	160	120	80	40	0
Volume finale ( $\mu\text{l}$ )	200					
DNS ( $\mu\text{l}$ )	300					
Chauffage 5min a 100°C						
Volume eau distillé (ml)	1.5					
Absorbance 530nm	0	0.127	0.209	0.422	0.498	0.662

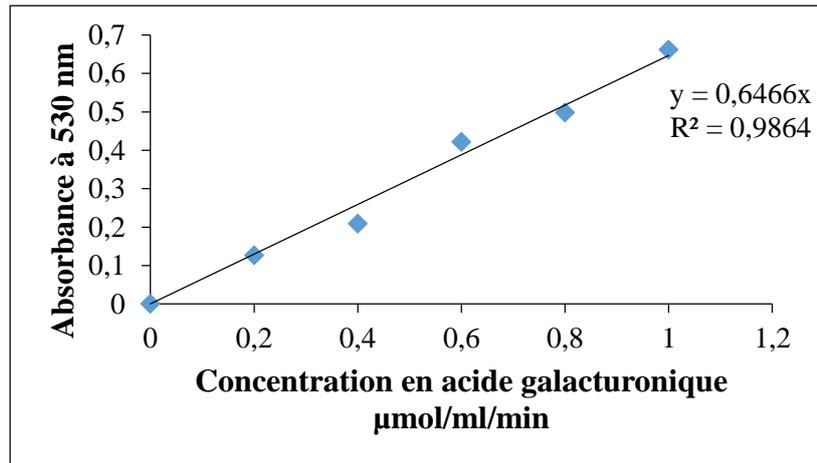


Figure G.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique.

## Annexe H : Dosage de l'azote total

### 1. Préparation du catalyseur :

Sulfate de cuivre.....10g.

Sulfate de potassium.....100g.

**Annexe I** : Plan et résultats de l'optimisation de l'activité enzymatique par le plan BBD.**Tableau I.1** : Plan et résultats de l'optimisation de l'activité enzymatique par le plan BBD.

	Potentiel d'Hydrogène	Température °C	Source d'Azote %(w/v)	Activité enzymatique μmol / ml / min	
				Valeurs réelles	Valeurs prédites
1	3	30	0.7	259.38	267.39
2	7	20	0.4	108.37	111.21
3	3	40	0.4	107.10	104.27
4	5	30	0.4	316.37	318.01
5	7	30	0.7	220.34	224.35
6	5	40	0.7	104.86	99.69
7	3	30	0.1	234.70	230.68
8	7	40	0.4	121.15	122.30
9	5	40	0.1	115.54	122.40
10	5	20	0.1	107.83	112.99
11	5	20	0.7	115.46	108.60
12	3	20	0.4	116.00	114.84
13	5	30	0.4	317.72	318.01
14	5	30	0.4	319.96	318.01
15	7	30	0.1	296.18	288.16

## Résumé

Ce travail est consacré à l'optimisation des paramètres qui influençant la production des pectinase par biofermentation en utilisant l'*Aspergillus niger* à partir des écorces d'agrumes.

Au cours de cette étude une souche microbienne est isolée, purifier et identifié comme *Aspergillus*. Cette dernière est ensemencé sur la poudre d'agrumes dont la caractérisation physicochimique révèle des taux d'humidité, de cendre totale, un pH, une acidité titrable, de sucres totaux, et sucres réducteurs, et une teneur en protéine et en azote total de l'ordre 14.22%, 3.62%, 4.83, 0.19%, 30.66%, 18.34%, 0.46% et 1.36% , 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 la activité enzymatique est obtenue une avec une concentration de poudre de 4g/50ml pour un temps de fermentation de 6jours.

L'application du model BBD à trois facteurs (pH, température, concentration en peptone) avec les trois niveaux (-1, 0, +1) a révélé que la meilleur activité enzymatique 318.7UI/ml est obtenue avec les conditions optimales de pH, de température et de concentration en peptone de l'ordre de 5.22, 30°C et 0.35g/50ml, respectivement.

L'étude de l'effet linéaire a révèle que seul le facteur température est très significatif sur la production, ainsi que l'interaction (pH-concentration en peptone) influence significativement sur l'activité enzymatique. L'effet quadratique démontre que les paramètres étudié influencent significativement sur le taux de production.

**Mots clés :** Agrumes, écorce, valorisation, optimisation, Box-Behnken, enzyme, activité enzymatique, *Aspergillus niger*.

## Abstract

This work is devoted to optimize the parameters for the production of biological pectinolytic enzymes using *Aspergillus niger*. From citrus by-products (peels).

In this study a microbial strain is isolated, purified and identified as *Aspergillus*. The strain is seeded on the citrus powder, the physicochemical characterization reveals moisture, total ash, pH, titratable acidity, total sugars and reducing sugars, and a total protein and nitrogen content of The order of 14.22%, 3.62%, 4.83, 0.19%, 30.66%, 18.34%, 0.46% and 1.36%, 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 concentration of 4 g / 50 ml powder for a fermentation time of 6 days.

The application of the three-factor BBD model (pH, temperature, peptone concentration) with the three levels (-1, 0, +1) revealed that the best enzymatic activity 318.7UI / ml is obtained with optimum pH conditions , Temperature and peptone concentration of the order of 5.22, 30 ° C and 0.35g / 50ml, respectively.

The study of the linear effect revealed that only the temperature factor is very significant on the production, as well as the interaction (pH-concentration of peptone) has a significant influence on the enzymatic activity. The quadratic effect demonstrates that the parameters studied have a significant influence on the rate of production.

**Key words:** Citrus, peel, valorisation, optimization, Box-Behnken, enzyme, enzymatic activity, *Aspergillus niger*.

# *Chapitre I*

# *Chapitre II*

# *Chapitre III*

*Conclusion*

# ***Introduction***

# ***Annexes***

# ***Bibliographie***