



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**Département : Biologie Appliquée**  
**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**  
**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Filière : Sciences Biologiques**  
**Spécialité : Bio-industrie, Analyses et Contrôle**

**Intitulé :**

**Valorisation de grignon d'olive comme support pour la production  
de métabolites d'intérêt par des isolats microbiens**

**Présenté et soutenu par : SIHAMDI Nouha**

**Le : /09/2020**

**Jury d'évaluation :**

**Présidente de Jury : Mme BELLIL Ines**

(Prof. UFM Constantine1)

**Rapporteur : Mr KACEM CHAOUICHE Noredine**

(Prof. UFM Constantine1)

**Examinatrice : Mme NEMOUCHI Sara**

(MCB. UFM Constantine1)

**Tuteur : Mr MANSOUR Mehdi**

(Doctorant. UFM Constantine1)

*Année universitaire*  
**2019-2020**

## ***Remerciements***

*J'exprime mes remerciements et ma profonde gratitude avant tous au bon Dieu qui m'a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.*

*Ce travail a été réalisé au laboratoire de mycologie, Biotechnologies et de l'activité microbienne (LAMyBAM). Faculté des sciences de la nature et de vie, Université Mentouri Constantine, et au Laboratoire Régional du Contrôle de Qualité (CACQE).*

*Mes premiers remerciements vont à Monsieur le président de Jury Pr. Kacem chaouche. N, Directeur de laboratoire et professeur à l'Université Mentouri Constantine, pour m'encadrer et pour l'orientation dont on a pu bénéficier. Pour ses précieux conseils, sa grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles.*

*Mes remerciements s'adressent également à Madame KARA Ali Mounira et Mansour Mehdi pour leur temps, leur gentillesse et leurs efforts fournis au laboratoire.*

*Je tiens aussi à présenter mes vifs remerciements et mon respect à Madame BELLIL Ines Pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'être un président de Jury et à Madame NEMOUCHI Sara de juger ce mémoire en tant qu'examinatrice.*

*J'adresse un remerciement particulier à Monsieur BENMOURALLAH Directeur du CACQE et tout le personnel pour leur accueil.*

*Enfin, un remerciement est adressé à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail :*

*À la personne la plus chère à mon cœur, ma maman, mon paradis sur terre, ma vie et la source de mon bonheur, mon énergie et ma motivation, qui a le droit de recevoir mes chaleureux remerciement pour tous les sacrifices qu'elle a consenti pour me permettre de suivre mes études dans les meilleures conditions possibles et n'avoir jamais cessé de m'encourager.*

*À mon papa, rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être, j'espère avoir répondu aux espoirs que tu as fondé en moi. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

*À la mémoire de mon grand-père et à ma grand-mère chérie, qui m'a accompagné par ses prières et sa douceur. J'espère que leur bénédiction m'accompagnera toujours.*

*À mes adorables soeurs : Hanine et Djoumana.*

*À mes tantes : Yasmine et Khadidja, à mes oncles et toute ma famille.*

*À mes copines : Sonia, Oumnia, Hafida, merci les filles pour m'aider et soutenir.*

*À mon ami Nassim, d'être toujours là pour m'écouter, ton amitié m'est précieuse.*

*À tous ceux qui sont proches de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom.*

## Résumé

Ce travail se focalise sur la mise en évidence des activités cellulases et xylanases produites sur milieu à base de grignon d'olive, chez une souche fongique appartenant au genre *Chaetomium*, fournie par le Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Frères Mentouri Constantine, situé à Chaabarsas. Pour ce faire, une étude de la morphologie du microorganisme utilisé et son aptitude à produire, sur milieux génériques, des enzymes extracellulaires a été réalisée ; suivie par une préparation et analyse du grignon d'olive brut, récolté d'une huilerie située à la ville d'ElMilia (Jijel). La production des enzymes à activités cellulases et xylanases par le champignon filamenteux *Chaetomium sp.* cultivé sur le grignon d'olive à 71.83% d'humidité, en fermentation solide, a donné un développement mycélien rapide corrélé avec la production de la xylanase et de la cellulase (endoglucanase). Les activités maximales ont été mesurées durant le deuxième et le troisième jour et estimées à 195.6 UI/mL et 272,9 UI/mL, respectivement. Ce résultat ouvre la voie sur la valorisation de grignon d'olive, considéré jusqu'ici comme déchet oléicole solide sans intérêt, pour la production de métabolites d'intérêt par différents microorganismes. Cette production peut être améliorée par l'optimisation de facteurs de fermentation et de conditions de culture.

**Mots clés :** Grignon d'olive, *Chaetomium sp.*, enzymes ligno-cellulolytiques, milieux de fermentation, optimisation.



## **Abstract**

The present work aims at highlighting and detecting the cellulolytic and xylanolytic activities produced on a medium containing olive pomace, by a fungal strain belonging to the genus *Chaetomium*, provided by the Laboratory of Mycology, Biotechnology and Microbial Activity (LaMyBAM) Brothers Mentouri University Constantine, located in Chaabarsas. To this end, an experiment was carried out, consisting of a morphological study of the used microorganism and its ability to produce, on generic media, extracellular enzymes. Followed, by a preparation and analysis of the raw olive pomace, obtained from an oil mill located in ElMilia (Jijel). The production of lignocellulolytic enzymes by the filamentous fungus *Chaetomium sp.* cultivated on olive pomace at 71.83% moisture content by solid fermentation, gave rapid mycelial development correlated with the production of xylanase and cellulase (endoglucanase). Peak activities were measured at the second and third day and estimated at 195.6 IU/mL and 272.9 IU/mL, respectively. These findings pave the way for the valorization of olive pomace, considered until now as uninteresting solid olive waste, for the production of metabolites of interest by various microorganisms. This production can be improved by optimizing fermentation factors and culture conditions.

**Key words :** Olive pomace, *Chaetomium sp.*, lignocellulolytic enzymes, fermentation media, optimization.

## ملخص

يرتكز هذا العمل على تسليط الضوء على نشاط إنزيمات Cellulase و xylanases لدى سلالة فطرية من نوع *Chaetomium* الذي زودنا به مخبر علم الفطريات الحبيوية والميكروبية (LaMyBAM)، جامعة الإخوة منتوري قسنطينة. عن طريق زراعته في وسط أساسه ثقل الزيتون. ومن أجل هذا، خصصنا الجزء الأول لدراسة مورفولوجيا الكائن الحي الدقيق المستعمل وقدرته على إنتاج إنزيمات خارج الخلايا، في أوساط عامة، متبوعاً بتحضير وتحليل ثقل الزيتون الخام الذي تم جمعه من معصرة في مدينة الميلية (جبل). إن إنتاج الأنزيمات اللينوسيلولوزية من طرف الفطر الخيطي *Chaetomium sp.* المزروع في ثقل الزيتون في درجة رطوبة تساوي 71,83% عن طريق تخمير في وسط صلب قد أعطى نمواً فطرياً سريعاً متناسباً مع إنتاج الكسيلاناز (xylanase) والسيلولاز (cellulase). ولقد تم قياس النشاطات القصوى مع نهاية اليومين الثاني والثالث وتم تقديرها بـ 195,6 و.د./مل و 272,9 و.د./مل على التوالي. تفتح هذه الدراسة الطريق نحو تثمين ثقل الزيتون، الذي طالما تم اعتباره، حتى الآن، كنفاية صلبة للزيتون ليست ذات قيمة، وهذا الإنتاج مواد ذات فائدة عن طريق مختلف الكائنات الحية الدقيقة. ويمكن تطوير هذا الإنتاج عن طريق تحسين عوامل التخمر وظروف الزراعة.

**الكلمات الرئيسية:** ثقل الزيتون، *Chaetomium sp.*، إنزيمات لينوسيلولوزية، اوساط التخمر، التحسين.

## Liste des abréviations

AOAC : Association of Official Analytical Chemists  
BG :  $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase  
CBH : 1,4- $\beta$ -D glucancellobiohydrolases  
CBM : Module de fixation au substrat  
CD : Domaine Catalytique  
CET : Centres d'Enfouissement Technique  
CMC : Carboxyméthylcellulose  
COI : Conseil Oléicole International  
COT : Carbone Organique Total  
CRCDG : Centre Centre de recherches sur la conservation des documents graphiques  
DNS : Acide Dinitrosalicylique  
DP : Degré de polymérisation  
EC : Enzyme Commission  
EG : Endoglucanase  
FMS : Fermentation en Milieu Solide  
LiP : Lignine Peroxydase  
MG : Matière Grasse  
mL : Millilitre  
MM : Matière Minérale  
MnP : Mn Peroxydase  
MO : Matière Organique  
MS : Matière Sèche  
NF : Norme Française  
ONFAA : l'Observatoire National des filières Agricoles et Agroalimentaire  
REME : Réseau des Entreprises Maghrébines pour l'Environnement  
UI : Unité Internationale  
VP : Versatile Peroxydase

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 01 : Structure de la ligno-cellulose.....   | 17 |
| Figure 02 : Structure de la cellulose (Le cellobiose : un disaccharide de deux résidus de glucose liés par des liaisons $\beta$ glycosidiques $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)..... | 18 |
| Figure 03 : Unités les plus représentées dans les hémicelluloses.....  | 19 |
| Figure 04 : a) Les trois précurseurs de la lignine. b) Exemple de formes radicalaires à l'origine de la lignification.....   | 20 |
| Figure 05 : Les principales liaisons entre la lignine et les différents polysaccharides.....   | 21 |
| Figure 06 : Représentation de la structure de la pectine.....  | 22 |
| Figure 07 : Quantité de résidus produits pour une production de 40.000T d'huile.....   | 23 |
| Figure 08 : Coupe transversale et longitudinale d'olives.....  | 25 |
| Figure 09 : Action synergique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose par les cellulases fongiques.....   | 31 |
| Figure 10 : Schéma des différentes activités enzymatiques nécessaires à la dégradation de l'hémicellulose.....   | 34 |
| Figure 11 : Caractérisation microscopique de <i>Chaetomium globosum</i> .....  | 39 |
| Figure 12 : Mécanisme de l'oxydation du gaïacol par la laccase.....  | 45 |
| Figure 13 : Extraction d'huile des grignons d'olive (Dispositif Soxhlet) .....   | 47 |
| Figure 14 : Suspensions sporales (inoculum).....   | 48 |
| Figure 15 : Fermentation solide en Erlenmeyers.....  | 49 |
| Figure 16 : Centrifugation du substrat fermenté.....   | 50 |
| Figure 17 : Extraits enzymatiques .....  | 50 |
| Figure 18 : Réaction du DNS avec un sucre réducteur.....   | 52 |
| Figure 19 : Observations microscopiques des spores de <i>Chaetomium sp.</i> .....  | 56 |
| Figure 20 : Révélation de l'activité cellulase sur milieu CMC.....   | 57 |
| Figure 21 : Révélation de l'activité xylanase sur milieu XMB.....  | 57 |
| Figure 22 : Révélation de l'activité laccasique sur milieu XMB.....  | 58 |
| Figure 23 : Grignon d'olive séché et tamisé.....   | 59 |
| Figure 24 : A : Matière grasse (huile d'olive) extraite ; B : Teneur en cendres de grignon d'olive.....  | 59 |
| Figure 25 : Colonie de <i>Chaetomium sp.</i> Après 48h d'incubation sur milieu gélosé à base de grignons d'olive (A : Surface ; B : Revers) .....                              | 60 |
| Figure 26 : Suivi de la croissance mycélienne pendant 6 jours de culture.....  | 61 |
| Figure 27 : Suivi de l'activité CMCase lors de la FMS.....   | 62 |
| Figure 28 : Suivi de l'activité xylanase lors de la FMS.....   | 63 |
| Figure 29 : Évolution de l'Humidité au cours de la FMS.....  | 64 |
| Figure 30 : Évolution du pH au cours de la FMS.....  | 65 |

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| Tableau 01 : Composition physique des différents types de grignon.....  | 26 |
| Tableau 02 : Composition chimique indicative des différents types de grignons.....                                  | 26 |
| Tableau 03 : Classification des enzymes.....  | 28 |
| Tableau 04 : Valorisation de la biomasse ligno-cellulosique dans la production d'enzymes ligno-cellulolytiques..... | 29 |
| Tableau 05 : Applications industrielles de la cellulase.....  | 33 |
| Tableau 06 : Principaux microorganismes utilisés dans la production de cellulase.....                               | 37 |
| Tableau 07 : Observations macroscopiques d'une culture de <i>Chaetomium sp.</i> sur milieu Sabouraud.....           | 54 |
| Tableau 08 : Composition chimique de grignons d'olive bruts après 2 mois d'extraction.....                          | 59 |

## Table des matières

|   |    |
|---|----|
| Introduction.....   | 13 |
| 1- Revue bibliographique.....   | 16 |
| 1.1- La biomasse ligno-cellulosique.....                              | 17 |
| 1.1.1- Généralités.....   | 17 |
| 1.1.2- Structure et composition.....                                  | 17 |
| 1.1.2.1- La cellulose.....  | 18 |
| 1.1.2.2- L'hémicellulose.....   | 18 |
| 1.1.2.3- La lignine.....  | 19 |
| 1.1.2.4- La pectine.....  | 21 |
| 1.1.2.5- Les extractibles.....  | 22 |
| 1.1.3- La ligno-cellulose et sa valorisation.....                     | 22 |
| 1.1.4- Secteur oléicole : Entre la production et les coproduits.....  | 23 |
| 1.1.4.1- Impact des résidus oléicoles.....                            | 24 |
| 1.1.4.2- Manque à gagner.....   | 24 |
| 1.1.4.3- Valorisation des déchets d'oliveries.....                    | 24 |
| 1.1.5- Les grignons d'olives : Un déchet précieux.....                | 25 |
| 1.1.5.1- Généralités.....   | 25 |
| 1.1.5.2- Composition de grignon d'olive.....                          | 26 |
| 1.1.5.3- Différentes filières de valorisation de grignon d'olive..... | 27 |
| 1.2- Les enzymes ligno-cellulolytiques.....                           | 28 |
| 1.2.1- Généralités et classification des enzymes.....                 | 28 |
| 1.2.2- Enzymes ligno-cellulolytiques et leur production.....          | 28 |
| 1.2.3- Les cellulases.....  | 30 |
| 1.2.3.1- Structure.....   | 31 |
| 1.2.3.2- Synergie des cellulases.....                                 | 32 |
| 1.2.3.3- Applications industrielles.....                              | 32 |
| 1.2.4- Xylanases (Hémicellulases) .....                               | 33 |
| 1.2.4.1- Mécanisme d'hydrolyse.....                                   | 33 |
| 2.2.4.2- Intérêt industriel.....                                      | 34 |
| 1.2.5- Ligninases.....  | 34 |
| 1.2.5.1- Les phénols oxydases (laccases) .....                        | 35 |
| 1.2.5.2- Les enzymes type Lignine peroxydase (LiP) .....              | 35 |

|  |    |
|--|----|
| 1.2.5.3- Les enzymes type manganèse peroxydase (MnP).....  | 35 |
| 1.2.5.4- Les enzymes type Peroxydase Versatile (VP) .....  | 36 |
| 1.2.5.5- Applications industrielles.....   | 36 |
| 1.2.6- Microorganismes producteurs des enzymes cellulolytiques.....  | 36 |
| 1.3- Champignons du genre <i>Chaetomium</i> .....  | 38 |
| 1.3.1- Généralités.....  | 38 |
| 1.3.2- Écologie et exigences de croissance.....  | 38 |
| 1.3.3- Caractères morphologiques.....  | 39 |
| 1.3.4- Applications.....   | 40 |
| 1.4- Fermentation en milieu solide (FMS) .....   | 40 |
| 1.4.1- Généralités et définitions.....   | 40 |
| 1.4.2- Applications de la FMS.....   | 41 |
| 1.4.3- Avantages et inconvénients.....   | 41 |
| 2- Matériel et méthodes.....   | 43 |
| 2.1- Microorganismes.....  | 44 |
| 2.1.1- Étude morphologique du microorganisme producteur d'enzyme.....                                      | 44 |
| 2.1.2- Mise en évidence des activités enzymatiques lignocellulolytiques.....                               | 45 |
| 2.2- Préparation du substrat.....  | 46 |
| 2.2.1- Caractérisation physicochimique des grignons d'olive.....   | 46 |
| 2.2.1.1- Détermination de la matière sèche (MS) .....  | 46 |
| 2.2.1.2- Détermination de la matière minérale (MM) .....   | 46 |
| 2.2.1.3- Détermination de la teneur en matière grasse (MG) .....   | 47 |
| 2.2.1.4- Détermination de la teneur en matière organique (MO) et du carbone organique total<br>(COT) ..... | 47 |
| 2.3- Croissance de la souche fongique sur milieu gélosé à base de grignon d'olive.....                     | 48 |
| 2.4- Production d'enzymes par Fermentation sur milieu solide « FMS » .....                                 | 48 |
| 2.4.1- Préparation de l'inoculum.....  | 48 |
| 2.4.2- Conduite de la fermentation.....  | 49 |
| 2.4.3- Suivi de la culture.....  | 50 |
| 2.4.3.1- Évolution de l'humidité .....   | 50 |
| 2.4.3.2- Évolution du pH.....  | 50 |
| 2.4.4- Dosage des activités enzymatiques.....  | 51 |
| 2.4.4.1- Activité cellulase (CMCase, endoglucanase) .....  | 51 |
| 2.4.4.2- Activité xylanase.....  | 52 |

|   |    |
|---|----|
| 3- Résultats et discussion.....   | 53 |
| 3.1- Microorganismes.....   | 54 |
| 3.1.1- Réactivation et étude morphologique du <i>Chaetomium sp.</i> producteur d'enzymes.....             | 54 |
| 3.1.2- Mise en évidence des activités enzymatiques lignocellulolytiques chez <i>Chaetomium sp.</i> .....  | 56 |
| 3.2- Préparation du substrat de fermentation (grignon d'olive) .....                                      | 58 |
| 3.3- Mise en culture de la souche fongique sur milieu gélosé à base de grignon d'olive.....               | 60 |
| 3.4- Production des enzymes par fermentation sur milieu solide « FMS » .....                              | 61 |
| 3.4.1- Suivi de la croissance mycélienne.....   | 61 |
| 3.4.2- Suivi cinétique de la production de la cellulase et de la xylanase par <i>Chaetomium sp.</i> ..... | 61 |
| 3.4.3- Évolution de l'humidité et du pH.....  | 64 |
| 4- Conclusion et perspectives.....  | 66 |
| 5- Références bibliographiques.....   | 68 |
| Annexes.....  | 87 |



# *Introduction*

## **Introduction**

Face au risque de la raréfaction des ressources énergétiques fossiles et aux enjeux du réchauffement climatique, la biomasse apparaît comme une ressource crédible de carbone renouvelable susceptible d'être valorisée comme solution alternative pour la production de combustibles solides et des carburants, tout en limitant les émissions de gaz à effet de serre (**Liu, 2015**).

A ce titre, la biomasse ligno-cellulosique fut, naturellement, au centre des recherches pour la production des carburants de substitution et pour étudier de nouvelles filières de biotechnologie blanche étant présentée comme alternative à la pétrochimie (**Ledéaut et al., 2016**). Une quantité considérable de la matière ligno-cellulosiques est générée par des pratiques agro-industrielles et l'agriculture est considérée comme source importante (10%) de la biomasse génératrice de la bioénergie (**Kummamuru, 2017**).

Parallèlement, cette biomasse peut être valorisée dans le domaine de la technologie des enzymes ligno-cellulolytiques pour la production de cellulase, de xylanase, de laccase, et de pectinase, utilisées dans le domaine de la bioénergie, du médical, de traitement du textile et de recherche et développement (**Charnock et McCleary, 2005**). A cet effet, plusieurs substrats comme le son de blé, le son du riz, la bagasse de canne et même les peaux de bananes sont utilisés par les microorganismes pour produire les enzymes (**Savitha et al., 2011 ; Meza et al., 2005 ; Faccelo et Cruz, 2007**).

Plusieurs espèces bactériennes possèdent le système enzymatique dégradant la matière ligno-cellulosique (**Yan et al., 2017 ; Rouches et al., 2016**), mais les champignons sont considérés comme les meilleurs producteurs d'enzymes ligno-cellulolytiques en raison de leurs cellulases naturelles douées d'une capacité de saccharification complète (**Pimentel et al., 2014**).

L'Algérie, possède un secteur oléicole très important qui, génère de grandes quantités de sous-produits qui sont soit brûlés, soit rejetés dans l'environnement, sans traitement préalable. La valorisation de ces déchets par l'utilisation des microorganismes est une méthode prometteuse et rentable à plusieurs niveaux (**Perraud-Gaime et Roussos, 2013**). En effet, Le grignon d'olive a servi comme substrat dans un milieu de culture solide pour la production de certaines enzymes par *Rhizopus oligosporus* (**Ismaili-Aiaoui et al., 2002**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail dont l'objectif est la recherche et la mise en évidence de l'activité ligno-cellulolytique d'une moisissure du genre *Chaetomium* sélectionnée, *in vitro*, comme laccase positive. L'originalité de cette étude, repose sur l'utilisation de grignon d'olive brut comme substrat de fermentation, sans aucun prétraitement ni inducteur. Pour la réalisation de cette étude plusieurs étapes sont prévues en l'occurrence :

- Une synthèse des principaux événements scientifiques en relation avec la valorisation de la biomasse d'origine oléicole.
- L'hydrolyse de cette biomasse ligno-cellulosique par voie microbienne en utilisant l'isolat sélectionné.
- Mise en évidence du complexe enzymatique responsable de l'hydrolyse.
- Discussion des résultats et rédaction du manuscrit.

# *Revue bibliographique*

# 1- Revue bibliographique

## 1.1- La biomasse ligno-cellulosique

### 1.1.1- Généralités

La ligno-cellulose naturelle est la matière organique renouvelable la plus abondante sur terre. Elle représente approximativement 27% de la superficie terrestre. La plus grande partie est utilisée comme combustible ou décomposée et transformée par une panoplie de microorganismes dans l'environnement naturel, pour se minéraliser en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. En effet, cette minéralisation présente une partie importante de cycle de carbone-et lorsqu'elle n'est pas valorisée, elle est considérée comme un gaspillage du point de vue ressources naturelles (Chen, 2014a). Néanmoins, l'utilisation de la matière ligno-cellulosique comme source de cellulose et de papier est presque ancestrale, en outre, de son utilisation comme matériau de construction et de combustion (Martinez et al., 2005).

### 1.1.2- Structure et composition

Les cellules végétales se distinguent des cellules animales par la présence chez les premières, d'une paroi constituée d'un mélange de polysaccharides, d'enzymes et d'autres polymères phénoliques qui la caractérisent (figure 1) (Taiz et al., 2010). De point de vue utilité, les polymères de cellulose et d'hémicelluloses apportent la rigidité à la paroi et autres composants lui fournissent la fluidité (Ochoa-Villarreal et al., 2012). Des parois secondaires sont déposées sur les parois primaires après que les cellules aient atteint leur maturité (Dominiak et al., 2014). Cette structure complexe présente un des problèmes inhérents à l'utilisation de biomasse ligno-cellulosique.

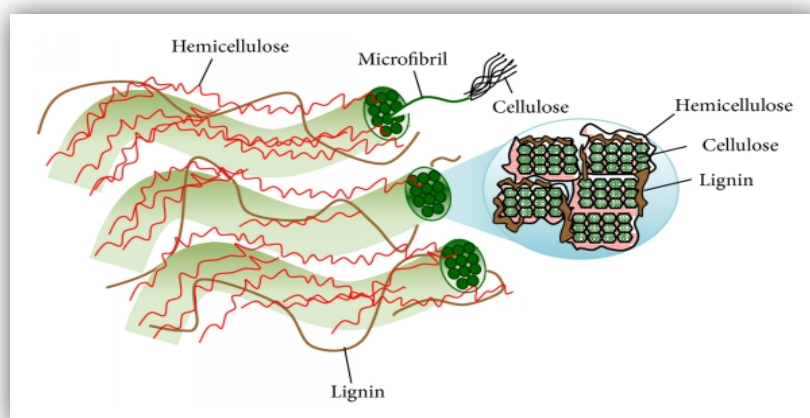
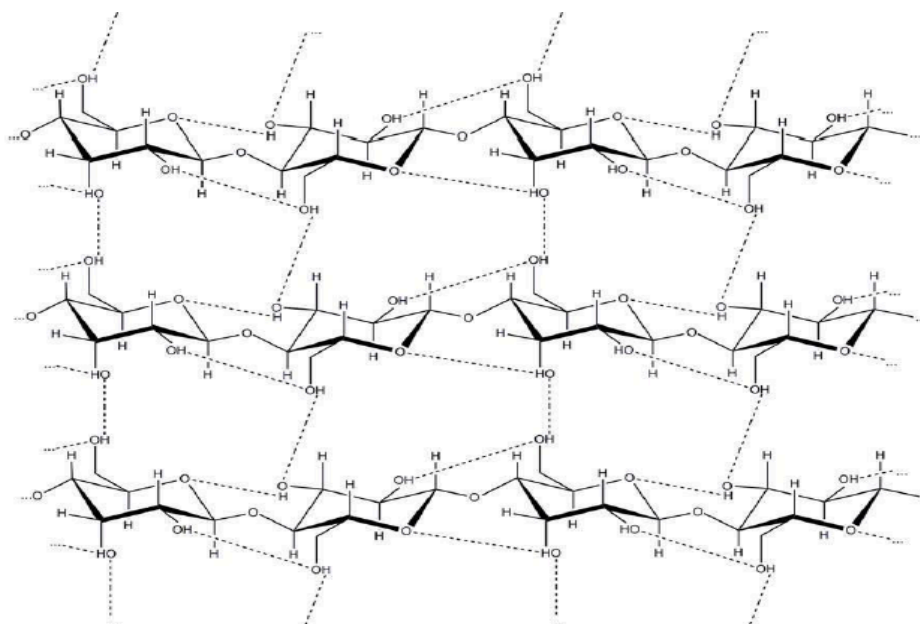


Figure 1 : Structure de la ligno-cellulose.

### 1.1.2.1- La cellulose

La cellulose est le polymère naturel le plus abondant sur terre, elle est extraite, principalement, à partir des plantes, mais peut aussi être isolée à partir d'algues, de bactéries et d'animaux (Varshney et al., 2011). Cet homopolymère linéaire formé par un enchaînement d'unités cellobiose, est composé de deux D-glucopyranose dites unités d'anhydroglucose (AGU) liés par des liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques (Figure 2). La formule chimique de la cellulose est  $(C_6H_{10}O_5)_n$  ; où  $n$ , appelé le degré de polymérisation (DP), représente le nombre de motifs glucose, allant de quelques centaines à plusieurs milliers, voire des dizaines de milliers selon sa provenance et sa situation au sein de la paroi cellulaire (Chen, 2014b). La cellulose existe sous forme amorphe qui correspond à un enchevêtrement désorganisé, à l'inverse lorsque le polymère est ordonné on dit qu'il se trouve sous la forme cristalline (Soudham, 2015).



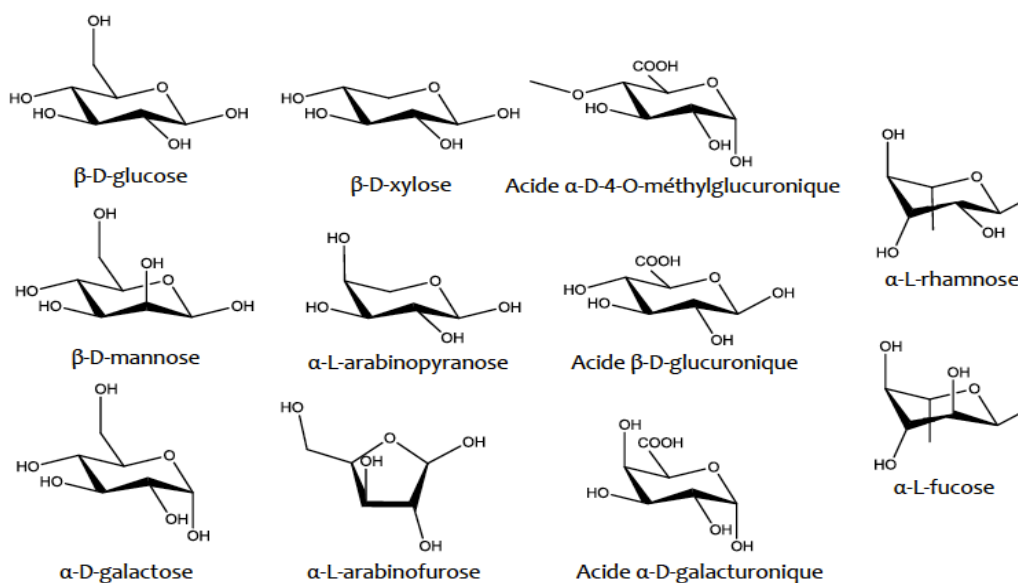
**Figure 2 :** Structure de la cellulose (Le cellobiose : un disaccharide de deux résidus de glucose liés par des liaisons  $\beta$  glycosidiques  $\beta$  (1 → 4) (Soudham, 2015).

### 1.1.2.2- L'hémicellulose

L'hémicellulose représente le deuxième glucide majeur de la ligno-cellulose. C'est un groupe diversifié de polymères de sucres hétérogènes à chaîne courte linéaires et ramifiés, généralement constitués de sucres différents : le L-arabinose, le D-galactose, le D-glucose, le D-mannose et le D-xylose (Figure 3) (Zhou et al., 2012). Le type le plus courant de polymère de sucre de la famille de l'hémicellulose est le xylane. En outre, les hémicelluloses peuvent également contenir de faibles quantités d'acides organiques tels que l'acide acétique et l'acide galacturonique et les groupes

acétyles qui peuvent être partiellement substitués aux groupes hydroxyle des sucres (**Gírio et al., 2010 ; Mussatto et Teixeira, 2010 ; Martins et al., 2011 ; Xu et al., 2013**).

Contrairement à la cellulose, les hémicelluloses manquent de cristallinité en grande partie du fait de leur structure ramifiée à chaîne courte en combinaison avec la présence de groupes acétyle attachés aux chaînes polymères (**Mussatto et Teixeira, 2010**). Leur composition varie en fonction de leur source (**Scheller HV et Ulvskov, 2010 ; Chundawat et al., 2011**). La chaîne de l'hémicellulose peut être soit un homopolymère (consistant en une unité répétée d'un seul sucre) ou un hétéropolymère (mélange de différents sucres) (**Gírio et al., 2010**).



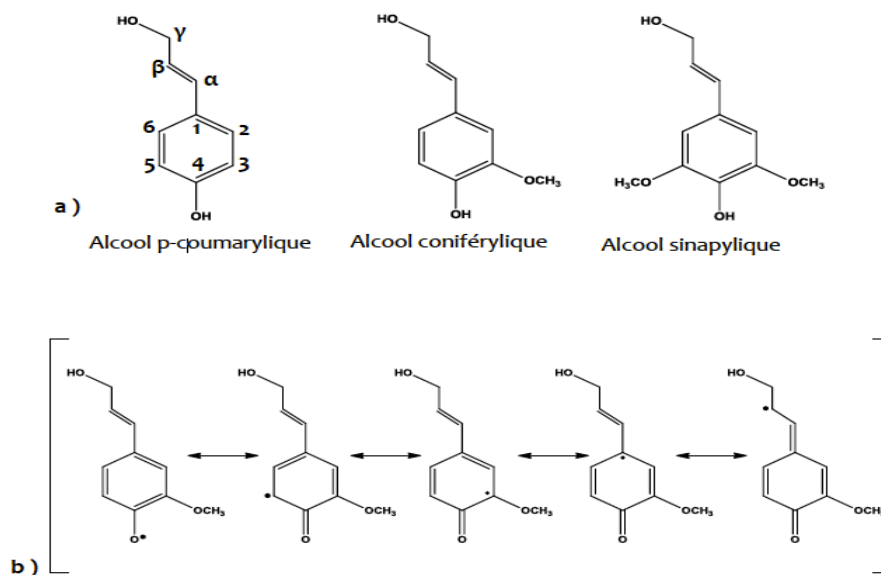
**Figure 3 :** Unités les plus représentées dans les hémicelluloses (Mussatto et Teixeira, 2010).

Au sein de la paroi végétale, les hémicelluloses assurent le renfort de la cellule en faisant le lien entre la lignine et la cellulose par le biais de liaisons de type hydrogène et Van der Waals ; d'autre part, plusieurs auteurs ont montré l'existence d'autres types de liaisons covalentes (ester et éther) (**Mussatto et Teixeira, 2010**). Ces liaisons sont formées lors de la biosynthèse de la lignine et leur existence rend difficile la séparation des différents composés de la biomasse ligno-cellulosique, ce qui est un frein pour leur valorisation industrielle.

### 1.1.2.3- La lignine

La lignine est un polymère complexe irrégulier, amorphe et hautement ramifié, qui permet à la plante de résister face aux fortes contraintes de la nature y compris les attaques microbiennes (**Helander et al., 2013**). Il représente une source dominante naturelle des polymères aromatiques. Sa composition varie en fonction de la source de ligno-cellulose ; constitué principalement de trois motifs phényle propane comme principaux éléments constitutifs : L'alcool p-coumarylique,

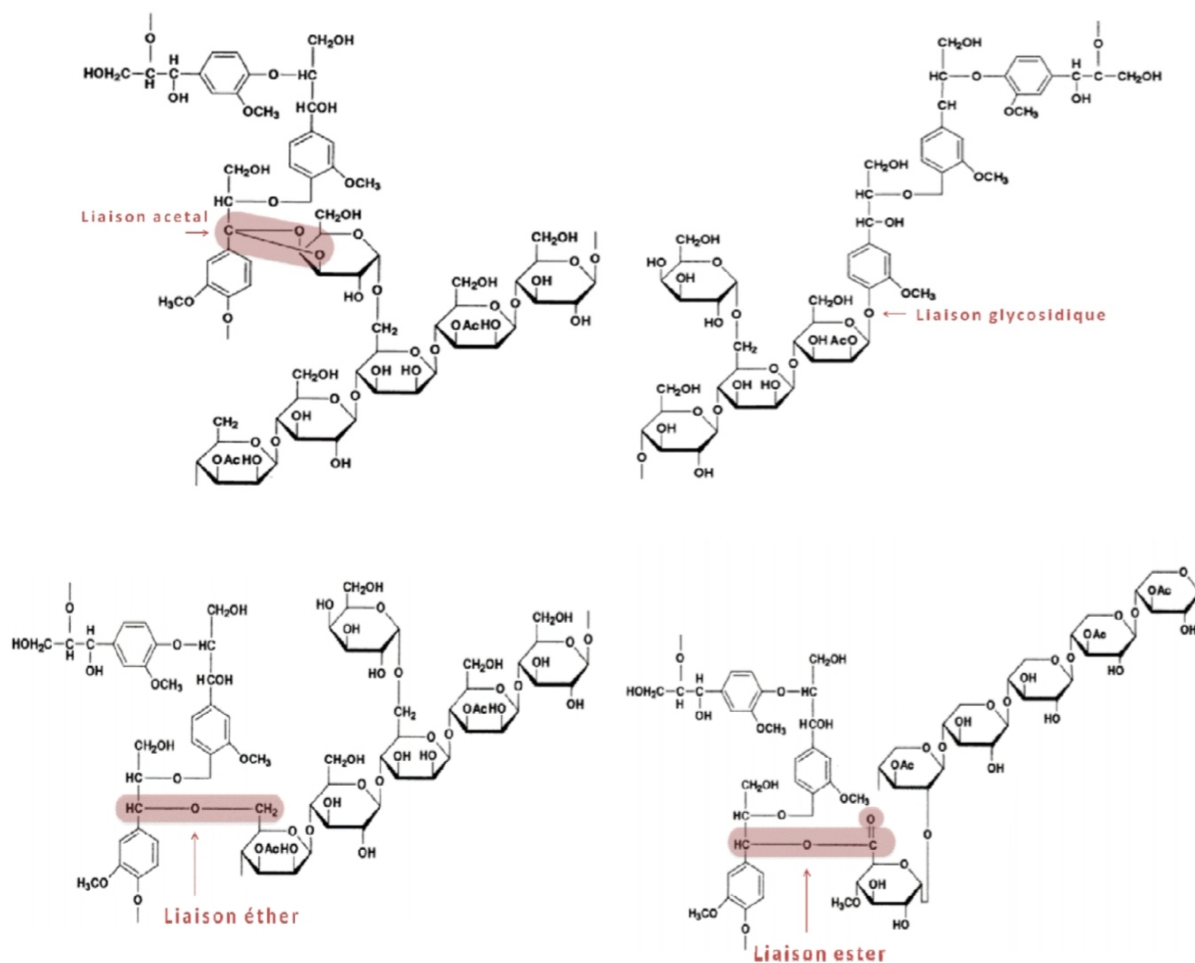
l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique, donnant lieu à une séquence aléatoire de trois sous-unités différentes (Figure 4) (Ralph *et al.*, 2004 ; Guo *et al.*, 2014). Au sein de la biomasse, la lignine joue un rôle important dans l'intégrité structurale des parois cellulaires en maintenant les polysaccharides ensemble (Várnai, 2012).



**Figure 4 :** a) Les trois précurseurs de la lignine. b) Exemple de formes radicalaires à l'origine de la lignification.

Deux familles de liaisons entre les sous unités forment la lignine : liaisons éthers, potentiellement, hydrolysables et les liaisons carbone-carbone, dites « condensées », beaucoup plus récalcitrantes à la dégradation. L'association entre la lignine et un polysaccharide est appelée complexe lignine-carbohydrates, elle se fait à travers de différents types de liaisons (Figure 5) (Takahashi et Koshijima, 1988 ; Koshijima et Watanabe, 2003). Un complexe de ce type a été mis en évidence pour la première fois par Erdman en 1866 afin d'expliquer la difficulté qui existe à séparer la lignine des polysaccharides notamment dans l'industrie papetière pour l'obtention de fibres de cellulose de haute qualité (Rakotovelo, 2016).





**Figure 5 :** Les principales liaisons entre la lignine et les différents polysaccharides (Koshijima et Watanabe, 2003).

#### 1.1.2.4- La pectine

La pectine est un mélange complexe de polysaccharides qui représente environ un tiers de la substance sèche de la paroi cellulaire. Sa structure est très difficile à déterminer car elle varie avec le temps (Novosel'skaya et al., 2000). Elle se compose, principalement, d'unités d'acide D-galacturonique (GalA) pouvant former des esters méthyliques (Figure 6), ayant des poids moléculaires moyens d'environ 50 000 à 150 000 daltons (Mukhiddinov et al., 2000).

Par des approches de bio-mimétisme, les chercheurs ont montré que la polymérisation de la lignine dans un milieu riche en pectine permet une meilleure dispersion dans le réseau de micro fibrilles de cellulose. Cette propriété a permis l'utilisation des pectines comme comptabilisant des fibres naturelles dans des matrices à base de soja ou de résine phénolique (Habrant et al., 2009).

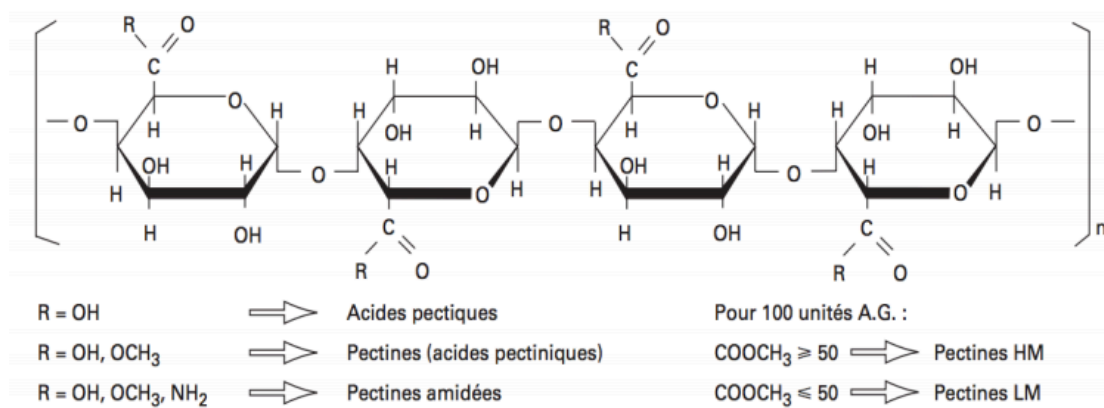


Figure 6 : Représentation de la structure de la pectine (Tilly, 2010).

### 1.1.2.5- Les extractibles

Les extractibles sont des molécules de faible poids moléculaire qui confèrent de nombreuses caractéristiques au bois comme sa couleur, son odeur, sa durabilité ou encore sa résistance à la lumière. Ce sont des alcaloïdes, des quinones, des graisses, des huiles, des saponines, des terpènes, des cires et un grand nombre de composés aromatiques et phénoliques (**Windeisen et Wegener, 2009**). Ils sont présents, surtout, dans les nœuds du bois, qui sont des zones de blessure, assurant ainsi une protection accrue contre les agressions extérieures au niveau de ces zones fragilisées (**Kebbi-Benkeder et al, 2015**).

### 1.1.3- La ligno-cellulose et sa valorisation

➤ Dans le monde, les déchets agro-industriels représentent la source ligno-cellulosique la plus exploitable. Ils proviennent des activités agricoles incluant de différents matériaux à partir de fruits, de légumes, de céréales, des bagasses générées à partir de la canne à sucre, des drèches de brasserie, etc. (**Mussatto et al., 2012**). L'industrie du café instantané à elle seule, produit 6 millions de tonnes de marc de café chaque année ; plusieurs études ont été dédiées à sa valorisation comme une source de biocarburants, pour la bio-remédiation et le compostage (**Mussatto et al., 2011**) mais il n'y a qu'une petite partie qui est valorisée pour la production d'enzymes ligno-cellulolytiques et spécialement, les cellulases (**Grigorevski-Lima et al., 2013**). Le reste est soit enfoui au niveau des Centres d'Enfouissement Technique (CET) ou alors abandonné dans la nature, ce qui constitue un risque majeur pour l'environnement et pour la santé publique (**Rebah, 2006**).

➤ En Algérie, d'après le ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, (2014), la loi n° 2001- 19 ; relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets, encourage les mesures incitatives octroyées par l'état pour le développement des activités de collecte, de tri,

de transport, de valorisation et d'élimination des déchets selon des modalités fixées par la réglementation. En effet, le grignon d'olive est parmi les déchets les plus abondants en Algérie, généré par les huileries et le processus d'exploitation d'olives.

#### 1.1.4- Secteur oléicole : Entre la production et les coproduits

Selon le Conseil Oléicole International (COI) (2015), les oliviers couvrent plus de 11 millions d'hectares dans 47 pays des cinq continents. Les principaux vergers sont recensés en Espagne, en Tunisie, en Italie, en Grèce, en Turquie, en Portugal et en Algérie.

D'après l'Observatoire National des filières Agricoles et Agroalimentaire (ONFAA) (2016), la production de l'huile d'olive a enregistré en 2016, le niveau le plus élevé des 15 dernières années à travers le territoire national soit une croissance de 25 % comparativement à la campagne écoulée. Cette activité oléicole a pour conséquences d'importants problèmes environnementaux car elle engendre des déchets solides et liquides. La mise en décharge de ce type de déchets n'est pas autorisée par la législation Algérienne (Rizoun, 2012). Néanmoins, malgré les différentes voies de valorisations existantes, ces déchets sont, soit brûlés, soit rejetés dans l'environnement, sans traitement préalable réel.

L'évaluation et la quantification des déchets solides générés par l'industrie oléicole en Algérie, ont été établies par le Réseau des Entreprises Maghrébines pour l'Environnement (REME) qui a déclaré que chaque année, la production des déchets oléicoles solides atteint plus de 30% des déchets totaux (Figure 7). C'est une situation assez alarmante qui nécessite d'être prise en charge pour des solutions rapides et efficaces.

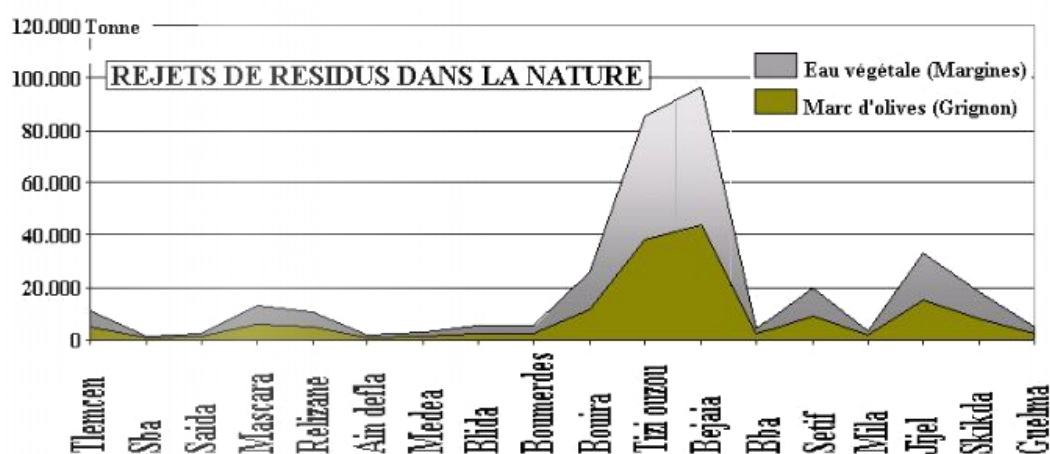


Figure 7 : Quantité de résidus produits pour une production de 40.000T d'huile (Moussouni, 2013).

#### **1.1.4.1- Impact des résidus oléicoles**

La majorité des grignons sont rejetés dans la nature, par conséquent, ils présentent une source de pollution permanente. En outre, ces déchets peuvent être contaminés par des champignons ou encore se lixivier par dégradation bactérienne, menaçant ainsi la santé humaine et déséquilibrant l'environnement (**Boudissa, 2012**).

Les margines, effluents d'extraction de l'huile d'olive, posent, à leur tour, de sérieux problèmes de pollution par leur concentration élevée en matières organiques, en polyphénols responsables de la coloration noire et en composés tanniques qui sont toxiques (**Boudoukhana, 2008**). Ils sont rejetés, le plus souvent, dans des cours d'eau, sans aucun contrôle préalable et nuisant fortement à la qualité de ces eaux de surface ce qui les empêche de s'auto-épurer (**Mébirouk, 2002**). De plus, l'accumulation du phosphore provoque l'eutrophisation et favorise la multiplication de pathogènes (**Vollenweider, 1968**). De même, l'acidité des résidus oléicoles a un impact négatif sur le sol qui provoque son imperméabilisation et l'asphyxie de sa faune par la suite (**Iboukhoulef, 2014**).

#### **1.1.4.2- Manque à gagner**

La gestion des déchets est devenue un des enjeux majeurs du génie urbain des décennies à venir. Il ne s'agirait plus désormais, de se débarrasser des déchets, mais plutôt, d'essayer d'en dégager une valeur ajoutée et utilitaire, notamment, dans les conditions actuelles de raréfaction des ressources naturelles et de matières premières. La solution optimale pour disposer des déchets serait donc, leur valorisation (**REME, 2011**).

En Algérie, les pertes annuelles du secteur oléicole, sont importantes. Elles s'estiment à : 650 tonnes de matière organique, 300 tonnes d'azote et près de 600 tonnes d'éléments minéraux et une perte considérable en eau (**Moussouni, 2013**).

#### **1.1.4.3- Valorisation des déchets d'oliveries**

La valorisation des déchets oléicoles présente un double intérêt. D'une part, elle permet de résoudre un problème environnemental, mais aussi, et surtout de subvenir au besoin économique national d'autre part.

Pour ce faire, et vu la Loi n° 2001-19 du 12 décembre 2001 relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets, la valorisation et/ou l'élimination des déchets doivent s'effectuer dans des conditions conformes aux normes de l'environnement. En effet, la valorisation de ces déchets par voie biologique présente une solution, par excellence, respectant ces conditions. Dans ce contexte, en faisant intervenir la biotechnologie, la production de bio-méthane, des biofertilisants,

des enzymes ligno-cellulolytiques et autres, sont déjà expérimentés et reste toujours un point de recherche à renforcer (Betaiche, 2015).

### 1.1.5- Les grignons d'olives : Un déchet précieux

#### 1.1.5.1- Généralités

Le grignon d'olive est un résidu solide, de couleur brune, issu de l'extraction totale de l'huile des olives par broyage et sans aucun traitement chimique. Le procédé d'extraction est réalisé par une succession d'opérations : lavage, broyage, malaxage de la pâte obtenue, puis l'extraction proprement dite (Boskou, 2006 ; Argenson *et al.*, 1999 ; Espiard, 2002). Il existe plusieurs types de grignon d'olive classés comme suit (Nefzaoui, 1987) :

- Grignon brut : c'est le résidu de la première extraction de l'huile d'olive.
- Grignon épuisé : produit après une seconde extraction avec un solvant chimique tel que l'hexane. Il est caractérisé par une faible teneur en huile et une teneur en eau réduite du fait qu'il a été déshydraté pour permettre le processus de l'extraction.
- Grignon d'olive partiellement dénoyauté : produit après dénoyautage du grignon brut.
- Grignon épuisé et partiellement dénoyauté : constitués essentiellement par la pulpe et contiennent encore une petite proportion de coques qui ne peuvent pas être séparées complètement par les procédés de tamisage ou de ventilation (Alibes *et al.*, 1984).

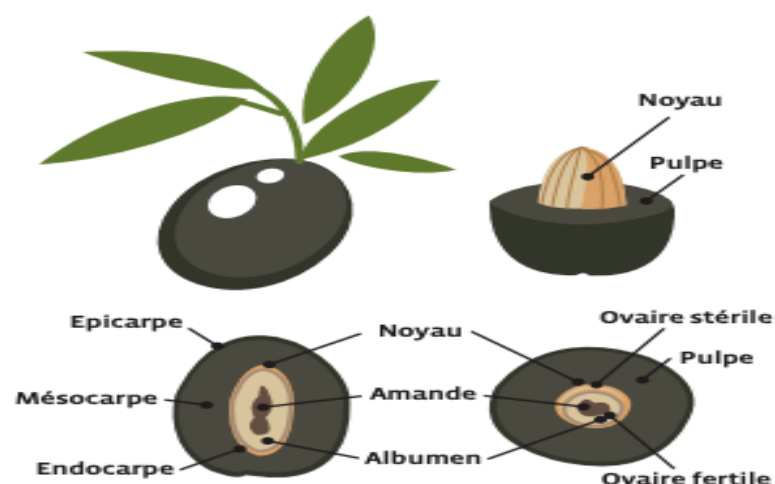


Figure 8 : Coupe transversale et longitudinale d'olives (AFIDOL, 2019).

### 1.1.5.2- Composition de grignon d'olive

#### ➤ Caractéristiques physiques

Ce résidu, qui représente environ 25 % des olives traitées, est constitué par des agrégats (Figure 8). La composition physique de grignon diffère selon les méthodes d'extraction utilisées (Nefzaoui, 1987).

**Tableau 1** : Composition physique des différents types de grignon (Nefzaoui, 1987)

| Composition<br>Produit | M.S (%) | Pourcentage (%) en matière sèche |           |             |                      |
|------------------------|---------|----------------------------------|-----------|-------------|----------------------|
|                        |         | Matière grasse                   | Noyau sec | Amandon sec | Mésocarpe + épicarpe |
| Olive                  | 51,4    | 27                               | 14,1      | 1,3         | 9                    |
| Grignon brut           | 75,9    | 9,1                              | 42,1      | 3           | 21,2                 |
| Grignon épuisé         | 72,3    | 4,2                              | -         | 5,6         | 39,3                 |
| Grignon tamisé         | 95,5    | 18,6                             | -         | 11,1        | 80,2                 |

- : test non effectué

#### ➤ Caractéristiques chimiques

La composition chimique de grignon varie selon le stade de maturité des olives, le procédé d'extraction et l'épuisement par solvants (Nefzaoui, 1984). La composition chimique des différents types des grignons d'olive est donnée par le tableau 2.

**Tableau 2** : Composition chimique indicative des différents types de grignons (D.P.V, 2009).

| Type de grignon                        | Matière sèche (%) | Matières minérales (%) | Matière Azotées Totales (%) | Cellulose brute (%) | Matières Grasses (%) |
|--|-------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------|----------------------|
| Grignon brut                           | 75-80             | 3-5                    | 5-10                        | 35-50               | 8-15                 |
| Grignon gras partiellement dénoyauté   | 80-95             | 6-7                    | 9-12                        | 20-30               | 15-30                |
| Grignon épuisé                         | 85-90             | 7-10                   | 8-10                        | 35-40               | 4-6                  |
| Grignon épuisé partiellement dénoyauté | 85-90             | 6-8                    | 9-14                        | 15-35               | 4-6                  |

➤ **Caractéristiques microbiologiques**

Dans les effluents d'huileries d'olive, seules les levures et moisissures peuvent croître en revanche, aucune présence de microorganismes pathogènes n'a été observée. Le pouvoir antimicrobien des effluents d'huileries d'olive est lié, essentiellement, à l'action exercée par les phénols monomériques et les pigments bruns ou catécholmélanique (**Hamdi et Ellouz, 1993**). Ces effluents agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes (**Ranalli, 1991**). Ils peuvent inhiber également l'activité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote en agissant sur les enzymes secrétées ou en précipitant les protéines nutritionnelles (**Hattenschwiler et Vitousek, 2000**).

**1.1.5.3- Différentes filières de valorisation de grignon d'olive**

Les données de la littérature qui décrivent toutes les possibilités de valorisation des grignons sont nombreuses, à savoir :

- L'extraction de l'huile résiduelle par solvant : la première étape de valorisation des grignons bruts, quand ils ne sont pas destinés à la fermentation « huile de grignons » (**Yacoub, 1997**), utilisée pour la consommation humaine après le raffinage ou pour la fabrication du savon (**Kadi et Fellag, 2001**).
- Son utilisation comme fertilisant (**Topal et al., 2003**) et pour la production de composés d'arômes d'intérêt dans les domaines agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique.
- Le traitement des eaux usées et de margine : La bio-sorption des métaux lourds et de phénols par les grignons d'olives est une technologie alternative aux méthodes conventionnelles qui sont très chères et peu efficaces (**Stasinakis et al., 2008**).
- L'extraction de peptides bioactifs (**Esteve et al., 2015**).
- Les grignons peuvent servir de milieu de fermentation, pour produire une biomasse probiotique (**Mennane et al., 2010**).
- Le grignon d'olive pourrait être appliqué non seulement comme un agent de sorption physique d'huile, mais aussi à des fins de bio-augmentation comme source biologique pour les bactéries hydrocarbonoclastiques (**Dashti et al., 2015**).
- La fermentation des grignons d'olives en milieu solide par des champignons thermophiles et filamenteux produit une panoplie de composés (**Kademi et al., 2003**). De plus, la fermentation anaérobie avec des lisiers de vaches produit du méthane utilisé comme une source d'énergie et en production d'électricité à usage domestique (**Hammad et al., 1999**).
- La valorisation thermique des grignons d'olives constitue l'alternative la plus pertinente pour la réduction de ces sous-produits oléicoles. La bio-combustion est une des formes

calorifiques (3500 Kcal/kg), utilisée pour alimenter en énergie le secteur oléicole et autres (Fedeli, 1997).

## 1.2- Les enzymes ligno-cellulolytiques

### 1.2.1- Généralités et classification des enzymes

Les enzymes, catalyseurs biologiques des organismes vivants, sont des macromolécules majoritairement de nature protéique (Cosnier, 2000), présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux substrats d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (Drouin, 2005). C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées. Selon la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie, les enzymes se répartissent en six classes (tableau 3) (Cosnier, 2000). Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases (Assamoi et al., 2009).

**Tableau 3** : Classification des enzymes (Cosnier, 2000).

| E.C (classe) | Classification  | Type de réaction catalysée                                  |
|--------------|-----------------|---|
| E.C.1        | Oxydoréductases | Oxydo-réduction   |
| E.C.2        | Transférases    | Transfert de groupements fonctionnels                       |
| E.C.3        | Hydrolases      | Hydrolyse   |
| E.C.4        | Lyases          | Élimination de groupements et formation de doubles liaisons |
| E.C.5        | Isoméras        | Isomérisation   |
| E.C.6        | Ligases         | Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP       |

### 1.2.2- Enzymes ligno-cellulolytiques et leur production

Les enzymes ligno-cellulolytiques, de puissantes enzymes produites par les microorganismes, peuvent être largement exploitées dans diverses industries à base de ligno-celluloses (Prakash et al., 2013). Elles sont capables d'hydrolyser les chaînes linéaires ainsi que les chaînes de ramification ; les exo-hydrolases clivent les liaisons, alors que les endo-hydrolases attaquent les liaisons de façon aléatoire ou à des positions spécifiques, ce qui provoquent une diminution initiale dans le degré moyen de polymérisation du substrat (Boucherba, 2011).



Depuis 2002, le marché global des enzymes industrielles et de spécialité conserve une forte croissance. Celle-ci a été estimée à plus de 1,5 milliards US\$ (García-Gómez et al., 2009 ; Rai et Mukherjee, 2010). Au cours des dernières années, la demande d'enzymes, industriellement importantes, telles que les cellulases, les xylanases et les pectinases, a augmenté en raison de leurs applications étendues dans diverses industries. Ces enzymes sont utilisées pour l'hydrolyse de la biomasse ligno-cellulosique dans d'autres produits à base d'enzymes (Shahzadi et al., 2014). Elles sont produites à partir de différents microorganismes par la fermentation à l'état solide ou la fermentation submergée de la biomasse ligno-cellulosique de manière rentable. Différents résidus agro-industriels sont utilisées (Tableau 4).

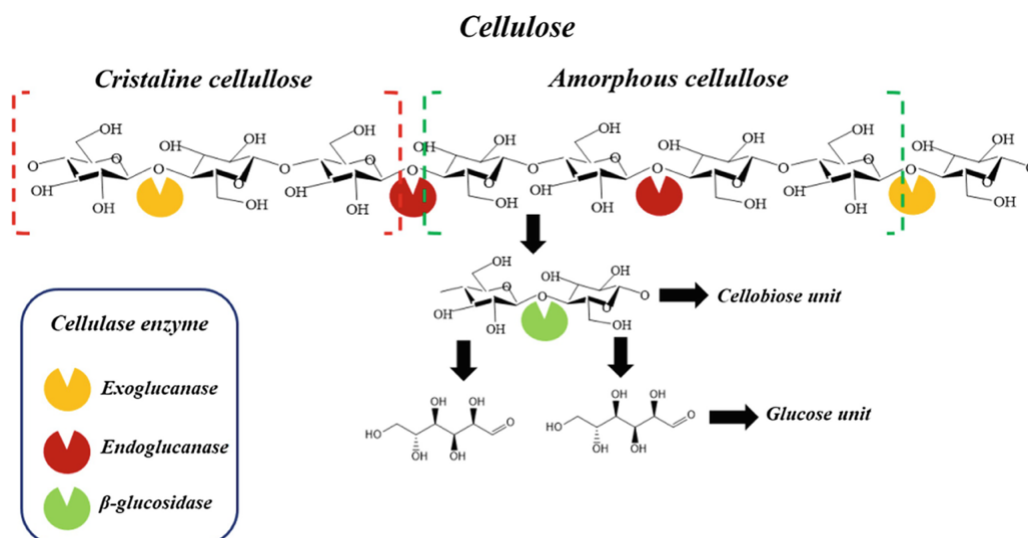
**Tableau 4** : Valorisation de la biomasse ligno-cellulosique dans la production d'enzymes ligno-cellulolytiques

| Substrat      | Microorganismes                | Enzymes produites     | Références                        |
|---------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Son de blé    | <i>Trichodermaharzianum</i>    | Cellulase et xylanase | Pathak et al.,2014                |
|               | <i>Trichodermareesei</i>       | Cellulase             | Brijwani et al.,2010              |
|               | <i>Aspergillus oryzae</i>      |                       |                                   |
|               | <i>Coprinellusdisseminatus</i> | Xylanase              | Singh et al.,2009                 |
|               | <i>Coprinuscinereus</i>        | Xylanase              | Dutt et al.,2013                  |
|               | <i>Bacillus pumilus</i>        | Endoxylanase          | Poorna et Prema, 2007             |
|               | <i>Cerrenaunicolor</i>         | Laccase               | Songulashvili et al.,2015         |
|               | <i>Aspegillusfumigatus</i>     | Amylase               | Singh et al.,2014                 |
|               | <i>Aspegillusniger</i>         | Lipase                | Falony et al.,2006                |
| Paille de blé | <i>Thermoascusaurantiacus</i>  | Endoglucanase         | Kalogeris et al.,2003             |
|               |                                | Cellobiohydrolase     |                                   |
|               |                                | $\beta$ - glucosidase |                                   |
|               |                                | Cellulase             |                                   |
|               |                                | Xylanase              |                                   |
|               |                                | $\beta$ - xylosidase  |                                   |
|               | <i>Aspergillus niger</i>       | Cellulases            | Kang et al.,2004                  |
|               |                                | Xylanases             |                                   |
|               | <i>Bacillus circulans</i>      | Xylanase              | Dhillon et Khanna, 2000           |
| Paille de riz | <i>Bacillus pumilus</i>        | Endoxylanase          | Poorna et Prema, 2007             |
|               | <i>Aspergillus fumigatus</i>   | Cellulases            | Soni et al.,2010                  |
| Son de riz    | <i>Bacillus pumilus</i>        | Endoxylanase          | Poorna et Prema, 2007             |
|               | <i>Trichodermareesei</i>       | Cellulases            | Roky-SalimietHamidi-Esfahani 2010 |
|               | <i>Aspergillus niger</i>       | Amylase               | Akpan et al.,1999                 |
| Épi de maïs   | <i>Trichodermareesei</i>       | Cellulases            | Liming et Xueliang, 2004          |
|               | <i>Trametesversicolor</i>      | Laccase               | Asgher et al.,2012                |
|               | <i>Termomyceslanuginosus</i>   | Amylase               | Kunammeniet al.,2005              |

|                                    |                                      |   |                                |
|------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------------------------|
| <b>Bagasse de la canne à sucre</b> | <i>Bacillus pumilus</i>              | Endoxylanase  | Poorna et Prema, 2007          |
|                                    | <i>Trichoderma reesei</i>            | Cellulases  | Mekala <i>et al.</i> , 2008    |
|                                    | Champignons de la pourriture blanche | Laccase   | Arora et Gill, 2001            |
| <b>Boues de papeterie</b>          | <i>Aspergillus niger</i>             | Endoglucanase   | Farinas <i>et al.</i> , 2011   |
|                                    | <i>Phanerochaete chrysosporium</i>   | Laccase<br>Manganèse peroxydase<br>Lignine peroxydase | Gassara <i>et al.</i> , 2010   |
| <b>Épluche de pois</b>             | <i>Trichoderma reesei</i>            | Cellulases  | Verma <i>et al.</i> , 2011     |
| <b>Écorce de banane</b>            | <i>Trichoderma viride</i>            | Protéase  | Sun <i>et al.</i> , 2011       |
|                                    | <i>Bacillus subtilis</i>             | Protéase  | Mukherjee <i>et al.</i> , 2008 |
| <b>Épluche de pomme de terre</b>   | <i>Bacillus subtilis</i>             | Amylase<br>Protéase<br>Polygalacturonate lyase        | Mahmood <i>et al.</i> , 1998   |
|                                    | <i>Bacillus licheniformis</i>        | Amylase   | Shukla et Kar, 2006            |
|                                    | <i>Bacillus subtilis</i>             | Amylase   | Shukla et Kar, 2006            |
|                                    | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>    | Mannanase   | Mabrouk et El Ahwany, 2008     |
| <b>Épluche d'orange</b>            | <i>Bacillus subtilis</i>             | Amylase, Protéase                                     | Mahmood <i>et al.</i> , 1998   |

### 1.2.3- Les cellulases

Les cellulases sont des enzymes extracellulaires inductibles synthétisés par les microorganismes durant leur croissance sur le matériel cellulosique (Liu *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2009), elles sont les seules enzymes qui peuvent hydrolyser les liaisons  $\beta$ -(1,4) des polysaccharides de cellulose en glucose. Elles donnent un grand rendement de saccharification (90 - 98 %) et leur utilisation peuvent rendre des effluents favorables pour l'environnement (Aftab et Vermette, 2008). Elles sont classées selon leur structure, comme toutes les enzymes agissant sur les sucres en travaillant synergiquement pour hydrolyser la cellulose (Figure 9) (Ballerini et Alazard-Toux, 2006 ; Zhou *et al.*, 2009).



**Figure 9 :** Action synergique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose par les cellulases fongiques (Osorio et al., 2020).

### 1.2.3.1- Structure

Les Cellulases sont composées d'unités structurellement et fonctionnellement distinctes, appelées domaines ou modules (**Henrissat et al., 1998**). Le plus souvent, constituées d'un domaine catalytique (CD) et d'un module de fixation au substrat (CBM), qui est généralement reliée au CD via un peptide de liaison souvent glycosylé (de 30 à 44 AA). Les enzymes qui n'ont pas de CBM conservent leur capacité d'absorber la cellulose, mais avec une affinité plus faible par rapport à l'enzyme complète (**Karlsson et al., 2002**). Les études de **Srisodsuk et al. (1993)** ont montré que la séparation spatiale suffisante des deux domaines (CD et CBM) est nécessaire pour le fonctionnement efficace de l'enzyme (**Linker et Teeri, 1996**).

#### a. Les Endoglucanases ou 1,4- $\beta$ -D-glucanglucanohydrolases (EGs)

Les endoglucanases sont connues pour hydrolyser aléatoirement les liaisons osidiques, principalement dans les zones amorphes. Ils sont les premiers responsables de la diminution du degré de polymérisation des composés cellulosiques (**Boisset et al., 2000**).

Les substrats sur lesquels agit ce type d'enzymes sont les celluloses modifiées ou amorphes, solubles telles que la Carboxymethylcellulose (CMC) qui est le substrat d'essai le plus souvent préconisé, on parle alors d'activité CMCCase. L'étude de la structure des EGs, révèle la présence de courtes lèvres formant une fente à l'intérieur de laquelle se place la chaîne de cellulose (**Davies et Henrissat, 1995**).

**b. Les exoglucanases ou 1,4- $\beta$ -D glucancellobiohydrolases (CBHs)**

Les cellobiohydrolases (CBHs) agissent de façon progressive à partir des extrémités non réductrices ou réductrices des chaînes de cellulose, libérant des molécules de cellobiose. Ces enzymes possèdent deux domaines fonctionnels, un site catalytique (CD) qui permet la réaction d'hydrolyse et un Cellulose Binding Domain (CBD) qui permet la liaison au substrat (**Teeri et al., 1998**), les deux sont reliés par une chaîne peptidique. Le CBD permet l'adsorption des enzymes à la surface de la cellulose et libérer l'accès aux chaînes de glucose de la cellulose (**Ting et al., 2009**).

**c.  $\beta$ -glucosidases ou  $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase (BGs)**

Elles catalysent, en phase liquide, l'hydrolyse de la cellobiose ou les cello-oligosaccharides (DP inférieur à 6) en glucose. Ce type n'a pas d'action sur la cellulose insoluble (**Arantes et Saddler, 2010 ; Ballerini, 2011**). La Cellobiose est montrée pour son effet inhibiteur plus fort que le glucose sur les EGs et les CBHs, par conséquent, son élimination est une étape importante du processus d'hydrolyse enzymatique (**Holtzapple et al., 1990**). De plus, il a en particulier été proposé d'utiliser les  $\beta$ -glucosidases pour l'hydrolyse de précurseurs glycosidiques non-odorants de molécules odorantes (**Williams et al., 1982**).

**1.2.3.2- Synergie des cellulases**

La synergie entre les cellulases est un phénomène essentiel lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Elle se produit lorsque l'action combinée de deux ou plusieurs enzymes conduit à une activité supérieure à la somme des activités des enzymes séparées. Deux types de synergies ont été mis en évidence dans la littérature : (**Medve et al., 1998 ; Nidetzky et al., 1994**). La synergie entre les cellobiohydrolases et les endoglucanases est appelée synergie Exo-Endo, alors que la synergie entre deux cellobiohydrolases est appelée synergie Exo-Exo. Plusieurs paramètres semblent influencer la synergie à savoir (**Azzouz, 2015**) :

- La concentration totale en enzymes.
- L'influence du ratio de chaque enzyme.
- Les propriétés morphologiques du substrat.

**1.2.3.3- Applications industrielles**

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale (**Chesson, 1987**). Elles occupent une place de choix dans le marché des enzymes, en raison de leurs applications industrielles multiples.

**Tableau 5 : Applications industrielles de la cellulase.**

|  |   |
|--|---|
| <b>Industries alimentaires</b>                   | Faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993). Traitement de différents produits pour améliorer leurs qualités ; où les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes.          |
| <b>Industries des textiles et des détergents</b> | Durant la finition, pour l'apparence des tissus par élimination des taches (Gusakov et al., 2007). Aussi dans les lessives afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (Maurer, 1997) ; (Cavako-Paulon, 1998).                  |
| <b>Industries de papeteries</b>                  | Fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases aux suspensions de pates en cours de lavage améliore leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1993).                                 |
| <b>Nutrition animale</b>                         | Utilisées comme additifs dans l'alimentation animal pour améliorer la digestibilité, ce qui réduit l'excrétion de cellulose non digérée (et donc diminue la charge polluante des excréta) (Scriban 1993 ; Gusakov et al., 2007).              |
| <b>Industries Thérapeutiques</b>                 | L'utilisation quasi confidentielle de certaines cellulases dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive (Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1993).  |
| <b>Production de biocarburants</b>               | Aujourd'hui il existe deux grandes filières de production de biocarburants :<br>-Production d'éthanol qui comprend l'éthanol et L'ETBE pour les véhicules essence.<br>-Production des huiles végétales avec l'EMHV pour les véhicules diesel. |

#### 1.2.4- Les xylanases (Hémicellulases)

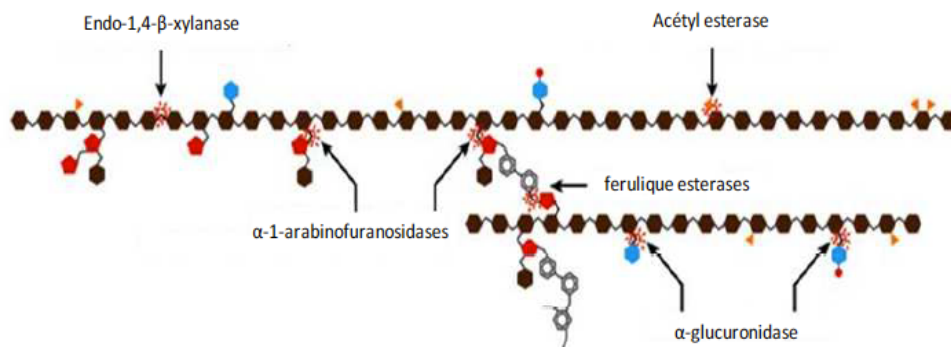
Les hémicellulases sont typiquement des protéines modulaires avec un module catalytique et d'autres modules fonctionnels. La dépolymérisation de l'hémicellulose fait intervenir un nombre plus important d'enzymes à cause de son hétérogénéité de structure. Le xylane étant le polysaccharide le plus présent, de nombreuses études ont porté sur la caractérisation des xylanases (Malherbe et Cloete, 2002 ; Sánchez, 2009).

##### 1.2.4.1- Mécanisme d'hydrolyse

Le mécanisme d'action de ces enzymes est le même que pour les cellulases avec une action à l'intérieur des chaînes et à partir de l'extrémité des oligosaccharides libérés. La synergie d'un groupe de xylanases est nécessaire pour la dégradation complète d'hémicellulose. La  $\beta$ -1,4-exoxylyanase agit sur les extrémités non réductrices, ainsi que l'endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase clive de l'intérieur du squelette et peut décomposer aléatoirement le xylane jusqu'à la formation du xylose par la  $\beta$ -xylosidase (Heng et al., 2008).

La température optimale des endoxylyanases varie entre 40° et 60 °C, elles sont plus thermostables chez les bactéries que les moisissures (Kulkarni et al., 1999).

Les xylanases de différents microorganismes sont souvent stables sur une gamme de pH 3-10 et montrent un optimum de pH dans la gamme 4-7. Elles constituent une unité protéique de poids moléculaire variable entre 8 et 145 KDa. Leur composition en acides aminés est dominée par les acides aspartique, glutamique, glycine, sérine et thréonine (Bakri, 2003).



**Figure 10** : Schéma des différentes activités enzymatiques nécessaires à la dégradation de l'hémicellulose (adapté de Sánchez, 2009 ; Malherbe et Cloete, 2002).

#### 1.2.4.2- Intérêt industriel

Les xylanases constituent la proportion commerciale majoritaire des hémicellulases. Elles peuvent être utilisées seules dans une large gamme de procédés industriels, y compris l'industrie des pâtes et papiers, les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, ce qui réduit l'utilisation des produits chimiques dangereux (Thomas *et al.*, 2013). De plus, elles ont des applications dans l'ensilage agricole en combinaison avec la cellulase et la pectinase, les xylanases ont été utilisées pour la clarification des jus de fruits (Kumar *et al.*, 2016). D'autres applications existent dans l'extraction et la préparation des cafés, dans les détergents et dans la production de polysaccharides actifs pharmacologiques. La tendance actuelle est d'utiliser des mélanges bruts d'hémicellulases de différentes espèces et de tirer profit des synergismes observés entre les multiples xylanases (Collins *et al.*, 2005).

#### 1.2.5- Ligninases

Des enzymes oxydatives extracellulaires sont impliquées dans la dépolymérisation de la lignine. On distingue notamment des peroxydases et des oxydases (Cullen et Kersten, 2004). Des études de microscopie électronique des premiers stades de la dégradation fongique du bois ont montré que les enzymes lignino-lytiques oxydantes sont trop grandes pour pénétrer dans les micropores des parois cellulaires (Wang *et al.*, 2002). Elles sont responsables, à travers l'action à la surface,

de la génération d'espèces radicalaires moins complexes et hautement réactives qui vont être les principaux artisans de la dégradation de la lignine (Wan et Li, 2010 ; Wan et Li, 2012).

#### 1.2.5.1- Les phénols oxydases (laccases)

Les laccases sont des enzymes très répandues chez les organismes bactériens, les végétaux et les champignons (Munk et al., 2015). Ce sont des oxydases à cuivre qui catalysent l'oxydation de composés phénoliques présents dans la lignine (méthoxyphénols, hydroquinones) ainsi que des dérivés acides et aldéhydiques de celle-ci (Debbies et al., 1996 ; Saparrat et al., 2002 ; Baldrian, 2006). A la différence des peroxydases, les laccases utilisent le dioxygène comme accepteur d'électron final et produisent des molécules d'eau (Thurston, 1994), en générant des radicaux aromatiques. Différentes réactions non enzymatiques vont intervenir pour briser les liaisons éthers, carbone-carbone et le noyau aromatique permettant au champignon de se procurer la source de carbone nécessaire à sa croissance (Martinez et al., 2005).

#### 1.2.5.2- Les enzymes type Lignine peroxydase (LiP)

Les LiPs sont des glycoprotéines de poids moléculaire compris entre 38 et 46 kDa. Elles jouent un rôle central dans la biodégradation de la lignine (Mayer et Staples, 2002). Ces enzymes sont H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dépendantes qui catalysent les dépolymérisations oxydatives des composés phénoliques et non phénoliques comme le gaïacol et le catéchol. Ils forment des radicaux intermédiaires qui subissent des réactions non enzymatiques telles que le clivage de la chaîne latérale et la méthylation. Ces enzymes ne nécessitent pas la participation de médiateurs grâce à leurs potentiels redox particulièrement élevés (Moredo et al., 2003 ; Wong, 2009).

#### 1.2.5.3- Les enzymes type manganèse peroxydase (MnP)

Ce sont des glycoprotéines extracellulaires découvertes il y a 30 ans chez l'espèce fongique *Phanerochaete chrysosporium* (Kuwahara et al., 1984 ; Glenn et Gold, 1985 ; Hofrichter, 2002). Elles sont constituées d'hème de protoporphyrine de fer qui catalyse l'oxydation de Mn (II) en Mn (III) qui peut ensuite oxyder les cycles phénoliques jusqu'à la minéralisation complète (Piontek et al., 2001). L'oxydation de substrats non phénoliques par Mn (III), nécessite la présence de co-oxydants (Hofrichter, 2002). En absence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les radicaux libérés peuvent être utilisés par MnP en tant que sources de peroxydes et accroître leur efficacité lignino-lytique (Asgher et al., 2008).

#### 1.2.5.4- Les enzymes type Peroxydase Versatile (VP)

Les enzymes type peroxydase versatiles (VPs) sont des glycoprotéines ayant des propriétés hybrides grâce à leur aptitude d'oxydation double pour oxyder Mn (II) ainsi que des composés aromatiques phénoliques et non phénoliques comme les colorants et l'hydroquinone (**Gomez-Toribio et al., 2001 ; Ruiz-Duenas et al., 2009**). Cela rend les VPs plus efficaces que les LiPs et MnPs, qui ne sont pas capables d'oxyder des composés phénoliques de manière efficace sans la présence d'alcool vératrylique ou de Mn (II), respectivement (**Wertz, 2010**).

#### 1.2.5.5- Applications industrielles

Les enzymes lignino-lytiques extracellulaires ont un potentiel énorme pour des applications industrielles dans divers domaines comme l'utilisation de la LiP et la MnP dans le blanchiment dans l'industrie des pâtes et papiers (**Maijala et al., 2007 ; Widsten et Kandelbauer, 2008**) et dans le domaine textile pour la dégradation des colorants et le blanchiment des déchets générés par les industries (**Shin, 2004 ; Kunamneni et al., 2008 ; Gomes et al., 2009**).

Dans l'alimentaire, la laccase améliore l'apparence de la couleur et élimine les composés phénoliques indésirables. Les MnPs et les LiPs ont un rôle potentiel dans la production d'arômes aromatiques (**Barbosa et al., 2008**) et la biodégradation de divers hydrocarbures aromatiques polycycliques (**Anastasi et al., 2009 ; Wen et al., 2009 ; Robles-Hernandez et al., 2008**). Leur rôle a également été vu dans la fabrication d'ustensiles médicaux et pharmaceutiques ainsi que dans la production des produits d'hygiène personnelle (**Maciel et al., 2010 ; Ghindilis, 2000 ; Kunamneni et al., 2008 ; Mikolasch et Schauer, 2009 ; Barbosa et al., 2008 ; Lee et al., 2006 ; Ponzoni et al., 2007**).

L'intérêt le plus important a été signalé dans la conversion des déchets de ligno-cellulose en produits à valeur ajoutée tels que les biocarburants, les produits chimiques fins et plusieurs enzymes (**Malherbe et Cloete, 2002**).

#### 1.2.6- Microorganismes producteurs des enzymes cellulolytiques

Plusieurs microorganismes sont connus pour leur production de cellulases et xylanases, représentés dans le tableau 6. Différentes bactéries ont été considérées comme des producteurs de cellulases robustes et versatiles (**Singhania, 2009**). Cependant, l'étude des cellulases chez les de Bacillus n'est pas très approfondie par rapport à celle des enzymes fongiques, car la plupart des cellulases de Bacillus hydrolysent la carboxyméthylcellulose synthétique, mais hydrolyse à peine la forme cristalline de la cellulose (**Ariffin et al., 2006 ; Makky, 2009 ; Balasubramanian et Simões, 2014**). Des microorganismes remarquables produisant des taux élevés de xylanases



alcalines exemptes de toute activité cellulolytique comme par exemple les *Bacillus*, *Paenibacillus macquariensis*, *Cellulomonas fimi* (Bajaj et al., 2012).

**Tableau 6** : Principaux microorganismes utilisés dans la production de cellulase (Singhania, 2009).

| Principaux groupes  | Genre                | Espèce  |  |
|---------------------|----------------------|---|--|
| Champignons         | <i>Aspergillus</i>   | <i>A.niger</i><br><i>A.nidulans</i><br><i>A.oryzae</i><br><i>A.aculeatus</i>  |  |
|                     | <i>Fusarium</i>      | <i>F.solani</i><br><i>F.fusosporium</i>   |  |
|                     | <i>Humicola</i>      | <i>H.insolens</i><br><i>H.griese</i>  |  |
|                     | <i>Melanocarpus</i>  | <i>M.albomyces</i>  |  |
|                     | <i>Nerospora</i>     | <i>N.crassa</i>   |  |
|                     | <i>Phanerochaete</i> | <i>P.chrysosporium</i>  |  |
|                     | <i>Penicillium</i>   | <i>P. brasilianum</i><br><i>P. occitanis</i><br><i>P. decumbans</i><br><i>P.purpurogenum</i><br><i>P.janthinellum</i> |  |
|                     | <i>Talaromyces</i>   | <i>T.emersonii</i>  |  |
|                     | <i>Trichoderma</i>   | <i>T.reesei</i><br><i>T.harzianum</i><br><i>T.longibrachiatum</i>   |  |
|                     | Bactéries            | <i>Acidothermus</i>   | <i>A.cellulolyticus</i>                    |
| <i>Bacillus</i>     |                      | <i>Bacillus sp.</i><br><i>B.subtilis</i><br><i>B.megaterium</i>   |  |
| <i>Clostridium</i>  |                      | <i>C.thermocellum</i><br><i>C.acitobutylicum</i><br><i>C.cellulorans</i>  |  |
| <i>Pseudomonas</i>  |                      | <i>P.cellulose</i>  |  |
| <i>Rhodothermus</i> |                      | <i>R.marinus</i>  |  |
| <i>Cellulomonas</i> |                      | <i>C.fimi</i><br><i>C.uda</i>   |  |
| Actinomycètes       |                      | <i>Streptomyces</i>   | <i>S.drodzowiczii</i><br><i>S.lividans</i> |
|                     |                      | <i>Thermomonosmonas</i>   | <i>T.fusca</i><br><i>T.curvata</i>         |

Les champignons filamenteux appartenant au groupe des Ascomycètes et Basidiomycètes sont utilisés pour produire un grand nombre d'enzymes ligno-cellulolytiques (**Braaksma et al., 2010**). Certaines de ces souches industrielles produisent plus de 100 g/l de cellulases et hémicellulases (**Balan et al., 2013**). Elles sont regroupées en espèces de pourriture blanche, de pourriture brune et de pourriture molle. Celles de la pourriture brune exercent peu d'effets sur la lignine, tandis que les espèces de la pourriture molle (Ascomycètes) possèdent des capacités intermédiaires (**Moore et al., 2011**).

### 1.3- Champignons du genre *Chaetomium*

#### 1.3.1- Généralités

Le genre *Chaetomium* est un champignon appartenant au phylum Ascomycota, de la classe Euascomycetes, d'ordre Sordariales et de la famille Chaetomiacees (**Zareb, 2014**). Selon la littérature, il comporte entre 80 et 100 espèces dont *Chaetomium globosum* est la plus connue et la plus étudiée (**Pieckova, 2003**). Il est mentionné comme faisant partie des agents possibles de mycoses nosocomiales parmi les microbes pathogènes fongiques en émergence, posant un risque pour les patients immunodéprimés (**Walsh et Groll, 1999 ; Tomsikova, 2002**).

#### 1.3.2- Écologie et exigences de croissance

Les *Chaetomium* sont des espèces fongiques communes et cosmopolites qui sont répandues dans le sol et sur les matières végétales en décomposition (**Samson et al., 1984 ; Abbott et al., 1995**). Toutefois, les concentrations de leurs spores dans l'air extérieur ne sont pas très élevées (**Al-Nahdi et al., 1989 ; Khan et Wilson, 2003**). Ces mycètes vivent sur la cellulose et peuvent être trouvés sur le bois, les panneaux de gypse, le compost, la paille et les matériaux semblables. Ils sont aussi connus comme agent de la pourriture du bois d'œuvre (**Samson et al., 1984**). Les *Chaetomium* sont également trouvés sur une variété de déchets et substrats contenant de la cellulose, incluant les archives documentaires, le papier peint, les textiles et les matériaux de construction (**CRC DG, 2007**).

Les espèces du genre *Chaetomium* exigent une grande quantité d'eau pour croître (Une activité de l'eau de plus 0,90) (**Andersen et Nissen, 2000**). Il se développe bien entre 16 et 25 °C, mais la plupart des espèces croissent de façon optimale entre 25 et 35 °C. Les espèces pouvant causer une infection envahissante chez l'homme se développent également bien de 35 à 37 °C (**Barron et al., 2003**).

La température létale du *C. globosum* se situe entre 55 à 57 °C. Cependant, les ascospores sont bien plus résistantes : elles peuvent survivre à une température de 60 °C pendant 60 minutes

(Pieckova, 2003). Cette espèce se développe de façon optimale à un pH se situant entre 7,1 et 10,4, mais peut également se développer à un pH se trouvant entre 3,5 et 11 (CRCDG, 2007).

### 1.3.3- Caractères morphologiques

#### ➤ Morphologie macroscopique des colonies

La surface de la colonie des espèces du genre *Chaetomium* est de texture laineuse, habituellement blanche, devenant olive ou grisâtre en surface avec l'âge. Le revers varie de jaune pâle à olivâtre et il présente souvent des teintes de rouge ou varie parfois de brun à noir (Larone, 1987). Sur le milieu à l'extrait de malt, les colonies ont un aspect granulaire, vert foncé avec un revers noir. De plus, elles dégagent une forte odeur. Le *Chaetomium* se développe et sporule sur des milieux de culture standards de mycologie. Sa croissance est rapide (St-Germain et Summerbell, 1996) et peut avoir besoin de huit à vingt jours pour la production de fructifications et la sporulation : à maturité, le thalle fongique se compose d'une couche dense de fructifications (Samson et al., 1984).

#### ➤ Morphologie microscopique

Le thalle est constitué d'hyphes septés, hyalins à brun pâle. Parmi les hyphes septés, il est facile de voir, sur la plupart des milieux, de grandes structures (100-150 x 110-225 µm) en forme de bouteille, brunes à noires, rondes ou ovoïdes, entourées de soies brunes droites ou ondulées. Ces structures sont des organes de fructification appelés périthèces. Ces périthèces contiennent de multiples structures en forme de sac, chacune renfermant des spores (ascospores) (figure 11). Les asques sont pédonculés, en massue et contiennent quatre ou huit spores, elles peuvent être produites dans une variété de tailles, de formes et de couleurs. Les ascospores sont très résistantes aux conditions de sécheresse et à l'irradiation UV (Samson et al., 1984 ; Larone, 1987 ; Hoog et Guarro, 1995).

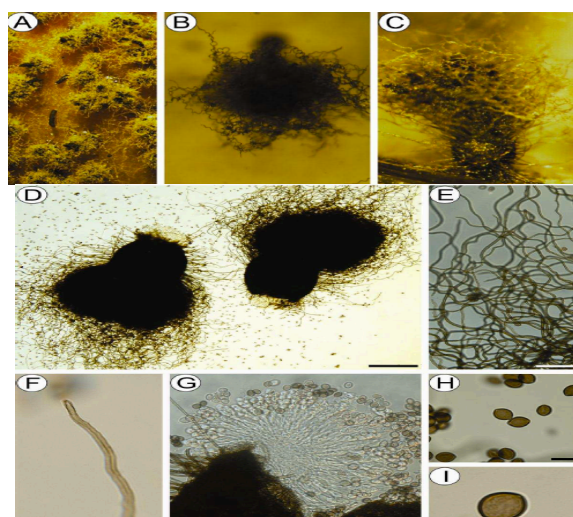


Figure 11 : Caractérisation microscopique de *Chaetomium globosum* (Gerais, 2013).

### 1.3.4- Applications

Les *Chaetomium* ont été signalés comme présentant une activité antagoniste contre certains pathogènes (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006). *Chaetomium globosum*, produit des mycotoxines comme les chaetoglobosines A et C lorsqu'il est cultivé sur des matériaux de construction (Fogle et al., 2007). D'autres métabolites secondaires ont été extraits comme la chaetominine, qui est un alcaloïde cytotoxique, des immunodépresseurs et des composés cytotoxiques (Jiao et al., 2006 ; Fujimoto et al., 2004 ; Andersen et Nissen, 2000).

Le *Chaetomium* décompose la cellulose très rapidement en produisant des cellulases thermostables (Sajith et al., 2016). Des recherches récentes ont été focalisées sur l'étude de nouvelles espèces, ses profils enzymatiques et génotypiques avec un criblage d'autres enzymes produites telles que la L-méthioninase utilisée dans la thérapie clinique, la laccase, polysaccharidemonooxygénase (PMO),  $\beta$ -1,3glucanase, dextranase et autres (Abdel-Azeem et al., 2016 ; Benhassine et al., 2016 ; Chen et al., 2018 ; Coronado-Ruiz et al., 2018 ; Hamed et al., 2016 ; Wanmolee et al., 2016).

## 1.4- Fermentation en milieu solide (FMS)

Pour la valorisation des substrats agricoles et des sous-produits de l'industrie agroalimentaire, les fermentations en milieu solide apparaissent comme une nouvelle voie biotechnologique peu exploitée mais prometteuse pour la production d'enzymes, de produits alimentaires, industriels ou pharmaceutiques (Betache, 2013).

### 1.4.1- Généralités et définitions

La fermentation en milieu solide est un des plus anciens procédés biotechnologiques connus au monde qui reproduit les conditions de vie naturelles des microorganismes, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique. Elle diffère de la fermentation en milieu liquide dans l'équilibre des phases solides, liquides et gazeuses sont présentes (Holker, 2005 ; Duchiron et copinet, 2011).

Le développement des champignons filamenteux se fait grâce à leurs enzymes hydrolytiques qui diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables (Pandey, 2003 ; Rahardjo et al., 2006). Ces espèces sont les mieux adaptées au FMS, en s'adaptant aux conditions xérophiles caractérisée par une faible activité de l'eau en outre de leur résistance à des pressions osmotiques élevées (Assamoi et al., 2009 ; Duchiron et copinet, 2011). De plus, leur capacité à pénétrer dans les espaces inter-particulaires des substrats solides (Viniestra-Gonzalez et Favela-Torres, 2006)

Les facteurs pouvant influencer la FMS sont : la nature du support et de ses propriétés (taille des particules, capacité de rétention d'eau), les micro-organismes (type, taille de l'inoculum et période de culture) et les paramètres physiques (température, oxygène, taux de dégagement de dioxyde de carbone) (Salihu et al., 2012).

#### 1.4.2- Applications de la FMS

Cette technique est utilisée depuis des milliers d'années dans les pays d'orient pour la préparation d'aliments traditionnels et dans les pays occidentaux pour la production du pain, du yogourt et du fromage (Mahadik et al., 2002 ; Bellon-Maurel et al., 2003).

Actuellement, les applications de la fermentation solide concernent : le compostage, l'ensilage, la bio-filtration de gaz malodorants, la production d'aliments riches en protéines pour l'alimentation animale, la production d'enzymes (amylases, cellulases, xylanases, laccases, etc.) et de métabolites (éthanol, acides organique, acide citrique, etc.) (Assamoi et al., 2009). La première production industrielle d'enzymes a été réalisée par fermentation de son de blé avec une souche de *Aspergillus oryzae* (Murooka et Yamshita, 2008).

#### 1.4.3- Avantages et inconvénients

- **Avantages**

Sur le plan technologique, la FMS ne nécessitent pas de conditions aseptiques strictes, les volumes des appareillages sont beaucoup plus réduits et posent moins de problèmes d'effluents et de récupération des produits. De plus, les enzymes excrétées par les champignons restent concentrés et ne sont pas immédiatement diluées comme dans le cas des cultures liquides. Ces vitesses de diffusion réduites rendent plus efficaces les enzymes (Raimbault, 1981).

De plus, sur le plan économique, plusieurs études ont démontré que ce type de culture peut conduire à des rendements plus élevés ; avec un besoin moindre en eau et une consommation énergétique beaucoup plus basse, la FMS a, selon la molécule d'intérêt ciblée, une **productivité volumique 10 à 100 fois plus importante que la fermentation en milieu liquide** (Lustrat, 2017). Les dernières années, ce bioprocédé a attiré de plus en plus d'attention, en raison de la possibilité de valoriser les déchets agro-industriels bon marché comme substrats pour produire plusieurs substances à haute valeur ajoutée par voie microbienne (Castilho et al., 2000).

- **Inconvénients**

Les problèmes essentiels des fermentations sur substrats solides résident principalement dans le *Scale up*. Ils sont liés, principalement, à la nature du substrat et le maintien des conditions

optimales de culture (**Raimbault, 1981**). La FMS comporte d'autres contraintes telles que le choix restreint de microorganismes, le développement des souches dans des conditions d'humidité réduite, l'estimation délicate de la biomasse à cause de la difficulté de séparation des microorganismes du substrat et l'accumulation des produits inhibiteurs lors de la fermentation (**Bataïche, 2014**).

# *Matériel et méthodes*

## 2- Matériel et méthodes

Cette étude a pour but la valorisation des grignons d'olive, par voie microbiologique, pour produire des enzymes à haute valeur ajoutée.

Ce travail a été réalisé au sein de Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri Constantine, et au niveau du laboratoire régional du Contrôle de Qualité et d'Emballage (CACQE).

### 2.1- Microorganismes

#### 2.1.1- Étude morphologique du microorganisme producteur d'enzyme

La souche utilisée dans ce travail est un *Chaetomium sp.* fourni par le laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) de l'Université des Frères Mentouri, Constantine. Sa réactivation est effectuée par ensemencement répété sur milieu Sabouraud (Annexe1) suivi d'une incubation à 32°C.

##### ➤ Étude macroscopique

Dans le but de déterminer l'aspect, le développement et la couleur de la colonie, des observations, à l'œil nu, ont été effectuées pendant 7 jours d'incubation.

##### ➤ Étude microscopique

L'étude morphologique du mycélium a pour objectif de vérifier l'absence ou la présence de cloisons, la couleur, la fructification et enfin la forme des spores. L'observation des éléments précédents est réalisée au microscope photonique au grossissement X40 suivant deux techniques de préparation de l'échantillon :

- **Méthode de ruban adhésif**

Un morceau de scotch est appliqué sur la colonie de sept jours à l'aide d'une pince puis déposé sur une lame porte-objet et observé au microscope (Lachapelle, 2004).

- **Coloration par le lactophénol-bleu coton**

Un fragment de la colonie de sept jours est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de lactophénol-bleu coton, suivi d'un chauffage, ensuite la préparation est recouverte d'une lamelle couvre-objet en éliminant les bulles d'air puis observé au microscope (Lachapelle, 2004).



## 2.1.2- Mise en évidence des activités enzymatiques lignocellulolytiques

### ➤ Mise en évidence de l'activité cellulasique

Des cylindres de gélose, contenant le mycélium fongique réactivé, ont été découpés stérilement et déposés à la surface du milieu carboxyméthylcellulose agar (CMC) (Annexe1). Après incubation pendant 5 jours à 32°C, la révélation des cellulases est effectuée par inondation des boîtes de Pétri au moyen d'une solution de rouge Congo (0.1%) (Annexe2) qui se fixe, préférentiellement, sur les polymères de cellulose. La réaction de fixation dure 30min., suivie d'un lavage avec une solution de NaCl(1M) (Annexe2) pendant 5min. L'activité cellulasique est mise en évidence par l'apparition des zones claires autour des colonies productrices de l'enzyme qui dégrade la cellulose (Oikawa *et al.*, 1998 ; Korish, 2003).

### ➤ Mise en évidence de l'activité xylanasique

Afin de confirmer que la souche utilisée peut produire de la xylanase, un disque contenant le mycélium fongique a été découpé stérilement et repiqué sur milieu XMB (Annexe1), additionné de 4% de xylane. Après incubation pendant 5 jours à 32°C, la révélation s'effectue par inondation des boîtes avec une solution au rouge Congo pendant 30min suivi d'un lavage des boîtes avec une solution de NaCl(1M) pendant 5min, l'apparition d'un halo clair autour de la colonie fongique indique une dégradation du xylane par des xylanases secrétées par la souche fongique (Nomori *et al.*, 1990).

### ➤ Mise en évidence de l'activité laccasique

L'activité laccasique a été mise en évidence sur milieu LMBG (Annexe1) contenant 0.1% (p/v) du gaïacol. Ce dernier, est un monométhoxybenzène constitué de phénol avec un substituant méthoxy en position ortho, utilisé comme substrat pour détecter l'activité laccasique.

Pour ce faire, un disque de la clonie précédente a été découpé etensemencé sur le milieu, après une incubation à 32°C pendant 5 jours, une couleur brune rougeâtre intense se développe autour des colonies fongiques où l'oxydation du gaïacol a eu lieu grâce à la présence de laccase (Figure12) (Kumar et Mishra, 2011).

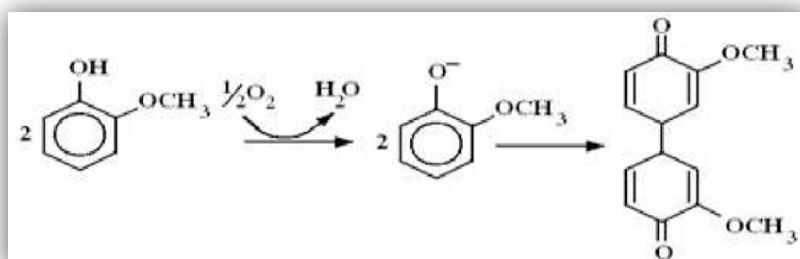


Figure 12 : Mécanisme de l'oxydation du gaïacol par la laccase (Sanchez-Amat et Solano, 1997).

## 2.2- Préparation du substrat

Le substrat végétal qui a fait l'objet de notre étude est le grignon d'olive récupéré d'une huilerie traditionnelle de la région de Milia, wilaya de Jijel, durant le mois de Février 2020. Cette huilerie applique l'extraction à système discontinu. Le séchage a été fait pendant un mois à l'air libre. Le grignon a été broyé puis tamisé avant son utilisation.

### 2.2.1- Caractérisation physicochimique du grignon d'olive

Après un mois de stockage, quelques analyses physicochimiques ont été effectuées sur l'échantillon du grignon d'olive afin de vérifier les caractéristiques nutritionnelles du substrat :

#### 2.2.1.1- Détermination de la matière sèche (MS) (NF V 03-921)

La teneur en matière sèche a été déterminée sur une aliquote de 5g d'échantillon, broyé et étalé, dans une capsule en porcelaine à une température de  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  jusqu'à poids constant.

La teneur en matière sèche est donnée par la formule suivante :

$$MS\% = \frac{P_1}{P_2} 100$$

Avec :  $P_1$  : poids de l'échantillon avant dessiccation.

$P_2$  : poids de l'échantillon après dessiccation.

#### 2.2.1.2- Détermination de la matière minérale (MM) (AOAC, 1975)

La teneur en matière minérale d'une substance alimentaire est le résidu de la substance après destruction de la matière organique par incinération.

Une prise d'essai de 5g de l'échantillon a été mise dans un creuset à incinération préalablement taré. Le creuset a été introduit dans le four ventilé réglé à  $550^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$  jusqu'à carbonisation de la matière, le chauffage a été effectué progressivement afin d'obtenir une carbonisation sans inflammation de la masse. La préparation a été maintenue à cette température jusqu'à l'obtention de cendres blanches, gris clair ou rougeâtres, dépourvues de particules charbonneuse (au moins trois heures). Ensuite, le creuset a été placé dans un dessiccateur et pesé immédiatement après refroidissement. La teneur en matière minérale est calculée comme suit :

$$MM (\%) = \frac{P_{\text{cendres}}}{P_{\text{Prise d'essai}}} 100$$

### 2.2.1.3- Détermination de la teneur en matière grasse (NF 03-903 AFNOR, 1966)

La détermination du taux de la matière grasse dans le grignon d'olive a été réalisée par la méthode de Soxhlet. Une quantité de grignon d'olive (10g) a été introduite dans des cartouches d'extraction placées dans l'extracteur (Figure 14). 250 ml de solvant (n-Hexane) ont été utilisés pour une extraction de 5 à 6 h, le reste du solvant dans l'huile rassemblée au fond d'un ballon déjà pesé vide a été éliminé en premier lieu par évaporation sur un bain de sable, ensuite dans une étuve réglée à  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant une heure. Après dessiccation, le ballon a été pesé. Le pourcentage de la matière grasse (l'huile d'olives) (Figure16) est calculé par la formule suivante :

$$MG\% = \frac{p2 - p1}{p0}$$

Avec :  $P_0$  : poids de grignon utilisé.

$P_1$  : poids du ballon vide.

$P_2$  : poids du ballon avec la matière grasse.



**Figure 13** : Extraction d'huile des grignons d'olive (Dispositif Soxhlet).

### 2.2.1.4- Détermination de la teneur en matière organique (MO) et du carbone organique total (COT)

La détermination de la MO a été obtenue par différence entre la masse sèche et la masse après calcination (matière minérale) (Pauwels et al., 1990). Par la suite, le carbone total a été mesuré, il représente la quantité de carbone lié dans un composant organique (dissoute ou en suspension). Il est souvent utilisé comme indicateur non spécifique de la qualité de l'eau. Le COT est calculé par convention comme suit :

$$\text{COT (\%)} = \text{MO (\%)} / 1.8$$

### 2.3- Croissance de la souche fongique sur milieu gélosé à base de grignon d'olive

Afin de s'assurer que la souche fongique utilisée peut croître en présence de grignon d'olive comme seule source de carbone, elle a été cultivée en boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé à base de grignon, composé de 20g/L d'Agar et 20g/L de grignon broyé et tamisé. L'agar est préparé séparément par la mise de la quantité de gélose dans 500mL, avec chauffage jusqu'à la dissolution totale de l'agar. La préparation est complétée par 20 g de grignon de l'olive préparé précédemment et le volume final est amené à 1L par l'ajout de l'eau distillée. Après malaxation le pH est mesuré et estimé à 6.5. Après stérilisation pendant 15minutes à 120°C, un disque mycélien a été prélevé d'une culture réactivée de 5 jours et déposé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu préparé. La culture a été incubée à 30°C jusqu'à observation d'un développement mycélien.

### 2.4- Production d'enzymes par Fermentation sur milieu solide « FMS »

Les Cellulases et xylanases sont produites par fermentation en milieu solide par une souche appartenant au genre *Chaetomium*. Sans inducteur, le grignon d'olive est utilisé comme seule source de carbone et l'eau distillée stérile comme agent de mouillage. Le protocole utilisé est celui de Sandhu et al. (2015) avec légères modifications.

#### 2.4.1- Préparation de l'inoculum

L'inoculation du milieu de fermentation a été faite par une suspension sporale à raison de  $10^7$  spores par mL de milieu (Leghlmi, 2013). La souche a été cultivée dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Sabouraud, incubées à 30°C pendant 7 jours. Après sporulation, chaque boîte a été lavée avec 5 ml d'eau distillée. Les spores ont été recueillies dans des bouteilles stérilisées, seulement 3 ml sont utilisés comme inoculum pour la production d'enzymes.

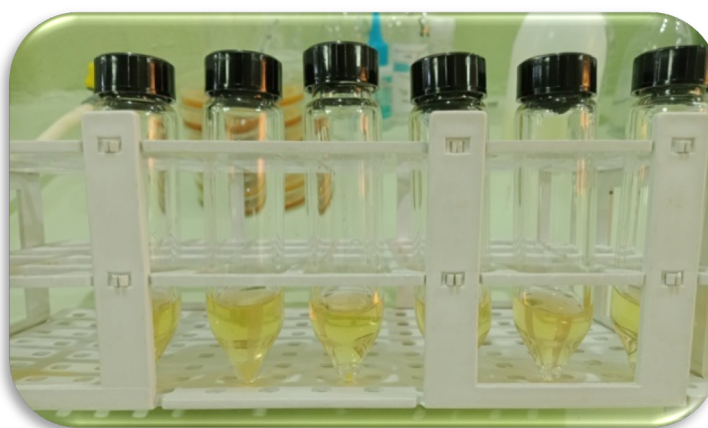


Figure 14 : Suspensions sporales (inoculum).

### 2.4.2- Conduite de la fermentation

Toutes les cultures ont été effectuées dans des Erlenmeyer de 500 mL contenant chacun 22.5g de substrat et 75ml de l'eau distillée stérile (300g/L) pour avoir un taux d'humidité de 71.83%. Le pH du milieu est de 6.5. Les Erlenmeyers ont été stérilisés à 120°C pendant 15 minutes, refroidis, puis inoculés avec la suspension de spores fongiques. Ils ont été incubés à 30°C dans une étuve durant six jours.



**Figure 15 :** Fermentation solide en Erlenmeyers.

Pour établir les cinétiques de fermentation il est indispensable de préparer autant d'Erlenmeyers que de points souhaités (**Saucedo-Castaneda, 1991**). Des prélèvements ont été effectués après homogénéisation d'échantillons pendant les six jours de la FMS. Ils ont été traités comme suit :

- 5g du produit fermenté prélevé ont été utilisés pour mesurer le poids sec (5g) et le pH. Parallèlement 40 g ont été mis en suspension dans 200 mL d'eau distillée afin de récupérer le maximum d'enzymes, l'homogénéisation a été réalisée dans un mixeur (MOULINEX) pendant 2min par intermittence pour éviter l'augmentation de la température. L'action mécanique du mixeur est très importante pour récupérer le maximum d'enzymes qui adhèrent fortement à la fraction cellulosique du substrat solide.
- Le mélange a été centrifugé à 4000 rpm pendant 20 min à froid (4°C) pour éviter la dénaturation des enzymes (Figure 16). Le surnageant clair récupéré représente l'extrait enzymatique brut (Figure 17).
- Pour traiter tous les échantillons dans les mêmes conditions, les extraits enzymatiques ont été conservés à 4°C au fur et à mesure des prélèvements (**Bansal et al., 2012**). La mesure des activités enzymatiques a été répétée deux fois.



**Figure 16 :** Centrifugation du substrat fermenté.



**Figure 17 :** Extraits enzymatiques.

### 2.4.3- Suivi de la culture

#### 2.4.3.1- Évolution de l'humidité

L'humidité H (%) est un paramètre qui renseigne sur le développement du champignon au cours de la culture. En effet, au cours de sa croissance, le champignon produit six molécules d'eau pour une molécule de glucose consommée (**Clémence, 2012**). Elle est déterminée par la méthode de la mesure du poids sec. D'une part, La matière sèche permet d'avoir des indications concernant la consommation du substrat. D'autre part, l'humidité est un paramètre permettant l'amélioration de la croissance du champignon et de la production des molécules recherchées. Pour ce faire, 2,5g de substrat fermenté de chaque prélèvement a été utilisé (**Audigie et al., 1984**). Les formules sont données comme suit :

$$H(\%) = [(P_0 - P_1) / P_0] \times 100$$

Avec :

**P<sub>0</sub>** : Poids frais.

**P<sub>1</sub>** : Poids sec.

#### 2.4.3.2- Évolution du pH

Le pH est très difficile à homogénéiser et à contrôler en FMS. En effet, au cours de la culture, le pH du milieu est modifié due à l'activité métabolique des souches soit en l'acidifiant, par la production d'acides ou par l'absorption d'ions ammonium, soit en l'alcalinisant, par la libération d'ammoniac provenant de la dégradation de protéines, d'urée ou d'autres amines (**Manpreet et al., 2005**). Cette variation a un effet direct sur l'activité des enzymes produites.

Le suivi de ce paramètre de culture a été effectué par une mesure directe sur la suspension obtenue avec l'échantillon de fermentation semi solide à l'aide d'un pH mètre, après étalonnage de l'appareil au moyen des solutions tampon de pH 4 et 7 à 25 C°.

## 2.4.4- Dosage des activités enzymatiques

### 2.4.4.1- Activité cellulase (CMCase, endoglucanase)

L'activité endoglucanase a été mesurée selon la méthode décrite par Ghose, (1987), dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés, après de l'hydrolyse d'un substrat cellulosique (Figure 18). La quantité de ces sucres est mesurée selon la méthode de Miller (**Miller, 1959**) par une réaction colorimétrique due à la présence du réactif : acide dinitrosalicylique (DNS) (Annexe2), en utilisant le glucose comme étalon (Annexe3).

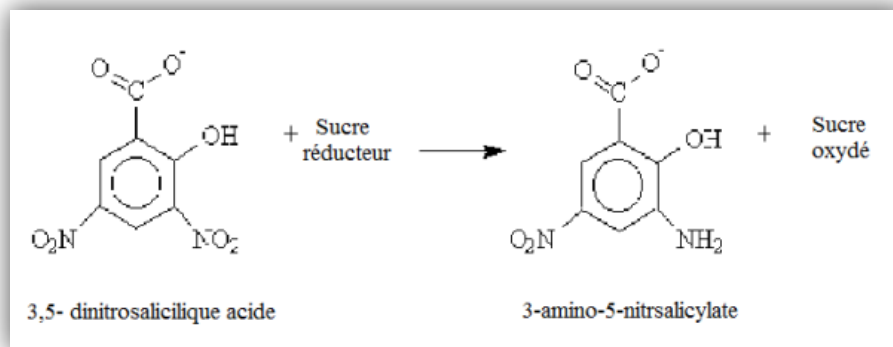
- **Méthode DNS (Miller, 1959)**

Après avoir récupéré les filtrats de culture, une dilution décimale a été réalisée (1ml filtrat de culture + 9ml eau distillée), dans chaque tube 1ml du mélange réactionnel (500 µl de surnageant contenant l'enzyme et 500 µl de substrat à 1% (p/v) (1g de CMC dissout dans 100ml de tampon citrate phosphate 0.1M, pH 4.8 (Annexe2)) a été incubé à 40°C pendant 5min. Toutes les réactions ont été arrêtées par l'addition de 3ml de DNS et les tubes ont été incubés à 100°C pendant 5min. Les échantillons ont été refroidis immédiatement dans un bain de glace puis leur volume a été complétés jusqu'à 10 ml avec de l'eau distillée, après homogénéisation, l'absorbance de chaque tube a été lue à 540 nm et les concentrations du substrat ont été calculées à partir de l'équation de courbe d'étalonnage.

L'exposition des échantillons à la lumière vive devrait être évitée à toutes les étapes et tous les tests ont été effectués en double.

- Pour effectuer l'étalonnage, des volumes de 1ml, 0.5ml, 0.25ml, 0.13ml, 0.06ml et 0.03ml d'une solution de glucose à 2.0g/l ont été mis dans une série des tubes à essais. Le volume de chaque tube est ajusté à 1ml avec de l'eau distillée puis 3ml de réactif DNS ont été ajouté, les tubes ont été bouchés, homogénéisés puis portés au bain-marie bouillant.
- Après 5 minutes, les tubes ont été refroidis dans un bain de glace et le volume de chaque tube a été complété à 10ml avec de l'eau distillée.
- Après refroidissement, l'absorbance de la coloration développée est lue à 540nm.

Une unité de l'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent glucose (lorsque le glucose est utilisé comme étalon sucre réducteur) par minute et par millilitre à 40°C et pH 4.8. S'il y a une forte couleur rouge brique donc il y a une grande production des sucres libérés (glucose).



**Figure 18** : Réaction du DNS avec un sucre réducteur.

#### 2.4.4.2- Activité xylanase

L'activité xylanase a été déterminée dans des conditions similaires à celles décrites dans l'activité de cellulase, le mélange réactionnel contient 500 $\mu$ l de surnagent contenant l'enzyme et 500 $\mu$ l de substrat à 1% (p/v) (1g de xylane dissous à froid dans 100ml de tampon citrate phosphate 50mM (pH 6.5) (Annexe2)). Une solution mère de xylose à 2.0 g/l est utilisée comme substrat à la place du glucose pour effectuer l'étalonnage (Annexe3).

Une unité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme ayant libérée 1 $\mu$ mol/ ml d'équivalents de xylose par minute à 40°C et pH 6.5.



## *Résultats et discussion*

### 3- Résultats et discussion

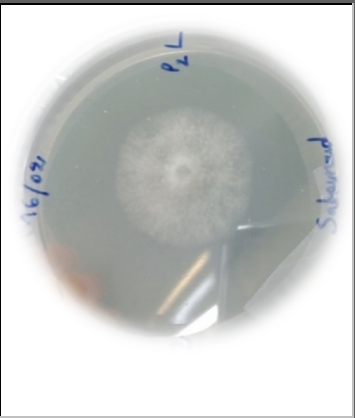
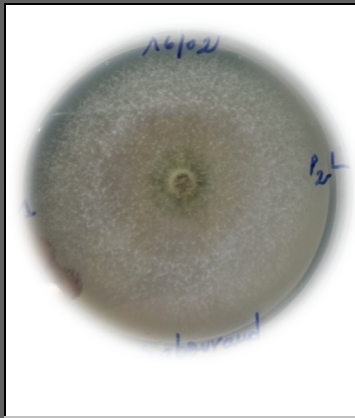
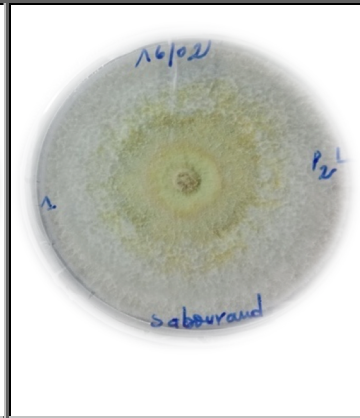
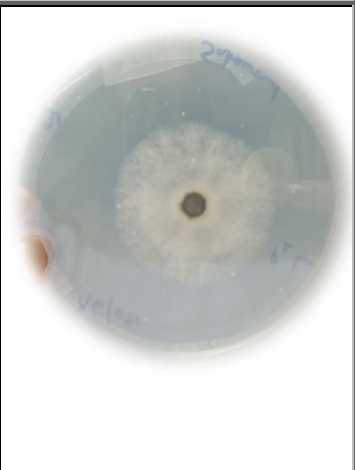
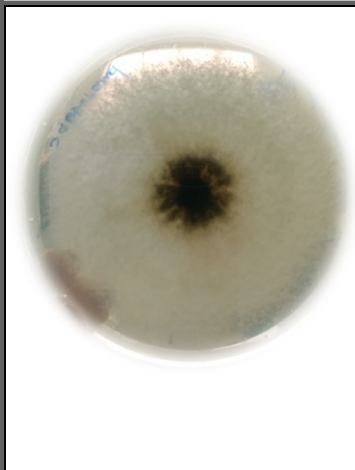
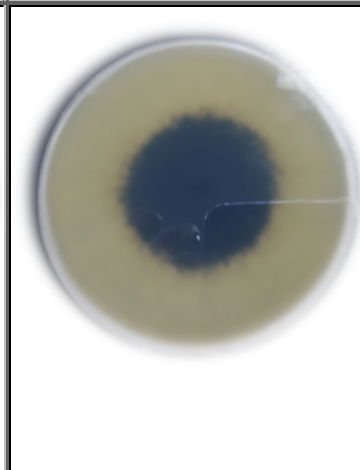
Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus de l'étude de la production des enzymes cellulases et xylanases par *Chaetomium sp.* sur milieu solide à base de grignon d'olive. L'activité des enzymes produites est mesurée pendant la fermentation pour suivre leur cinétique ; précédée par une caractérisation de la souche testée et préparation du substrat.

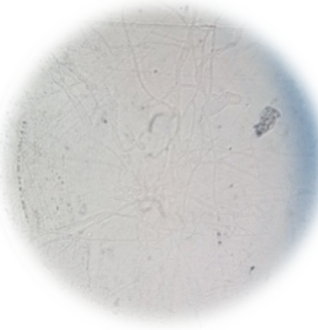
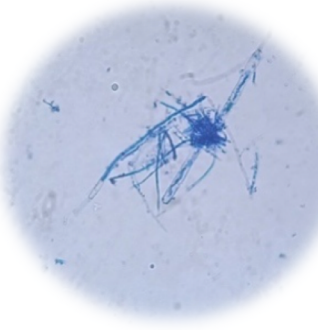
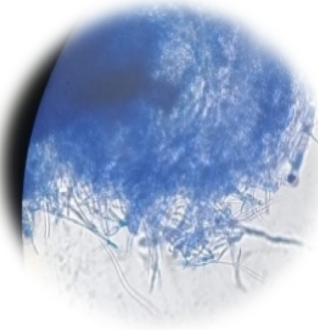
#### 3.1- Microorganismes

##### 3.1.1- Réactivation et étude morphologique du *Chaetomium sp.* producteur d'enzymes

Le suivi de croissance de la souche à l'œil nu et au microscope optique (Gx40) est effectué en suivant son développement sur milieu Sabouraud pendant 6 jours, les observations obtenues sont résumées dans le tableau 7.

**Tableau7** : Observations macroscopiques d'une culture de *Chaetomium sp.* sur milieu Sabouraud.

| Durée d'incubation (Jours) | 2 jours   | 3 jours  | 6 jours   |
|----------------------------|---|--|---|
| <b>Vue d'ensemble</b>      |  |  |  |
| <b>Revers de la boîte</b>  |  |  |  |

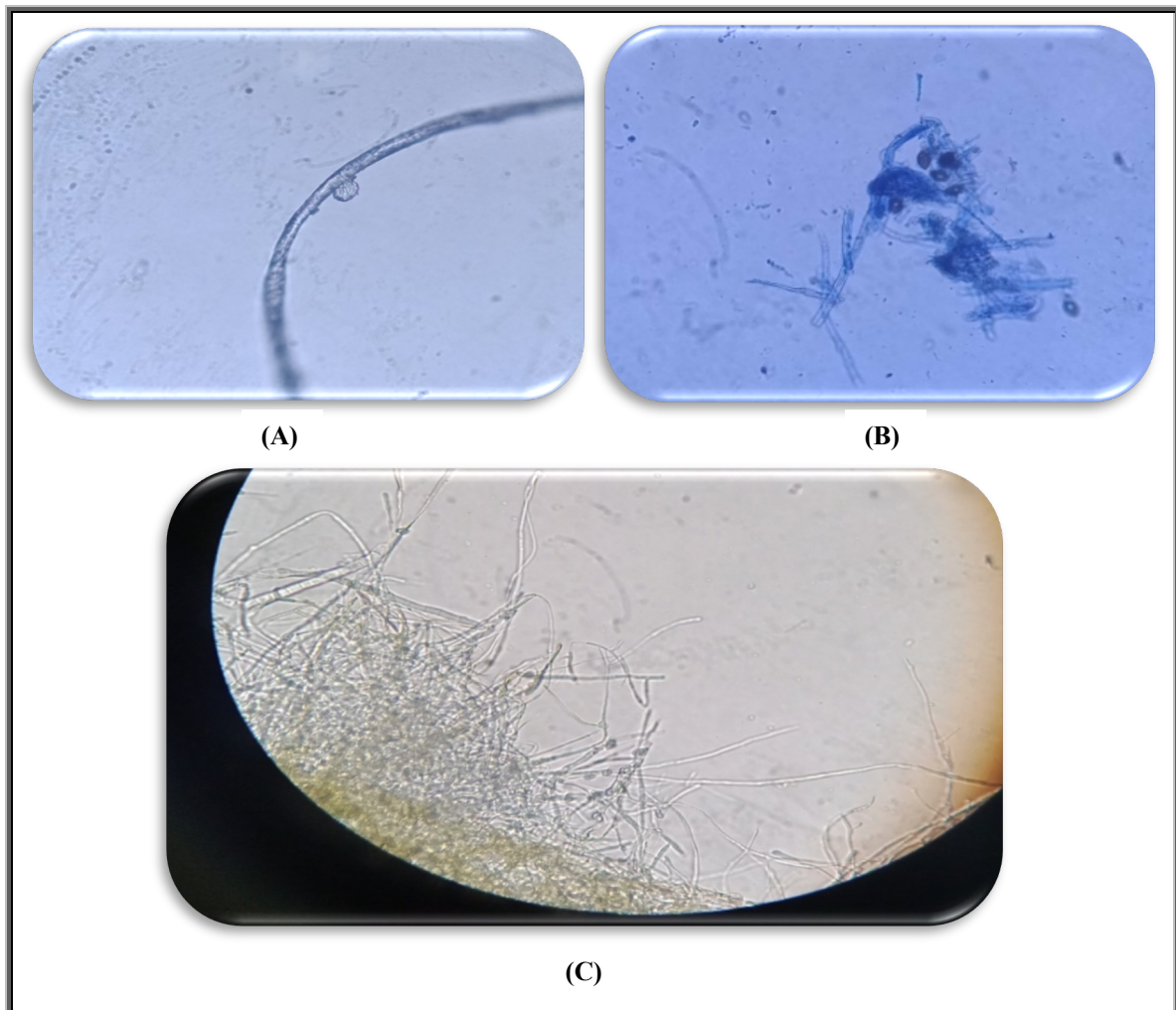
| Diamètre de la colonie (mm)      | 42  | 66   | Envahissement de toute la boîte   |
|----------------------------------|---|--|---|
| Observation microscopique (GX40) |  |  |  |

- **Caractères macroscopiques**

Ce champignon a une croissance très rapide et extensive sur milieu Sabouraud (diamètre de 42 mm après 48 heures d'incubation). La surface de la colonie est de texture laineuse, blanche, devenant olive en surface au bout du troisième jour. Le revers varie de jaune pâle à olivâtre, il présente une teinte de brun à noir avec la sporulation au sixième jour (**Larone, 1987**).

- **Caractères microscopiques**

Les observations microscopiques au grossissement (x40) sont effectuées en utilisant la méthode de ruban adhésif et celle du lactophénol-bleu de coton. Le thalle est constitué d'hyphes septés, mais difficiles à séparer à cause de la structure condensée de ce genre de champignons. Concernant la sporogénèse, les ascospores apparaissent unicellulaires et elliptiques sous forme de citron (figure 19), identiques à celles décrites dans la littérature (**Dupuy et al., 2012**).

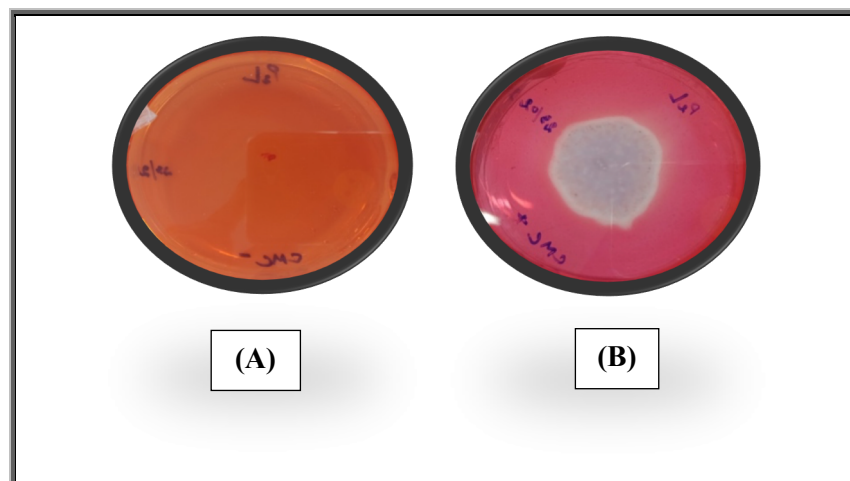


**Figure 19 :** Observations microscopiques des spores de *Chaetomium sp.*

### 3.1.2- Mise en évidence des activités enzymatiques lignocellulolytiques chez *Chaetomium sp*

- **Mise en évidence de l'activité cellulasique**

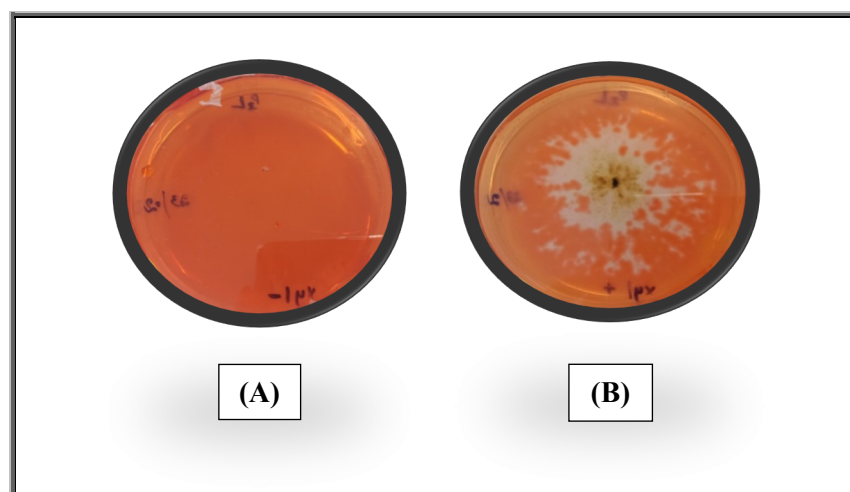
La coloration du milieu CMC,ensemencé par la souche de *Chaetomium sp.*, a laissé apparaître une zone claire modérée de 18 mm autour de la colonie (Figure 20). La carboxyméthylcellulose (CMC) est un substrat de l'endoglucanase et  $\beta$ -galactosidase. Cet essai est un bon indicateur de la capacité cellulasique des microorganismes. En effet, la présence du colorant Rouge Congo permet de différencier entre la couleur rouge intacte de la CMC signifiant l'absence de l'enzyme et la zone claire du substrat susceptible d'être dégradé par la cellulase de la souche testée (**Pointing et al., 1999**). Plusieurs travaux ont montré la présence des cellulases chez ce genre de champignons (**Kapoor et al., 2010 ; Al-Kharousi et al., 2015**). Cette enzyme permet à la souche de dégrader la matière cellulosique en sucres simples (glucose) assimilables et nécessaires pour sa croissance.



**Figure 20** : Révélation de l'activité cellulosique sur milieu CMC  
(A : Témoin ; B : Milieu inoculé par la souche testée).

- **Mise en évidence de l'activité xylanase**

La coloration avec le Lugol du milieu XMB ensemencé par la souche étudiée a permis la distinction d'une zone jaune autour de la colonie contre une couleur rouge intacte du Rouge Congo pour le reste du milieu. Cette couleur jaunâtre représente une zone de dégradation de xylane d'un diamètre de 12 mm, entourée d'une zone plus claire due à la sécrétion de la cellulase (Figure 21). En effet, les microorganismes qui produisent des cellulases sont, généralement, capables d'hydrolyser le xylane en xylose et autres sucres simples ; il existe peu d'exemples connus de microorganismes dégradant uniquement la cellulose ou les xylanes (Gilbert et Harlewood, 1993). De ce fait, la production de xylanase permet à la souche d'agir sur l'hémicellulose de la matière ligno-cellulosique et d'assurer une dépolymérisation de cette dernière.

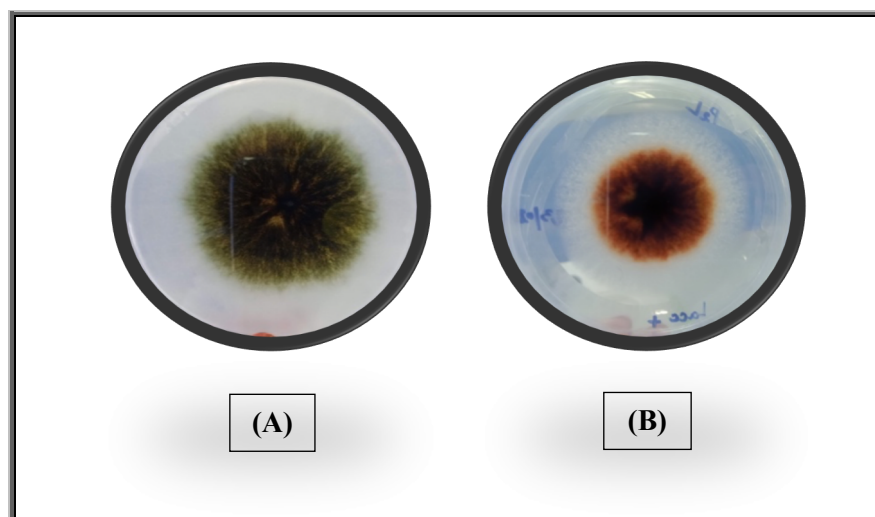


**Figure 21** : Révélation de l'activité xylanase sur milieu XMB  
(A : Témoin ; B : Milieu inoculé par la souche étudiée).

- **Mise en évidence de l'activité laccasique**

L'activité laccasique de la souche fongique a été mise en évidence sur le milieu LMBG contenant 0.02% du gaïacol. Ce dernier, est un monométhoxybenzène constitué du phénol avec un substituant méthoxy, utilisé comme substrat pour détecter l'activité laccasique (**Sandhu et Arora, 1985**). Après cinq jours d'incubation, une couleur rouge brunâtre, à l'emplacement de la colonie de la souche, a été observée (Figure 22). Cette couleur indique l'oxydation du gaïacol par la laccase (**Mabrouk et al., 2010 ; Ang et al., 2010**).

En fait, plusieurs espèces thermophiles appartenant à ce genre ont été utilisées pour la production de laccase halotolérante et pour l'étude de son rôle dans l'humification et la décoloration des colorants synthétiques (**Chefetz et al., 1998 ; Mtibaa et al., 2017**). De plus, une espèce isolée du forêt de Chettaba à Constantine a pu produire une laccase sans inducteur sur trois milieux de culture différents (**Benhassine et al., 2015**).



**Figure 22** : Révélation de l'activité laccasique sur milieu XMB  
(A : Témoin ; B : Milieu inoculé par la souche étudiée).

### 3.2- Préparation du substrat de fermentation (grignon d'olive)

Après un mois de séchage à l'air libre, le grignon d'olive a été broyé et tamisé afin de séparer les débris de coque de la pulpe pour obtenir une poudre, à l'aide d'un tamis de mailles de 1mm de diamètre (Figure 23).





Figure 23 : Grignon d'olive séché et tamisé.

- **Caractérisation physicochimique du grignon d'olive**

La disponibilité des nutriments dans un aliment est essentiellement déterminée par sa composition chimique, par rapport aux éléments disponibles et non disponibles et à des facteurs qui peuvent limiter la disponibilité des composants avec lesquels ils sont associés (Shabtay *et al.*, 2009). La composition de grignon d'olive utilisé est la suivante (tableau 8) :

Tableau 8 : Composition chimique de grignons d'olive bruts après 2 mois d'extraction.

| Teneur en Matière Sèche (%) | Teneur en matière minérale/Cendres (%) | Teneur en matière organique (%) | Carbone organique Total (%) | Teneur en matière grasse (%) |
|-----------------------------|--|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 89.76                       | 4.43                                   | 85.33                           | 47.41                       | 19.02                        |

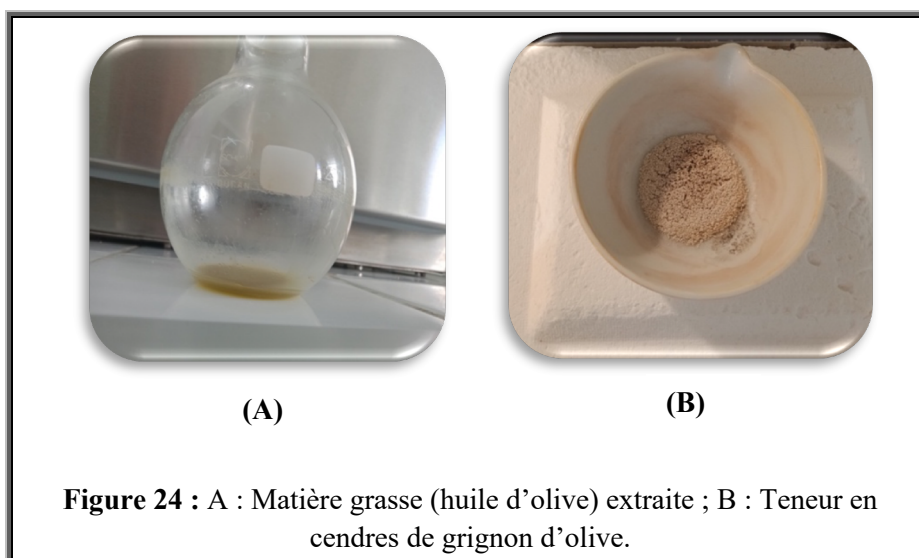
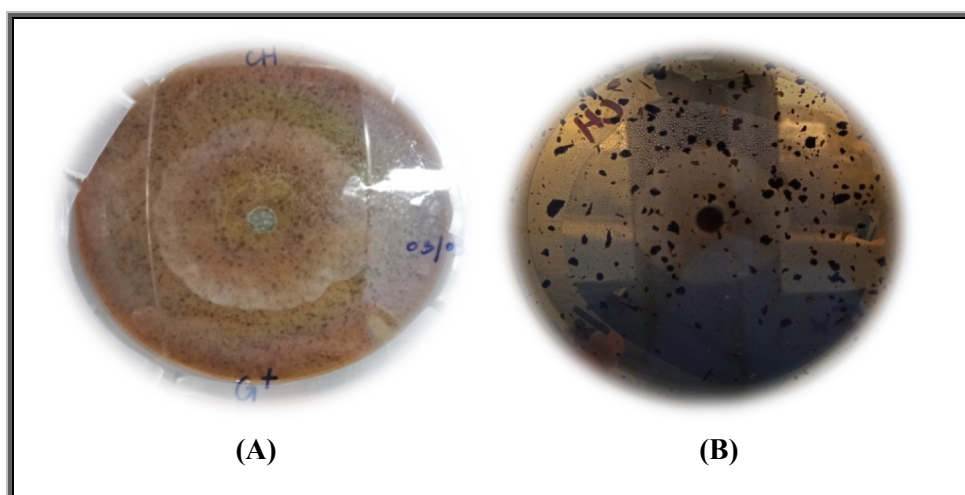


Figure 24 : A : Matière grasse (huile d'olive) extraite ; B : Teneur en cendres de grignon d'olive.

Les résultats obtenus de l'analyse de grignon d'olive de stockage d'un mois sont en accord avec ceux de **Nefzaoui, 1985**. Le taux de la matière sèche plus ou moins élevé est due à l'effet de la température et l'augmentation du taux de la cellulose brute (**Elhachemi, 2010**). Concernant la matière grasse, la valeur trouvée est en relation avec le procédé d'extraction employé ; les grignons bruts n'ont subi aucun traitement de séparation des phases ce qui signifie la teneur élevée en gras. En outre, le taux de la matière minérale reste en accord avec les valeurs trouvées par **Nefzaoui, 1985**. Cette stabilité s'explique par l'effet du séchage à l'air libre qui diminue le taux d'humidité des grignons d'olive ce qui implique la diminution de l'activité microbienne et l'inhibition du phénomène de fermentation, donc l'absence d'exploitation des sels minéraux par les microorganismes. Selon **M'sadak et al. (2015)**, le grignon d'olive est riche en carbone organique avec une moyenne de 55.3% ce qui est en accord avec les valeurs obtenues (47.41%).

### 3.3- Mise en culture de la souche fongique sur milieu gélosé à base de grignon d'olive

Le résultat de ce test a montré que la souche *Chaetomium sp.* a pu utiliser les nutriments contenus dans le grignon pour croître, en sécrétant des enzymes ligno-cellulolytiques extracellulaires. Ce genre a également montré un bon développement sur un milieu gélosé à base de feuilles et de tiges de citrouille (**Bouaouine et Gharfi, 2015**) et sur l'écorce de grenade (**Atalla et El Gamal, 2020**).



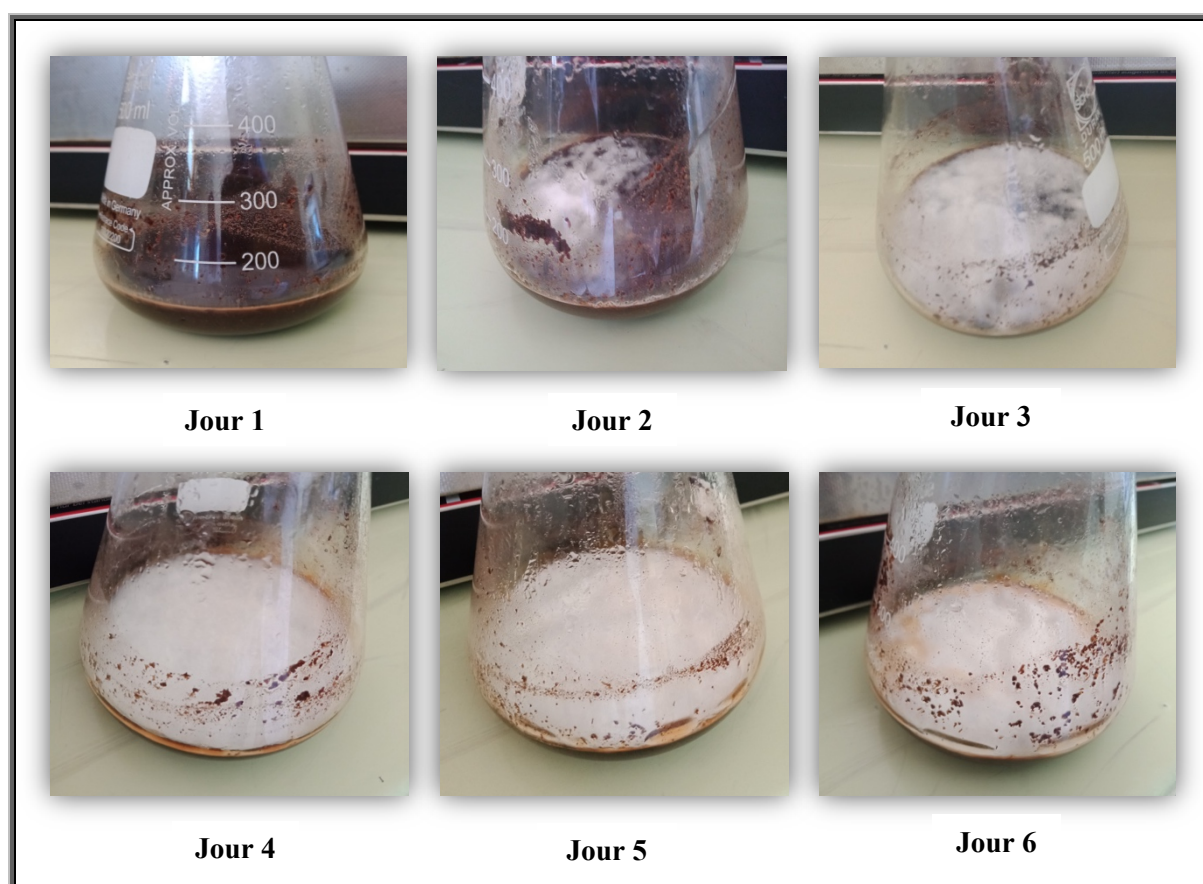
**Figure 25** : Colonie de *Chaetomium sp.* Après 48h d'incubation sur milieu gélosé à base de grignons d'olive (A : Surface ; B : Revers).



### 3.4- Production des enzymes par fermentation sur milieu solide « FMS »

#### 3.4.1- Suivi de la croissance mycélienne

Durant les deux premiers jours de croissance, un développement du mycélium plus ou moins lent a été observé ceci peut être expliqué par le caractère hydrophobe de grignon. Cette croissance progresse significativement au troisième jour, où le mycélium envahit toute la surface du milieu et le mycélium devient plus épais au cours des jours qui suivent ; cela est expliqué par la composition satisfaisante du milieu par rapport aux exigences de la souche étudiée. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Al kharousi et al. (2015)** qui ont utilisés un bouillon de CMC comme milieu de fermentation. L'aspect des cultures fongiques est représenté dans la figure 28.

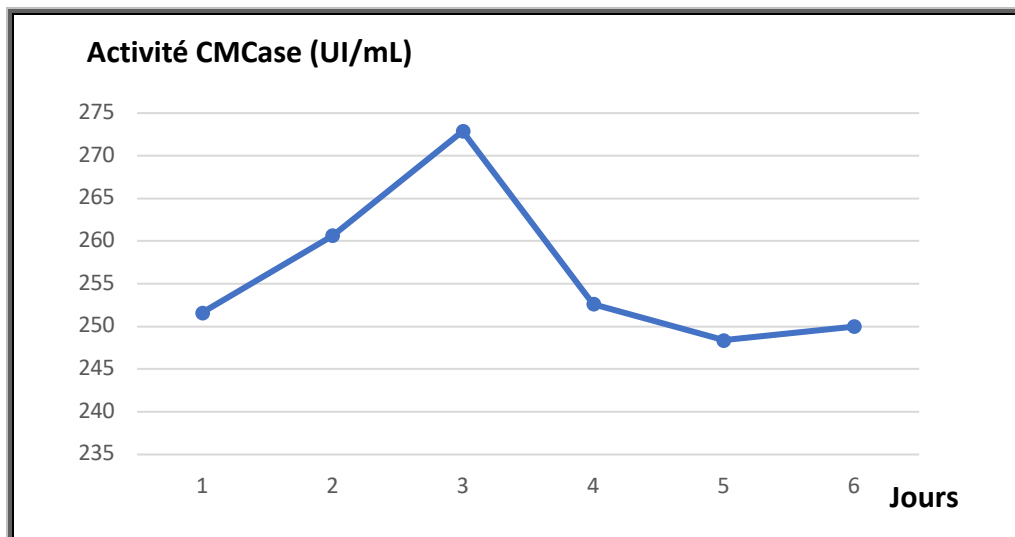


**Figure 26** : Suivi de la croissance mycélienne pendant 6 jours de culture.

#### 3.4.2- Suivi cinétique de la production de la cellulase et de la xylanase par *Chaetomium sp.*

##### ➤ Activité cellulosique (CMCase /Endoglucanase)

La cinétique de production de la cellulase par la souche testée, dans un milieu à base de grignon d'olive, a été étudiée pendant les six premiers jours de la fermentation par la mesure de l'activité enzymatique CMCase (endoglucanase).



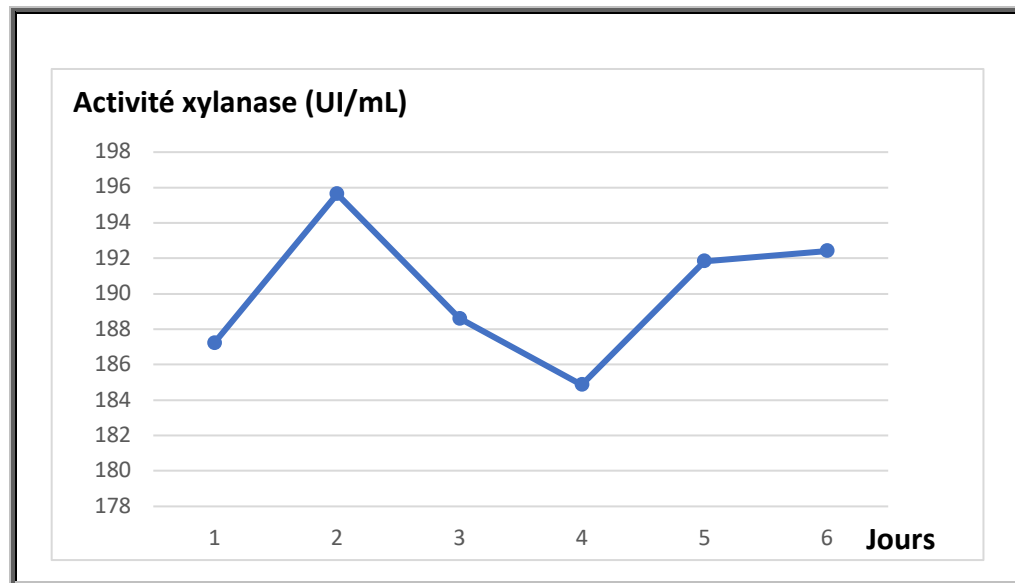
**Figure 27 :** Suivi de l'activité CMCase lors de la FMS.

La figure montre que l'activité endoglucanase augmente progressivement dès le début de la culture. Le pic de la production est obtenu après 3 jours d'incubation avec une valeur mesurée à 272,9 UI/mL. Suivi, pendant 48h, d'une diminution jusqu'à l'obtention d'une valeur de 248.4 UI/mL. Au-delà, on assiste à une stabilité de la production.

Les résultats obtenus dans cette étude sont supérieurs à ceux trouvés par **Al-Kharousi et al. (2015)**, qui ont montré que la production de la cellulase, dans un bouillon CMC, est corrélée à la croissance de *Chaetomium sp.* avec une activité maximale de  $155.3 \pm 25.6$  UI/mL. Nos résultats indiquent que la souche testée a produit l'enzyme pour dégrader la cellulose, contenue dans le grignon et utilisée comme source de carbone présente. De même, lors de l'étude de **Gautam et al. (2012)**, où *Chaetomium sp.* a montré une activité endoglucanase de 1.19 IU/mL lors de la production du compost en valorisant les déchets municipaux solides.

#### ➤ **Activité xylanase**

Le suivi cinétique de l'activité xylanasiqne produite par *Chaetomium sp.* sur le grignon d'olive est présenté par la figure 28.



**Figure 28 :** Suivi de l'activité xylanase lors de la FMS.

Le profil cinétique de l'activité xylanase présente la même allure que celle obtenue par l'activité CMC<sub>Case</sub>. L'enzyme est produite dès le premier jour d'incubation et atteint une valeur maximale de 195.6 UI/mL au deuxième jour. Elle diminue pendant les 48 heures qui suivent jusqu'à 184.86 UI/mL, puis ré-augmente progressivement.

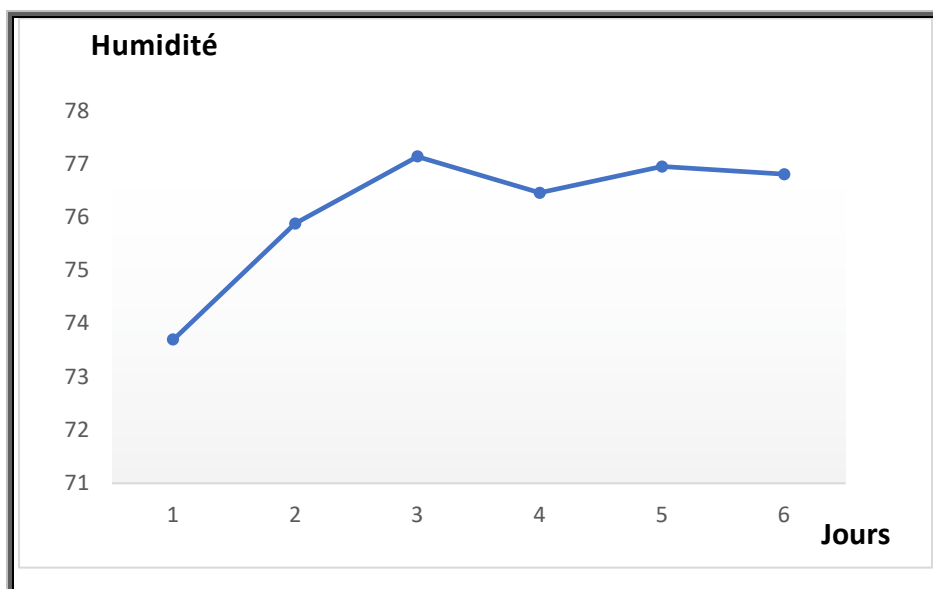
Les résultats obtenus sont largement supérieurs à ceux trouvés par **Latif et al. (2006)**, où l'activité maximale d'une xylanase produite par *Chaetomium thermophile* sur milieu liquide, à base de paille de blé et d'urée, a été de 27.8 UI/mL. Par contre nos résultats restent inférieurs à ceux trouvés par **Cherien et ElGamal (2020)**, qui ont montré, par culture de *C. globosum*, que l'écorce de grenade est le plus rentable parmi les déchets agricoles testés avec une activité de 1398.34 UI/mL mesurée au septième jour de culture. En fait, plusieurs genres appartenant aux Ascomycètes comme *Aspergillus*, *Trichoderma* et *Penicillium* ont montré une production minimale de cette enzyme par fermentation sur milieux à base de grignon, paille de riz, de noyau de palmier, bagasse de la canne à sucre et autres (**Kheng et Che Omar, 2005 ; Gawande et Kamat, 2001 ; Azzouz, 2015**).

La diminution de l'activité endoglucanase et xylanase observées au quatrième et cinquième jour peut être expliquée par l'accumulation des composés phénoliques, issus de la dégradation de la lignine, dans le milieu de fermentation. De plus, les toxines et métabolites secondaires secrétés par *Chaetomium* (**ECCC, 2018**). Toutefois, les valeurs mesurées à partir des derniers prélèvements signifient que le milieu de culture n'est pas encore épuisé et peut servir pour plus de production, ce qui nécessite de prolonger la durée d'incubation lors des études ultérieures.

### 3.4.3- Évolution de l'humidité et du pH

#### ➤ Suivi de l'humidité

Le pH du milieu et l'humidité évoluent durant la fermentation avec la croissance du microorganisme et la production des enzymes extracellulaires. Cette variation est en fonction des activités métaboliques des micro-organismes. En FMS avec les moisissures, il est difficile de déterminer directement la biomasse, car il est pratiquement impossible de séparer la biomasse du substrat de fermentation. La perte en poids sec du substrat de fermentation est hautement corrélée à la biomasse (**Raimbault ,1989 ; Terebiznik et Pilosof, 1999**). Les mesures sont effectuées toutes les 24 heures durant la fermentation et les résultats obtenus sont représentés sur les figures 29 et 30.



**Figure 29** : Évolution de l'Humidité au cours de la FMS.

L'humidité initiale du milieu est un facteur critique en FMS car elle détermine le taux de croissance et le rendement en produit (**Gervais et Molin, 2003**). De nombreux auteurs, en particulier, **Latifian et al., (2007)** et **Sun et al., (2010)** ont montré que l'humidité optimale pour production de cellulase, par les ascomycètes sous FMS correspond à 70%.

Dans la présente étude l'augmentation significative de l'humidité par rapport à la valeur initiale (71.83%) et donc la perte en poids sec dès le début de la fermentation est expliquée par la dégradation du substrat de fermentation et la croissance rapide du champignon en produisant les enzymes recherchées (**Weng et Sun, 2006 ; Tao et al., 2010**). De plus, la libération des molécules d'eau, comme produit des réactions enzymatiques, lors de la dégradation de la ligno-cellulose.

### ➤ Suivi du pH

L'intervalle de variation du pH au cours de la fermentation (entre 5.87 et 6.50) confirme la préférence du milieu acide pour la production de cellulase et d'autres enzymes dégradant la ligno-cellulose pour la plupart des ascomycètes (El Said, 2008). Ce qui est confirmé par les travaux de Cherien et ElGamal (2020) et Latif et al. (2006), dont l'activité d'une xylanase produite par *Chaetomium* était meilleure entre un pH de 6 et 6.6.

Par ailleurs, les fermentations de ce genre sont souvent accompagnées par la formation des acides organiques ce qui rend le pH du milieu acide.

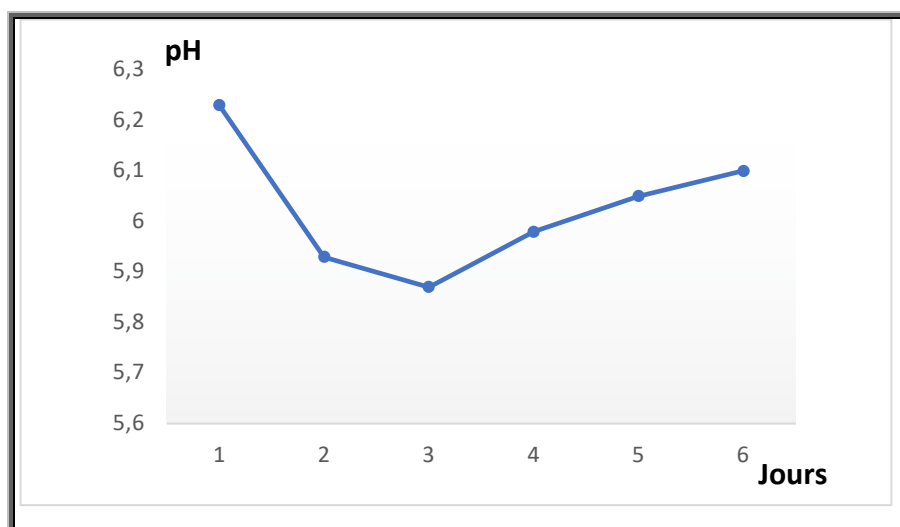


Figure 30 : Évolution du pH au cours de la FMS.

Toutefois, il est difficile de comparer les résultats obtenus dans notre étude avec ceux rapportés par les différents auteurs avant de procéder à une optimisation de quelques paramètres de culture.

## *Conclusion et perspectives*

## 4- Conclusion et perspectives

L'objectif de cette étude était la valorisation d'un déchet oléicole (grignon d'olive brut), par voie microbiologique, en utilisant une souche fongique appartenant au genre *Chaetomium* pour mettre en évidence l'activité cellulasique et xylanasiq.

Plusieurs travaux ont été réalisés pour caractériser la composition chimique des déchets oléicoles. L'étude de la composition chimique de grignon a permis de conclure sa richesse en nutriments nécessaires aussi bien à la croissance microbienne qu'à la production des métabolites recherchés. De ce fait, un milieu de fermentation semi solide en a été préparé et utilisé pour la production d'enzymes ligno-cellulosiques par *Chaetomium sp.*, isolat fourni par le laboratoire (LaMyBAM). Ce milieu a permis, en effet, de produire une activité enzymatique maximale de 272.87 UI/mL et 195.63 UI/mL pour la cellulase et la xylanase, respectivement. D'après cette étude, nous pouvons conclure que, même en absence de paramètres optimisés, *Chaetomium sp.* a montré une production significative.

Néanmoins les résultats de ce modeste travail ne constituent qu'une ébauche et plusieurs points constatés nécessitent d'être approfondis :

- Optimisation du milieu de fermentation pour un meilleur rendement.
- Recherche de l'activité enzymatique intermédiaire et ses produits.
- Production en *scale-up*.

## *Références bibliographiques*



## 5- Références bibliographiques

- Abid O., Najar A T., Ghorbel R., Benromdhane A. (2014).** Effect of fungal treatment by solid state fermentation on the nutritive value of Olive Cake université de Sfax, Tunisie.
- Abbott, S. P., Sigler, L., McAleer, R., McGough, D. A., Rinaldi, M. G., et Mizell, G. (1995).** Fatal cerebral mycoses caused by the ascomycete *Chaetomium strumarium*. J Clin Microbiol. 33[10], 2692-2698.
- Abdel-Azeem AM., Gherbawy YA., Sabry AM. (2016).** Enzyme profiles and genotyping of *Chaetomium globosum* isolates from various substrates. Plant Biosyst 150(3):420–428.
- Abo-State. M.A.M., Hammad. A.I., Swelim. M., Gannam. R.B. (2010).** Enhanced production of cellulase by *Aspergillus* spp. Isolated from agriculture wastes by solid state fermentation. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 8(4). 402-410.
- AFIDOL, (2019).** Carnet de route : A la découverte de l'olivier. Les olives, 12.
- Aftab A. et Vermette P. (2008).** Culture-based strategies to enhance cellulose enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. Biochem. Eng. J. 40 : 399-407.
- Alex Rakotovelo, (2016).** Fragmentation enzymatique de la lignine pour l'obtention de synthons phénoliques. Polymères. Université de Bordeaux.
- Alibes X., Berge P., Martilotti F. Nefzaoui A., Zoïopoulos P. (1984).** Utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin Méditerranéen. P :43.
- Al-Nahdi, M., al-Frayh, R., et Hasnain, S. M. (1989).** An aerobiological survey of allergens in al Khobar, Saudi Arabia. Allerg.Immunol. (Paris.). 21[7], 278-282.
- Andersen, B. and Nissen, A. T. (2000).** Evaluation of media for detection of *Strachybotrys* and *Chaetomium* species associated with water-damaged buildings. International Biodeterioration & Biodegradation 46, 111-116.
- Arantes., Valdeir., Saddler., Jack N. (2010).** Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis : the role of amorphogenesis. Biotechnology for Biofuels, vol. 3, n°4.
- Argenson, C. et al. (1999).** L'olivier. Les Editions Ctifl. pp. 204.
- Ariffin, H., Abdullah, N., UmiKalsom, M. S., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2006).** Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. International Journal of Engineering and Technology, 3(1), 47-53.
- Asgher M., Kausar S., Bhati HN., Shah SAH., Ali M. (2008).** Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum* commune IBL-06. Int. Biodeter. Biodegr. 61(2): 189-193.

- Assamoi. A.A., Destain. J., Thonart. P. (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* .13(2). 281-294.
- AstolfiFilho. S., Silva-Nunes. C.G. (2014).** Endo And exoglucanases produced by *Penicillium Citrinum* isolated from Amazon. *BMC Proceedings* .8.179.
- Atalla, Sherien M. M., and Nadia G. El Gamal. (2020).** Production and characterization of xylanase from pomegranate peel by *Chaetomium globosum* and its application on bean under greenhouse condition. *Bulletin of the National Research Centre*, vol. 44, no. 1, 2020, p. NA.
- Audigie C.L., Fagerella J., Zonszain F. (1984).** Manipulation d'analyse biochimique. P : 270. Edition Tec et Doc, Lavoisier. Paris.
- Azzouz Zahra. (2015).** Production de cellulases et de xylanases fongiques par fermentation solide et liquide à base de paille et de son de blé. Diplôme de Magister : Département microbiologie. Université A. MIRA- BEJAIA.
- Bakri, Y. (2003).** Optimisation de la production de xylanases par *Penicillium canescens* 10-10c. Thèse de doctorat : Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique).
- Balan.V., Jin. M., Culbertson. A., Uppugundla. N. (2013).** The Saccharification Step: *Trichoderma reesei* Cellulase Hyper Producer Strains. In; Faraco.V. *Lignocellulose Conversion Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production*. Ed : Springer. New York. U.S.A. 65-92.
- Balasubramanian, N., et Simões, N. (2014).** *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase ; a thermo *stable* enzyme with a wide substrate spectrum utility. *International journal of biological macromolecules*, 67, 132-139.
- Baldrian, P. (2006).** *Fungal laccases – occurrence and properties*. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215–242.
- Ballerini D. et Alazard-Toux N. (2006).** Les biocarburants : état des lieux, perspectives et enjeux du développement. Edts . Technip, Paris. p 264.
- Bansal. N., Tewari. R., Soni. R., Soni. K.S. (2012).** Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*. 32.1341–1346.
- Barbosa E.S., Perrone D., Vendramini A.L.A., Leite S.G.F. (2008).** Vanillin production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on green coconut agro-industrial husk in solid state fermentation. *BioResources*. 1042–1050

- Barron, M. A., Sutton, D. A., Veve, R., Guarro, J., Rinaldi, M., Thompson, E., Cagnoni, P. J., Moultney, K., and Madinger, N. E. (2003).** Invasive mycotic infections caused by *Chaetomium perlucidum*, a new agent of cerebral phaeohyphomycosis. *J Clin Microbiol.* 41[11], 5302-5307.
- Bataïche Insaf. (2014).** Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques. Thèse de doctorat en Bioprocédés et Biotechnologies, Applications Mycologiques. Département de microbiologie. UFM, Constantine. p :29.
- Benhassine S, Kacem CN, Destain J. (2016).** Production of laccase without inducer by *Chaetomium* species isolated from Chettaba forest situated in the east of Algeria. *Afr J Biotechnol* 15(7) : 207.
- Bellon-Maurel, V., Orliac, O. et Christen, P. (2003).** Sensors and measurements in solid state fermentation : a review. *Proc. Bioch.* 38 : 881–896.
- Benny Chefetz, Yona Chen, Yitzhak Hadar. (1998).** Purification and Characterization of Laccase from *Chaetomium thermophilum* and Its Role in Humification. Food and Environmental Quality Sciences, The Hebrew University of Jerusalem.
- Bettache. A. (2013).** Isolement et sélection d'actinomycètes producteurs d'enzymes cellulolytiques. Thèse de doctorat. Université AMIRA-BEJAIA. Algérie .191.
- Bharadwaj Kummamuru. (2017).** World Bioenergy Association. *Wba global bioenergy statistics.* p33-38.
- Boisset. C., Frascini. C., Schulein. M., Henrissat. B., Chanzy. H. (2000).** Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbio.* 66-1444-1452.
- Boskou, D. (2006).** Olive oil chemistry and technology. (2e edn). AOCS Press.
- BOUAOUINE Adjial Soumeya et GHARFI Manel. (2015).** Production de la laccase par des mycètes filamenteux sur milieu à base de déchets de citrouille (*cucurbita sp.*). Mémoire en Sciences Biologiques. Université des frères Mentouri, Constantine.
- Boucherba. N. (2011).** Production, purification et caractérisation d'une endoxygénase produite par une souche de *Jonesia denitrificans*. Thèse de doctorat. Université AMIRA, Bejaia. Algérie. 181.
- Boudissa F, 2012.** Influence des radiations micro-ondes sur l'extraction de l'huile de grignon d'olive imprègne de margines. Mémoire de Master, faculté des sciences, université MOULOUD MAMMARI, Tizi-Ouzou, 90p.

- Boudoukhana H, (2008).** Impacts des margines sur les eaux d'Oued BOUCHTATA (wilaya de Skikda). **Mémoire** de Magister, Faculté des sciences et des sciences de l'ingénieur, 82p.
- Braaksma. M., Van Den Berg. R.A., Van Der Werf. M.J., Punt. P.J. (2010).** A Top Down Systems Biology Approach for the Identification of Targets for Fungal Strain and Process Development. In; Borkovich. k.a., Ebbole. d.j. Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fung. Ed; ASM Press. Washington. U.S.A. 25-35.
- Castilho, L. R., Medronho, R. A. and Alves, T. I., (2000).** Production of pectinase obtained by solid-state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresources Technology*, 71, 45-50.
- Charnock, S.J., Mccleary, B. V. (2005).** Les enzymes : Applications industrielles et analytiques. *Revue des Œnologues* : 116, 1–5.
- Chavarría M. (2018).** Two new cellulolytic fungal species isolated from a 19th-century art collection. *Sci Rep* 8(1):1–9.
- Chen C., Chen J., Geng Z., Wang M., Liu N., Li D. (2018).** Regioselectivity of oxidation by a polysaccharide monooxygenase from *Chaetomium thermophilum*. *Biotechnol Biofuels* 11(1):1–16.
- Chen, H. (2014a).** Brief Introduction to the Biotechnology of Lignocellulose. In *Biotechnology of Lignocellulose* (pp. 1-24). Springer Netherlands.
- Chen, H. (2014b).** Chemical composition and structure of natural lignocellulose. In *Biotechnology of Lignocellulose* (pp. 25-71). Springer Netherlands.
- Chesson A. (1987).** Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In : Hresign W, Cole DJA, editors. *Recent Advances in Animal Nutrition*. London, Butterworths, p 71-89.
- Chundawat, S. P. S., Donohoe, B. S., Da Costa Sousa, L., Elder, T., Agarwal, U. P., Lu, F. (2011).** Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. *Energy Environnement*.
- Clémence Restino. (2012).** Production d'acide itaconique par des souches d'*Aspergillus* par fermentation en milieu solide. p :64.
- COI, (2015a).** Étude internationale sur les coûts de production de l'huile d'olive. International Olive Council. Madrid, Spain. : 41p.
- Collins T., Gerday C., Feller G. (2005).** Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev* :29 :3–23.
- Coronado-Ruiz C., Avendaño R., Escudero-Leyva E., Conejo-Barboza G., Chaverri P.,**

- Cosnier, S. (2000).** Biosensors based on immobilization of biomolecules by electrogenerated polymer films. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 89 : 127-138.
- CRCDG. Centre de recherche sur la conservation des documents graphiques. (2007).** Moisissures et biens culturels. Ministère de la culture et de la Communication, France.
- Cullen D. et Kersten P.J. (2004).** Enzymology and molecular biology of lignin degradation. *Biochem. Mol. Biol.* 13 : 249-263.
- Dashti N., Ali N., Khanafer M., Al-Awadhi H., Sorkhoh N., Radwan S. (2015).** Olive pomace harbors bacteria with the potential for hydrocarbon biodegradation, nitrogen fixation and mercury-resistance : Promising material for waste-oil-bioremediation. *J. Environ. Manage.* 155 : 49-57.
- Davies. G., Henrissat. B. (1995).** Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3 (9). 853-859.
- Debbies S.Y., Xu F., Golightly E.J., Kim M.B., Brown S.H., Rey M.W., Scheider P., de Hoog, G. and Guarro, J. (1995).** Atlas of clinical fungi. Baarn, Central bureau voor Schimmelcultures.
- Deshpande., B. P. Azhar Murtuza. (2011).** *Isolation of laccase producing fungi and partial characterization of laccase*, Department of Biotechnology, B.V.B. College of Engineering and Technology, Hubli, Karnataka 580031, India, 1(4) : 543-549, ISSN 2249-9075.
- Direction de la Production Végétale (DPV). (2009).** Département lié au ministère de l'agriculture, Rabat, Maroc.
- Dominiak, M. M., Mikkelsen, J. D., et Marie Søndergaard, K. (2014).** A novel perspective on pectin extraction. Technical University of Denmark, Department of chemical and biochemical Engineering.
- Drouin, M. (2005).** Étude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître en sciences (M.Sc.). Canada.
- Duchiron. F., copinet. E. (2011).** Fermentation en milieu solide. Document (Doc. BIO 620) université de Reims.1-16.
- Elhachemi Cheikh. (2010).** Effet de différents modes de séchage sur la stabilité des qualités nutritionnelles et microbiologiques du grignon d'olive durant 3 mois de stockage. Thèse de doctorat. Faculté des sciences and Technology, université d'Oran.
- Elisabeth Lustrat. (2017).** Fermentation en milieu solide : bénéficiez de ses 3 avantages. Nutrition et santé, protéines, technologie ou process agroalimentaire.
- El-Said AHM., Saleem A., (2008).** Ecological and Physiological Studies on Soil Fungi at Western Region, Libya. *Mycobiology*. 36:1–9. doi: 10.4489/MYCO.2008.36.1.001

- El-Tarabily, K.A., Sivzithamparam, K., (2006).** Potencial of yeast as bicontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* .47:25-35.
- Environment and Climate Change Canada (ECCC). (2018).** Final Screening Assessment of *Chaetomium globosum* strain ATCC 6205.
- Espiard, E. (2002).** Introduction à la transformation industrielle des fruits. (edn). TEC et DOC.
- Esteve C., Marina M.L., García M.C. (2015).** Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food Chem.* 167: 272-280.
- Facelo, Johann et Cruz Osma. (2007).** Banana skin : A novel material for a low-cost production of laccase. Master thesis, graduate studies in chemical, environmental And process engineering, *Rovira i Virgili University* : Ecole Technique Supérieur d'Enginyeria Química, Spain, 28p.
- Farooq Latif, Muhammad Asgher, Rabia Saleem, Ahmed Akrem and R.L. Legge. (2006).** Purification and Characterization of a Xylanase Produced by *Chaetomium thermophile* NIBGE. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22:45–50 . DOI: 10.1007/s11274-005-57454
- Fedeli, E. (1997).** Technologie de production et de conservation de l'huile. *Encyclopédie mondiale de l'olivier*. pp.253-283.
- Fogle, M. R., Douglas, D. R., Jumper, C. A., and Straus, D. C. (2007).** Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia*. 164[1], 49-56.
- Fujimoto, H., Sumino, M., Okuyama, E., and Ishibashi, M. (2004).** Immunomodulatory constituents from an Ascomycete, *Chaetomium seminudum*. *J Nat.Prod.* 67[1], 98-102.
- Gaime Perraud et Sévastianos Roussos. (2013).** Unité de valorisation complète de déchets oléicoles par lombricompostage : Production de produits à haute valeur ajoutée : lombricompost, savon, collagène et lombrics. *Sciences de la Biodiversité et Ecologie*. Université Aix-Marseille (AMU). p : 3-6
- García-Gómez M-J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O. et Prado-Barragán L-A. (2009).** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.*, (N°112), 604–608.
- Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Jamaluddin, Awasthi, M. K., et Sarsaiya, S. (2012).** Diversity of cellulolytic microbes and the biodegradation of municipal solid waste by a potential strain. *International journal of microbiology*, 2012, 325907. <https://doi.org/10.1155/2012/325907>

- Gawande P. V et M.Y. Kamat. (2001).** Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application University Department of Chemical Technology, University of Mumbai, Matunga.
- Gerais, Minas. (2013).** *Chaetomium spp.* FILOGENIA E CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS. FITOPATOGÊNICOS TRANSMISSÍVEIS POR SEMENTES. 22p
- Gervais P., Molin P. (2003).** The role of water in solid-state fermentation. *Biochem.Eng. J.* 13 :85-101
- Ghindilis A.L. (2000).** Direct electron transfer catalysed by enzymes: application for biosensor development. *Biochem. Soc. Trans.* 28:84–89.
- Ghose. TK. (1987).** Mesure des activités de la cellulase. *Pure Apple Chemistry* : 59, 257-268
- Gilbert H.J., Hazlewood G.P. (1993).** Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* 139: 187-194.
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carneiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., et Bogel-Lukasik, R. (2010).** Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4775-4800.
- Glenn JK, Gold MH. (1985).** Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys*, 242, 329–341.
- Gomes E., Aguiar A.P., Carvalho C.C., Bonfa M.R.B., Da Silva R., Boscolo M. (2009).** Ligninases production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Braz. J. Microbiol.* 31–39.
- Gómez-Toribio V., Martínez AT., Martínez MJ., Guillén F. (2001).** Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 268:4787–4793.
- Grigorevski-Lima, A. L., de Oliveira, M. M. Q., do Nascimento, R. P., da Silva Bon, E. P., et Coelho, R. R. R. (2013).** Production and partial characterization of cellulases and xylanases from *Trichoderma atroviride* 676 using lignocellulosic residual biomass. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169(4), 1373-1385.
- Guo, F., Shi, W., Sun, W., Li, X., Wang, F., Zhao, J., et Qu, Y. (2014).** Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 1.
- Habrant, A., Gaillard, C., Ralet, M-C., Lairez, D. et Cathala, B. (2009).** Relation between chemical structure and supramolecular organization of synthetic lignin-pectin particles. *Biomacromolecules*, 10, 3151 3156.

- Halkier T., Mondore K. et Henrik F. (1996).** Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. Environ. Microbiol. 62 (3): 834-841.
- Hamdi M. et Ellouz R. (1993).** Treatment of detoxified olive mill wastewater by anaerobic filter and aerobic fluidized bed process. Environ. Technol. 19: 183-188.
- Hamed SR., Abo Elsoud MM., Mahmoud MG., Asker MMS. (2016).** Isolation, screening and statistical optimizing of L-methioninase production by *Chaetomium globosum*. Afr J Microbiol Res 10(36):1513–1523.
- Hammad, M., Badarneh, D. et Tahboub, K. (1999).** Evaluating variable organic waste to produce methane. Ene.Conv. Manage. 40 : 1463-1475.
- Hattenschwiler S. et Vitousek P.M. (2000).** The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. TREE. 15: 238-243.
- Helander, M., H. Theliander, M. Lawoko, G. Henriksson, L. Zhang, et M.E. Lindström. (2013).** Fractionation of technical lignin: Molecular mass and pH effects. Bioresources, 2013. 8(2) : p. 2270-2282.
- Heng, W. H. W. T. C., Weigang, J. W. Z. (2008).** Research Advances on Characteristics and Application of Xylanases. Food and Fermentation Industries, 3, 039.
- Henrissat. B., Teeri. T.T., Warren. R.A.J. (1998).** A scheme for designating enzymes that hydrolyze the polysaccharides in the cell walls of plants. FEBS Lett. 425. 352-354.
- Hind Leghlimi. (2013).** Cellulase de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de Doctorat en Cotutelle. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et UFR des Sciences exactes et Naturelles. P :30-31.
- Hofrichter, M. (2002).** Review: Lignin conversion by manganese peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.*, **30**, 454-466.
- Holker. U.L.J. (2005).** Solid-state fermentation are there any biotechnological advantages?. Current Opinion in Microbiology. 8(3). 301-306.
- Holtzapple M., Cognata M., Shu Y., Hendrickson C. (1990).** Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. Biotechnol. Bioeng. 36 : 275-287.
- Iboukhoulef H, (2014).** Traitement des margines des huileries d'olive par les procédés d'oxydation avancés basés sur le système Fenton-like (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cu). Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Tizi-Ouzou, 124p.



- Ismaili-Aiaoui M., Kamal M., Kademi A., Morin A., Roussas S., Houde A. (2002).** Valorization of moroccan olive cake using solid state fermentation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, chapter 4 : 35-41.
- Jean Lachapelle. (2004).** Revue du Cercle de Mycologie de Bruxelles – n°4 (2004).
- Jean-Yves Le Déaut., Bruno Sido., Roland Courtea. (2016).** L'office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques de la biomasse à la bioéconomie : Une stratégie pour la France. Resources 1, 33-53.
- Jiao, R. H., Xu, S., Liu, J. Y., Ge, H. M., Ding, H., Xu, C., Zhu, H. L., and Tan, R. X. (2006).** Chaetominine, a cytotoxic alkaloid produced by endophytic *Chaetomium sp.* IFB-E015. Org Lett. 8[25], 5709-5712
- Kademi A., Ismaili-Alaoui M., Houde A. (2003).** Des arômes synthétiques...au naturel. Centre de Recherche et de Développement sur les aliments Saint Hyacinthe, Québec.
- Kadi, H. et Fellg, H. (2001).** Modelling of extraction from olive foot cake using hexane. Grasas y Acetces. 52(6).
- Karlsson. J., Siika-aho. M., Tenkanen.M., Tjerneld .F. (2002).** Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. J. Biotechnol.99.63-78.
- Kebbi-Benkeder, Z., Colin, F., Dumarçay, S., et Gérardin, P. (2015).** Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. Ann. For. Sci. 72, 277–284.
- Khan, N. N. and Wilson, B. L. (2003).** An environmental assessment of mold concentrations and potential mycotoxin exposures in the greater Southeast Texas area. J Environ Sci.Health A Tox.Hazard.Subst Environ Eng. 38[12], 2759-2772.
- Kim B. K., Lee B. H., LeeY. J., Jin I. H., Chung C. H. et Lee J. W. (2009).** Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A-53. Enz. Microb. Technoly. 44 : 411-416.
- Korish M. (2003).** Production, purification, properties and application of the cellulose From a wild type strain of a yeast isolate. Faculty of biology, Johannes gutenberg-University, mainz, germany.
- Koshijima, T., Watanabe, T. (2003).** Association between lignin and carbohydrates in wood and other plant tissues. Springer, Berlin, pp. 91–131.
- Kulkarni N., Shendye A. & Rao M., (1999).** Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiol. Rev., 23, 411-456.

- Kumar, M., Chakdar, H., Pandiyan, K. (2016).** Bacterial xylanases : biology to biotechnology. *3 Biotech* **6**, 150. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0457-z>
- Kumar, S. et Mishra, A. (2011).** Optimization of laccase production from WRF-1 on groundnut shell and cyanobacterial biomass: By application of Box-Behnken experimental design. *Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Kunamneni A., Ghazi I., Camarero S., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M. (2008).** Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochem.* 169–178.
- Larone, D H. (1987).** Medically important fungi. A guide to identification. 2nd edition, -230 p. New York - Amsterdam - London, Elsevier Science Publishing Co., Inc.
- Latifian M. (2007).** Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid- state fermentation conditions. *Bioresour Technol.* 98 : 3634-3637
- Lee J.W., Lee S.M., Hong E.J., Jeung E.B., Kang H.Y., Kim M.K., Choi I.G. (2006).** Estrogenic reduction of styrene monomer degraded by *Phanerochaete chrysosporium* KFRI 20742. *J. Microbiol.* 44:177–184.
- Linker. M., Teeri.T.(1996).** The cellulose binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proc.Nat. Acad. Sci.*93. 12251-12255.
- Liu J., Yuan X., Zeng G ., Shi J. et Chen S. (2006).** Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. *Process Biochem.* 41: 2347-2351.
- Mabrouk AM, Kheiralla ZH, Hamed ER, Youssry AA, Abd El Aty AA (2010).** Screening of some marine derived fungal isolates for lignin degrading enzymes production. *Agric and Biol J. North Am.* Publ. line, pp. 2151-7525.
- Maciel M.J.M., Silva A.C., Ribeiro H.C.T. (2010).** Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. *Electron. J. Biotechnol.* ISSN: 0717-3458.
- Maijala P., Mettala A., Kleen M., Westin C., Poppius-Levin K., Herranen K., Lehto J.H., Reponen P., Maentausta O., Hatakka A. (2007).** 10th International Congress on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. *Book of Abstracts*. Treatment of softwood chips with enzymes may reduce refining energy consumption and increase surface charge of fibers; p. 65.

- Makky, E. A. (2009).** Avicelase production by a thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* isolated from soil using sugarcane bagasse. *World AcadSciEngTechnol*, 57, 487-91.
- Malherbe, S., and Cloete, T.E. (2002).** Lignocellulose biodegradation : Fundamentals and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1, 105–114.
- Manpreet. S., Sawraj. S., Sachin. D., Pankaj. S., Banerjee. U.C. (2005).** Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology.* 1(2). 1-9.
- Martins, D. A. B., Gomes, E., do Prado, H. F. A., Ferreira, H., de Souza Moretti, M. M., da Silva, R et Leite, R. S. R. (2011).** Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. INTECH Open Access Publisher.
- Martinez A.T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F.J., Feirreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M.J., Gutiérrez A. and del Río J.C. (2005).** Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Intern. Microbiol.* 8: 195-204.
- Maurice Raimbault. (1981).** P :44- 46. Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. Ed :de l’office de la recherche scientifique et technique outre-mer.
- Mayer, A.M., et Staples, R.C. (2002).** Laccase:new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60: 551-5.
- Mebirouk M, (2002).** Rejets des huileries, développement d’un procédé intégré pour la biodégradation des polyphénols.
- Medve. J., Karlsson. J., Lee. D., Tjerneld. F. (1998).** Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: Adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 59(5). 621–634.
- Mennane Z., Tada S., Aki I., Faid M., Hassani S., Salmaoui S. (2010).** Caractérisation physico-chimique et microbiologique des grignons d’olive de 26 huileries traditionnelles de la région de Beni Mellal (Maroc). *Technologies de laboratoire.* 5, N°19.
- Meza Juan Carlos., Lomascolo Anne., Casalot Laurence., Sigoillot Jean-Claude., Auria**
- Mikolasch A., Schauer F. (2009).** Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82:605–624.
- Miller, GL. (1959).** Utilisation du réactif acide dinitrosalicylique pour la détermination du sucre réducteur. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428. Doi : 10.1021 / ac60147a030.
- Moore. D., Robson. G.D., Trinci. A.PJ. (2011).** 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press. New York.706.

- Moredo, N., Lorenzo, M., Domínguez, A., Moldes, D., Cameselle, C., Sanroman, A. (2003).** Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 665-669
- Moussouni, A. (2013).** La réalisation d'une étude de faisabilité de nouvelles techniques pour la valorisation des déchets dans le secteur agroalimentaire au Maghreb, sous-secteur : huile d'olives. REME. Algérie.
- Moza Mohammed AL-Kharousi., Nallusamy Sivakumar., Abdulkadir Elshafie. (2015).** Characterization of cellulase enzyme produced by *Chaetomium sp.* isolated from books and archives. Department of Biology, College of Science, Sultan Qaboos University, Muscat, Oman.
- M'sadak. Y., Makhlouf. M., El Amrouni. S., (2015).** Évaluation qualitative et possibilités de valorisation biologique de la biomasse oléicole reprise dans le Sahel Tunisien, *Journal of New Sciences*, Volume 18(4). ISSN 2286-5314, 11 pages.
- Mtibaa, R., de Eugenio, L., Ghariani. B., Louati. I., Belbahri. L., Nasri. M et Mechiri. T. (2017).** A halotolerant laccase from *Chaetomium* strain isolated from desert soil and its ability for dye decolourization. *Laboratory of Enzyme Engineering and Microbiology, National School of Engineers of Sfax, University of Sfax, Tunisia.*
- Mukhiddinov, Z. K., Khalikov, D. K., Abdusamiev, F. T., et Avloev, C. C. (2000).** Isolation and structural characterization of a pectin homo and ramnogalacturonan. *Talanta*, 53(1), 171-176.
- Munk, L., Sitarz, A.K., Kalyani, D.C., Mikkelsen, J.D., and Meyer, A.S. (2015).** Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnol. Adv.* 33, 13–24.
- Murooka. Y., Yamshita. M. (2008).** Traditional healthful fermented products of Japan. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 35(8). 791-798.
- Mussatto, S.I., Ballesteros, L.F., Martins, S., Teixeira, J.A. (2011).** Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Sep. Purif. Technol.* 83, 173–179.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S. Teixeira, J. A. (2012).** Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. INTECH Open Access Publisher.
- Mussatto, S. I., & Teixeira, J. A. (2010).** Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (Méndez-Vilas, A., Ed.),* 2, 897-907.
- Nadine Dupuy., Jordina Belmonte., David Navarro., (2010).** Ascospores Quelles espèces Quel impact sanitaire. RNSA, UAB, PIA, ICTA. P : 7\_9.

- Nefzaoui, A. (1987).** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. Séminaire sur l'économie de l'Olivier, Tunisie.
- NF V 03-921.** Tourteaux de graines oléagineuses - Détermination de la teneur en eau et en matières volatiles.
- NF 03-903 AFNOR. (1966).** Observations sur le dosage de l'huile des graines de cotonnier
- Nidetzky. B., Zachariae. W., Gercken. G., Hayn. M., Steiner. W. (1994).** Hydrolysis of Cellooligosaccharides by *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases experimental data and kinetic modeling. *Enzyme. Microbial. Technol.* 16. 43– 52.
- N. Kapoor, M. Tyagi, H. Kumar, A. Arya, M.A. Siddiqui, A. Amir and A.S. Malik. (2010).** Production of Cellulase Enzyme by *Chaetomium* sp. using Wheat Straw in Solid State Fermentation. *Research Journal of Microbiology*, 5: 1199-1206.
- Nommori T., Watanabe T., Shinke R., Kawamura Y. (1990).** Purification and properties of thermstable xylanase and  $\beta$ -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothersophilus* strain. *J. Bacteriol. Biotechnol.* 879-881.
- Novosel'skaya I. L., Voropaeva N. L., Semenova L. N., et al. (2000).** Trends in the science and applications of pectins. *Chemistry of Natural Compounds* 36 (1): 1–10.
- ONFAA, (2016).** Bilan de la campagne oléicole. Segment huile d'olive. Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires. Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la pêche : 13p.
- Osorio-González C.S., Chaali M., Hegde K., Brar S.K., Kermanshahipour A., Avalos-Ramírez A. (2020).** Production and Processing of the Enzymes from Lignocellulosic Biomass. In : Daramola M., Ayeni A. Valorization of Biomass to Value-Added Commodities. *Green Energy and Technology*, Springer.
- Pandey. A. (2003).** Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 13 (3).81-84.
- Pang Pei Kheng et Ibrahim, C.O. (2005).** Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 27(2) : 325-336
- Pauwels JM., Vanrust E., Verloo M., Mvoudo ZE. (1990).** Manuel de laboratoire de pédologie: Méthodes d'analyses des sols et des plantes. *Publications Agricoles* 28, pp 265.
- Pieckova, E. (2003).** In vitro toxicity of indoor *Chaetomium* Kunze ex Fr. *Ann Agric. Environ Med.* 10[1], 9-14.
- Pimentel. P.S.S., Lima de Souza. A., Rosas Nascimento. A.T., Vaz de Andrade. E.,**

- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M., & Kapadnis, B. (2013).** Actinomycetes : a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. BioMed research international.
- Piontek, K., Smith, A.T. et Blodig, W. (2001).** Lignin peroxidase structure and function. *Biochemical Society Transactions*, vol. 29, no. 2, p. 111-116.
- Ponzoni C., Beneventi E., Cramarossa M.R., Raimondi S., Trevisi G., Pagnoni U.M., Riva S., Forti L. (2007).** Laccase-catalyzed *dimerization* of hydroxystilbenes. *Adv. Synth. Catal.* 349:1497–1506.
- Rahardjo. Y.S.P., Tramper. J., Rinzema. A.M. (2006).** Conversion and transport phenomena in solid state fermentation : A *review* and perspectives. *Biotechnology Advances.* 24(2).161-179.
- Raimbault M., Soccol C.R., Chuzel G. (1989).** International training course on solid state fermentation. Montpellier. *ORSTOM.* 139-150.
- RaiS-K. et Mukherjee A-K. (2010).** Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochem.Eng.j.* (N°48), 173–180.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., et Boerjan, W. (2004).** Lignins : natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 29-60.
- Ranalli A. (1991).** L'effluent des huiles d'olives : propositions en vue de son utilisation et son épuration. Références aux normes italiennes en la matière. *Olivae.* 39 : 18-34.
- Rebah, M. (2006).** Les déchets qui nous menacent. La Dépêche. Journal Algérien.
- Réseau des Entreprises Maghrébines pour l'Environnement (REME). (2011).** Gestion de déchets organiques : Valorisation des Déchets dans le Secteur Agroalimentaire au Maghreb.
- Richard. (2005).** Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: Influence of ethanol vapours as inducer, *Process Biochemistry*, 40 p. 3365-3371.
- Rizoun, L. (2012).** Situation environnementale de l'industrie oléicole en Algérie. Conférence à Athènes.
- Robles-Hernandez L., Gonzales-Franco A.C., Crawford D.L., Chun W.W.C. (2008).** Review of environmental organopollutants degradation by white-rot basidiomycete mushrooms. *Tecnociencia Chihuahua.* 2:32–39.
- Rouches., S Zhou., J. P. Steyer., H. Carrère. (2016).** White-Rot Fungi pretreatment of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion : Impact of glucose supplementation. *Process Biochemistry.* INRA, France.

- Roussos. S., Hannibal. L., Durand. A., Diez. M., Saucedo. G., Montet. D., Graille. J. (1994).** Enrichissement en protéines du tourteau de coprah : sélection de champignons filamenteux en FMS. *Oléagineux*. 49 (5). 235-247.
- Sajith S, Priji P., Sreedevi S., Benjamin S. (2016).** An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *J Nutr Food Sci* 06(01):1–13.
- Salihu, A., Alam, Md. Z., Abdulkarim, M. I. et Salleh, H. (2012).** Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Res. Cons. Recy.* 58: 36-44.
- Samson, RA., Hoekstra, ES., et al. (1984).** Introduction to food and airborne fungi. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. Baarn, Centralalbureau voor Schimmellcultures, 6th, -389 p.
- Sanchez-Amat, A. et F. Solano. (1997).** A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonasp* shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 240: 787-792
- Sanchez, C. (2009).** Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.*, 27(2), 185-94.
- Sandhu, D.K., Arora, D.S. (1985).** Laccase production by *Polyporus sanguineus* under different nutritional and environmental conditions. *Experientia* **41**, 355–356. <https://doi.org/10.1007/BF02004501>
- Sandhu. S.K., Oberoi. H.S., Babbar. N., Miglani. K., Chadha. B.S., Nanda. D.K. (2013).** Two-Stage Statistical Medium Optimization for Augmented Cellulase Production via Solid-State Fermentation by Newly Isolated *Aspergillus niger* HN-1 and Application of Crude Cellulase Consortium in Hydrolysis of Rice Straw. *J. Agric. Food Chem.* 61. 12653–12661.
- Saparrat M.C.N., Guillén F., Arambarri A.M., Martínez A.T. and Martínez M.J. (2002).** Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4): 1534-1540.
- Saucedo-Castaneda. G. (1991).** Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castellii* cultivé sur support solide. Thèse doctorat. Université Montpellier II. France. 213.
- Savitha S. Desai., Gururaj B. Tennali., Nityanand Channur., A. C. Anup., Gouri** Microscopie, méthodes d'examen, colorations. p. 35 – 71
- Scheller, H. V., &Ulvskov, P. (2010).** Hemicelluloses. *Plant Biology*, 61(1), 263.
- Shahzadi, T., Mehmood, S., Irshad, M., Anwar, Z., Afroz, A., Zeeshan, N., Sughra, K. (2014).** Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. *Advances in Bioscience and Biotechnology*.

- Shabtay A., Hadar Y., Eitam H, Bros A., Orlov A., Izhaki I., Kerem Z., Tadmor Y. (2009).** The potential of Pleurotus-treated olive mill solid waste as cattle feed. *Bior. Technol.* 100: 6457–6464.
- Shin K.S. (2004).** The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent. *J. Microbiol.* 42:37–41.
- Singhania, R. R. (2009).** Cellulolytic enzymes. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 371-381). Springer Netherlands.
- Soudham, V. P. (2015).** Biochemical conversion of biomass to biofuels: pretreatment–detoxification hydrolysis–fermentation. (Thèse de doctorat). Université d’Umeå, Suède.
- Stasinakis S., Irene E., Anastasios V., Petalas C., Halvadakis P. (2008).** Removal of total phenols from olive-mill wastewater using an agricultural by-product, olive pomace, *J. Hazard. Mater.* 160 : 408-413.
- St-Germain, G et Summerbell, R. (1996).** Champignons filamenteux d'intérêt médical. Caractéristiques et identification. -314 p. Belmont, Star Publishing Company.
- Sun H., Ge X., Hao Z., Peng M. (2010).** Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. *African J. Biotech.* 9. 2 : 163-166.
- Tadao Oikawa., Yasuyuki Tsukagawa et Kenji Soda. (1998).** Endo-βGlucanase Secreted by a Psychrotrophic Yeast : Purification and Characterization, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62:9, 1751-1756.
- Taiz, L., et Zeiger, E. (2010).** *Plant physiology*. Sinauer Associates, Incorporated.
- Takahashi, N. & Koshijima, T. (1988).** Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenate*) wood. *Wood Science and Technology*, 22, 231-241.
- Tao. Y.M., Zhu. X.Z., Huang. J.Z., Ma. S.J., Wu. X.B., Long. M.N., Chen. Q-X. (2010).** Purification and Properties of Endoglucanase from a Sugar Cane Bagasse Hydrolyzing Strain. *Aspergillus glaucus* XC9. *J. Agric. Food Chem.* 58(10). 6126–6130.
- Terebiznik. M.R., Pilosof. A.M.R. (1999).** Biomass estimation in solid state fermentation by modeling drymatter weight loss. *Biotechnology Techniques.* 3 (13). 215-219. *Chaetomium* sp. isolated from books and archives
- Thomas L., Joseph A., Arumugam M., Pandey A. (2013).** Production, purification, characterization and over expression of xylanase from actinomycetes. *Ind J Exp Biol* 51:875–884.
- Thurston, C.F. (1994).** The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19–26.
- Tilly G. 2010.** Pectines. *Techniques de l'ingénieur* 1-11.



- Tomsikova, A. (2002).** Causative agents of nosocomial mycoses. *Folia Microbiol (Praha)*. 47[2], 105-112
- Topal H., Atimtay A.T., Durmaz A. (2003).** Olive cake in a circulating fluidized bed. *Fuel* .82: 1049-1056.
- Várnai, A. (2012).** Improving enzymatic conversion of lignocellulose to platform sugars. VTT Science. (Thèse de doctorat). Université de Helsinki, Christchurch, Nouvelle Zélande, Finlande.
- Varshney, V. K., et Naithani, S. (2011).** Chemical functionalization of cellulose derived from nonconventional sources. In *Cellulose Fibers: Bio-and Nano-Polymer Composites* (pp. 43-60). Springer Berlin Heidelberg.
- Viniegra-Gonzalez, G. et Favela-Torres, E. (2006).** Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? *Food Tech. Biotech.*44:397–406.
- Vollenweider, R.A. (1968).** Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors of eutrophication. *O.C.D.E. Paris*.
- Walsh, T. J. and Groll, A. H. (1999).** Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl.Infect Dis.* 1[4], 247-261.
- Wan, C., Li, Y. (2010).** Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme Microb. Technol.*, 47(1-2), 31-36.
- Wan, C., Li, Y. (2012).** Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Adv.*, 30(6), 1447-57.
- Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R., Pickard, M.A. (2002).** Purification, Characterization, and Chemical Modification of Manganese Peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Curr. Microbiol.*, 45(2), 77-87.
- Wanmolee W., Sornlake W., Rattanaphan N., Suwannarangsee S., Laosiripojana N., Champreda V. (2016).** Biochemical characterization and synergism of cellulolytic enzyme system from *Chaetomium globosum* on rice straw saccharification. *BMC Biotechnol* 16(1):1–12.
- Wanwitoo Wanmolee., Warasirin Sornlake., Nakul Rattanaphan., Surisa Suwannarangsee., Navadol Laosiripojana et Verawat Champreda. (2016).** Biochemical characterization and synergism of cellulolytic enzyme system from *Chaetomium globosum* on rice straw saccharification. JGSEE, King Mongkut’s University of Technology Thonburi, Bangkok.

- Wen X., Jia Y., Li J. (2009).** Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*-a white rot fungus. *Chemosphere*.75 : 1003–1007.
- Weng. X.Y., Sun. J.Y. (2006).** Kinetics of biodegradation of free gossypol by *Candida tropicalis* in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 32 (3) . 226-232.
- Wertz, J-L. (2010).** LA LIGNINE. Note de synthèse (22 novembre 2010).p 19-20.
- Widsten P., Kandelbauer A. (2008).** Laccase applications in the forest products industry : a review. *Enzym. Microb. Technol.* 42:293–307.
- Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B. and Massy-Westropp R.A. (1982).** Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry*, 21, 8.
- Windeisen, E., and Wegener, G. (2009).** Significance, Analysis and Potential of Utilization of Extractives from Wood: Different Aspects and Examples. *Mater. Sci. Forum* 599, 79–106.
- Wong, D. W. S. (2009).** Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157, 174–209.
- Xu, J. K., Sun, Y. C., Xu, F., & Sun, R. C. (2013).** Characterization of hemicelluloses obtained from partially delignified Eucalyptus using ionic liquid pretreatment. *BioResources*, 8(2), 1946-1962.
- Xun Liu. (2015).** Valorisation énergétique de la biomasse lignocellulosique par digestion anaérobie : Pré traitement fongique aérobie. *Microbiologie et Parasitologie*. INSA de Lyon.
- Yacoub Y. (1997).** Valorisation des sous-produits. *L'investisseur agricole*. 19 : 17-18.
- Zareb, A. (2014).** Contribution à l'étude des mycoendophytes foliaires du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) de dayata Aiat (Timzerth, Laghouat, Algérie). Mémoire de Magister en science Agronomique. Université Mouloude Mammerride tizi ouzou, 143p.
- Zhou J., Wang Y. H., Chu J., Luo L. Z., Zhuang Y. P. et Zhang S. L. (2009).** Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam- exploded corn stover by statistically designed experiments. *Bior. Technol.* 100 : 819-825.
- Zhou, L., Wang, J., Wang, K., Xu, J., Zhao, J., Shan, T., et Luo., C. (2012).** Secondary Metabolites with Antinematodal Activity from Higher Plants. *Studies in Natural Products Chemistry*, 37, 67-114.

# *Annexes*

## Annexe 1 : Milieux de culture

### 1.1- Milieu Sabouraud

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Sabouraud .....     | 63g    |
| Agar .....          | 14g    |
| Eau distillée ..... | 1000mL |

pH= 6 ± 0.2

Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

### 1.2- Milieu CMC

|  |        |
|--|--------|
| Extrait de levure .....  | 0.1g   |
| CMC .....  | 20g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                              | 1g     |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O .....                         | 0.001g |
| C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> ..... | 5g     |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....                         | 0.5g   |
| Agar .....   | 17g    |
| Eau distillée .....  | 1000mL |

Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

### 1.3- Milieu XMB

|  |        |
|--|--------|
| Extrait de levure.....   | 0.1g   |
| Xylane .....   | 40g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                              | 1g     |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O .....                         | 0.001g |
| C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> ..... | 5g     |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....                          | 0.5g   |
| Agar.....  | 17g    |
| Eau distillée.....   | 1000mL |

Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

**Complément : 0.25% w/v Lugol.**

**1.4- Milieu LMBG**

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Peptone .....                         | 3g      |
| Glucose.....                          | 10g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 0.6g    |
| ZnSO <sub>4</sub> .....               | 0.001g  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 0.4g    |
| FeSO <sub>4</sub> .....               | 0.0005g |
| MgSO <sub>4</sub> .....               | 0.5g    |
| MnSO <sub>4</sub> .....               | 0.05g   |
| Agar.....                             | 17g     |
| Eau distillée .....                   | 1000mL  |

pH= 6 ± 0.2 à 25°C additionné de 0.02% du Gaïacol

Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

**Annexe 2 : Réactifs et tampons****2.1- Rouge Congo à 0.1%**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Rouge Congo .....   | 1g     |
| Eau distillée ..... | 1000mL |

**2.2- Solution NaCl (1M)**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| NaCl .....          | 38g    |
| Eau distillée ..... | 1000mL |

**2.3- Réactif DNS (acide dinitrosalicylique)**

|  |        |
|--|--------|
| DNS .....  | 10g    |
| NaOH .....   | 16g    |
| KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O ..... | 300g   |
| Eau distillée .....  | 1000mL |

- **Protocole de préparation**

Dans un bécher de 1000ml, On fait la dissolution de 10g d'acide 3,4-dinitrosalicyclique dans 200mL d'eau distillée. Puis, avec agitation, on ajoute lentement la solution de 16g NaOH dissoute dans 150ml d'eau distillée.

- Le mélange doit être incubé à 50°C sous agitation pour obtenir une solution limpide.
- Ajouter de 300g de tartrate de Sodium et de Potassium ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) en petites portions.
- Filtration du mélange par un papier filtre en papier puis compléter le volume à 1000mL avec de l'eau distillée.

La conservation se fait dans une bouteille en verre sombre à une température inférieure à 20°C.

#### 2.4- Tampon citrate-Phosphate (0.1M) / pH= 4.8

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Acide citrique .....            | 23g    |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ..... | 14.2g  |
| Eau distillée .....             | 1000mL |

#### 2.5- Tampon citrate-Phosphate (0.05M) / pH= 6.5

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Acide citrique .....            | 11.5g  |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ..... | 7.1g   |
| Eau distillée .....             | 1000mL |

### Annexe 3 : Courbes d'étalonnage

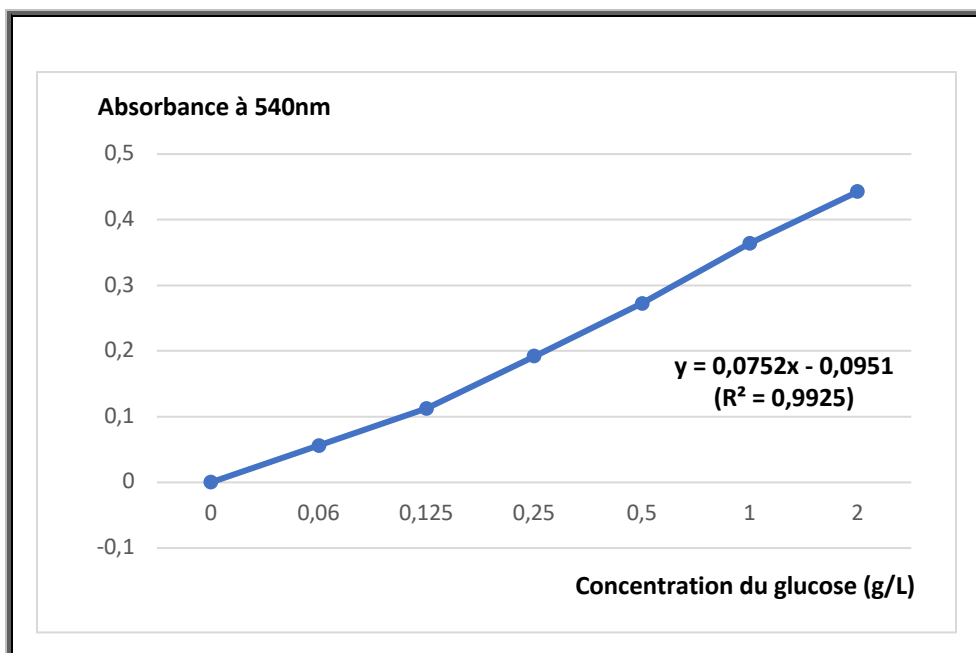


Figure 31 : Courbe d'étalonnage du dosage du Glucose (CMC ase).

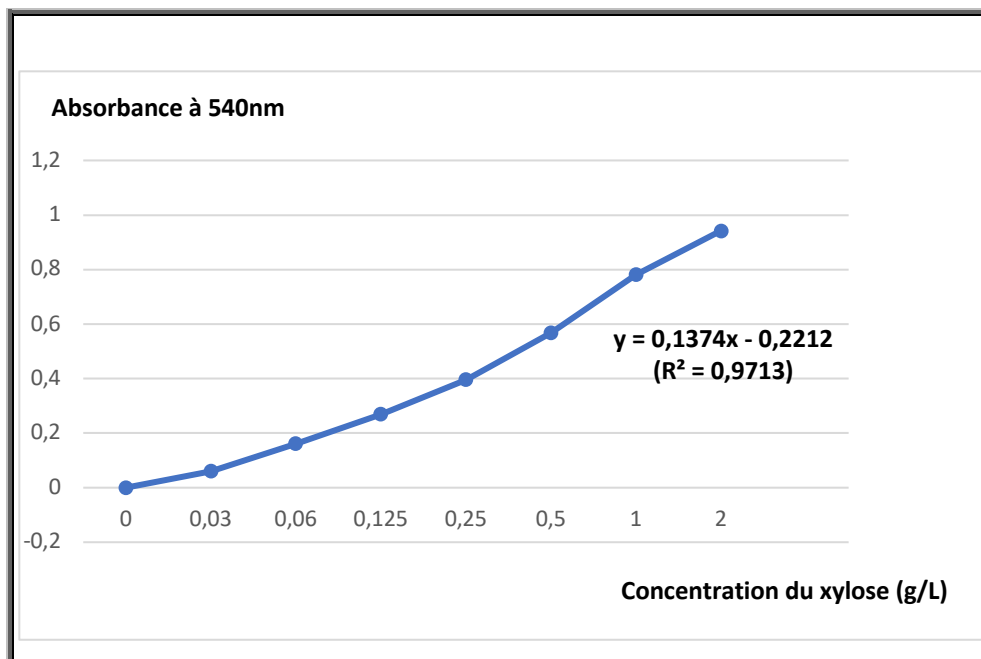


Figure 32 : Courbe d'étalonnage du dosage du xylose (xylanase).

|  |   |
|--|---|
| <b>Nom et Prénom :</b> SIHAMDI Nouha   | <b>Date de soutenance :</b> / 09 / 2020 |
| <b>Thème : Valorisation de grignon d'olive comme support pour la production de métabolites d'intérêt par des isolats microbiens</b>  |   |
| <p><b>Résumé</b></p> <p>Ce travail se focalise sur la mise en évidence des activités cellulasiques et xylanasiques produites sur milieu à base de grignon d'olive, chez une souche fongique appartenant au genre <i>Chaetomium</i>, fournie par le Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Frères Mentouri Constantine, situé à Chaabarsas. Pour ce faire, une étude de la morphologie du microorganisme utilisé et son aptitude à produire, sur milieux génériques, des enzymes extracellulaires a été réalisée ; suivie par une préparation et analyse du grignon d'olive brut, récolté d'une huilerie située à la ville d'ElMilia (Jijel). La production des enzymes à activités cellulasiques et xylanasiques par le champignon filamenteux <i>Chaetomium sp.</i> cultivé sur le grignon d'olive à 71.83% d'humidité, en fermentation solide, a donné un développement mycélien rapide corrélé avec la production de la xylanase et de la cellulase (endoglucanase). Les activités maximales ont été mesurées durant le deuxième et le troisième jour et estimées à 195.6 UI/mL et 272,9 UI/mL, respectivement. Ce résultat ouvre la voie sur la valorisation de grignon d'olive, considéré jusqu'ici comme déchet oléicole solide sans intérêt, pour la production de métabolites d'intérêt par différents microorganismes. Cette production peut être améliorée par l'optimisation de facteurs de fermentation et de conditions de culture.</p> |   |
| <p><b>Mots clés :</b> Grignon d'olive, <i>Chaetomium sp.</i>, enzymes ligno-cellulolytiques, milieux de fermentation, optimisation.</p>  |   |
| <p><b>Laboratoire de Recherche :</b> Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies, et de l'activité Microbienne (LaMyBAM), Département de Biologie Appliquée. Faculté des sciences de la Nature et de la Vie. Université Frères Mentouri Constantine.</p>  |   |
| <p><b>Jury d'évaluation :</b></p> <p><b>Présidente de Jury :</b> Mme BELLIL Ines (Prof. UFM Constantine1).</p> <p><b>Rapporteur :</b> Mr KACEM CHAOUICHE Noredine (Prof. UFM Constantine1).</p> <p><b>Examinatrice :</b> Mme NEMOUCHI Sara (MCB. UFM Constantine1).</p> <p><b>Tuteur :</b> Mr MANSOUR Mehdi (Doctorant. UFM Constantine1).</p>   |   |