

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire
Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie**

Intitulé :

**Contribution à l'étude de la production de cellulase
levurienne par fermentation en milieu solide à base de
déchets d'agrumes.**

Présenté par :

Soutenu le : 23/09/2021

**BENSALEM Ouassim
HORCHI Dalila**

Jury d'évaluation :

Présidente: DAKHMOUCHE S. M.C.A. Ecole Normale Supérieure Assia Djebar - Constantine

Encadreur : LABBANI F-Z. K. M.C.B. Ecole Normale Supérieure Assia Djebar - Constantine

Examinatrice: BENNAMOUN L. M.C.B. Université Frères Mentouri - Constantine 1.

Année Universitaire : 2020-2021

Remerciements

Je remercie Dieu Tout-Puissant, pour sa bénédiction sans fin, ses connaissances et sa force qui rendent ce travail possible.

Mes remerciements s'adressent à notre encadreur, l'enseignante Dr. LABBANI Fatima Zohra Kenza, M.C.B à l'ENSC, pour avoir accepté de diriger ce travail. Son soutien, ses compétences et sa clairvoyance nous ont été d'une aide inestimable.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à Dr. DAKHMOUCHE Scherazad. M.C.A, à l'ENSC et Dr. BENNAMOUN L. M.C.B à l'Université Frères Mentouri - Constantine 1.

Dédicaces

A mon père Youcef et ma mère Yamina pour leur amour inestimable, leurs sacrifices, leur confiance, leur soutien et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.

mes adorables soeurs & frères : Nora, Soraya, Fatima, Cherif, Lamia, Abd-elbaki, Ilhem, Samira, Ahlem, Zakaria, Salma, et Zaineb, et à tous mes neveux et nièces pour leur tendresse, leur complicité et leur présence, Aussi, je le dédie à mes amis les plus grandes sources de mon bonheur, Nesrine, Ikram, Karima et sa tante Sofia, Anisa et Brahim.

Merci pour votre soutien.

Dalila

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes chers parents : Salim & Fatime el Zohra

Mes adorables soeurs & frères : Ahmed, Mouhamed et Nour El

Houda

Merci pour votre soutien.

Ouassim

Résumés

Résumé

L'objectif principal de ce mémoire est l'étude de la production de cellulase levurienne par fermentation en milieu solide (FMS) à base de déchets d'agrumes. Les écorces d'agrumes contiennent des sucres fermentescibles, y compris le glucose, le fructose et le saccharose, ainsi que des polysaccharides insolubles, de la pectine et de la cellulose avec de faibles niveaux de composants non fermentescibles tels que la lignine. Elles constituent donc un substrat bien étudié pour la production d'enzymes et en particulier les cellulases à la FMS. La FMS fait référence à la fermentation microbienne, qui se déroule en l'absence ou la quasi-absence d'eau libre. Les cellulases produites par les levures sont actives dans une large gamme de pH et à haute température. De plus, elles présentent un degré raisonnable de stabilité au pH et à la température. Ces propriétés les rendent adaptées aux processus biotechnologiques. Le prétraitement chimique des écorces d'agrumes avec l'acide sulfurique ou le NaOH est essentiel pour éliminer la lignine et l'hémicellulose et exposer les fractions lignocellulosiques pour un accès facile aux cellulases pendant l'hydrolyse enzymatique et par conséquent améliorer le taux et le rendement des sucres réducteurs. La FMS utilisant des levures pour la production de cellulase ont été moins fréquemment rapportés. Néanmoins, on peut citer des souches de *Aureobasidium pullulans*, *Candida shehatae*, *C. tropicalis*, *Pachysolan tannophilus*, *Pichia stipitis* et *Saccharomyces cerevisiae*. Le milieu de fermentation à base d'écorces d'agrumes (humidifiés à 50 ou 80%) est incubé avec la suspension levurienne (DO = 1.0) à 30°C pendant 72h. L'extrait enzymatique brut est obtenu après addition du tampon citrate sodium (50 mM, pH 4.8) puis incubation (1h, sous agitation 100 rpm) et centrifugation pendant 20 minutes à 3000xg. Les activités cellulolytiques (activité papier filtre et activité carboxyméthylcellulase) sont déterminées par la méthode de Miller (1959) en utilisant le réactif acide dinitrosalicylique (DNS).

Les cellulases présentent une cible pour les recherches aussi bien académiques ou industrielles. Leur intérêt s'est développé à travers le monde, en raison de leurs applications industrielles multiples : l'industrie des pâtes et papier, des textiles, des biocarburants, aussi dans l'extraction de jus de fruits et légumes.

Mots clés : Levures, production, cellulase, écorces d'agrumes, fermentation en milieu solide.

Abstract

The main objective of the present work is to study the yeast cellulase production by solid-state fermentation (SSF) using citrus waste. Citrus peels contain fermentable sugars, including glucose, fructose, sucrose, and insoluble carbohydrates, pectin and cellulose with low levels of non-fermentable components such as lignin. Citrus peels constitute a well-studied substrate for the production of enzymes, in particular cellulases in SSF. The SSF refers to microbial fermentation, which occurs in the absence or near absence of free water. Cellulases produced by yeasts are active in a wide range of pH and high temperatures. In addition, they have a reasonable degree of stability at pH and temperature. These properties make them suitable for biotechnological processes. The chemical pretreatment of citrus peels with sulphuric acid or NaOH is essential to remove lignin and hemicellulose and to expose lignocellulosic fractions for an easy access to cellulases during enzymatic hydrolysis and consequently to improve the rate and yield of reducing sugars. The SSF using yeasts for the production of cellulase were reported less frequently. However, we can mention strains of *Aureobasidium pullulans*, *Candida shehatae*, *C. tropicalis*, *Pachysolan tannophilus*, *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. The fermentation medium based on citrus peels (50 or 80% moisture) is incubated with the yeast suspension (OD = 1.0) at 30°C for 72 hours. The crude enzymatic extract is obtained after adding the sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8), incubation for 1h with shaking at 100 rpm and then centrifugation (20 min at 3000xg). Cellulolytic activities (filter paper activity and carboxymethylcellulase activity) are determined by Miller's method (1959) using dinitrosalicylic acid reagent (DNS). Cellulases present a target for both academic and industrial research. Their interest has developed around the world due to their multiple industrial applications: pulp and paper industry, textiles, biofuels, as well as the extraction of fruit and vegetable juices.

Keywords: Yeast, production, cellulase, citrus peels, solid-state fermentation.

الملخص

إن الهدف الرئيسي من هذه المذكرة هو دراسة إنتاج إنزيمات السيليلاز من طرف الخميرة بأسلوب تخمر الحالة الصلبة في وسط مكون من قشور الحمضيات. تحتوي قشور الحمضيات على سكريات قابلة للتخمر، بما في ذلك الجلوكوز والفركتوز والسكروز، إضافة إلى السكريات المتعددة الغير القابلة للذوبان، البكتين و السيليلوز مع مستويات منخفضة من المكونات غير القابلة للتخمر كاللجنين. وبالتالي تشكل قشور الحمضيات ركيزة جد مدروسة لإنتاج الإنزيمات، و خاصة إنزيمات السيليلاز بأسلوب تخمر الحالة الصلبة. يشير تخمر الحالة الصلبة إلى التخمر الميكروبي، الذي يحدث في غياب أو شبه غياب الماء الحر. تنشيط إنزيمات السيليلاز المنتجة من قبل الخميرة على نطاق واسع من درجة الحموضة (pH) وفي درجات حرارة عالية. بالإضافة إلى فإنها تملك استقرار حراري وثبات درجة الحموضة (pH) معقولين. هذه الخصائص تجعلها مناسبة في العمليات البيوتكنولوجية. تعتبر المعالجة الكيميائية لقشور الحمضيات باستعمال حمض الكبريتيك أو NaOH ضرورية لإزالة اللجنين والهيميسيليلوز وعرض الأجزاء اللجنوسيليلوزية لتسهيل وصول إنزيمات السيليلاز إليها أثناء التحلل المائي الإنزيمي، وبالتالي تحسين معدل ومردود السكريات المختزلة. إن أسلوب تخمر الحالة الصلبة المستعمل لفطريات الخميرة لأجل إنتاج إنزيمات السيليلاز قد تم التقرير عنه بشكل قليل في مختلف الدراسات. إلا أنه يمكننا سلاطات خميرة منها *Condida*، *Aureobasidium pullulans*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Pichia stipitis*، *Pachysolantannophilus*، *C. tropicalis*، *shehatae*. يتم حضن وسط التخمر المكون من قشور الحمضيات (50 أو 80% من الرطوبة) مع معلق الخميرة (كثافة الضوء = 1.0) عند 30°م مدة 72 ساعة. يتم الحصول على المستخلص الإنزيمي الخام بعد إضافة محلول منظم سترات الصوديوم (50 mM, pH 4.8) ثم الحضانة (مدة ساعة تحت التحريك 100 rpm) وعملية الطرد المركزي مدة 20 دقيقة عند 3000xg. يتم تحديد الأنشطة المحللة للسيليلاز (نشاط ورق الترشيح ونشاط الكربوكسيميثيل سيليلاز) بواسطة طريقة Miller (1959) باستخدام كاشف DNS. تمثل إنزيمات السيليلاز هدفاً لكل من البحوث الأكاديمية والصناعية. ولقد تطور اهتمامها في مختلف أنحاء العالم، نظراً لتطبيقاتها الصناعية المتعددة: صناعة اللب والورق، المنسوجات، الوقود الحيوي، فضلاً عن استخراج عصائر الفواكه والخضروات.

الكلمات المفتاحية: فطريات الخميرة، إنتاج، إنزيمات السيليلاز، قشور الحمضيات، تخمر الحالة الصلبة.

Table des matières

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumés

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 1

Chapitre I. Généralités sur les cellulases et les levures

I. Les cellulase

1. Définition de la cellulase.....	3
2. Nomenclature de la cellulase	3
3. Structure des cellulases	3
4. Mode d'action de cellulase	4
6. Origines des cellulases	6
6.1. Origine animale	7
6.2 Origine végétale	7
6.3 Origine microbienne	7

II. Les levures

1. Description des levures.....	8
2. Ecologie et habitat des levures	9
3. Caractéristiques morphologiques des levures.....	9
4. Classification des levures	9
5. Métabolisme des levures.....	11
6. Caractéristiques sexuelles des levures.....	12
7. Caractéristiques culturelles des levures.....	12
8. Applications biotechnologiques des levures.....	13

Chapitre II. Généralités sur les agrumes

1. Description morphologique et physiologique des agrumes	15
2. Production de déchets d'agrumes.....	16
3. Composition chimique globale des écorces d'agrumes	17
4. Production mondiale d'agrumes.....	19
5. Importance de l'agrumiculture en Algérie.....	19
6. Stratégie de valorisation des déchets d'agrumes.....	19
6.1. Huiles essentielles.....	19
6.2. Production de pectines.....	20
6.3. Protéines d'organismes unicellulaires (POU)	20
6.4. Antioxydants.....	20
6.5. Production de biocarburants.....	20
6.6. Production d'enzymes.....	21

Chapitre III. Production de cellulase par FMS à base de déchets d'agrumes

1. La fermentation en milieu solide	22
1.1. Définition de la fermentation en milieu solide.....	22
1.2. Facteurs environnementaux et les paramètres de culture.....	22
1.2.1. Temperature.....	22
1.2.2. Humidité relative et l'activité de l'eau.....	22
1.2.3. Aération.....	23
1.2.4. pH.....	23
1.2.5. Biomasse.....	23
1.3. Applications de la FMS.....	24
2. Production de cellulase par FMS à base de déchets d'agrumes.....	25
2.1. Préparation des écorces d'agrumes.....	25
2.2. Traitement chimique des écorces d'agrumes.....	25
2.3. Levures utilisées pour la production de cellulases par FMS.....	25
2.4. Préparation de l'inoculum.....	25
2.5. Conduite de la fermentation en milieu solide.....	26
2.6. Extraction de l'enzyme.....	26
2.7. Dosage des activités cellulolytiques.....	26
2.7.1. Activité papier filtre (APF).....	27
2.7.2. Activité carboxyméthylcellulase (CMCase)	27

Chapitre IV. Applications industrielles des cellulases

1. Industrie des pâtes et papiers.....	29
2. Production de bioéthanol.....	29
3. Industrie du textile.....	30
4. Industrie de l'alimentation animale.....	31
5. Industrie de la transformation des aliments.....	31
6. Agriculture.....	32
Conclusion et perspectives	33
Références bibliographiques	35
Annexes	44

Liste des figures

Figure 01.(A): Illustration représentant les différents domaines dans la structure 3D des cellulases. (B): Représentation schématique de l'organisation multi-domaines des cellulases. EXG: Exoglucanase ; CBH II : Cellobiohydrolase II ; EG B: Endoglucanase B.....	04
Figure 02. Hydrolyse de la cellulose par les trois types de cellulases : l'endoglucanase, la cellobiohydrolase et la β -glucosidase.....	05
Figure 03. Mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par la cellulase. Asp : Acide aspartique en position 201 de la séquence de l'enzyme. Glu : Acide glutamique en position 555 de la séquence de l'enzyme.....	06
Figure 04. Structure générale d'une cellule de levure.....	08
Figure 05. Cycle de reproduction asexuée et sexuée d'une levure à ascospore.....	12
Figure 06. Schéma détaillant la structure du péricarpe de l'orange.....	16
Figure 07. Principaux déchets résultant du pressage des agrumes.....	17
Figure 08. Exemple de courbes étalons de glucoses réalisés pour la détermination de l'APF (a) et l'activité CMCase (b)	27
Figure 09. Transformation de la biomasse végétale en bioéthanol. La cellulose est le polysaccharide le plus abondant dans la paroi cellulaire végétale et il constitue une source potentielle des sucres fermentescibles. Son traitement par des cellulases conduit à la libération des sucres simples (glucose). Le glucose est utilisé pour produire le bioéthanol.....	30
Figure 10. Différentes applications des cellulases en industrie alimentaire.....	32

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification de Kreger-Van des levures.....	10
Tableau 02. Produits industriels produits par les levures.....	13
Tableau 03. Quelques enzymes industrielles produites par les levures.....	14
Tableau 04. Composition chimique globale des écorces de différentes variétés d'agrumes.....	17
Tableau 05. Principaux domaines d'applications de la FMS	24

Liste des abréviations

CBD : Cellulose Binding Domain

CO₂ :Dioxyde de carbone

POU : Protéines d'organismes unicellulaires

FMS : Fermentation en milieu solide

FML : fermentation en milieu liquide

SDA: Sabouraud's Dextrose Agar

SDB: Sabouraud's Dextrose Borth

YEP: Yeast extract Peptone

DNS: dinitrosalicylique

CMCase: Carboxyméthylcellulase

APF: Activité papier filtre

Introduction

Introduction

Au cours des dernières années, il existe une demande croissante d'enzymes d'intérêt industriel. Ainsi, les cellulases occupent la troisième place mondiale dans l'industrie des enzymes. L'intérêt des cellulases s'est développé à travers le monde, en raison de leurs applications industrielles multiples telles que l'industrie du papier et de la pâte, des textiles, des biocarburants, aussi dans l'extraction de jus de fruits et légumes. En outre, les cellulases étaient commercialement valables pour plus de 30ans, et présentent une cible pour les recherches aussi bien académiques ou industrielles (Bahouli et Zidalmal, 2020). Ce sont un groupe complexe d'enzymes sécrétées par un large éventail de micro-organismes, notamment des champignons filamenteux, des bactéries et des levures (Sandhya *et al.*, 2005 ; Khelil, 2017).

De nos jours, les cellulases produites par des levures gagnent en intérêt, car elles sont actives dans une large gamme de pH et à haute température (Touijer, 2019). En effet, les levures sont des acteurs essentiels intervenant dans plusieurs domaines. Elles constituent un groupe important et hétérogène de microorganismes qui suscitent actuellement un intérêt grandissant de la part des scientifiques et des différents acteurs des secteurs bioalimentaire et médical (Labrani, 2015). En outre, la production d'enzymes par les levures confère plusieurs avantages car elles sont faciles à cultiver et à manipuler par rapport aux bactéries. De plus, les levures se développent dans une variété de milieux et elles ont un grand avantage en raison de leur robustesse avec une large gamme de tolérance physico-chimique (Khelil, 2017).

D'autre part, plusieurs travaux dans la littérature (Li *et al.*, 2016; Sagar *et al.*, 2018 ; Shariq et Sohail, 2019) ont rapportés l'utilisation des déchets agro-industriels tels que les écorces des fruits (écorces de pommes, de mangue, de bananes et d'agrumes) comme substrat de fermentation pour la production d'enzymes. Parmi eux, les écorces d'agrumes constituent environ 50 % du poids total des fruits, mais elles ne présentent aucune importance économique. Elles sont largement utilisées comme aliment pour le bétail ou rejetées dans la nature sans aucun traitement. En effet, les écorces d'agrumes contiennent des sucres fermentescibles, y compris le glucose, le fructose et le saccharose, ainsi que des polysaccharides insolubles, de la pectine et de la cellulose avec de faibles niveaux de composants non fermentescibles tels que la lignine. Elles constituent donc un substrat bien étudié pour la production d'enzymes à l'état solide et en fermentation en milieu liquide (FML) (Shariq et Sohail, 2019).

L'intérêt pour la fermentation en milieu solide (FMS) a augmenté en fonction du développement d'applications pour la production de divers métabolites (Try, 2018). En se basant sur les études antérieures, des cellulases peuvent être produites par FMS avec un rendement qui peut être plus élevé qu'en FML (Shariq et Sohail, 2019; Bahouli et Zidalmal, 2020). En outre, les autres intérêts de la FMS sont la taille du réacteur plus petit qu'en FML, une consommation d'énergie moins élevée, l'absence de résidu liquide, et le bon contrôle des facteurs environnementaux (Try, 2018 ; Bahouli et Zidalmal, 2020).

Tous ces avantages et privilèges ont stimulé notre intérêt à mener une étude la production des cellulases par des levures cultivées par fermentation sur milieu solide à base de déchets d'agrumes. Le premier chapitre présente des généralités sur les cellulases et les levures. Le deuxième chapitre est consacré aux déchets d'agrumes. Le troisième chapitre porte sur la production de cellulases levuriennes par fermentation en milieu solide à base de déchets d'agrumes.

Chapitre I :

Généralités sur les cellulases et les levures

I. Les cellulases

1. Définition des cellulases

Les cellulases [1,4-(1,3; 1,4) - β -D-glucanohydrolase] font référence à un groupe d'enzymes qui travaillent ensemble pour hydrolyser la cellulose en sucre simples. C'est l'un des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases, un système enzymatique complexe composé de trois types d'enzymes principales:

- Endo- β -(1,4)-glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4),
- Exo- β -(1,4)-glucanase ou cellobiohydrolase (CBH) (EC 3.2.1.91),
- β -(1,4)-glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) (Reffas, 2017)

2. Nomenclature des cellulases

Nom codifié : E.C.3.2.1.4

Nom systématique : 1,4-(1,3 ; 1,4)- β -D-Glucan 4-glucanohydrolase.

Nom recommandé : Cellulase.

Synonymes : Endoglucanase, Endo- β -(1,4)-glucanase, Cellulase carboxyméthylrique, β -(1,4)-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase, etc. (Reffas, 2017)

3. Structure des cellulases

Les cellulases ont des propriétés structurelles et physico-chimiques différentes selon leur origine. La majorité des cellulases microbiennes étudiées étaient des protéines acides avec des niveaux de glycosylation élevés. La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines avec un niveau élevé d'acides aminés acides, plutôt que des métalloprotéines (Bahouli et Zidalmal; 2020). Elles ont une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels : le site catalytique et le site de liaison au substrat ou CBD pour « *Cellulose Binding Domain* » (Figure 01). Le CBD existe sous forme domaine simple, double ou triple et il pourrait être situé dans l'extrémité C-terminale (terminaison carboxyle) ou N-terminale (terminaison amine) de la protéine. Le CBD est connecté au domaine catalytique via un peptide riche en proline et thréonine, appelé "Linker" (Lakhundi *et al*; 2015).

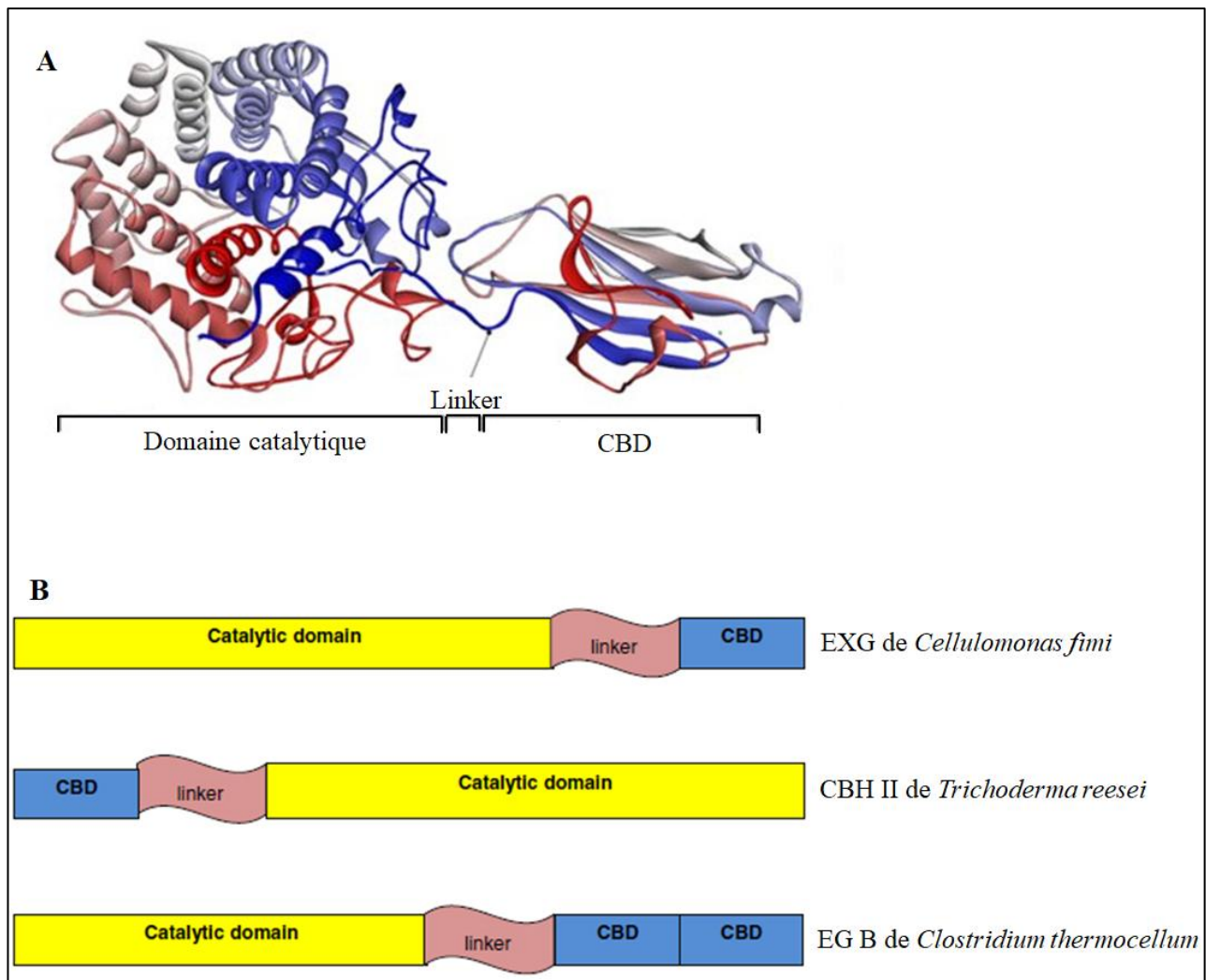


Figure 01. (A) : Illustration représentant les différents domaines dans la structure 3D des cellulases (Pirich et al. 2020). (B) : Représentation schématique de l'organisation multi-domaines des cellulases. EXG : Exoglucanase ; CBH II : Cellobiohydrolase II ; EG B : Endoglucanase B (Lakhundi *et al.* 2015).

4. Mode d'action des cellulases

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose est un processus complexe qui nécessite la participation de nombreuses enzymes (Lynd *et al.* ; 2002). La dégradation enzymatique de la cellulose en D-glucose exige l'action synergique de trois classes des cellulases : l'exo- β -(1,4)-D-glucanase, l'endo- β -(1,4)-D-glucanase et la β -D-glucosidase. Chacune de ces enzymes ne peut pas hydrolyser seule le complexe de la cellulose cristalline efficacement, mais en travaillant en synergie avec d'autres types de cellulases elle peut augmenter le taux d'hydrolyse de manière significative.

- Les endo- β -(1,4)-D-glucanases ou les endocellulases hydrolysent les zones amorphes de la chaîne de cellulose. Elles attaquent les liaisons β -(1,4)-D-glycosidiques en interne de la cellulose (endohydrolyse).
- Les cellobiohydrolases ou les exo- β -(1,4)-glucanases vont hydrolyser les zones cristallines. Elles libèrent du cellobiose à partir des extrémités non réductrices ou des extrémités réductrices du polymère de cellulose selon la spécificité de l'enzyme.
- Les β -(1,4)-D-glucosidases ou les cellobiases hydrolysent le cellobiose en libérant des unités simples de β -D-glucose (Figure 02) (Badrana, 2017).

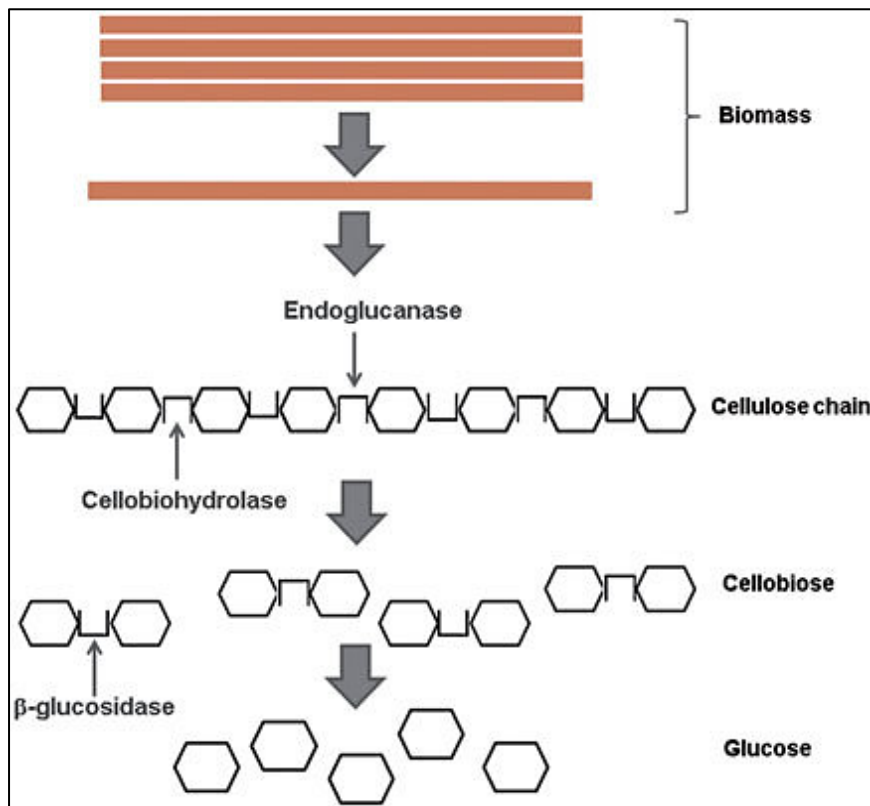


Figure 02. Hydrolyse de la cellulose par les trois types de cellulases : l'endoglucanase, la cellobiohydrolase et la β -glucosidase (Pulgar et Saadin, 2013).

5. Mécanisme d'action des cellulases

Les cellulases ont un mécanisme d'action acide/base, qui nécessite un donneur de protons et une base nucléophile. Dans la plupart des cas, les glycosides utilisent la catalyse acide-base pour cliver les liaisons glycosidiques. L'hydrolyse est catalysée par deux résidus catalytiques de la cellulase : un acide général et un nucléophile ou une base. La configuration anomérique est soit

inversée, soit conservée pendant l'hydrolyse (Bahouli et Zidalmal, 2020). Dans la première étape de réaction, la base nucléophile cible le noyau anomérique du substrat. Dans la seconde étape réactionnelle, le donneur de protons (un premier acide aminé de la cellulase) protonise l'oxygène de la liaison osidique, permettant le clivage de la liaison C1-O et la libération du premier fragment du substrat. Cependant, un deuxième acide aminé de l'enzyme chargée négativement, qui enlève un hydrogène d'une molécule d'eau et forme un groupe hydroxyle (OH⁻), qui agit comme un nucléophile sur un carbone d'une molécule de glucose, stabilisera l'autre fragment, qui est instablement attaché à l'enzyme. La liaison glycosidique est libérée et l'autre fragment du substrat (Hadjaz, 2020).

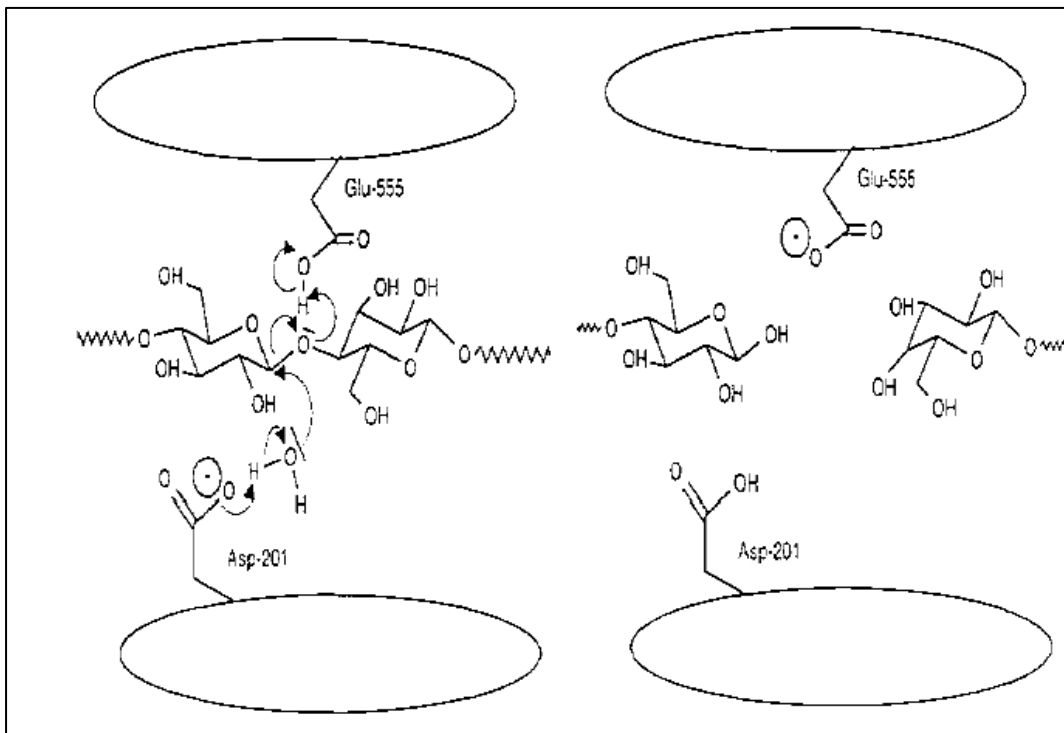


Figure 03. Mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par la cellulase. Asp : Acide aspartique en position 201 de la séquence de l'enzyme. Glu : Acide glutamique en position 555 de la séquence de l'enzyme (Leghlimi,2013).

6. Origines des cellulases

Les cellulases sont présentes dans un large spectre d'espèces, y compris les bactéries, les champignons, les plantes, les protozoaires, les vers, les mollusques, les insectes, etc. En conséquence, les cellulases peuvent provenir de diverses sources, y compris des sources animales, végétales et microbiennes (Benkerrou et Hamaili, 2012).

6.1. Origine animale

Malgré leur incapacité à créer des cellulases endogènes, de nombreuses espèces animales (omnivores et herbivores) utilisent la cellulose comme source d'énergie, mais cela est dû à la vie symbiotique des micro-organismes dans leur système digestif. En conséquence, seules quelques cellulases endogènes dans des organismes supérieurs ont été identifiées (Elhadi, 2019).

6.2. Origine végétale

Les cellulases jouent un rôle clé dans la maturation des fruits, où elles aident à libérer les arômes. La majorité de ces enzymes végétales sont obtenues en les extrayant des fruits. Les exoglucanases sont absentes des préparations de cellulose d'origine végétale. La production d'enzymes végétales, en revanche, est limitée par la disponibilité des matières premières (Sebti et Deghdak, 2018).

6.3. Origine microbienne

Les cellulases microbiennes sont principalement produites par les moisissures et les bactéries (Touijer, 2019). Elles sont capables de décomposer la cellulose et de libérer le CO₂ ainsi que des acides organiques comme l'acide formique, l'acide butyrique et l'acide acétique (Atek et Benouali, 2016).

Très peu de levures sont cellulolytiques. Néanmoins, Des souches appartenant aux genres : *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* ont été décrites comme des organismes producteurs de cellulases (Giese *et al.*, 2017). Les cellulases produites par les levures sont actives dans une large gamme de pH et à haute température. De plus, elles présentent un degré raisonnable de stabilité au pH et à la température. Ces propriétés les rendent adaptées aux processus biotechnologiques (Korish, 2003; Touijer, 2019).

II. Les levures

1. Description des levures

Les levures sont des champignons microscopiques dont la caractéristique commune est l'état permanent ou prédominant (Figure 04). Les levures sont des eucaryotes complètement différents des bactéries (appartenant aux procaryotes). Les levures sont résistantes aux antibiotiques, les sulfamides et autres agents antibactériens (Montes de Oca et al., 2016). Les levures sont des microorganismes non photosynthétiques, chimio-hétérotrophes, elles tirent donc leur nutrition de la dégradation de différentes substances organiques (Hencke, 2000). Le bourgeonnement est le mode de reproduction végétative le plus fréquent chez les levures (Figure 04). Un autre mode de reproduction végétative peut être rencontré : la fission, qui est caractéristique du genre *Schizosaccharomyces* (Labrani, 2015). Environ 1500 espèces de levures ont été découvertes jusqu'à ce jour (Phale, 2018). Les levures peuvent être identifiées et caractérisées selon différents critères basés sur la morphologie cellulaire (mode de division, forme des spores, etc.), la physiologie cellulaire (tests de fermentation des sucres, etc.), l'immunologie (comme l'immunofluorescence) et la biologie moléculaire (tel que le polymorphisme de longueur des fragments d'amplification). L'analyse des séquences moléculaire est de plus en plus utilisée par les taxonomistes pour catégoriser des nouvelles espèces (Walker, 2009).

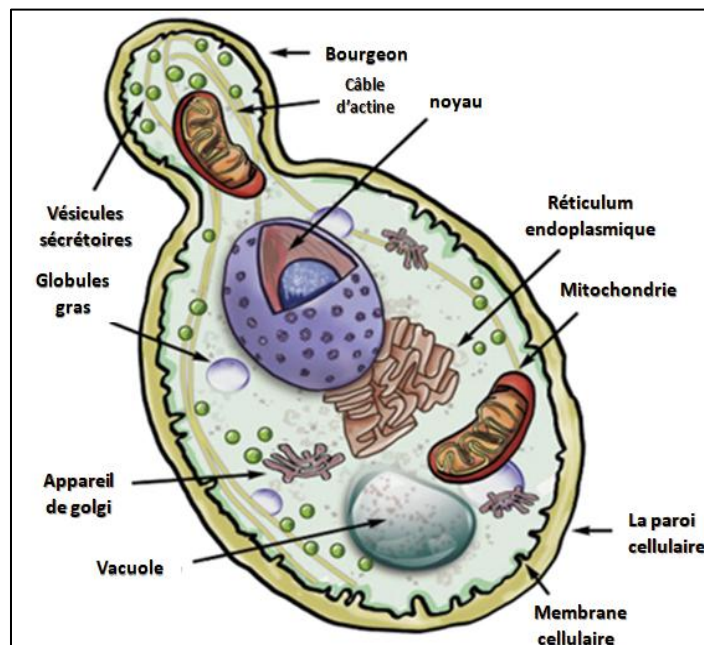


Figure 04. Structure générale d'une cellule de levure (Speers *et al.*, 2015).

2. Ecologie et habitat des levures

En écologie, les levures colonisent tous les milieux et sont donc des organismes ubiquitaires : à l'intérieur des êtres vivants, dans les eaux, dans l'air et dans le sol (Houcent, 2015). Les tissus végétaux et les milieux riches en sucres tels que les fruits murs, les feuilles, les fleurs, le miel et les sirops constituent l'habitat préféré des levures (Walker, 2009 ; Houcent, 2015). Cependant, quelques espèces se sont trouvées en relations symbiotiques ou parasitaires avec les animaux. Certaines levures comme l'espèce *Candida albicans*, sont des pathogènes opportunistes de l'homme. De nombreuses espèces levuriennes peuvent être isolées à partir d'environnements extrêmes, tels que les milieux à faible potentiel hydrique (fortes concentrations de sucre ou de sel), les basses températures (ex., les levures psychrophiles isolées des régions polaires) et la faible disponibilité en oxygène (ex., le tractus intestinal des animaux) (Walker, 2009).

3. Caractéristiques morphologiques des levures

La morphologie des levures est d'une grande importance taxonomique. Elle est sphérique, ovoïde, globuleuse, cylindrique, ellipsoïde, allongée, apiculée, ogivale, triangulaire ou en forme de bouteille (Labbani, 2016). Le diamètre d'une cellule de levure est environ 5-10 μ m, elle est donc grande qu'une cellule bactérienne (entre 0.5-5 μ m) (Montes de Oca *et al.*, 2016).

La paroi cellulaire des levures présente une structure rigide avec une épaisseur de 100-200nm et constitue environ 25% du poids sec total de la cellule. Le cytoplasme des levures est un fluide colloïdal légèrement acide aqueux contenant des protéines, des glycoprotéines, des macromolécules ainsi que des grandes entités macromoléculaires (ribosomes, protéasomes, etc.) et des particules lipidiques (Tofalo et Suzzi, 2017).

Les levures sont classées comme eucaryotes car elles ont un noyau et des chromosomes distincts dont la taille et le nombre varie d'une espèce à l'autre. La cellule de levure contient également des organites intracellulaires entourés de membranes individuelles tels que l'appareil de Golgi, les mitochondries, le réticulum endoplasmique et les vacuoles (Figure 04) (Speers *et al.*, 2015; Tofalo et Suzzi, 2016).

4. Classification des levures

La classification de référence pour les levures est celle de Kreger-Van (1984) qui présente des changements importants par rapport à la classification de Lodder (1971). Les nouveaux critères de classification (la composition en bases azotées de l'ADN, la structure de la paroi et le type de coenzyme Q) sont pris en compte pour permettre des études plus rigoureuses. Cette classification

répertorie 60 genres et 500 espèces (Msahazi, 2015). Le tableau (1) démontre la classification des levures (Houcent, 2015).

Tableau 1. Classification de Kreger-Van des levures (Houcent, 2015).

Classes	Famille	Sous-famille	Genre
Ascomycètes	<i>Spermophthoraceae</i>		<i>Coccidiascus</i> <i>Pachysolen</i>
	<i>Saccharomycetaceae</i>		<i>Metschnikowia</i> <i>Pachyticospora</i>
		<i>Schizosaccharomycetoideae</i>	<i>Nematospora</i> <i>Pichia</i>
		<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>
		<i>Nadsonioideae</i>	<i>Hanseniaspora</i> <i>Saccharomycopsis</i>
			<i>Nadsonia</i> <i>Schwaniomyces</i>
			<i>Saccharomyces</i> <i>Sporopachydermia</i>
			<i>Wickerhamia</i> <i>Stephanoascus</i>
			<i>Lipomyces</i> <i>Torulaspora</i>
			<i>Ambrosiozyma</i> <i>Wickerhamiella</i>
			<i>Arthroascus</i> <i>Wingea</i>
		<i>Lipomycetoideae</i>	<i>Citeromyces</i> <i>Zygosacchromyces</i>
		<i>Saccharomycetoideae</i>	<i>Clavispora</i> <i>Hansenula</i>
			<i>Cyniclomyces</i> <i>Isstchenkia</i>
		<i>Debaryomyces</i> <i>Kluveromyces</i>	
		<i>Dekkera</i> <i>Lodderomyces</i>	
		<i>Guilliermondella</i>	
Basidiomycètes	<i>Filobasidiaceae</i>		<i>Chionosphaera</i>
	<i>Sirobasidiaceae</i>		<i>Filobasidiella</i>
	<i>Tremellaceae</i>		<i>Filobasidium</i>
			<i>Leucosporidium</i>
			<i>Rhodospidium</i>
			<i>Sporidiobolus</i>
			<i>Fibulobasidium</i>
			<i>Sirobasidium</i>
			<i>Holtermannia</i>
			<i>Tremella</i>
Deutéromycètes	<i>Cryptococcaceae</i>		<i>Aciculoconidium</i> <i>Rhodotorula</i>
			<i>Brettanomyces</i> <i>Sarcinosporon</i>
			<i>Candida</i> <i>Schizoblastosporion</i>
			<i>Cryptococcus</i> <i>Sterigmatomyces</i>
	<i>Sporobolomycetaceae</i>		<i>Kloeckera</i> <i>Sympodiomyces</i>
			<i>Malassezia</i> <i>Trichosporon</i>
			<i>Oosporidium</i> <i>Trigonopsis</i>
			<i>Phaffia</i> <i>Sporolomyces</i>
			<i>Bullera</i>

Les levures comprennent trois divisions : la division des Ascomycètes, la division des Basidiomycètes et la division des Deutéromycètes.

- **Les Ascomycètes** : sont des espèces à thalle produisant des spores de reproduction sexuée (ascospores) à l'intérieur de la cellule fertile nommée asque.

- **Les Basidiomycètes** : sont des espèces à thalle produisant des spores de reproduction sexuée (basidiospores) à l'extérieur de la cellule fertile nommée baside (Rapior et Fons, 2019).
- **Les Deutéromycètes** : sont un groupe de levures qui n'ont pas de mode connu de reproduction sexuée et ne se reproduisent que par voie végétative (Houcent, 2015).

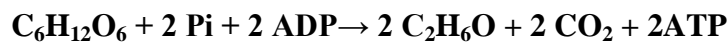
5. Métabolisme des levures

En tant qu'organismes chimio-organotrophes, les levures obtiennent du carbone et de l'énergie sous forme de composés organiques. Les sucres sont largement utilisés par les levures. Certaines de ces derniers peuvent bien se développer sur le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le saccharose et le maltose (Walker, 2009). Les levures métabolisent préférentiellement les sucres qui sont principalement convertis en éthanol et en dioxyde de carbone (CO₂), elles peuvent également utiliser des acides aminés et des acides organiques, des polyols, des alcools, des acides gras et d'autres substances. Le mécanisme générateur d'énergie des levures sont la respiration (métabolisme oxydatif) et la fermentation (métabolisme fermentaire). Ces deux voies débutent par le produit final de la glycolyse, la conversion du glucose en pyruvate (Tofalo et Suzzi, 2016).

La respiration ou « métabolisme oxydatif » correspond à l'oxydation complète du glucose en CO₂ en présence de l'oxygène (Hencke, 2000). La multiplication des levures nécessite cette voie métabolique. L'équation suivante représente le bilan énergétique de la respiration (Msahazi, 2015) :



La fermentation ou « métabolisme fermentaire » est l'oxydation incomplète du glucose (Hencke, 2000). En anaérobiose, les levures peuvent fermenter le glucose pour produire de l'éthanol et du CO₂ ainsi que du glycérol, des alcools, des aldéhydes, esters et certains acides organiques. L'équation suivante représente le bilan énergétique de la fermentation (Msahazi, 2015):



Les levures favorisent la respiration parce que son apport énergétique est plus élevé par rapport à celui de la fermentation. La plupart des organismes ne choisissent la voie fermentaire que lorsque la respiration est altérée (Al daccache, 2019).

6. Caractéristiques sexuelles des levures

Les caractéristiques sexuelles impliquent la présence d'asques et d'ascospores. Le mode de formation des asques est caractéristique des espèces haploïdes et homothalliques. Les ascospores sont présentes dans les asques, tel que le genre *Pichia*. Les genres des levures basidiomycètes montrent la formation de téliospores, tel que le genre *Rhodospordium*. Les spores sont à parois épaisses, souvent riches en lipides, peut-être fusceuses ou sphéroïdales (Phale, 2018).

La levure est le plus souvent diploïde, peut être entrée en méiose et forme des spores haploïdes. Les levures haploïdes adoptent l'un des deux types sexuels possibles, le type a ou le type α . La cellule arrête de se diviser en phase G1, et forme une extension cellulaire en direction de l'autre cellule. Lorsqu'ils s'atteignent, les deux cellules fusionnent et forment un zygote diploïde qui prolifère ensuite par division asexuée (Figure 05) (Caudron, 2014 ; Houcent, 2015).

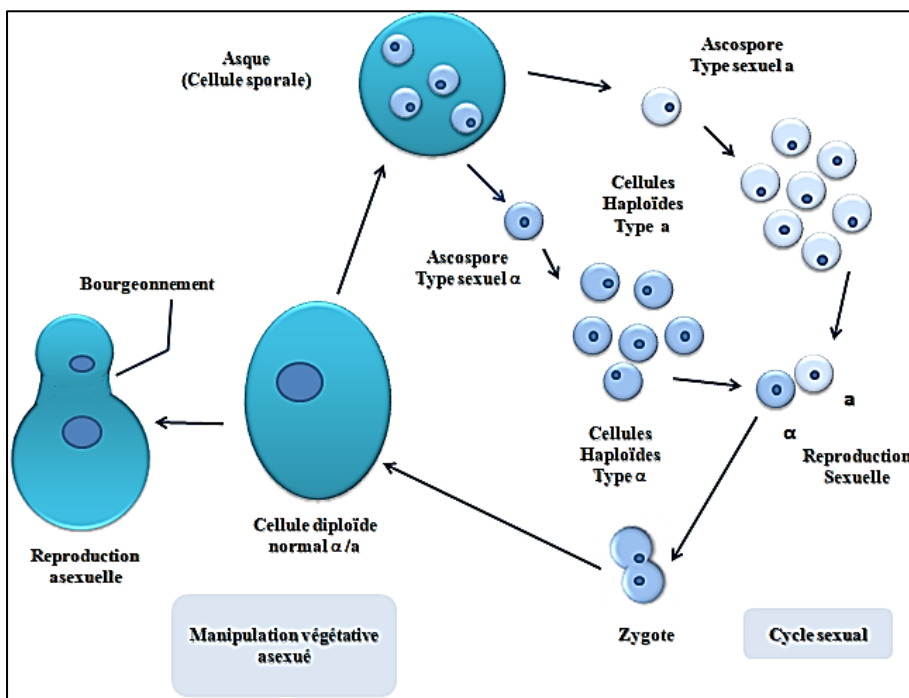


Figure 05. Cycle de reproduction asexuée et sexuée d'une levure à ascospore (Houcent, 2015).

7. Caractéristiques culturelles des levures

Les levures sont faciles à cultiver en laboratoire sur une variété de milieux complexes et synthétiques. La culture des levures peut être étudiée en milieu liquide ou solide. Leur croissance en milieu liquide peut être traduite par la formation d'un sédiment, un anneau ou une pellicule. La formation de la pellicule en milieu liquide est proprement associée avec la demande en oxygène des levures. Les colonies sur milieu solide peuvent être butyreuses (apparence de beurre), mucoïdes

(visqueuse), friables, pigmentées, etc. La formation des pigments est caractéristique des genres *Rhodotorula* et *Sporobolomyces* (Phale, 2018).

8. Applications biotechnologiques des levures

Grâce à un métabolisme diversifié, les levures occupent une place centrale quant à leurs utilisations en biotechnologie. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie,), enzymes industriels, boissons alcoolisées, vitamines et différents produits chimiques, ainsi que certaines molécules d'intérêt médical mais aussi à la valorisation de déchets agricoles, industriels et à la production des protéines recombinantes (Walker, 2009 ; Msahazi, 2015). Le tableau (02) résume les différentes utilisations industrielles des levures.

Tableau 02. Produits industriels produits par les levures (Walker, 2009)

commodité	Exemples
Brevages	Boissons alcoolisées potables : Bière, vin, cidre, saké et spiritueux distillés (whisky, rhum, gin, vodka et cognac)
Alimentation et alimentation animale	Levure de boulangerie, extraits de levure, levure fourragère, facteur de croissance du bétail et pigments alimentaires
Produits chimiques	Carburant éthanol (bioéthanol) dioxyde de carbone, glycérol et vitamines d'acide citrique ; les levures sont également utilisées comme catalyseurs bioréducteurs en chimie organique
Enzymes	Invertase, inulinase, pectinase, lactase et lipase
Protéines recombinantes	Hormones (par exemple, insuline), vaccins viraux (par exemple, vaccin contre l'hépatite B), anticorps (par exemple, récepteur IgE), facteurs de croissance (par exemple, facteur de nécrose tumorale), interférons (par exemple, interféron leucocytaire), protéines sanguines (par exemple, albumine sérique humaine) et enzymes (p. ex., lipase gastrique et chymosine)

- **Production d'enzymes**

Les enzymes sont des catalyseurs très importants utilisés dans plusieurs industries (industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques). La principale source d'enzymes industrielles est les microorganismes (bactéries, moisissure et levures). Les levures peuvent produire d'enzymes industrielles (amylase, lipase, cellulase, etc.) (Tableau 03). Elles constituent l'une d'importantes sources de ces catalyseurs biologiques, car elles contiennent une capacité polyvalente et leur prix est

moins cher par rapport à d'autres microorganismes. En plus, les levures se multiplient rapidement et sont moins exigeantes en nutriments (Boulefkhad, 2018 ; Zamouche et Nedjar, 2018).

Tableau 03. Quelques enzymes industrielles produites par les levures (Zamouche et Nedjar, 2018 ; Sharma, 2016).

Enzymes	Types de liaison hydrolysée	Des exemples des levures productrices	Industrie
Amylase	α 1-4 endogène	<i>Lipomycess tarkey</i> <i>Schwanniomyces castalii</i> <i>Aureobasidium pullulans</i>	Préparation des aliments, textile, papeterie, pharmacie
Pectinase	Hydrolyse la pectine	<i>A. pullulans</i>	Extraction et clarification des jus de fruit, traitement des eaux usées
Lactase	Hydrolyse la liaison β (1-4) du lactose en galactose et glucose	<i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Klyveromycesfr agilis</i>	Préparation des aliments laitiers
β-galactosidase	β -1-4 du lactose	<i>Saccharomyces</i> sp.	Applications alimentaires
Estérase	Il hydrolyse les liaisons entre les fractions d'acide uronique du xylane et le polymère de lignine	<i>A. pullulans.</i>	Applications alimentaires et pharmaceutiques, papeterie,
Lipase	Hydrolyse les liaisons sn1 et sn3 des triacylglycérols ou TG	<i>Candida lipolytica</i> <i>C. rigosa</i> <i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Préparation des aliments Thérapeutique Aromes
Protéase	catalysent l'hydrolyse des protéines.	<i>A. pullulans.</i> <i>Candida, Debaryomyces.</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Brasserie, panification, domaine médical et pharmaceutique.
Cellulase	β -1,4 D-glucosidiques	<i>S. cerevisiae</i> <i>Trichosporon laibachii</i> <i>Candida wickerhamii</i> <i>C. tropicalis</i> <i>Khryveromyces lactis</i>	Industrie du textile, Industrie des pâtes et papiers, La fertilité du sol, Industrie de l'alimentation animale, Industrie de la transformation des aliments.

Chapitre II :

Généralités sur les

déchets d'agrumes

Les agrumes sont des petits arbres ou arbustes vivaces dont la taille varie de 2 à 10 m de hauteur, selon les espèces (Hamidi et Limam, 2018). Ils appartiennent à la famille des Rutacées et au genre végétal *Citrus*. Les citrus comprennent 6 espèces : oranges, mandarines, limettes pamplemousses, citrons et kumquats et chaque espèce comporte de nombreuses variétés. De plus, par croisement sont né de nombreux hybrides, tels que les clémentines (Maghnem et Sadi, 2016).

1. Description morphologique et physiologique des agrumes

Les fruits des principales espèces et variétés cultivées du genre *Citrus* diffèrent par leur coloration, leur forme, leur calibre, la composition de leur jus et leur époque de maturité. Tous les fruits cultivés du genre *Citrus* présentent la même structure anatomique présentée dans la figure (06) (Ramful *et al.*, 2010). D'un point de vue botanique, les agrumes sont des fruits charnus de type baie avec un péricarpe structuré en trois parties bien différenciées : l'épiderme appelé Flavédo, le mésocarpe appelé Albédo et l'endocarpe (pulpe). L'épiderme est la surface périphérique du fruit. Il est coloré par des pigments caroténoïdes et représente 8 à 10% du fruit. Il contient de nombreuses glandes sécrétrices d'essences aromatiques qui sont réparties de façon irrégulière. Ces glandes sont des poches bordées par plusieurs assises de cellules sécrétrices dont la formation fait intervenir des cellules épidermiques et des nodules méristématiques superficiels.

Le mésocarpe est la couche intérieure blanchâtre, de structure spongieuse, plus ou moins épaisse par rapport à la taille du fruit, elle peut constituer 12 à 30% du fruit. Elle est intimement associée à l'épiderme avec lequel elle forme ce qu'il est convenu d'appeler les écorces d'agrumes.

L'endocarpe est la partie comestible d'agrumes. Il est constitué d'une fine membrane qui tapisse les nombreuses loges carpellaires. Du côté interne, cette membrane porte des poils succulents dont l'ensemble forme la partie comestible ou pulpe renfermant les graines ou pépins (Albagnac, 2002 ; Bennici *et al.*, 2004 ; Ramful *et al.*, 2010).

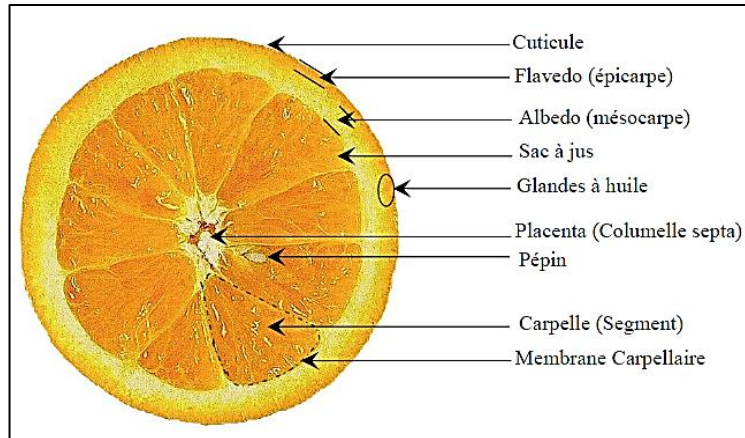


Figure 06. Schéma détaillant la structure du péricarpe de l'orange (Bousbia, 2011).

2. Production de déchets d'agrumes

Les agrumes sont les fruits les plus utilisés en grandes quantités à travers le monde. Ils sont soit consommés en l'état, soit transformés en confiture, en jus, etc. L'industrie de transformation des agrumes en jus génèrent d'importantes quantités de déchets qui sont rejetés dans la nature sans aucun traitement (Sayah, 2013 ; Meghnem et Sadi, 2016).

Le pressage des agrumes résulte en la formation de 15 millions de tonnes de déchets industriels par an dans le monde. Les déchets d'agrumes contiennent principalement, les déchets générés après le pressage des agrumes et les fruits non pressés pour des raisons commerciales (fruits endommagés) ou des raisons de réglementation limitant la production. Les principaux déchets qui résultent de l'extraction du jus sont les écorces (flavédo et albédo), les pépins et la pulpe. Ils représentent 50% à 60% de la masse du fruit entier et les écorces constituent 60% à 65% de la masse de ces déchets (El Kantar, 2018).

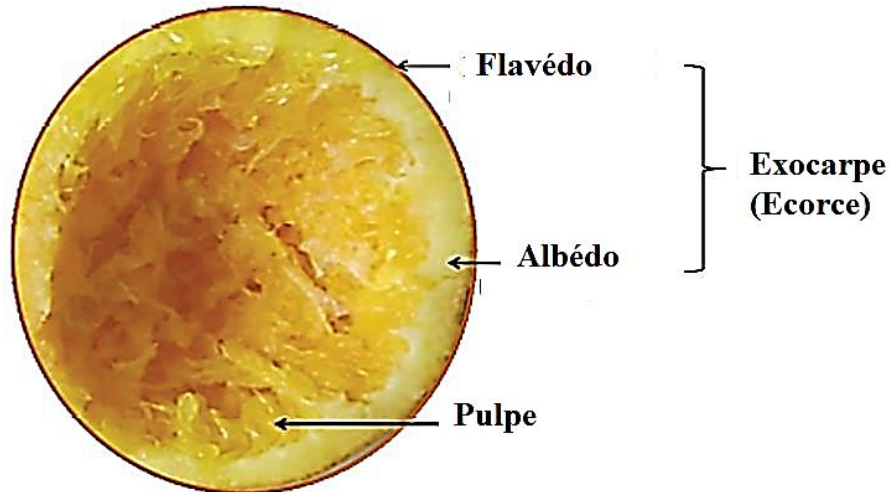


Figure 07. Principaux déchets résultant du pressage des agrumes (El Kantar, 2018).

3. Composition chimique globale des écorces d'agrumes

La composition chimique des écorces d'agrumes est sujette à des variations sous l'influence de divers facteurs, notamment la variété. De plus, dans une même variété, la teneur en divers composés dépend des facteurs climatiques et environnementaux. Le Tableau (05) représente la composition chimique globale des écorces d'agrumes des principales variétés comestibles, exprimée en g pour 100g base sèche (bs).

Tableau 04. Composition chimique globale des écorces de différentes variétés d'agrumes (g/100gbs) (Loubar et Mebarki, 2020).

Variété de citrus	Orange	Mandarine	Citron
Eau	3.14b	3.79b	3.01b
	2.97a		
Lipides	1.66b	2.97b	0.48b
	0.95a		
	4.00c	1.57c	1.51
Protéines	1.76b	8.55b	5.87b
	2.67		
	7.90f	2.16 ^e	6.79d
	8.01a	7.33c	7.88g
	9.06c		

Glucides	15.01b	18.27b	14.89b
	46.60a	8.50c	6.52c
	47.81c		13.77g
Minéraux	2.56c	3.96b	4.68b
	3.31a	4.06e	2.52c
	3.45b	10.03c	
Fibres	41.64b	27.89b	14.00h
	13.38e	7.14e	
Caroténoïdes totaux	0.04k	0.20k	0.01k
Phénols totaux	17.21o	13.01o	22.32o
	0.96l	0.78e	4.40n
	1.89b		
Vitamine C	0.145s	0.28s	0.109s

a- Kammoun *et al.* (2011) ; b-Ghanem *et al.* (2012) ; c- Marin *et al.* (2007) ; d- Fiagnerola *et al.* (2005) ; e- Magda *et al.* (2008) ; f- Grigelmo-Minguel *et al.* (1999) ; g- Masmoudi *et al.* (2008) ; h- Gorinstein *et al.* (2001) ; k- Wang *et al.* (2008) ; l- Lagha-Bernamrouche *et al.* (2013) ; n- Cheyner *et al.* (2006) ; o- Ghasemi *et al.* (2009) ; s- Barros *et al.* (2012).

Les écorces d'agrumes présentent des teneurs élevées en eau (variant de 2.97-3.79 g/g bs), soit 60% à 75% en base humide) et en sucres solubles (6.52-47.81 g/100g bs). De ce fait, c'est un coproduit hautement périssable qui fermente et présente un développement des moisissures (Farhat *et al.*, 2011; Kammoun *et al.*, 2011). De plus, ce coproduit est riche en protéines (1.79-9.06 g/100g bs) et en minéraux (2.52-10.03 g/100 bs), alors que les lipides sont très peu abondants (0.48-4 g/100g bs).

Les écorces d'agrumes sont particulièrement riches en composés digestibles et offrent de nombreuses possibilités d'utilisation pour l'alimentation fonctionnelle humaine et animale ainsi qu'en tant que complément alimentaire (Bampidis et Robinson, 2006). L'utilisation des écorces fraîches en alimentation pour bétail est limitée à cause des maladies que peut provoquer la consommation de ce produit (mycotoxicose, parakératose du rumen) (Duoss-Jennings *et al.*, 2013).

Les écorces d'agrumes sont une source importante d'essences odorantes et d'huiles essentielles (0.6-1%) (Oreopoulou *et al.*, 2007; Yeoh *et al.*, 2008 ; Hosni *et al.*, 2010 ; Farhat *et al.*, 2011). Elles contiennent aussi des pigments, essentiellement des caroténoïdes (0.01-0.20 g/100g bs) mais aussi des anthocyanes (dans le cas des oranges sanguines).

4. Production mondiale d'agrumes

La production annuelle d'agrumes dans les régions tropicales et subtropicales dépasse 120 millions tonnes (MT) (Mahato *et al.*, 2020). Environ 73% de la production sont consommés en frais, 26% sont destinés à la transformation et 9% à l'exportation. Cette production est répartie en plusieurs variétés d'agrumes dans laquelle l'orange représente 57%, la mandarine 30%, le pamplemousse 7% et le citron et la lime 6% (USDA, 2014). Avec une production de 17,34 MT, le Brésil est le premier producteur d'oranges dans le monde. Il assure 34% de la production mondiale, suivi par la Chine (7,6 MT), les Etats-Unis (6,29 MT) et l'Union Européenne (6,07 MT).

Dans la région Méditerranéenne, 22,5 MT d'agrumes sont produites par les 12 pays membres du Comité de Liaison des Agrumes Méditerranéens (CLAM) dont l'Espagne, le Maroc, la Turquie, l'Italie, l'Egypte, la Grèce, la Tunisie (USDA, 2014).

5. Importance de l'agrumiculture en Algérie

La culture des agrumes, comme l'arboriculture fruitière, occupe une place fondamentale et constitue l'une des priorités clés des décideurs au niveau du ministère algérien de l'Agriculture, selon Aouane et Ghezli (2001) (Hamidi et Limam, 2018). En tant que source de fruits frais, il est stratégiquement important (Belhia, 2016).

Au moment de l'indépendance, l'Algérie possédait une superficie citrique de 45 000 hectares. La superficie des agrumes était de 63 323 acres en 2011, mais elle est aujourd'hui à peine de 55 000 ha. L'industrie des agrumes est concentrée dans le centre du pays, avec 56 pour cent au centre, 30 pour cent à l'est et 14 pour cent à l'ouest (Omari, 2017).

Les principales wilayas agrumicoles sont: Blida (15809 ha), Chlef (5777 ha), Alger (5065ha), Relizane (4417 ha), Mascara (4232 ha), Mostaganem (4079 ha) et Tipasa (3725ha). En fin juillet 2011, il a été créé le premier Club des agrumiculteurs en Algérie à Tipasa (Omari, 2017).

6. Stratégie de valorisation des déchets d'agrumes

Il s'agit d'une matière première pour la fabrication de nombreux produits, y compris les huiles essentielles, les protéines d'organismes unicellulaires (POU), les enzymes, etc. (Diomi, 2014).

6.1. Huiles essentielles

Les déchets d'agrumes contiennent des huiles essentielles qui sont des agents antimicrobiens bien connus. Les huiles essentielles peuvent être utilisées comme une alternative aux fongicides synthétiques (Meghnam et Sadi, 2016). Les huiles essentielles sont contenues dans des sacs d'huile ou des glandes dont le diamètre varie de 0.4 à 0.6 mm. Le D-limonène est le principal constituant

odorant des agrumes, il est utilisé dans la fabrication d'aliments et de médicaments en tant qu'agent aromatisant et il a aussi de nombreuses applications dans l'industrie chimique ainsi que dans les cosmétiques et les produits ménagers domestiques (Diomi *et al.*, 2014).

6.2. Production de pectines

La pectine est un composant important des parois cellulaires des dicotylédones. Les plus importants d'entre eux sont les agrumes, qui sont utilisés dans la fabrication de pectine commerciale (pamplemousse, citron et orange). La pectine est utilisée dans l'industrie alimentaire pour ses propriétés épaississantes et de texture, ainsi que sa capacité de gélification et de stabilisation. Elle est également utilisée dans une variété de produits (comme les produits laitiers, les préparations de fruits, la crème glacée, les émulsifiants, les confitures et les gelées) (M'Hiri, 2015 ; Diomi *et al.*, 2014).

6.3. Protéines d'organismes unicellulaires (POU)

Les protéines d'organismes unicellulaires (POU) sont des protéines ou biomasses microbiennes obtenues à partir de déchets agricoles et industriels comme substrats pour couvrir les besoins en protéines de la nutrition animale et humaine. Les déchets d'agrumes sont très riches en matières celluloses (cellulose et hémicellulose), mais pauvres en lignine, ce qui en fait potentiellement de bonnes sources d'alimentation pour les ruminants et des substrats prometteurs pour la production de protéines microbiennes. L'utilisation de déchets d'agrumes peut avoir un impact assez positif sur l'approvisionnement en aliments pour la nutrition animale tout en réduisant la pollution de l'environnement (Diomi *et al.*, 2014).

6.4. Antioxydants

Les déchets d'agrumes contiennent des antioxydants tel que la néohespéridine, la naringine et l'acide ascorbique. Ces antioxydants sont très importants dans la production des plusieurs médicaments, l'inhibition de la corrosion de l'acier en milieu acide (pH=1) et basique (pH=12) et l'inhibition aussi d'oxydation des matières oxydables en éliminant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif (Hamidi et Limam, 2018 ; Diomi *et al.*, 2014)

6.5. Production de biocarburants

Les déchets d'agrumes sont également utilisés dans des réactions biochimiques telles que la production de biocarburants (bioéthanol). Ce dernier est obtenu par hydrolyse enzymatique, suivie d'une fermentation (à l'aide de la levure *Saccharomyces cerevisiae*). Dans les résidus d'agrumes, on trouve du D-limonène, qui est très toxique pour l'activité biologique des micro-organismes et inhibe

la digestion anaérobie, donc il faut d'abord l'enlever. Les déchets d'agrumes sont utilisés aussi pour la production du plastique biodégradable et comme inhibiteur de la corrosion des métaux et des alliages (M'Hiri, 2015 ; Meghnem et Sadi, 2016).

6.6. Production d'enzymes

Le domaine le plus important d'utilisation des déchets d'agrumes est la production de plusieurs enzymes telle que les pectines, les xylanases, les amyases et en particulier les cellulases. Les cellulases sont devenues indispensables dans de nombreux domaines du secteur commercial comme l'industrie du textile, la fertilité du sol, l'industrie de l'alimentation animale, etc. (Sharma, 2016 ; Reffas, 2017).

Chapitre III :
Production de cellulase
par FMS à base de
déchets d'agrumes

1. La fermentation en milieu solide

1.1. Définition de la fermentation en milieu solide

La fermentation en milieu solide (FMS) est définie comme la croissance de micro-organismes sur un substrat solide humidifié, dans lequel d'humidité est présente suffisamment pour maintenir la croissance et le métabolisme microbiens (Rahardjo *et al.*, 2006). La FMS peut être également décrite comme un processus où les microorganismes sont cultivés sur une matrice solide, servant de support et/ou de substrat, en absence ou presque d'eau libre. Cependant, la matrice doit contenir assez d'eau pour permettre la croissance du micro-organisme. Le maximum d'humidité dépend de la capacité d'absorption du substrat utilisé (Leghlimi, 2013). De plus, Thomas *et al.* (2013) ont défini la FMS comme un processus hétérogène à trois phases, comprenant des phases solide, liquide et gazeuse, qui offrent des avantages potentiels pour la culture microbienne pour le développement de bioprocédés et de produits. Selon Ashok *et al.* (2017), la FMS est un processus impliquant la culture de micro-organismes sur un substrat solide avec une teneur en humidité minimale.

Quelle que soit la définition, on peut comprendre que la FMS fait référence à la fermentation microbienne, qui se déroule en l'absence ou la quasi-absence d'eau libre.

1.2. Facteurs environnementaux et les paramètres de culture

1.2.1. Température

La température est l'un des facteurs les plus difficiles à réguler en FMS. La faible conductivité thermique de l'air (en comparaison de celle de l'eau), des supports et l'absence d'eau libre limite le transfert de chaleur et son élimination favorisant ainsi une élévation de la température pouvant aller jusqu'à 20°C au-dessus de la température d'incubation (Pandey, 2003). Cette élévation de la température dépend du type de microorganisme, de la porosité, de la taille des particules et de la profondeur du support.

1.2.2. Humidité relative et l'activité de l'eau

En FMS, l'eau est présente sous deux formes : sous la forme d'eau complexée à l'intérieur de la matrice solide, et sous la forme d'une couche mince qui peut être absorbée à la surface des particules ou contenue dans les régions capillaires (Raimbault, 1998).

La teneur en eau nécessaire pour les cultures est avant tout dépendante des souches utilisées, mais sa limite inférieure est fixée à 12%, duquel les activités métaboliques cessent, et sa limite supérieure dépend principalement du support et de sa capacité de rétention (Assamoi *et al.*, 2009). Le contenu en eau, ou plutôt la quantité d'eau disponible, est un facteur très important puisqu'une

faible humidité limiterait l'hydrolyse du substrat, la solubilisation et la diffusion des nutriments et/ou l'accumulation de composés inhibiteurs dans les particules solides, tandis qu'une forte humidité réduit la porosité (espace inter particulaire), le volume des gaz et les échanges gazeux, tout en favorisant la contamination bactérienne (Duchiron, 2011). Le maintien d'une teneur en eau optimale est par conséquent essentiel. Cependant, des variations dues au développement du microorganisme (phénomène de respiration qui produit de l'eau), à l'aération, à l'hydrolyse du substrat et à la production de chaleur métabolique (augmentation de la température) peuvent provoquer un assèchement du milieu.

1.2.3. Aération

L'aération est un facteur essentiel en FMS puisqu'elle va permettre : l'oxygénation (surtout pour les organismes aérobies comme les champignons filamenteux), la dissipation de la chaleur métabolique (régulation de la température du milieu) et l'élimination des produits du métabolisme (CO₂, vapeur d'eau, composés volatils) (Duchiron, 2003). Le choix d'un support poreux et la calibration de la taille des particules par broyage (1 mm -1 cm) permettra d'optimiser l'aération du milieu de culture en facilitant la circulation de l'air (Manpreet *et al.*, 2005). Il faut cependant noter qu'un changement dans la porosité du support (pour les supports organiques) se produit lors de la dégradation du substrat avec le risque d'un tassement ou d'une compaction des particules, provoquant la formation de chemins préférentiels et une réduction de l'apport d'oxygène.

1.2.4. pH

Le pH est très difficile à homogénéiser et à contrôler en FMS. En effet, au cours de la culture, l'activité métabolique des souches va modifier le pH du milieu 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 (Pankaj, 2005). Une régulation partielle de ce facteur au cours de la fermentation peut cependant être réalisée par l'ajout d'acide ou de base à l'eau utilisée pour ajuster le taux d'humidité du milieu. Un autre système de régulation (passif) consiste à utiliser des systèmes tampon, comme l'emploi de résidus agro-industriels présentant naturellement un excellent pouvoir tampon ou l'utilisation d'un mélange de sels d'ammonium et d'urée (Sandhya *et al.*, 2005).

1.2.5. Biomasse

L'estimation de la biomasse pour le suivi des cinétiques de croissance est délicate car les microorganismes sont (presque) inséparables du support. Cependant, il existe :

- des méthodes d'estimation directes : elles sont très difficiles et consistent en une séparation de la biomasse (uniquement pour les organismes unicellulaires) ou en une suppression de la matrice solide (organique) ;
- des méthodes d'estimations indirectes : elles se font soit par le dosage de composés spécifiques de la biomasse (protéines, acides nucléiques, glucosamine, ergostérol), soit par le suivi de l'activité métabolique de la biomasse (respirométrie : oxygène consommé ou CO₂ produit, production d'ATP, d'enzymes extracellulaires).

1.3. Applications de la FMS

La FMS est traditionnellement utilisée pour la fabrication de nombreux produits alimentaires dans les pays orientaux et africains. Elle est principalement retrouvée en Asie pour la production (très traditionnelle) de Koji, un substrat fermenté contenant des enzymes et servant de base pour la fabrication de produits alimentaires nécessitant une culture ultérieure en phase liquide (Prevot, 2013). Cependant, la FMS s'est également progressivement développée à d'autres domaines d'applications comme le montre le tableau ci-dessous.

Tableau 05. Principaux domaines d'applications de la FMS (Prevot, 2013).

Domaine d'application	Produits	Microorganismes
Alimentaire	Fromages à pâte persillée, fromages à croûte fleurie (camembert, brie,...)	<i>Penicillium roquefortii</i> <i>Penicillium camembertii</i> <i>Penicillium caseicolum</i>
	Pain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Acides organiques	Acide citrique Acide lactique	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus oryzae</i>
Divers	Bioconversion de substrats agricoles (compostage, ensilage)	
	Bioremédiation des polluants organiques dans le sol	
	Détoxification biologique de composés toxiques et dangereux	
Métabolites secondaires	Arômes	<i>Penicillium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp.
	Antibiotiques (pénicilline)	
	Hormones végétales (acide gibbérellique)	<i>Penicillium notatum</i>
	Alcaloïdes (ergot)	<i>Gibberella fujikuroi</i> <i>Claviceps purpurea</i>
Enzymes	Amylases, glucoamylases Cellulases, xylanases Pectinases Protéases	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Trichoderma</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Rhizopus oligosporus</i>

2. Production de cellulase par FMS à base de déchets d'agrumes

2.1. Préparation des écorces d'agrumes

Les écorces ou les déchets d'agrumes sont excessivement lavées à l'eau pour éliminer les contaminants chimiques et les sucres résiduels. Les déchets sont coupés en petits morceaux (1-2 cm), séchés au soleil, puis placés au four à 60°C pendant une nuit. Les écorces séchées sont pesées jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Elles sont ensuite broyées en une fine poudre et tamisées à l'aide d'un tamis fin (Bind *et al.*, 2005 ; Shariq et Sohail, 2019).

2.2. Traitement chimique des écorces d'agrumes

Avant leur utilisation pour la production de cellulase, les écorces d'agrumes subissent un traitement chimique à l'acide sulfurique (H₂SO₄) ou à l'hydroxyde de sodium (NaOH) avec des concentrations de 0.5%, 0.75% ou 1%. La suspension obtenue est excessivement lavée à l'eau jusqu'à ce que le pH du lavage au travers devienne neutre.

L'objectif du processus de prétraitement est d'éliminer la lignine et l'hémicellulose, de réduire la cristallinité de la cellulose et d'exposer les fractions lignocellulosiques pour un accès facile aux cellulases pendant l'hydrolyse enzymatique et par conséquent améliorer le taux et le rendement des sucres réducteurs (Bahouli et Zidalmal, 2020).

2.3. Levures utilisées pour la production de cellulases par FMS

La cellulase produite par FMS pourrait potentiellement réduire le coût de production en raison de certains avantages tels que la faible consommation d'énergie et le rendement élevé du produit. Les procédés de FMS utilisant des cultures de levures pour la production de cellulase ont été moins fréquemment rapportés. Néanmoins, on peut citer des souches de *Aureobasidium pullulans*, *Candida shehatae*, *C. tropicalis*, *Pachysolan tannophilus*, *Pichia stipitis* et *Saccharomyces cerevisiae*, (Leite *et al.*, 2007 ; Bahouli & Zidalmal, 2020).

2.4. Préparation de l'inoculum

Selon les travaux réalisés par Qadir *et al.* (2018) et Shariq & Sohail (2019), les souches de *C. tropicalis* et *S. cerevisiae* sont maintenues sur milieu SDA (Sabouraud's Dextrose Agar) (Annexe 01). L'inoculum est préparé en ensemençant séparément les souches dans le milieu SDB (Sabouraud's Dextrose Borth) (Annexe 02). L'incubation est effectuée à 30°C ou 35°C sous agitation à 150 rpm pendant 24 h ou 48 h. La densité cellulaire est vérifiée par spectrophotomètre à 600 nm par rapport au blanc et maintenue à 1.0 pour l'ensemencement dans le milieu de production.

D'autre part, l'inoculum d'une souche levurienne d'*A. pullulans*, utilisée pour la production de cellulases par FMS à base de déchets agroindustriel, a été préparé par ensemencement de la souche dans des erlenmeyers de 125 ml contenant 20 ml du milieu PDA (Annexe 02). L'incubation est effectuée à 28°C pendant 48 h. La suspension cellulaire est ensuite obtenue en grattant soigneusement la surface du milieu de culture par l'application de 25 ml d'une solution minérale (Leite *et al.*, 2007).

2.5. Conduite de la fermentation en milieu solide

La FMS fournit un ancrage pour les cultures levuriennes en croissance et empêche également la contamination bactérienne en raison de la faible teneur en humidité (Yogita, 2020).

Les déchets d'agrumes sont répartis dans des erlenmeyers de 100 ml à raison de 1 g/erlen et humidifiés à 50% ou 80% en utilisant le milieu YEP (Yeast extract Peptone) (Annexe 03) comme source d'azote (Shariq et Sohail, 2019). Le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 30 min. Après stérilisation, les erlenmeyers sont inoculés avec 0.5 ml de la suspension levurienne (DO = 1.0), puis incubés à une température de 30°C dans une étuve pendant 72 h (Qadir *et al.*, 2018 ; Shariq et Sohail, 2019).

2.6. Extraction de l'enzyme

A la fin de la fermentation, un volume de 10 ml d'une solution tampon citrate sodium (50 mM, pH 4.8) contenant 0.05% (v/v) de tween 80 est ajouté au milieu fermenté des déchets d'agrumes. Le mélange est incubé sous agitation (100 rpm) pendant 1 heure. Après filtration, le filtrat est centrifugé pendant 20 minutes à 3000xg et le surnageant est utilisé comme l'extrait enzymatique brut (Qadir *et al.*, 2018 ; Shariq et Sohail, 2019).

D'autre part, dans les études réalisées par Leite *et al.* (2007), l'extrait brut de l'enzyme est obtenu en ajoutant 50 ml d'eau distillée au milieu fermenté. Le mélange est incubé pendant 2 heures sous agitation (80 rpm), puis centrifugé pendant 20 minutes à 1000xg. Le surnageant obtenu représente l'extrait enzymatique brut.

2.7. Dosage des activités cellulolytiques

Les activités cellulolytiques sont déterminées par la méthode de Miller (1959) en utilisant le réactif acide dinitrosalicylique (DNS). Cette réaction est basée sur le développement de couleur après la réaction entre les sucres réducteurs libérés par la cellulase et le réactif DNS.

2.7.1. Activité papier filtre (APF)

L'APF est utilisée pour déterminer l'activité totale dans un complexe cellulastique selon la méthode de Ghose (Ghose, 1987) dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés (lors de l'hydrolyse d'un substrat cellulosique) (Yaiche et Aidouni, 2018).

Le mélange réactionnel est constitué de l'extrait brut enzymatique et le substrat qui est le papier filtre Watman N°1 (1 x 6 cm) dans une solution de tampon citrate (0.05 M, pH 4.8). La réaction enzymatique se déroule à 50°C pendant 1 heure. Une unité d'activité papier filtre est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une micromole (μM) de sucres réducteurs, équivalent glucose, du papier filtre par minute selon les conditions réactionnelles (Mejias *et al.*, 2018 ; Yaiche et Aidouni, 2018).

2.7.2. Activité carboxyméthylcellulase (CMCase)

L'activité CMCase est mesurée dans un volume total de 50 μl d'un mélange réactionnel contenant 0.25 μl d'extrait enzymatique brut 0.25 μl d'une solution de CMC à 0.5 % (w/v) préparée dans un tampon citrate sodium (50 mM, pH 4.8). Après incubation, la réaction enzymatique est arrêtée en ajoutant un volume de 150 μl de réactif DNS, suivi d'une incubation à 35°C pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite refroidi dans un bain de glace pendant 5-10 min (Qadir *et al.*, 2018 ; Shariq et Sohail, 2019). Le mélange est dilué en ajoutant 720 μl d'eau distillée et l'absorbance de la coloration développée est mesurée à 540 nm. L'activité enzymatique est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant le glucose comme standard (Figure 08).

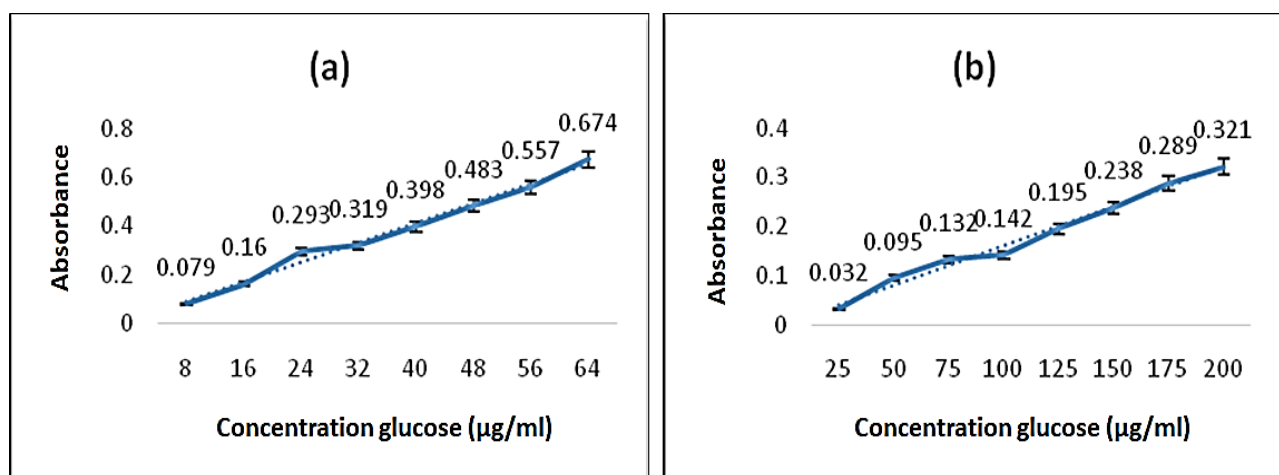


Figure 08. Exemple de courbes étalon de glucose réalisées pour la détermination de l'APF (a) et l'activité CMCase (b) (Rashi *et al.*, 2015).

Une unité de l'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole de sucres réducteurs équivalents au glucose par minute et par millilitre (ml) de solution, à 35°C, pH 4.8. Le blanc est préparé de la même manière, sans l'addition de substrat (Yaiche et Aidouni, 2018 ; Shariq et Sohail, 2019).

Chapitre IV.
Applications industrielles
des cellulases

Les cellulases ont attiré l'attention du monde entier en tant que biocatalyseurs en raison de leurs énormes applications industrielles et de leur importance commerciale. Les cellulases sont devenues indispensables dans de nombreux domaines du secteur commercial comme discuté ci-dessous (Sharma, 2016).

1. Industrie des pâtes et papiers

L'utilisation des cellulases dans les industries du papier et de la pâte à papier est principalement motivé par la capacité des papiers à se désencrer, mais il s'agit toujours d'une nouvelle application. Bien que la présence de cellulases dans la préparation des pâtes et papiers soit indésirable en raison du risque de dégradation des fibres et de perte de viscosité, plusieurs brevets et études spécifient l'utilisation de cellulases, en particulier de cellulases alcalines, pour l'amélioration du drainage, le désencrage des papiers recyclés et le blanchiment des pâtes (Jayasekara et Ratnayake, 2019 ; Bahouli et Zidalmal, 2020).

La réduction en pâte mécanique, y compris le broyage et le raffinage des matières ligneuses, est généralement associée à une consommation d'énergie élevée. Mais la bio-pulpage à l'aide de cellulases et d'autres enzymes est une approche écologique et moins énergivore. Le raffinage peut générer de petites particules de pâtes qui entraînent finalement une réduction du taux de drainage de la pâte au cours de la fabrication du papier. Les cellulases sont très efficaces pour hydrolyser ces particules, améliorant ainsi la capacité de drainage de la pulpe. Les cellulases ainsi que les hémicellulases jouent un rôle crucial dans la modification de la pâte grossière et le renforcement des feuilles à main. Le prétraitement de la pâte kraft blanchie avec des cellulases de *Trichoderma* sp. entraîne une amélioration du degré de battage de la pâte, une réduction de la consommation d'énergie et une amélioration de l'indice de traction de la feuille à main (Sharma *et al.*, 2016).

2. Production de bioéthanol

Les biocarburants sont des matières organiques non fossiles (biomasse) et renouvelables qui sont utilisées pour fabriquer des carburants alternatifs (Hardy *et al.*, 2015). Le pétrole et le charbon, par exemple, sont les principales sources d'énergie. Cependant, ce type d'énergie a un certain nombre de conséquences environnementales néfastes (pollution de l'air, réchauffement climatique et émission de gaz à effet de serre). L'accent est mis sur les sources d'énergie alternatives afin d'atténuer ces effets négatifs sur l'environnement. Le bioéthanol est un alcool fabriqué à partir de la fermentation de biomasse végétale et qui présente une efficacité énergétique similaire à celle de

l'essence. Le bioéthanol est fabriqué à partir de substrats fermentescibles (cane à sucre, betterave à sucre, maïs, orge, blé, etc.) et est qualifié de carburant de première génération (Leghlimi, 2013). Le bioéthanol de deuxième génération est fabriqué à partir de la biomasse lignocellulosique (résidus agricoles comme la paille ou les cannes de maïs, résidus forestiers) (Pimentel et Patzek, 2005).

En effet, la biomasse lignocellulosique détient un potentiel considérable pour répondre à la demande énergétique actuelle du monde. Une application potentielle des cellulases est la conversion de matières celluloses en glucose et autres fermentescibles sucres, qui à leur tour peuvent être utilisés comme substrats microbiens pour la production de protéine unicellulaire ou d'une variété de produits de fermentation tels que le bioéthanol (Figure 09). Dans ce contexte, différents rapports (Economou *et al.*, 2010; Lever *et al.*, 2010 ; Zhu *et al.*, 2015) révèlent que les extraits des cellulases, produits par FMS sont suffisants pour produire de l'éthanol à partir de la biomasse lignocellulosique broyée (Kushad *et al.*, 2011 ; Jayasekara et Ratnayake, 2019).

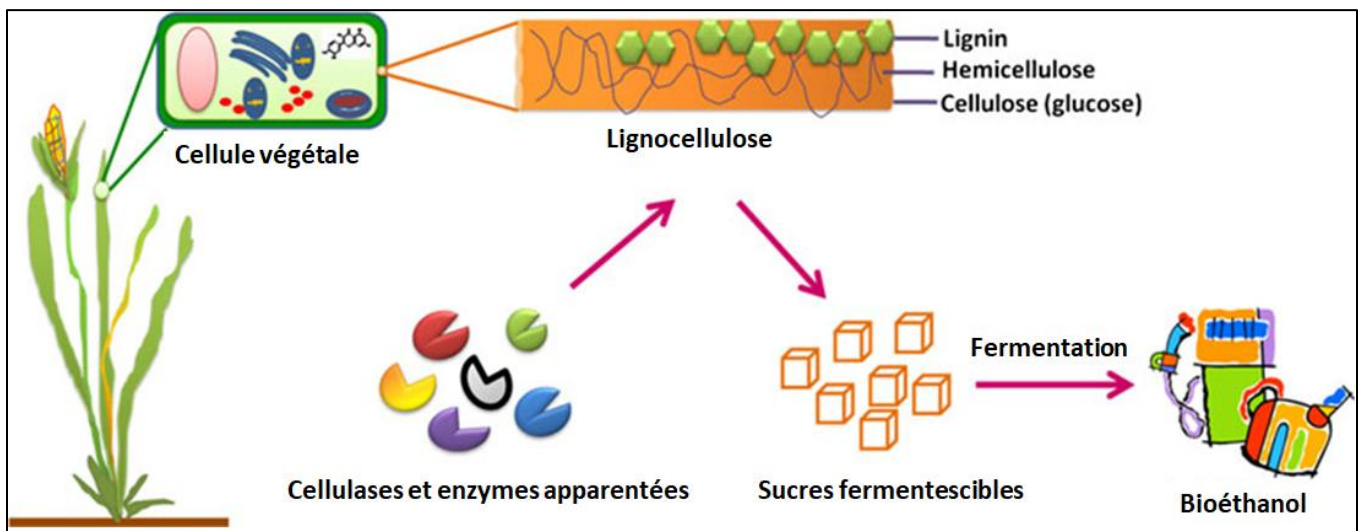


Figure 09. Transformation de la biomasse végétale en bioéthanol. La cellulose est le polysaccharide le plus abondant dans la paroi cellulaire végétale et il constitue une source potentielle des sucres fermentescibles. Son traitement par des cellulases conduit à la libération des sucres simples (glucose). Le glucose est utilisé pour produire le bioéthanol (Phitsuwan *et al.*, 2013).

3. Industrie du textile

L'industrie textile est l'une des plus grandes industries au monde. Cette industrie a connu une croissance durant ces quelques dernières décennies). Les cellulases sont maintenant devenues le troisième plus grand groupe d'enzymes utilisé dans cette application (Jayasekara et Ratnayake, 2019).

Elles sont utilisées à nombreuses fins dans l'industrie textile, spécialement pour donner un aspect lisse et brillant du tissu ainsi qu'une luminosité de couleur, l'assouplissement des vêtements et l'élimination de l'excès de teinture des tissus, pour le traitement par voie humide des textiles, le biolaquage de vêtements en denim (jeans), le biopolissage du coton et d'autres tissus cellulosique, l'assouplissement (Juturu *et al.*, 2014 ; Behera et Ray, 2016 ; Jayasekara et Ratnayake, 2019).

4. Industrie de l'alimentation animale

L'utilisation des enzymes fibrinolytiques comme les cellulases dans le traitement des aliments pour animaux (volailles, animaux de compagnie et poissons) a reçu une attention considérable car elle a abouti à une amélioration des performances des animaux. Les préparations enzymatiques contenant des cellulases et des hémicellulases sont utilisées pour de nombreuses activités telles que la production de lait, la prise de poids corporel et l'alimentation (Juturu *et al.*, 2014).

La digestion des aliments à l'aide des cellulases seules a entraîné une augmentation de 5 à 22 % de la production de lait chez les vaches laitières par rapport à celles ayant reçu des aliments non transformés. Cela a également augmenté la quantité de nourriture que les vaches prenaient, car la nourriture était plus facilement digestible et donc moins de charge sur le système digestif (Bahouli et Zidalmal, 2020).

5. Industrie de la transformation des aliments

La production et la transformation des aliments sont devenues une préoccupation majeure pour l'humanité en raison du changement climatique, l'urbanisation et l'augmentation de la population. Il est nécessaire de produire des aliments avec une meilleure texture, saveur, couleur et pour le rendre convenable pour l'emballage et la consommation (Ejaz *et al.*, 2021).

Les cellulases sont considérées comme des outils précieux en biotechnologie alimentaire en raison de l'augmentation de leur application dans de nombreux processus (Figure 10). Elles sont utilisées dans le monde entier en raison de leur potentiel prometteur à être exploité dans divers processus impliqués dans la biotechnologie alimentaire comme la clarification des jus, la réduction de la viscosité des nectars, la concentration des purées, l'altération des propriétés sensorielles des fruits, l'extraction de l'huile d'olive et l'amélioration de la qualité des produits de boulangerie (Sharma, 2016).

Les cellulases jouent un rôle important dans le complexe d'enzymes de macération (cellulases, xylanases et pectinases) qui sont employées pour augmenter le rendement des jus de fruits et de légumes en les extrayant et en les clarifiant. La viscosité des nectars et des purées de fruits tropicaux peut être réduite en utilisant des cellulases et des enzymes de macération. Une extraction accrue, une

meilleure qualité, plus d'antioxydants, un moindre risque de rancissement et moins de déchets sont tous des avantages de leur utilisation. Les cellulases sont également utilisées pour fabriquer des colorants alimentaires (additifs alimentaires) et pour extraire les caroténoïdes des plantes (Juturu *et al.*, 2014 ; Bahouli et Zidalmal, 2020).

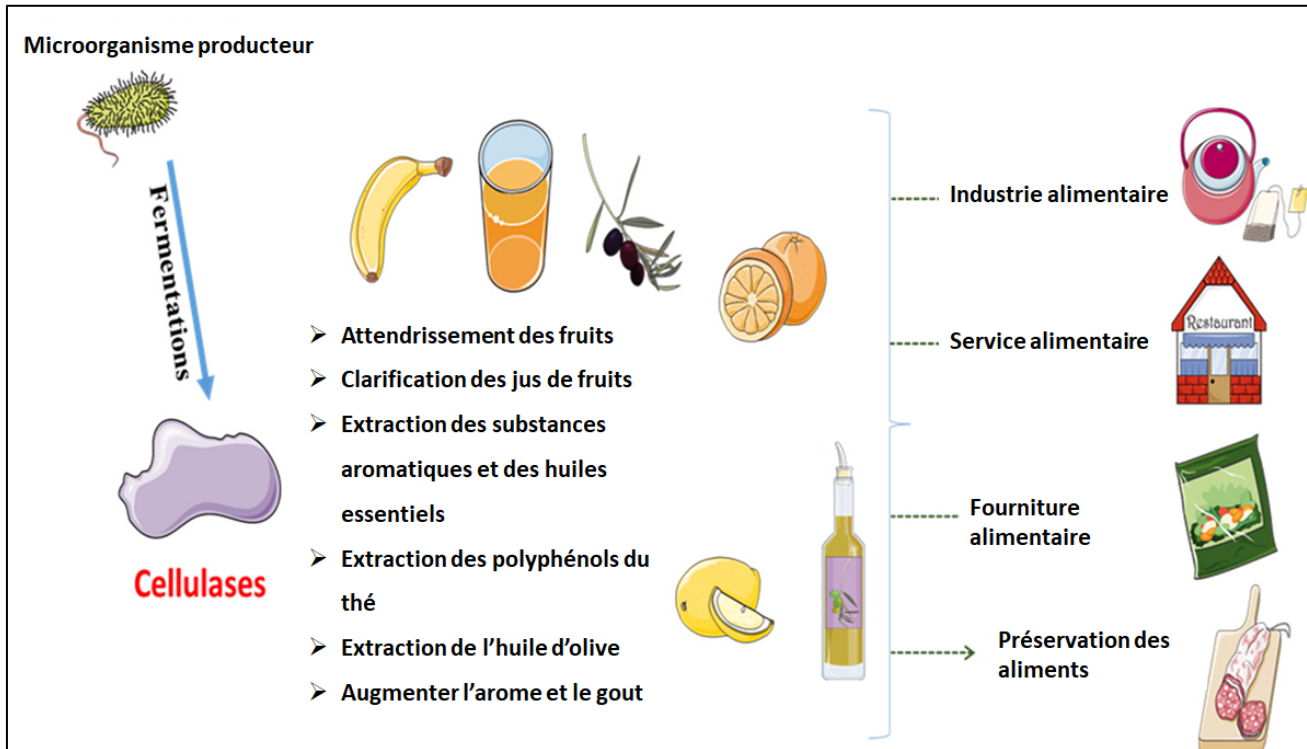


Figure 10. Différentes applications des cellulases en industrie alimentaire (Ejaz *et al.*, 2021).

6. Agriculture

L'application de cellulases dans l'agriculture est généralement rapportée pour l'amélioration de la croissance des cultures et un agent de contrôle des maladies des plantes. A cette fin, des combinaisons de cellulases, d'hémicellulases et de pectinases sont largement appliquées. Certaines cellulases fongiques ont la capacité de dégrader la paroi cellulaire des agents pathogènes des plantes (Sandhya *et al.*, 2019)

En plus, les cellulases accélèrent la décomposition des résidus végétaux incorporés au sol, ce qui conduit à l'augmentation de l'azote disponible dans le sol et l'activité microbienne. Les cellulases entraînent également l'augmentation des nutriments et le pH final du sol qui dépend des résidus végétaux dégradés et les propriétés du sol (Phitsuwan *et al.*, 2012).

Conclusion et perspectives

Le présent travail a pour but l'étude bibliographique sur la production de cellulases levuriennes par FMS à bases d'écorces d'agrumes.

Le choix de ce type de déchets se fait en raison de leur richesse en sucres solubles (6.52-47.81 g/100g bs). En effet, les écorces d'agrumes présentent des teneurs élevées en sucres fermentescibles, y compris le glucose, le fructose et le saccharose, avec de faibles niveaux de composants non fermentescibles tels que la lignine. Elles constituent donc un substrat bien étudié pour la FMS.

La FMS peut être décrite comme un processus où les microorganismes sont cultivés sur une matrice solide, servant de support et/ou de substrat, en absence ou la quasi-absence d'eau libre. La FMS s'est progressivement développée à différents domaines d'applications tels que le domaine alimentaire, la production de métabolites secondaires et la production d'enzymes (amylases, pectinases, xylanases, cellulases, etc.). La production d'enzymes en particulier les cellulases présente la stratégie la plus importante de valorisation des écorces d'agrumes.

Les cellulases microbiennes sont principalement produites par les moisissures et les bactéries, mais très peu de levures sont cellulolytiques. Cependant, les cellulases levuriennes présentent différents avantages qui les rendent adaptées aux processus biotechnologiques tels que : l'action sur une large gamme de pH et de température, un degré raisonnable de stabilité au pH et à la température.

Les procédés de FMS utilisant des cultures de levures pour la production de cellulases ont été moins fréquemment rapportés. Néanmoins, on peut citer des souches de *Aureobasidium pullulans*, *Candida shehatae*, *C. tropicalis*, *Pachysolan tannophilus*, *Pichia stipitis* et *Saccharomyces cerevisiae*.

La production de cellulases levuriennes par FMS à base de déchets d'agrumes nécessite un prétraitement chimique à l'acide sulfurique (H_2SO_4) ou à l'hydroxyde de sodium (NaOH) avec des concentrations de 0.5%, 0.75% ou 1%. Les déchets traités sont humidifiés à 50 ou 80%, puis inoculés avec la suspension levurienne (D.O = 1.0) et incubés à 30°C pendant 72 h.

L'extrait enzymatique brut est obtenu après addition du tampon citrate sodium (50 mM, pH 4.8) puis incubation (1h, sous agitation 100 rpm) et centrifugation pendant 20 minutes à 3000xg. Les activités papier filtre et carboxyméthylcellulase sont déterminées par la méthode de Miller (1959) en utilisant le réactif DNS.

Les applications industrielles de la cellulase sont multiples, on peut citer l'industrie du papier et de la pâte, des textiles, des biocarburants, industrie de l'alimentation animale, industrie de la

Conclusion et perspectives

transformation des aliments et l'agriculture. En outre, les cellulases étaient commercialement valables pour plus de 30 ans, et présentent une cible pour les recherches aussi bien académiques ou industrielles.

Ce travail de mémoire ouvre des perspectives :

- ✓ Recherche et sélection de souches levuriennes pour la production de cellulases.
- ✓ Production de la cellulase en FMS à base de différents déchets d'agrumes non valorisés en Algérie.
- ✓ Optimisation des paramètres de la production de la cellulase (pH, température, humidité, inoculum, nature de l'agent humidifiant, temps d'incubation).
- ✓ Purification et caractérisation de la cellulase produite (poids moléculaire, pH optimum, température optimale).

Références bibliographiques

Références bibliographique

- Al Daccache, M. (2019). *Étude du potentiel fermentaire de la pomme libanaise et impact des procédés émergents sur la fermentation du jus en vue de l'élaboration du cidre*. Thèse de Doctorat en Chimie, Université de Technologie de Compiègne, France.
- Albagnac, G., Varoquaux, P., Montigaud, J.C. (2002). *Technologie de transformation des fruits*. Paris : Lavoisier-Tec & Doc. pp : 302-304.
- Assamoi, A. A., Destain, J. Thonart, P. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 13(2), 281-294.
- Atek, Y., Benouali, Y. (2016). *Mise en évidence des activités cellulolytiques, xylanolytiques et amylolytiques issues de différentes souches fongiques*. Mémoire de Master en Biochimie Appliquée, Université des Frères Mentouri, Constantine 1.
- Ashok, A., Kruthi D., Devulapally, R. M. R., Devarai, S. K. (2017). Design of solid-state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.014>
- Badruna, L. (2017). *Création d'enzymes multimodulaires à façondédiées à la dégradation de substrats complexes*. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
- Bahouli, M., Zidalmal, B. (2020). *Valorisation des déchets lignocellulosiques par fermentation en milieu solide pour la production de cellulases microbiennes*. Mémoire de Master en Biochimie, Université des Frères Mentouri, Constantine 1.
- Barros, H. R. D. M., Ferreira, T. A. P. D. C., Genovese, M. I. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*. 134, 1892-1898. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.090>
- Bampidis ,V. A., Robinson, P.H. (2006). Citrus by-products as ruminant feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 128, 175-217. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.12.002>
- Behera, S. S., Ray, R. C. (2016). Solid state fermentation for production of microbial cellulases : *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 656-669. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>
- Bennici, A., Tani, C. (2004). Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 199, 464-475.
- Benkerrou, F., Hamaili, K. (2012). *Etude de la croissance et la production des cellulases par *Bjerkandera sp.* sur le son et la paille de blé*. Mémoire d'ingénieur en Génie Biologique. Université de Béjaia.

Références bibliographique

- Bousbia, N. (2011). *Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires*. Thèse de Doctorat en Chimie. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique – Alger.
- Caudron, F., Yves B. (2014). Sexualité et mémoire : ce que la levure peut nous apprendre. *Med Sci*, 30(4), 48-349. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143004003>
- Cheynier, V., Sarni-Manchado, P. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Paris : Lavoisier-Tec & Doc. pp : 50-59.
- Diomi, M., Paul, C. (2014). Biotransformation of citrus by product into value added product. *Waste Biomass Valor*, 5, 529-549.
- Duoss, E. B., Aines, R.D., Spaddaccini, C. M., Stolaroff, J. K., Vericella, J., Lewis, J. A., Farthing, G. (2013). Encapsulated Solvents for Carbon Dioxide Capture. *Energy Procedia*, 37, 219-224. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.05.105>
- Duchiron, F., Copinet, E., (2011). Fermentation en milieu solide (FMS). Biomédical-Pharma, Médicaments et produits pharmaceutiques, Techniques de l'ingénieur BIO620.
- Elhadi, R. (2019). *Isolement et sélection d'une souche bactérienne productrice de cellulases à partir des excréments d'un dromadaire (Camelus dromedarius) (Biskra)*. Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée, Université de Biskra, Algérie.
- Ejaz, U., Muhammad, S., Ghanemi, A. (2021). Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics*, 6(44). <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- Economou, C. N., Makri, A., Aggelis, G., Pavlou, S., Vayenas, D.V. (2010). Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell. *Bioresource Technology*, 101 (4), 1385-1388. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.028>
- El Kantar, S. (2019). *Valorisation des coproduits issus des industries d'agrumes : extraction des molécules bioactives par des technologies innovantes*. Thèse de Doctorat en Génie des procédés. Université de Technologie de Compiègne, Université Saint-Joseph (Beyrouth).
- Farhat, A., Fabiano-Tixier, A.S., El Maataoui, M., Maingonnat, J.F., Romdhane, M., Chemat, F. (2011). Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chemistry*, 125, 255-261.
- Figuerola, F., Hurtado, M.L., Estevez, A.M., Chiffelle, I., Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*. 91, 395-401.

Références bibliographique

- Ghanem, N., Mihoubi, D., Kechaoua, N., Boudhrioua M, N., (2012). Microwave dehydration of three citrus peel cultivars: Effect on water and oil retention capacities, color, shrinkage and total phenols content. *Industrial Crops and Products*, 40, 167-177.
- Ghasemi, K., Ghasemi, Y., EbrahimZadeh, M.A. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22, 3, 277-281.
- Grigelmo-Miguel, N., Martin-Belloso, O., (1999). Comparison of dietary fibre from by- products of processing fruits and greens and from cereals. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 32, 503-508.
- Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Park, Y., Haruenkit R., LojekA., Caspi A., Libman I., Trakhtenberg S. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74, 309-315.
- Giese, E. C., Dussán, K. J., Pierozzia, M., Chandela, A. K., Pagnocad, F. C., da Silva, S. S. (2017). Cellulase Production by *Trichosporon laibachii*. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, 9(4), 271-278. <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v9i4.1024>
- Hadjaz, A. (2020). *Isolement de souche productrice de cellulases et optimisation de la production enzymatique*. Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée, Université de Biskra, Algérie.
- Hamidi, F., Limam, F. (2018). Etude phytochimique et pouvoir antioxydant de l'écorce d'orange et citron. Master en Sciences Alimentaire, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, Algérie.
- Hardy, N. Henaut, I., Augier, F., C., Béal, C., Ben Chaabane, F. (2015). Rhéologie des champignons filamenteux : un outil pour la compréhension d'un procédé de production de biocatalyseurs utilisés pour la production de bioéthanol. *Rhéologie*, 27, 43-48.
- Hencke, S. (2000). *Utilisation alimentaire des levures*. Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré - Nancy1.
- Housnat, P. (2015). *Isolement et identification des levures du tubercule de manioc «Manihot esculenta » de la region de Vakinankaratra*. Mémoire d'Etudes Approfondie en Sciences de la Vie, Option : Biotechnologie-Microbiologie, Université d'Antananarivo.
- Hosni, K., Zhaed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Sebei H. (2010). Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: *Evidence for the genotypic influence*. *Food chemistry*. 123, 1098-1104.

Références bibliographique

- Jayasekara, S., Ratnayake, R. (2019). Microbial cellulases: an overview and applications. Cellulose. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84531>
- Juturu, V., Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188-203.
- Kammoun, B., Ghanem, A., Mihoubi, N., Kechaou, D., Boudhrioua, N., Mihoubi, N. (2011). Effect of Infrared Drying on Drying Kinetics, Color, Total Phenols and Water and Oil Holding Capacities of Orange (*Citrus Sinensis*) Peel and Leaves. *Journal of Food Engineering*. 7(5), 1-25.
- Khilil, O., (2017). *Production de cellulase et d'enzymes associées par des souches de Bacillus sp : Le role des prétraitements et l'effet des polyphénols, des flavonoides et des biosurfactants*. Thèse en vue de l'obtention du Diplôme de doctorat, Université Mohamed Boudiaf-Oran.
- Korish, M. (2003). *Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast isolate*. Thèse de Doctorat, Johannes Gutenberg-University Mainz.
- Kushad, R.C., Gupta, R., Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 1-10. <https://doi.org/10.4061/2011/280696>
- Lagha-Benamrouche, S., Madani, K. (2013). (Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723–730. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.048>
- Labbani, F. Z. K. (2016). *Activité « Killer » chez des levures isolées des sols du Nord-Est Algérien: Purification, caractérisation et effet sur les souches de levures indésirables*. Thèse de Doctorat, Université des frères Mentouri-Constantine 1.
- Lakhundi, S., Ruqaiyyah, S., Naveed, A. K. (2015). Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections. *Parasites & Vectors*, 8, 23.
- Leghlimi, H. (2017). *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*. Mémoire de Master, Université des frères Mentouri-Constantine 1.
- Leite, R. S. R., Bocchini, D. A., Da Silva Martins, E., Silva, D., Gomes, E., Da Silva, R. (2007). Production of Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzymes from *Aureobasidium pulluans* on Solid State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137, 281-288.
- Lever, M., Ho, G., Cord-Ruwisch, R. (2010). Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulase from solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 101, 7083–7087.

Références bibliographique

- Li, B., Xu, H., & Mu, X. (2016). Review of Alkali-Based Pretreatment to Enhance Enzymatic Saccharification for Lignocellulosic Biomass Conversion. *Industrial & Engineering Chemistry Research Review*, 55, 8691-8705. DOI: 10.1021/acs.iecr.6b01907.
- Lodder, J. (1971). *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam, London: North Holland Publishing Company.
- Loubar, K., Mebarki, Y. (2020). *Intéret des sous-produits d'agrumes*. Mémoire de Master, Génie Alimentaire, Université A. Mira de Bejaia
- Lynd L.R., Weimer P. J., van Zyl, W.H., and Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577.
- M'Hiri, N. (2015). *Etude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces des l'orange ((Maltaise demi sanguine)) et exporation de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbon*, Thèse de Doctorat en Science Agronomiques, Université de Carthage, Tunis.
- Magda, R.A., Awad, A.M., Selim, K.A. (2008). Evaluation of mandarin and orange peels as natural sources of antioxidant in biscuits. *Alexander Journal of Food Science & Technology*, 75-82.
- Maghmem, R., Sadi, A. C. (2016). *Extraction de l'huile Essentielle à partir du Déchet d'agrumes (orange)*. Mémoire de Master en Chimie de l'environnement, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M., Baral, E R., Koteswararao, R., Dhyani, A., Cho, M. H., Cho S. (2020) Bio-sorbents, industrially important chemicals and novel materials from citrus processing waste as a sustainable and renewable bioresource: A review. *Journal of advanced research*, 23, 61–82.
- 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.
- Marin, F.A., Soler-Rivas, C., Benavente-Garcio., Castillo, J., Perez-Alvarez, J.E. (2007). By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*, 100, 736-741.

Références bibliographique

- Masmoudi, M., Besbes, S., Chaabouni, S., Robert, C., Paquot, M., Blecker, C., Attia, H. (2008). Optimization of pectin extraction from lemon by-product with 752 acidified date juice using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 74, 185-192.
- Mejias, L., Cerda, A., Barrena, R., Gea, T., & Sánchez, A. (2018). Microbial strategies for cellulase and xylanase production through solid-state fermentation of digestate from biowaste. *Sustainability*, 10(2433), 1-15. Doi:10.3390/su10072433.
- Montes de Oca, R., Salem, A. Z. M., Kholif, A. E., Monroy, H., Pérez, L. S., Zamora, J. L., Gutiérrez, A. (2016). Yeast: Description and Structure. <https://www.researchgate.net/publication/293605511>
- Msahazi, A. (2015). *Isolement et caractérisation des Levures Sauvages de la Carotte ((daucus carota)) de la région de vakinankaratra*. Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etude Approfondies en Sciences de la vie, *Biotechnologie-Microbiologie*, Université d'Antananarivo
- Omari, M., Ben Koibich, M., (2017). Etude de l'influence de quelques facteurs abiotique sur le comportement «*in vitro*» de *Fusarium* sp., agent de la Fusariose des agrumes (Citrus). Et évaluation «*in vitro*» de l'effet antifongique de l'extrait méthanoïque de *Salvia officinalis* à son égard. Mémoire de Master en Agronomie, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
- Oreopoulou, V., Tzia, C. (2007). Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants and colorants. Dans V., Oreopoulou, R., Winfried, *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*. Springer.
- Phale, S. (2018). Yeast: Characteristics and Economic Significance. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 8(5), 1-3.
- Phitsuwan, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Khin Lay Kyu, K., Ratanakhanokchai, K. (2013). Present and potential applications of cellulase in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia Microbiologica*, 58, 163-176.
- Pandy, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81-84.
- Pimentel, D., Patzek, T.W. (2005). Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. *Natural Resources Research*, 14(1), 65-76.
- Prevot, V. (2013). *Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide*. Thèse de Doctorat en Microbiologie Industrielle, Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Pulgar, E. M., Saadeddin, A. (2013). The cellulolytic system of *Thermobifida fusca*. *Critical Reviews in Microbiology*, 40, 236-247. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.776512>

Références bibliographique

- Qadir, F., Shariq, M., Ahmed, A., Sohail, M. (2018). Evaluation of a yeast co-culture for cellulase and xylanase production under T solid-state fermentation of sugarcane bagasse using multivariate approach. *Industrial Crops & Products*, 123, 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.021>
- Rashid, M. H., Skidar, D., Jahan, I, Mojumder, S. (2015). Characterization of Total Cellulase and endo- β -1, 4- glucanase and their Applications in Biofuels Production as well as Protection of Crops from Damaging by Insects. *Canadian Chemical Transactions*, 3, 275-284.
- Rahardjo, Y. S., Tramper, J., Rinzema, A. (2006). Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances*, 24(2), 161-179.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate Fermentation *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 174-188.
- Ramful, D., Bahorunb, T., Bourdonc, E., Tarnusc, E., Aruoma, O.I. (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*. 278, 75-87.
- Rapior, S., Fons, F. (2019). La classification des champignons. Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier I, Montpellier, France.
- Reffas, F. Z. I. (2017). Isolement et caractérisation de bactéries productrices de cellulase. Thèse de Doctorat en Microbiologie moléculaire et protéomique, Université de Sidi bel Abbes, Algérie.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(8), 2689-2694.
- Sengar, R. S., Lugani, Y., Rai, R., Prabhu, A. A., Maan, P., Hans, M., Kumar, V., Kumar, S., Anuj K. Chandel, A. K. (2020). Recent advances in bioethanol production from lignocelluloses: a comprehensive review with a focus on enzyme engineering and designer biocatalysts. *Biofuel Research Journal*, 28, 1267-1295.
- Sayah, M., Taouda, H., Chabir., R , Yousfi, L.K., Derwich, E., Kandri Rodi,Y. , Ouazzani Chahid, F. , Errachidi, F. (2013). Valorisation des déchets industriels d'agrumes par l'extraction des huiles essentielles Valuation of industrial citrus waste by essential oils extraction. *Gestion et Protection de l'Environnement Proceedings G-ENVIRON-5, Volume 3 (2013) 124-129.*
- Shariq, M., Sohail, B. (2019). *Citrus limetta* peels: a promising substrate for the production of multienzyme preparation from a yeast consortium. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(43), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0278-0>

Références bibliographique

- Sharma, A., Tewari, R., Rana, S., Soni, R., Soni, S. K. (2016). Cellulases: Classification, methods of determination and industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(8).
- Sebti, C., Deghdak, M. (2018). *Production de cellulase par Trichoderma longibrachiatum cultivée sur grignon d'olive*. Mémoire de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique, Université des Frères Mentouri Constantine 1.
- Speers, A., Forbes, J. (2015). *Yeast*. The International Centre for Brewing and Distilling, Heriot-Watt University, Edinburgh, Scotland, UK; Dalhousie University, Halifax, NS, Canada.
- Thomas ,L., Larroche, C., ashok,P ., (2013). Current developement in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 81 : 146-161
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Di Gianvito, P., Arfelli, G., Schirone, M., Corsetti, A., G. Suzzi, G. (2016). *Journal of Applied Microbiology*, 120, 1574-1584. <https://doi.org/10.1111/jam.13113>
- Touijer, H., Benchemsi, N., Mohamed, E., Janati Idrissi, A., Chaouni, B., Bekkari, H. (2019). Thermostable Cellulases from the Yeast *Trichosporon* sp. *Enzyme Research*, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2019/2790414>
- Try, S. (2018). *Production d'Aromes Par Fermentation en Milieu Solide*. Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne-Franche Comté
- Walker, G. (2000). The Role of metal ions in optimising yeast fermentation performance. In: Nutritional Aspects II. Synergy between yeasts and bacteria. Lallemand Technical Meeting 2000 Perugia, Italy.
- Wang, Y. C., Chuang, Y. C., Hsu, H.W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*. 106(1), 277-284.
- Yaiche, S., Aidouni, B. (2018). *Optimisation de la production de cellulase par Trichoderma longibrachiatum cultivée sur son de blé*. Mémoire de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique, Université des Frères Mentouri-Constantine 1.
- Yeoh, S., Shi, J., Langrish, T. A. G. (2008). Comparisons between different techniques for waterbased extraction of pectin from orange peels. *Desalination*, 218, 229-237.
- Yogita, P.L., Vilas, G. (2018). Solid State Fermentation of Orange Peels for Production of Cellulase, Pectinase and Recovery of Orange Oil using *Aspergillus* Species NCIM 1432. *Department of Chemical Engineering, Institute of Chemical Technology, Nathalal Parekh Marg, Matunga, Mumbai- 400 019, India* <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-123470/v1>.
- Zhu, Y., Xin, F., Chang, Y., Zhao, Y., & Weichong, W. (2015). Feasibility of reed for biobutanol production hydrolyzed by crude cellulase. *Biomass Bioenergy*, 76, 24–30.

Références bibliographique

- Zamouche, K. Nedjar, L. R. (2018). *Contribution à l'étude de la microflore levure du lait de chamelle d'Algérie*. Mémoire de Master en Biochimie de la Nutrition, Université des Frères Mentouri-Constantine1.

Annexes

Annexe 01

Sabouraud's Dextrose Agar (SDA):

- Glucose 20 g
- Peptone 10 g
- Agar 20 g
- Eau distillée 1000 ml

Annexe 02

Sabouraud's Dextrose Broth (SDB):

- Glucose 20 g
- Peptone 10 g
- Eau distillée 1000 ml

Annexe 03

Potato Dextrose Agar (PDA):

- Glucose 20 g
- Extrait de pomme de terre 4.0 g
- Agar 20 g
- Eau distillée 1000 ml

Annexe 04

Yeast Extract Peptone (YEP):

- Glucose 20 g
- Peptone 20 g
- Extrait de levure 10 g
- Eau distillée.....1000 ml

Master en Biochimie BENSALEM Ouassim HORCHI Dalila	Date de soutenance : 23/09/2021
Intitulé : Contribution à l'étude de la production de cellulase levurienne par fermentation en milieu solide à base de déchets d'agrumes.	
Résumé <p>L'objectif principal de ce mémoire est l'étude de la production de cellulase levurienne par fermentation en milieu solide (FMS) à base de déchets d'agrumes. Les écorces d'agrumes contiennent des sucres fermentescibles, y compris le glucose, le fructose et le saccharose, ainsi que des polysaccharides insolubles, de la pectine et de la cellulose avec de faibles niveaux de composants non fermentescibles tels que la lignine. Elles constituent donc un substrat bien étudié pour la production d'enzymes et en particulier les cellulases à la FMS. La FMS fait référence à la fermentation microbienne, qui se déroule en l'absence ou la quasi-absence d'eau libre. Les cellulases produites par les levures sont actives dans une large gamme de pH et à haute température. De plus, elles présentent un degré raisonnable de stabilité au pH et à la température. Ces propriétés les rendent adaptées aux processus biotechnologiques. Le prétraitement chimique des écorces d'agrumes avec l'acide sulfurique ou le NaOH est essentiel pour éliminer la lignine et l'hémicellulose et exposer les fractions lignocellulosiques pour un accès facile aux cellulases pendant l'hydrolyse enzymatique et par conséquent améliorer le taux et le rendement des sucres réducteurs. La FMS utilisant des levures pour la production de cellulase ont été moins fréquemment rapportés. Néanmoins, on peut citer des souches de <i>Aureobasidium pullulans</i>, <i>Candida shehatae</i>, <i>C. tropicalis</i>, <i>Pachysolantannophilus</i>, <i>Pichiastipitis</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Le milieu de fermentation à base d'écorces d'agrumes (humidifiés à 50 ou 80%) est incubé avec la suspension levurienne (DO = 1.0) à 30°C pendant 72h. L'extrait enzymatique brut est obtenu après addition du tampon citrate sodium (50 mM, pH 4.8) puis incubation (1h, sous agitation 100 rpm) et centrifugation pendant 20 minutes à 3000xg. Les activités cellulolytiques (activité papier filtre et activité carboxyméthylcellulase) sont déterminées par la méthode de Miller (1959) en utilisant le réactif acide dinitrosalicylique (DNS).</p> <p>Les cellulases présentent une cible pour les recherches aussi bien académiques ou industrielles. Leur intérêt s'est développé à travers le monde, en raison de leurs applications industrielles multiples : l'industrie des pâtes et papier, des textiles, des biocarburants, aussi dans l'extraction de jus de fruits et légumes.</p> <p>Mots clés : Levures, production, cellulases, écorces d'agrumes, fermentation en milieu solide.</p>	
Jury d'évaluation : Président : DAKHMOUCHE S. M.C.A. Ecole Normale Supérieure AssiaDjebar - Constantine. Encadreur : LABBANI F-Z. K. M.C.B. Ecole Normale Supérieure AssiaDjebar - Constantine. Examinatrice : BENNAMOUN L. M.C.B. Université Frères Mentouri - Constantine 1.	
Année Universitaire : 2020-2021	