

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biochimie - Biologie Cellulaire et Moléculaire كيمياء الحيوية - البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

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

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

*Etude de la cellulase fongique*

Présenté par : CHAOUCHE Lilia Chirine

Le 30 /11/2022

Jury d'évaluation :

**Encadreur :** Mme DAKHMOUCHE Scheherazad (MCA- ENS Assia Djebbar).

**Examinatrice 1 :** Mme BENNAMOUN Leila (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 2 :** M. NOUADRI Tahar (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Année universitaire  
2021 - 2022

## **Remerciement**

*Nous exprimons tout d'abord nos profonds remerciements à **Allah** qui nous a donné le courage et la volonté de mener à terme cette étude.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à Mme **Dekhmouche Scheherazad** (MCA, à ENSC) d'avoir accepté d'encadrer ce mémoire, pour ses conseils et orientations fructueuses pour la confiance qu'elle nous a accordé tout au long de la réalisation de ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance et notre gratitude envers tous ceux qui nous ont soutenu et encouragé tout au long de cette traversée du désert et nous ont permis de redoubler d'effort et de persévérance.*

<b>Liste des figures</b> .....	<b>i</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>ii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>iii</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>1</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I Production des cellulases fongiques</b> .....	<b>2</b>
1. Isolement et identification des souches cellulolytiques.....	2
2. Production des cellulases .....	8
2.1. Fermentation et milieux de production.....	8
2.2. Champignons producteur des cellulases .....	16
<b>Chapitre II Optimisation de la production des cellulases fongiques</b> .....	<b>18</b>
<b>Chapitre III Applications des cellulases fongiques</b> .....	<b>34</b>
1. Industrie du textile.....	34
2. Industries agro-alimentaires .....	34
3. Industrie des détergents .....	35
4. Industrie de l'alimentation animale.....	35
5. Bioraffinerie .....	35
6. Industrie des pâtes et papiers .....	35
7. Industrie du bioéthanol .....	36
8. Industrie du vin et de la brasserie .....	37
9. Extraction de pigments et de composés bioactifs.....	38
10. Industrie pharmaceutique .....	38
<b>Conclusion</b> .....	<b>33</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>40</b>

## Liste des figures

- Figure 1:** Activité cellulolytique des isolats fongiques (analyse qualitative). Plaque de gélose contenant du CMC comme substrat et du rouge Congo comme indicateur. Une zone de dégagement autour des puits indique une dégradation de la cellulose..... 2
- Figure 2:** Halo d'hydrolyse formé autour de la colonie lors de la croissance pendant 48 h à 30°C..... 4
- Figure 3:** Halo d'hydrolyse formé autour de la colonie lorsqu'elle a été cultivée pendant 96 h à 30°C..... 5
- Figure 4:** Images pour les régimes d'ensilage de maïs et le fumier de vache et le fumier de vache à digestion anaérobie. Régimes d'ensilage de maïs (a), l'ensilage de maïs broyé grossièrement régimes enrichis en aliment protéique complémentaire (b), matières solides de fumier bovin après élimination de la partie liquide par emballage mécanique (c), fumier de vache digéré en anaérobie obtenu à partir de la séparation physique du lisier après un processus de digestion anaérobie pour la production de biogaz (d) ..... 7
- Figure 5:** Profil cinétique de réduction de la production de sucre par les champignons *Penicillium funiculosum*, *Fusarium verticillioides* et *Cladosporium cladosporioides*, en utilisant CMC ou Avicel comme seule source de carbone à travers la fermentation submergée ..... 9
- Figure 6:** Effet du milieu de culture sur la production de cellulase par *P. funiculosum*, utilisant différentes matières premières comme sources de carbone ..... 9
- Figure 7:** Effet de la concentration de carboxyméthylcellulose (CMC) de 0 à 1,5 % (p/v) sur la production de cellulase de la levure nommée UBU-SK6. La croissance (A) et la production d'enzymes (B) ont été mesurées à intervalles de 24 h pendant 7 jours ..... 13
- Figure 8 :** Indices d'activité enzymatique (EAI) pour les cinq souches de levure cultivées sur milieu solide. Les différentes lettres indiquent une différence significative à un niveau de signification de 5 % (p 0,05) entre les souches, pour les deux substrats (Carboxyméthylcellulose et SERVACEL®)..... 14
- Figure 9 :** Profil d'activité cellulasique de *C. oligophagum* JRC1 avec le temps : Affichage du profil de l'activité endoglucanase, exoglucanase et b-glucosidase (UI/ml) et protéines totales (lg/ml) avec le temps dans un milieu contenant de la CMC comme source de carbone..... 16
- Figure 10 :** Fermentation à l'état solide sur six types de textiles en utilisant différents milieux de culture ..... 19
- Figure 11:** Production de cellulase sur des déchets textiles à différentes températures. .... 20

<b>Figure 12:</b> Effet des inducteurs sur la production de cellulase à partir de déchets textiles (mélange 80/20 coton/PET).....	21
<b>Figure 13:</b> Production de cellulase par fermentation à l'état solide à l'aide de différents substrats à 30°C et concentration de 10 <sup>5</sup> spores.....	22
<b>Figure 14:</b> Effet du pourcentage d'humidité (p/v) sur la production de cellulase après 6 jours d'incubation lorsque le son de blé a été inoculé avec 10 <sup>5</sup> spores concentration à 30°C .....	23
<b>Figure 15:</b> Effet de la température sur la production d'enzymes cellulase après 6 jours d'incubation (substrat : le son de blé, taux d'ensemencement de 10 <sup>5</sup> spores/g, taux d'humidité 70 % (p/v) à 30°C .....	23
<b>Figure 16:</b> Comparaison du potentiel d'hydrolyse de différentes préparations de cellulase ..	26
<b>Figure 17:</b> Hydrolyse de substrats cellulotiques .....	26
<b>Figure 18:</b> Effet de la variation de température d'incubation sur la CMCase .....	27
<b>Figure 19:</b> Effet du pH sur l'activité CMCase et FPase (température 50 °C, 10 mg/mL CMC et 50 mg/mL papier filtre) .....	27
<b>Figure 20:</b> (a) Effet du temps de pré incubation du papier filtre sur la concentration de glucose ; (b) la cinétique de la FPase (pH 4,8, température 50°C, et papier filtre 50 mg/mL).....	28
<b>Figure 21:</b> Effet de la température sur la production de cellulase ; Les cultures ont été inoculés et incubés à différentes températures pendant 72 heures dans des conditions statiques. Les barres d'erreur présentées sont des valeurs moyennes de ± écart type des doublons de trois expériences indépendantes .....	29
<b>Figure 22:</b> Effet du pH sur la production de cellulase ; Les milieux stériles ont été inoculés et incubés à 50 °C à différents pH pendant 72 heures dans des conditions statiques. Les barres d'erreur présentées sont des valeurs moyennes ± écart type des doublons de trois expériences indépendantes .....	30
<b>Figure 23:</b> Effet de différentes sources de carbone sur la production de cellulase.....	30
<b>Figure 24:</b> Effet de différentes concentrations de glucose sur la production de cellulase ; le milieu de contrôle ne contient pas de glucose. Les erlens d'essai ont été additionnés d'une concentration différente de glucose de 0,1 à 0,8 % p/v. Après l'inoculation, les milieux sont incubés à 50 °C pendant 72 heures à pH 5,5 .....	31
<b>Figure 25:</b> Effet de différentes sources d'azote organique sur la production de cellulase ; le milieu témoin ne contenait aucune source d'azote organique. Les erlens d'essai ont été complétés avec différentes sources d'azote organique dans le milieu (1,0 % p/v) .....	32
<b>Figure 26:</b> Effet de différentes concentrations d'extrait de malt sur la production de cellulase ; le flacon témoin ne contient pas d'extrait de malt. Les erlens d'essai contenant de différentes	

concentrations d'extrait de malt (0,1 à 0,8 % p/v) les milieux ont été inoculés et incubés à 50 °C pendant 72 heures à pH 5,5 ..... 32

**Figure 27:** Effet de différentes sources d'azote inorganique sur la production de cellulase ; le flacon témoin ne contient aucune source d'azote inorganique. Flacons d'essai modifiés avec différentes sources d'azote inorganique dans le milieu (1,0 % w/v)..... 33

**Figure 28:** Action du complexe enzymatique cellulase dans la bioconversion de la biomasse en bioéthanol..... 37

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Souches productrices de cellulases.....	17
<b>Tableau 2:</b> Conception de la composition centrale de quatre facteurs sur FMS pour la production de cellulase.....	19

### Liste des abréviations :

**AE** : Activité enzymatique

**BGL** :  $\beta$  Glucosidase

**CMC** : Carboxymethylcellulase.

**EnG** : Endoglucanase

**ExG** : Exoglucanase

**FPase** : Activité papier filtre

**RSM** : Méthodologie de surface de réponse

**FMS** : Fermentation sur milieu solide



# Résumés

## Résumé

---

### Résumé

La cellulose est un biopolymère naturel abondant sur terre et le déchet agricole le plus dominant. Cette biomasse cellulosique est une ressource renouvelable et abondante avec un grand potentiel de bioconversion en bioproduits à valeur ajoutée. Il peut être dégradé par la cellulase produite par différents microorganismes cellulolytiques. Cette enzyme a diverses applications industrielles et est maintenant considérée comme un groupe majeur d'enzymes industrielles. Notre travail traite dans le premier chapitre l'isolement des souches fongiques cellulolytiques et les différents biotopes utilisés pour leur screening. Les milieux extrêmes peuvent renfermer des souches productrices des cellulases résistantes ayant un grand intérêt dans l'industrie. Le deuxième chapitre décrit les connaissances actuelles sur la production de cellulase par fermentation submergée et fermentation à l'état solide, Sa production est améliorée par le clonage et l'expression du gène de la cellulase ou par l'optimisation par la méthode « OFAT » ou par les méthodes statistiques. Les différentes applications industrielles de des cellulases sont récapitulées dans le troisième chapitre.

**Mots clés :** Cellulase, champignons, production, optimisation.

### Abstract

Cellulose is a natural biopolymer abundant on earth and the most dominant agricultural waste. This cellulosic biomass is a renewable and abundant resource with great potential for bioconversion into value-added bio-products. Cellulase produced by different cellulolytic microorganisms can degrade cellulose. This enzyme has various industrial applications and nowadays is considered as a major group of industrial enzymes. Our work deals in the first chapter with the isolation of cellulolytic fungal strains and the different biotopes used for their screening. Extreme environments may contain strains producing resistant cellulases of great interest in industry. The second chapter describes the current knowledge on the production of cellulase by submerged fermentation and solid-state fermentation, its production is improved by cloning and expression of the cellulase gene or by optimization by the "OFAT" method or by statistical methods. The different industrial applications of cellulases are summarized in the third chapter.

**Key words:** Cellulase, fungal species, production, optimization.

### الملخص:

السليولوز هو بوليمر حيوي طبيعي يتواجد بكثرة على الأرض وهو أكثر المخلفات الزراعية انتشارًا. هذه الكتلة الحيوية السليلوزية هي مورد متجدد وفير مع قدرة كبيرة للتحويل البيولوجي إلى منتجات حيوية ذات قيمة مضافة. يمكن أن يتحلل عن طريق انزيم السيلولاز الذي تنتجه الكائنات الدقيقة المحللة للسليولوز. هذا الإنزيم له تطبيقات صناعية مختلفة ويعتبر الآن مجموعة رئيسية من الإنزيمات الصناعية. في الفصل الأول من هذه الدراسة مع عزل السلالات الفطرية المنتجة لإنزيم السيلولاز والبيئات الحيوية المختلفة المستخدمة في فحصها. قد تحتوي البيئات القاسية على سلالات تنتج سلولازات مقاومة ذات أهمية كبيرة في الصناعة. يصف الفصل الثاني المعرفة الحالية حول إنتاج إنزيم السيلولاز عن طريق التخمر في وسط سائل والتخمير في الحالة الصلبة، ويتم تحسين إنتاجه عن طريق الاستنساخ والتعبير عن مورثة السيلولاز أو عن طريق التحسين باستخدام طريقة "OFAT". أو بالطرق الإحصائية. تم تلخيص التطبيقات الصناعية المختلفة لإنزيمات السيلولاز في الفصل الثالث.

**الكلمات المفتاحية:** السيلولاز، الأنواع الفطرية، الإنتاج، الشروط المثالية.

# **Introduction**

## Introduction

---

### Introduction

La biomasse lignocellulosique est la matière première renouvelable la plus abondante au monde qui comprend la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (**Thapa et al, 2020 ; Singh et al, 2021**). La cellulose est synthétisée par les bactéries, les champignons, et les plantes supérieures par l'enzyme cellulose synthase, qui est une enzyme conservée dans tous les organismes avec des séquences d'acides aminés différentes, indiquant la production de cellulose dans diverses conditions (**Thapa et al, 2020**).

Les micro-organismes sont omniprésents dispersés dans les habitats les plus divers et les plus extrêmes la terre. Ils sont considérés comme des ressources biochimiques exceptionnelles diverses d'enzymes multifonctionnelles cellulolytiques avec des propriétés fonctionnelles et génétiques adaptables (**Thapa et al, 2020**). L'industrie de la biotechnologie est toujours dans la recherche et l'exploration de biomolécules d'origine microbien comme les enzymes dans divers habitats environnementaux extrêmes tels que le microbiote du rumen, les sources chaudes/froides, etc (**Rai et al, 2012 ; Thapa et al, 2020**).

L'enzyme cellulase produite par les champignons aérobies joue actuellement un rôle important et dominant dans diverses applications industrielles. À ce jour, *Trichoderma reesei* et ses mutants, dominent le marché des cellulases industrielles destinées à l'industrie des biocarburants (**Jain & Agrawal, 2017**).

L'application des cellulases est vaste et diverse en industrie : des pâtes et papiers, de textile, la production de bioéthanol, industrie agroalimentaire, etc (**Singh et al, 2021**).

Afin d'apporter notre contribution dans ce domaine, nous avons choisi de mener une étude sur la production des cellulases par les champignons, qui se décline en trois chapitres :

- ✚ **Chapitres I** : Est consacré à présenter des études bibliographiques sur la production des cellulases fongiques.
- ✚ **Chapitres II** : Etude de l'optimisation de divers paramètres de la production des cellulases.
- ✚ **Chapitres III** : Etude bibliographiques des différentes applications industrielles des cellulases fongiques.

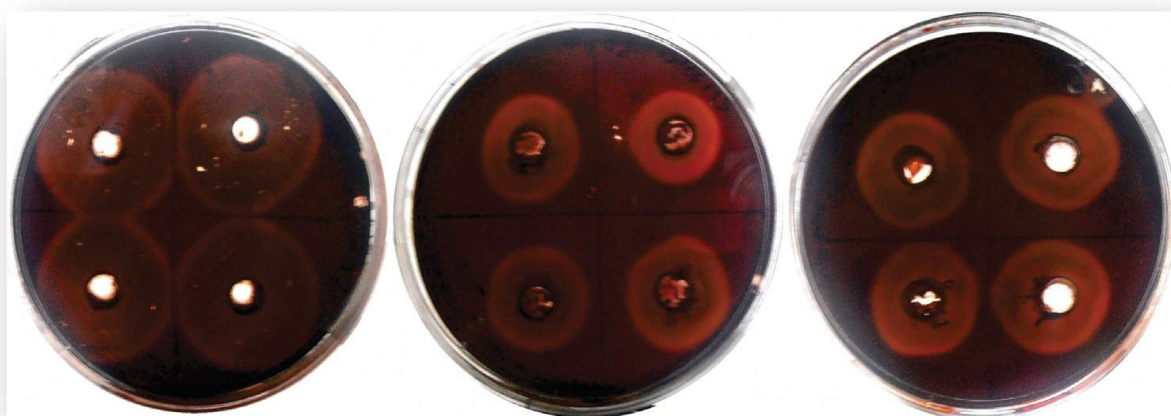
Enfin, ce travail est achevé par une **conclusion générale**.

# **Chapitre I**

## **Production des cellulases fongiques**

## 1. Isolement et identification des souches cellulolytiques

Différentes études ont été réalisées sur l'isolement des souches cellulolytiques à partir de différents biotopes. Un total de 120 micro-organismes ont été obtenus à partir d'échantillon de *Moringa oleifera* étalés sur de la gélose au dextrose de pomme de terre (PDA) incubée à 30°C pendant 4 jours, Les cultures fongiques ont été purifiées par la méthode de la pointe d'hyphe unique et la technique de la plaque de dilution en série. 48 d'entre eux ont été purifiés (41 bactéries et 7 champignons) et ont été testés pour la production d'enzymes cellulolytiques sur des plaques de CMC-agar. Les résultats de la méthode de la zone de compensation ont révélé que la plupart de ces micro-organismes (42) ont la capacité d'hydrolyser la cellulose, les isolats ayant les plus grands halos hydrolytiques ont été observés pour trois isolats fun-gal : FG1, FG3 et FC2f (**Fig 1**). Après identification moléculaire les séquences obtenues ont été déposées dans la banque NCBI GenBank sous les numéros d'accèsion KR185322 (*Penicillium funiculosum*), KR185323 (*Fusarium verticillioides*), KR185324 (*Cladosporium cladosporioides*) (**Vázquez-Montoya et al, 2019**).



**Figure 1:** Activité cellulolytique des isolats fongiques (analyse qualitative). Plaque de gélose contenant du CMC comme substrat et du rouge Congo comme indicateur. Une zone de dégagement autour des puits indique une dégradation de la cellulose (**Vázquez-Montoya et al, 2019**).

Pour la production des enzymes cellulolytiques, la souche locale *A. niger* A68 a été sélectionnée pour fermenter et produire des enzymes cellulolytiques. Isolement de la souche locale était isolé à partir du sol, réactivée sur PDA à 30 °C pendant 7 jours, le dénombrement des spores en suspension a été déterminées à l'aide d'une chambre de Neubauer (**Alves et al, 2019**).



Les moisissures *Penicillium sp* et *Rhizomucor sp* et *Trichoderma koningii* INCQS 40331 (CFAM 422) ont été isolés, l'activation a été réalisée en une plaque de gélose contenant 4,2 % (p/v) gélose au dextrose de pomme de terre à 28 °C pendant 5 jours. Après cette période, les spores ont été récoltées par en ajoutant 10 mL de Tween-80 à 0,1 % (**Salomão et al, 2019**).

D'autre part l'isolement de vingt-trois espèces fongiques, obtenues à partir de diverses sources appartenant à quatre genres différents, espèces fongiques ont été collectées à différents endroits au Ravi dans le campus Pattoki à l'université des sciences vétérinaires et animales, Lahore à partir de : graines de palissandre, sol de rhizobium, sol des plantes à fleurs, sol des d'agrumes, déchets de tomates, terre agricole, pain, effluents textiles, bois de plantes anciennes, sol de gombo, graine de goyave et écorces d'agrumes. D'autres espèces recombinantes ont été obtenues à partir de laboratoire de biochimie. Les espèces fongiques ont été isolées et recultivées sur trois milieux : milieu gélose au dextrose de pomme de terre (milieu PDA), milieu de gélose de Czapek (milieu CA) et milieu d'extrait de malt puis identification selon caractéristiques morphologiques sont à la base de l'identification de ces espèces fongiques (**Imran et al, 2018**).

A partir de la sélection des isolats levures a été réalisée en les cultivant sur un milieu de Mandels et Weber (MW, 1969), contenant la carboxyméthylcellulose (CMC) comme unique source de carbone et d'énergie. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 48 à 72 h. L'activité cellulolytique a été révélée par l'addition de rouge Congo à 1%, qui se lie aux polymères de cellulose. Au bout de 15 à 20 min, un lavage au NaCl (1M) a été effectué. L'apparition d'un halo lumineux autour des colonies indique que la CMC incorporée dans le milieu a été dégradée par la cellulase sécrétée par les isolats ; ces derniers sont appelés "cellulase +", la caractérisation moléculaire a été réalisée par le séquençage de la région d'ADN ITS (**Touijer et al, 2019**).

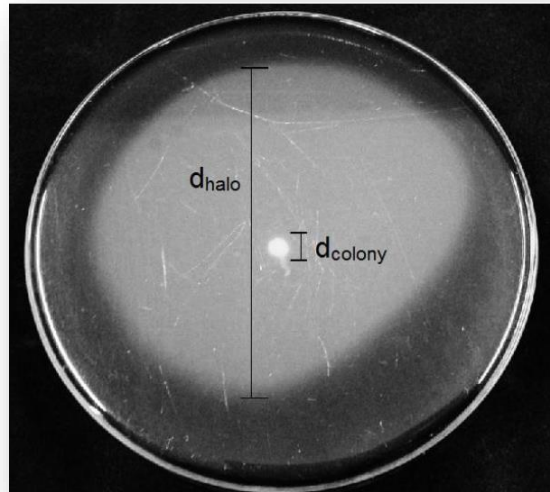
Un total de 82 souches de levure qui ont été obtenues à partir de 111 échantillons prélevés à partir de diverses sources telles que le sol, les écorces d'arbres et les excréments d'insectes de la forêt de RongKho, 2g de chaque échantillon a été incubé dans 5 ml de bouillon d'extrait de levure-extrait de malt (YM) (3 g/l extrait de levure, 3 g/l extrait de malt, 5 g/l de peptone et 10 g/l de glucose), contenant 0,1 g/l de chloramphénicol et 2 g/l de propionate de sodium pour empêcher la croissance des bactéries et des moisissures, respectivement. Les plaques ont été incubées à 30°C pendant 2-3 jours, et les colonies de levures ont été purifiées par stries répétées trois fois. Le criblage a démontré que 45 souches ont la capacité d'hydrolyse de la cellulose qui a confirmée par la présence d'un halo incolore autour de la colonie. Parmi

ces colonies que 3 (UBU-SK6, UBU-JK8 et UBU-JK9/1) sont hautement significatives. L'activité enzymatique de ces 3 souches présentait respectivement 0,224, 0,238 et 0,26 UmL<sup>-1</sup>. L'identification des souches de levures sauvages ont été utilisée par séquençage d'ADN ribosomique (Thongekkaew & Kongsanthia, 2016).



**Figure 2:** Halo d'hydrolyse formé autour de la colonie lors de la croissance pendant 48 h à 30°C (Thongekkaew & Kongsanthia, 2016).

Goldbeck et al, (2012) ont isolé des levures à partir de différents milieux tel que les fruits et les sols de biomes brésiliens tropicaux, y compris : la forêt tropicale atlantique (s'étend le long de la côte brésilienne), le Cerrado (écorégion de savane tropicale) ; le Pantanal (la plus grande zone humide du monde) et la forêt amazonienne (biome complexe du fait de la grande diversité de la végétation présente, considérés comme les « poumons du monde »). Les levures isolées ont été maintenues sur gélose inclinée (milieu GYMP : 2,0 % glucose, extrait de levure 0,5 %, extrait de malt 1,0 %, monobasique 0,2 % phosphate de sodium, gélose à 2,0 % et pH 5,5) à 5 °C. Un total de 390 stockées dans la banque de cultures du Laboratoire de Génie des Bioprocédés et correspondait à un total de 390 souches. La sélection des levures était basée sur l'apparition des halos autour des colonies de la décomposition de la CMC et de la cellulose (SERVACEL®. Sur un total de 390 souches de levures sauvages précédemment isolées, seulement 16 souches sont cellulase positive dont cinq sont les plus performants avec une forte activité enzymatique (Figure 3).

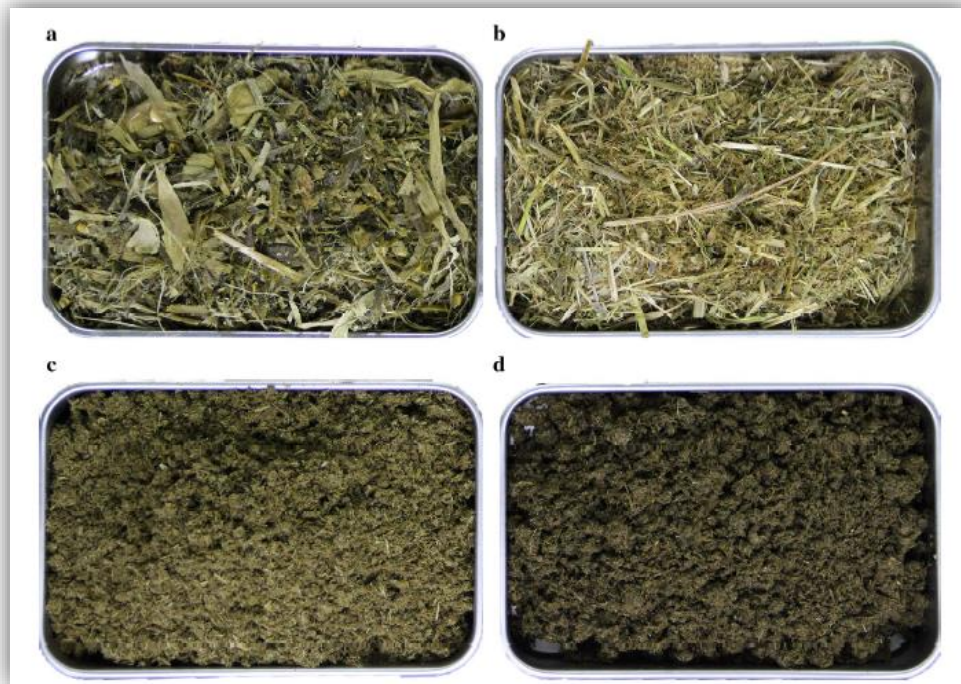


**Figure 3:** Halo d'hydrolyse formé autour de la colonie lorsqu'elle a été cultivée pendant 96 h à 30°C (Goldbeck et al, 2012).

La souche fongique IODBF5 isolée d'un sol contenant le bois pourri (Chamba, Himachal Pradesh, Inde) a été maintenue sur gélose inclinée au dextrose de pomme de terre. Après 5 jours, les spores ont été récupérés comme inoculum et ont été obtenus en les délogant de la surface de PDA inclinée dans une solution stérile à 0,05 % de tween 80, puis un comptage des spores a été effectué sur hémocytomètre ; 108 spores/100 mL ont été inoculé dans les flacons agités pour la production d'enzymes (Saini et al, 2015).

Les échantillons ont été prélevés à partir du sol dans les zones de décomposition du bois et riches en termites du CSI Indian Institute of Petroleum, Dehradun (Inde). Le criblage des plaques a été effectué en utilisant un milieu sélectif. Les échantillons du sol ont été mis en suspension dans de l'eau stérile, l'ensemencement a été effectué sur un milieu de Mandel modifié avec 1 % de sel de sodium de carboxyméthylcellulose et 1% de SCB prétraité à l'acide comme seule source de carbone avec incubation à  $30\pm 2$  °C pendant 3-5 jours. Les cultures purifiées ont été régulièrement maintenues sur des plaques de gélose au dextrose de pomme de terre (PDA) et ont été sous-cultivées chaque semaine. Simultanément, des stocks de glycérol (25%) ont également été préparés à partir des cultures fongiques purifiées et ont été conservés au Congélateur à 80°C (Revco Ultima Plus, Thermoscientific) puis un examen microscopique a été réalisé sur toutes les cultures fongiques isolées (Leica ; Modèle DMIL). L'identification fongique a été faite en se basant sur les caractéristiques morphologiques, des mycéliums, des fructifications et de la disposition des conidies (Jain & Agrawal, 2018).

Du fumier de vache et du fumier de vache digéré en anaérobiose ont été collectés dans une ferme laitière (province du Shandong, Chine). Le lisier de fumier de vache frais collecté et ensuite a été introduit dans des digesteurs continus pour la génération du méthane. La digestion anaérobie pourrait se produire efficacement entre 25 °C et 40 °C. Dans ce processus, les substances organiques sont décomposées et transformées en biogaz par des bactéries productrices de méthane dans des conditions anaérobies. *Saccharomyces cerevisiae* LF1 a été cultivé dans du milieu YPD (1 % d'extrait de levure, 2 % de peptone et 2 % de glucose) à 30 °C et 200 tr/min. Pour induire l'expression de la cellulase, il a été pré cultivé *Penicillium oxalicum* C1-9 sur du milieu de Vogel contenant 1 × solution saline de Vogel et 2% de glucose pendant 26 h (Yan, 2018).



**Figure 4:** Images pour les régimes d'ensilage de maïs et le fumier de vache et le fumier de vache à digestion anaérobie. Régimes d'ensilage de maïs (a), l'ensilage de maïs broyé grossièrement régimes enrichis en aliment protéique complémentaire (b), matières solides de fumier bovin après élimination de la partie liquide par emballage mécanique (c), fumier de vache digéré en anaérobie obtenu à partir de la séparation physique du lisier après un processus de digestion anaérobie pour la production de biogaz (d) (Yan, 2018).

Pour économiser le cout de production, la bagasse a été utilisée comme substrat pour un total de 25 isolats de levures isolées. Après le criblage 10 isolats de levure ont montré une zone claire maximale sur le milieu contenant de la cellulose après coloration au rouge Congo, l'isolat R-1, a montré un diamètre maximal de zone claire (Rai et al, 2012).

Les échantillons de sol riches en déchets cellulosiques tels que les feuilles, les déchets végétaux, etc., ont été collectés dans les cinq régions autour de la zone locale, Jodhpur, es prélevés dans des tubes stériles et stocké à 4 C jusqu'à utilisation ultérieure. Une gramme d'échantillon homogénéisé a été mise en suspension aseptique dans 100 ml de solution saline stérilisée (0,85 % p/v de NaCl). 1 ml de la dilution obtenue est transféré dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu YPD (g/l) : extrait de levure, 10 ; peptone, 20 ; glucose, 10 ; et incubé à 30°C et 120 tr/min à pH 120M/min. Afin d'éviter la croissance bactérienne une dose de 100 µg/ml Ampicilline est recommandée. Environ 139 colonies de levures ont été

isolées sur gélose YPD additionnée d'ampicilline. Ces isolats obtenus ont ensuite été étalés sur le milieu de production de lipides (g/l) : Glucose, 40 ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2 ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 ; extrait de levure, 1; Agar, 20. Vitamines (mg/l) : D-biotine, 0,002 ; pantothénate de calcium, 0,4 ; acide folique, 0,002 ; inositol, 2 ; niacine, 0,4 ; acide para-aminobenzoïque (PABA), 0,2 ; chlorhydrate de pyridoxine, 0,4; riboflavine, 0,2 ; thiamine, 0,4, à 30 °C (pH 5,5). Les colonies de levures se développant sur milieu de production de lipides ont en outre été criblées pour l'accumulation de lipides en utilisant la fluorescence rouge du Nil. Les colonies de levure ayant les taux lipidiques importants (gouttelettes à l'intérieur des cellules) ont ensuite été cultivées sur des plaques dans un milieu de production contenant (g/l): tributyrine, 10 ; peptone, 5; extrait de levure, 3; gélose, 20, pH 6,0 et incubés à 30 °C. ou l'activité lipase a été détectée par dosage qualitatif sur plaque en utilisant la tributyrine comme source de lipide. L'expression de l'enzyme lipase a été confirmée par une zone de clairance autour de la colonie. (Vyas & Chhabra, 2017).

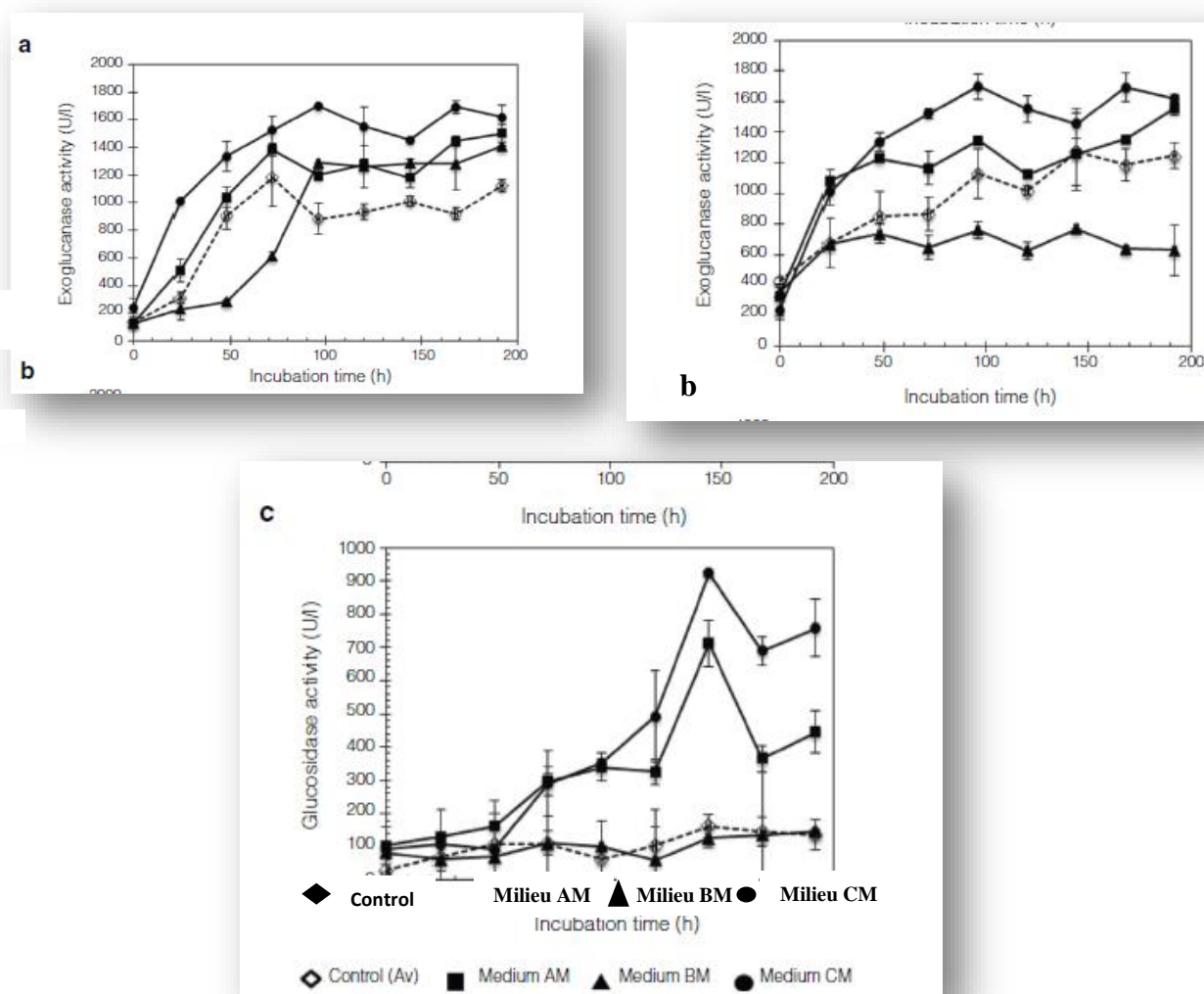
## 2. Production des cellulases

### 2.1. Fermentation et milieux de production

Vázquez-Montoya et al, (2019) ont isolé et purifié 42 micro-organismes à partir de la biomasse de *Moringa oleifera*, les champignons présentant des halos significatifs sur le milieu de base hydrolytiques dans la CMC comme substrat ont été identifiés selon la nature moléculaire comme *Penicillium funiculosum*, *Fusarium verticillioides* et *Cladosporium cladosporioides*.

La culture des espèces a été faite en fermentation submergée sur le milieu A qui contient soit de la cellulose soluble (CMC), soit la forme cristalline insoluble (Avicel) comme seule source de carbone. Les dosages ont été effectués dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml contenant 70 ml de milieu., les flacons ont été inoculés à une concentration finale de  $10^6$  spores/ml et incubés pendant 168 h à 30°C sous agitation à 200 tr/min puis échantillons ont été prélevés à différents intervalles de temps et centrifugés à 10 000 tr/min pendant 10 min. les expériences ont été réalisées en triple. La capacité à dégrader la cellulose dans les deux milieux (CMC et Avicel). Les 3 moisissures *P funiculosum* et *C. cladosporioides* *F. verticillioides* ont montrés leur capacité à à dégrader la matière cellulolytique : l'Avicel pour *P funiculosum* et *C. cladosporioides* et le CMC pour *F. verticillioides*. Evaluation de l'activité de *Penicillium sp* avec différentes source de carbone dont uneest la paille de Moringa Les quantités de sucre

réducteur libéré par hydrolyse enzymatique dans les différentes fermentations sont indiquées dans la **figure 5**.



**Figure 5:** Profil cinétique de réduction de la production de sucre par les champignons *Penicillium funiculosum*, *Fusarium verticillioides* et *Cladosporium cladosporioides*, en utilisant CMC ou Avicel comme seule source de carbone à travers la fermentation submergée (Vázquez-Montoya et al, 2019).

L'action cellulolytique *Penicillium sp* a été étudiée en utilisant différents milieux de culture (A), (B) et (C) avec de la paille de moringa comme seule source de carbone. Les milieux minéraux A, B et C ont été utilisés pour l'hydrolyse et la production de cellulase. Les compositions de ces milieux étaient les suivantes (g/l) : Milieu A (MA) : 1,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 0,7,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ; 0,5,  $\text{NaCl}$  ; 0,7,  $\text{FeSO}_4$  ; 0,3,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ; 0,3,  $\text{MnSO}_4$  ; pH 4,0. Milieu B (MB) : 2,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 0,4,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ; 0,3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ; 0,005,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ; 0,0016,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ; 0,0014,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ; 0,002,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 0,97, urée ; 0,36, extrait de levure ; pH 5. Milieu C (MC) : 2,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 0,3,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ; 0,3,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ; 1,4,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ;

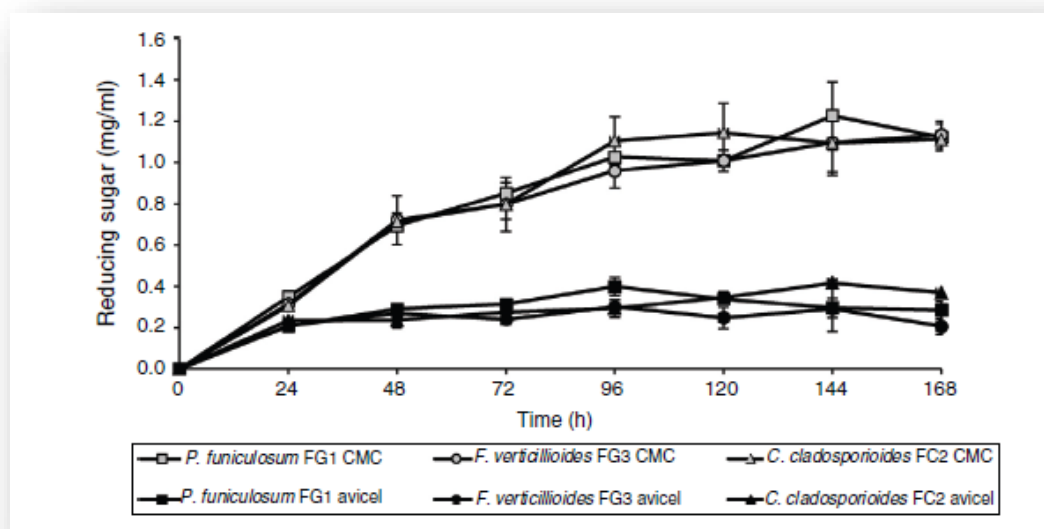
0,005,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,0016,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,0014,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,002,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25, peptone; 0,75, extrait de levure ; 0,3, urée ; 1,0 mL, Tween-80 et pH 5,5, rapporté par Mandels et Weber<sup>27</sup>. CMC (1 %), Avicel® (Fluka Analytical, Pcode : 101137236, New York, États-Unis) (1 %) ou moringamilled (0,5 mm) paille (2 %) ont été ajoutés individuellement comme sources de carbone. Tous les dosages ont été réalisés dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 70 ml de milieu. Les flacons ont été inoculés à une concentration finale de  $1 \times 10^6$  spores/ml et incubés pendant 168 h à 30°C avec agitation à 200 tr/min. Les échantillons ont été prélevés à différents intervalles de temps et centrifugés à 10 000 tr/min pendant 10 min. les expériences ont été réalisées en triple. La **figure 6** montre le profil cinétique obtenu pour les enzymes cellulolytiques produites par *P. funiculosum* : EnG, ExG et BG. En particulier, l'activité Endoglucanase (EnG) qui a atteint  $1683,27 \pm 109,14$  U/l lorsque le milieu C contenant de la paille de moringa a été utilisé, ce qui était 2,77 fois plus élevé que l'activité trouvée dans A, B ou C sans paille de moringa (**Fig. 6a**). De plus, ExG et les activités BG ont augmenté de 8, 26 et 2, 30 fois, respectivement, dans le milieu C avec de la paille de moringa (**Fig. 6c**).

Une augmentation constante d'EnG a été obtenue dans la culture sur milieu C de 1313,8 U/l à 1624,8 U/l pendant 48-192 h de fermentation (**Vázquez-Montoya et al, 2019**).

Une augmentation constante d'EnG a été obtenue dans la culture sur milieu C de 1313,8 U/l à 1624,8 U/l pendant 48---192 h de fermentation (**Vázquez-Montoya et al, 2019**).

D'après les résultats obtenus, la paille de Morinaga est une bonne source de nutriments pour le marché de la production d'enzymes cellulolytiques à partir de souches fongiques et son utilisation pourrait aider à réduire les coûts de production de cellulase (**Vázquez-Montoya et al, 2019**).





**Figure 6:** Effet du milieu de culture sur la production de cellulase par *P. funiculosum*, utilisant différentes matières premières comme sources de carbone (Vázquez-Montoya et al, 2019).

L'étude de la production multienzymatique des cellulases de *d'A. niger* A68 isolée à partir du sol et la préparation du substrat solide qui a été prétraitée par une solution alcaline en utilisant peroxyde d'hydrogène à 1% (v/v) dans le rapport 50:1 (ml g 1) à un pH de 11,5 avec une solution de NaOH. Après précipitation filtré et séché dans une étuve à 50 °C réalisée en fermentation solide réalisée dans des flacons Erlenmeyer (250 ml) contenant la bagasse de canne à sucre (1,0 g) stérilisé précédemment dans un autoclave pendant 20 min à 121 °C pour stériliser le matériel et le récipient. Les milieux sontensemencés avec 100 µl de suspension de spores *d'A. niger* ayant une concentration de  $1,0 \cdot 10^7$  spores/ml. Le processus de la FMS a été réalisé à l'aide par dans étuve bactériologique (Quimis) à 30 C pendant 48 h. Ensuite, les produits fermentés ont été obtenus par des méthodes d'extraction : 1/ La méthode d'extraction liquide-liquide (ELL) suivie d'une extraction assistée par ultrasons (UAE), 2/ l'extraction liquide liquide (ELL). L'ELL était plus efficace que l'ELL-UAE en deux étapes, et le maximum des activités enzymatiques pour l'activité d'hydrolyse de papier filtre FPase, la CMCase et la  $\beta$ -glucosidase étaient de 0,354, 0,303 et 3,135 U/ ml, respectivement. Il semble que le processus d'extraction ELL était meilleur parce qu'il consommait moins d'énergie, nécessite un équipement plus simple et offre une plus grande efficacité dans un temps plus court (Alves et al, 2021).

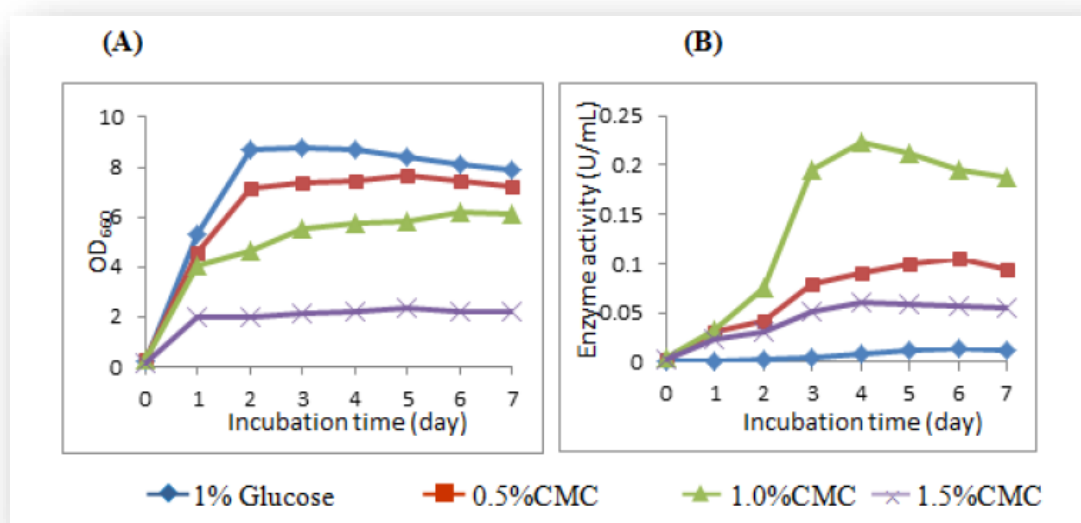
La bagasse de canne à sucre a été prétraitée avec une solution acide-alcaline comme suit : 10 g de bagasse ont été mis en suspension dans 200 mL d'une solution d'acide sulfurique à 1 % (v/v). La suspension a été agitée à 100°C pendant 40 min ; le substrat a été filtré et lavé à l'eau chaude jusqu'à pH neutre, par la suite, 200 mL d'une solution de NaOH à 7 % (p/v) a été ajoutés à la bagasse lavée et prétraitée à l'acide, la suspension est maintenue sous agitation à 100°C pendant 40 min. Après cela, le substrat a été lavé à l'eau chaude jusqu'à pH neutre et avec un tampon citrate 50 mM pH 4.8, le résidu solide a été séché au four à 55°C jusqu'à poids constant.

Les cultures en la fermentation solide des champignons *Penicillium sp*, *Rhizomucor sp* et *Trichoderma koningii* ont été réalisées en présence de la bagasse de la canne à sucre (naturelles et prétraitées avec de l'acide alcalin et solutions de peroxyde d'hydrogène) comme substrats. Les fermentations sont réalisées dans des Erlenmeyer de 250 mL contenant 5 g de substrat, différents taux d'humidité ont été testé (50, 60 et 70 % d'humidité) et les milieux sontensemencés avec  $2,0 \times 10^7$  spores/g de substrat. Différentes température de culture ont été testées 28, 33 ou 38 °C pour tous les tests, ces derniers ont été réalisées dans un incubateur équipé avec contrôle de la température pendant 72 h (*T. koningii*) et 120 h (*Penicillium sp* et *Rhizomucor sp*). A la fin de la fermentation, 50 ml de solution de NaCl à 2% (w/v) a été ajoutée au milieu de culture et agitée à 200 tr/min pendant 1 heure à 28 °C pour l'extraction enzymatique. Après centrifugation (3500 rpm à 25 °C pendant 30 min), le surnageant a été récupéré et utilisé pour mesurer l'activité de l'endoglucanase en présence de CMC par la méthode standard. Les activités enzymatiques (UI/g substrat) obtenues dans le FMS de *T. koningii*, *Penicillium sp* et *Rhizomucor sp*, les résultats ont montré que le champignon le plus adapté à la production de cellulases était le *T. koningii* (8,2 UI/g de substrat), suivi de *Penicillium sp* (1,7 UI/g de substrat), De plus, les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant bagasse de canne à sucre naturelle (NSB) pour tous les champignons. Les analyses statistiques ont montré que la température a un effet plus important sur la production de cellulases par les champignons évalués (Salomão et al, 2019).

Les 3 souches isolées (UBU-SK6, UBU-JK8 et UBU-JK9/1) et identifiés comme : *Candida sp* 05-7-186T, *Candida easanensis* et *Candida sp* ST-390 respectivement. Les isolats ont été évalués pour l'activité de la CMC dans un milieu de CMC-extrait de levure contenant 1 % d'extrait de levure contenant et différentes concentrations de CMC (0,5-1,5 %) sous agitation à 150 tr/min à 30 °C pendant 7 jours. Ensuite, les cellules ont été séparées par centrifugation, le surnageant acellulaire est utilisé comme source d'enzyme. L'activité de la

CMC a été déterminée en mesurant la libération de sucres réducteurs du sel de CMC-Na à l'aide de la méthode Somogyi-Nelson (**Jantaporn & Kongsanthia, 2016**).

Le résultat de la production de cellulase de trois souches sélectionnées (UBU-SK6, UBU-JK8 et UBU-JK9/1) a montré que le milieu de culture contenant 1,0 % de CMC est l'induction la plus efficace de la production d'enzymes, cette valeur est assez proche des résultats de production de cellulase par *Pseudomonas sp* et *Alternaria sp.* MS28. L'activité cellulase la plus élevée d'UBU-SK6 a été observée à 96 h de fermentation (0,224 UmL<sup>-1</sup>) (**Fig 7**).



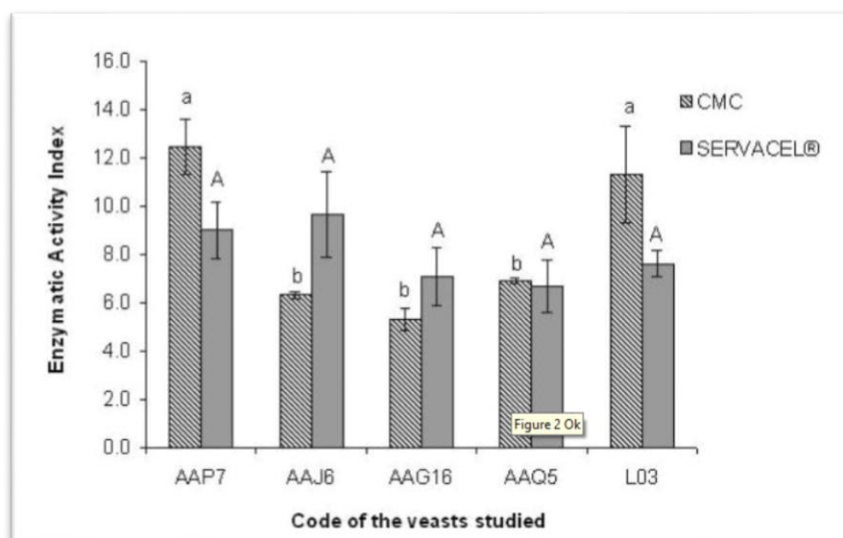
**Figure 7:** Effet de la concentration de carboxyméthylcellulose (CMC) de 0 à 1,5 % (p/v) sur la production de cellulase de la levure nommée UBU-SK6. La croissance (A) et la production d'enzymes (B) ont été mesurées à intervalles de 24 h pendant 7 jours (**Jantaporn & Kongsanthia, 2016**).

Tandis que l'activité enzymatique la plus élevée des souches de levure UBU-JK8 et UBU-JK9/1 a été observée les 120 h de fermentation (0,238 et 0,26 UmL<sup>-1</sup>, respectivement) (**Jantaporn & Kongsanthia, 2016**).

En comparant la production de cellulase de ces levures à des différentes souches de levures étudiées antérieurement, les activités de levure nommées UBU-SK6, UBU-JK8 et UBU-JK9/1 étaient inférieures à celles de *Candida stellata* (30,6 UmL<sup>-1</sup>), *Aureobasidium pullulans* la souche PJF-4b (0,44 UmL<sup>-1</sup>), *Candida glabrata* la souche PJS-4a (0,38 UmL<sup>-1</sup>) et *Candida litsaeae* la souche PJB-3 (0,36 UmL<sup>-1</sup>). Cependant, les rendements en cellulase de

ces isolats de levures étaient deux fois plus élevés que ceux les plus actifs des *Trichosporon sp.* (0,12 et 0,14 UmL<sup>-1</sup>) (Jantaporn & Kongsanthia, 2016).

Parmi 390 souches de levures sauvages précédemment isolées, 16 souches ont montré une hydrolyse de la cellulose, vérifiée par le halo incolore dans le milieu solide. Puis ces 16 souches présélectionnés, seulement 5 ont été sélectionnés car elles sont les plus performant pour la production enzymatique. Pour la sélection en milieu solide, les levures sauvages ont été cultivées afin d'identifier celles capables de dégrader la CMC et la cellulose microcristalline (SERVACEL®). Après incubation, les milieux ont été révélés avec une solution de rouge Congo et la formation de halo a été analysée. La formation d'un halo clair entourant la colonie indique une activité hydrolytique. Les diamètres des halos ont été mesurés dans trois directions différentes pour déterminer la valeur moyenne (Fig 8).



**Figure 8 :** Indices d'activité enzymatique (EAI) pour les cinq souches de levure cultivées sur milieu solide. Les différentes lettres indiquent une différence significative à un niveau de signification de 5 % ( $p < 0,05$ ) entre les souches, pour les deux substrats (Carboxyméthylcellulose et SERVACEL®) (Goldbeck et al, 2012).

Les majuscules ont été utilisées pour les tests avec SERVACEL® et les minuscules pour les tests avec la Carboxyméthylcellulose (CMC), évaluée par le test de Tukey.

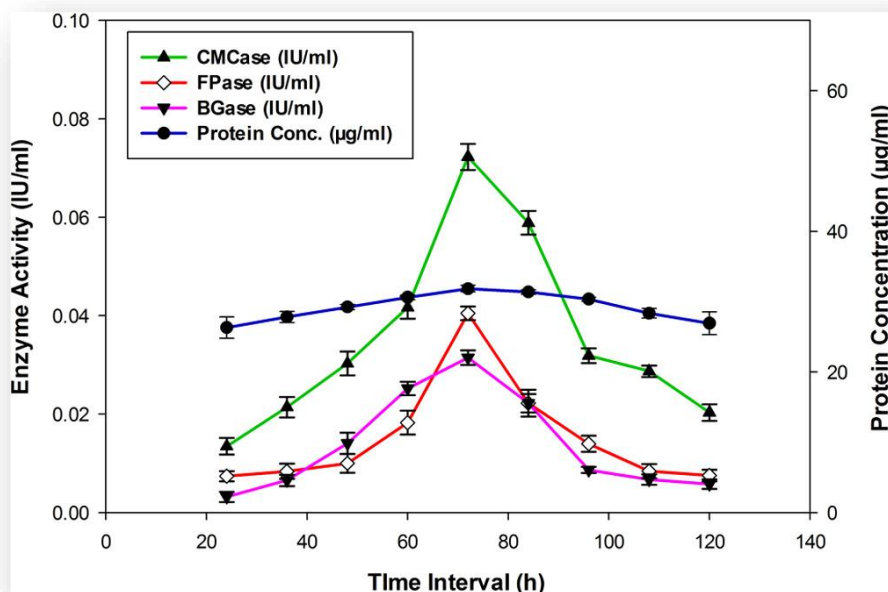
Le criblage en milieu liquide ou les fermentations ont été effectuées dans des flacons agités à 30°C et 150 tr/min, et surveillées pendant 288 h. Des échantillons ont été prélevés toutes les 48 h, et d'autres prélevés périodiquement ont été centrifugés à 4 ° C et 18 200 x g pendant 10 min. Le surnageant présente l'extrait enzymatique brut est soumis à des dosages de

CMCase (activité endoglucanase), FPase (activité papier filtre) et activité cellobiase. Le résultat a montré qu'une seule souche (AAJ6) parmi les cinq présélectionnées sur milieu solide est sélectionnée comme productrice potentielle de cellulase montrant une activité hydrolytique la plus élevée sur la CMC (0,33 U/ml) et sur le papier filtre (0,039 U/ml). L'identification moléculaire de cette souche de levure sauvage (AAJ6) a été réalisée à partir des séquences des domaines ITS1-5.8S-ITS2 et D1/D2 de l'ADN ribosomal de la sous-unité (26 S) et il est avéré que la levure est *Acremonium strictum* (Goldbeck et al, 2012).

Différents espèces de levures ont été isolées à partir d'échantillons de sol de la région subantarctique et des essais préliminaires ont montré des activités amylase et cellulase, ces levures ont été caractérisées par leur assimilation et leur fermentation de l'amidon soluble (SS) et de CMC (Carrasco et al, 2016).

D'autre part ces levures ont été étudiées pour leur capacité à se développer dans un milieu minimal (YNB) avec l'amidon soluble (SS) ou CMC comme seule source de carbone. Les résultats ont montré que toutes les levures testées ont pu se développer sur ces milieux. A l'exception de *Leuconeuropsora sp.* (T27Cd2), qui atteint plus de biomasse lorsqu'il est cultivé avec 0,5 % CMC, toutes les levures ont montré une biomasse plus élevée lorsqu'elles sont cultivées avec 2 % de CMC qu'avec des concentrations plus faibles (Carrasco et al, 2016).

La levure oléagineuse *Cystobasidium oligophagum* a été isolée et cultivée dans un milieu de production contenant (g/l) : CMC, 10 ; extrait de levure, 0,6 ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7 ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2 ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1, gélose 20 (pH 6) (Goldbeck et al., 2012), après une incubation à 30 °C. Les colonies qui ont montré une croissance ont été plaquées réplique. L'activité cellulase extracellulaire a été confirmée par la méthode de rouge congo à 0,2 %. Les cellulases comprennent l'endoglucanase (CMCase), l'exoglucanase (cellobiohydrolase/FPase) et  $\beta$ -glucosidase. Les dosages pour les trois enzymes ainsi que la concentration en protéines (100 ml de milieu) à 28 °C ont été enregistrés toutes les 12 h comme indiqué dans la **Figure 9**. Il a été indiqué que sur le milieu CMC, l'activité enzymatique spécifique la plus élevée pour l'endoglucanase (CMCase), l'exoglucanase et la  $\beta$ -glucosidase obtenues étaient de  $2,27 \pm 0,007$ ,  $1,26 \pm 0,0408$  et  $0,98 \pm 0,0408$  UI/mg respectivement (activité enzymatique  $0,072 \pm 0,013$ ,  $0,040 \pm 0,006$ ,  $0,031 \pm 0,011$  UI/ml respectivement) après 72h d'incubation (Vyas & Chhabra, 2017).



**Figure 9 :** Profil d'activité cellulosique de *C. oligophagum* JRC1 avec le temps : Affichage du profil de l'activité endoglucanase, exoglucanase et b-glucosidase (UI/ml) et protéines totales (lg/ml) avec le temps dans un milieu contenant de la CMC comme source de carbone (Vyas & Chhabra, 2017).

## 2.2. Champignons producteur des cellulases

Différentes souches fongiques ont montré leur capacité à produire une activité cellulosique (**Tableau 1**).

**Tableau 1:** Souches productrices de cellulases.

<b>Souche</b>	<b>Référence</b>
<i>Penicillium funiculosum, Fusarium verticillioides, Cladosporium cladosporioides</i> )	<b>Vázquez-Montoya et al, 2019.</b>
<i>Aspergillus niger</i>	<b>Alves et al, 2019.</b>
<i>Penicillium sp et Rhizomucor sp Trichoderma koningii</i>	<b>Salomão et al, 2019.</b>
<i>Aspergillus niger</i>	<b>Imran et al, 2018.</b>
<i>Trichosporon</i>	<b>Touijer et al, 2019.</b>
<i>Candida</i>	<b>Thongekkaew &amp; Kongsanthia, 2016.</b>
<i>Acremonium strictum</i>	<b>Goldbeck et al, 2012.</b>
<i>Penicillium sp. Rhizomucor sp. Trichoderma koningii</i>	<b>Salomão et al, 2019.</b>
<i>Penicillium oxalicum</i>	<b>Saini et al, 2015.</b>
<i>Aspergillus sp Penicillium</i>	<b>Jain &amp; Agrawal, 2017.</b>
<i>Penicillium oxalicum Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>Yan, 2018.</b>
<i>Candida</i>	<b>Rai et al, 2012.</b>
<i>Cystobasidium oligophagum</i>	<b>Vyas &amp; Chhabra., 2017.</b>
<i>Trichoderma reesei</i>	<b>Lodha et al, 2020</b>

# **Chapitre II**

## **Optimisation de la production des cellulases fongiques**



Pour la production des enzymes telles que la cellulase, protéase,  $\alpha$  amylase, ... etc il serait intéressant d'optimiser leur production par l'utilisation des plans statistiques.

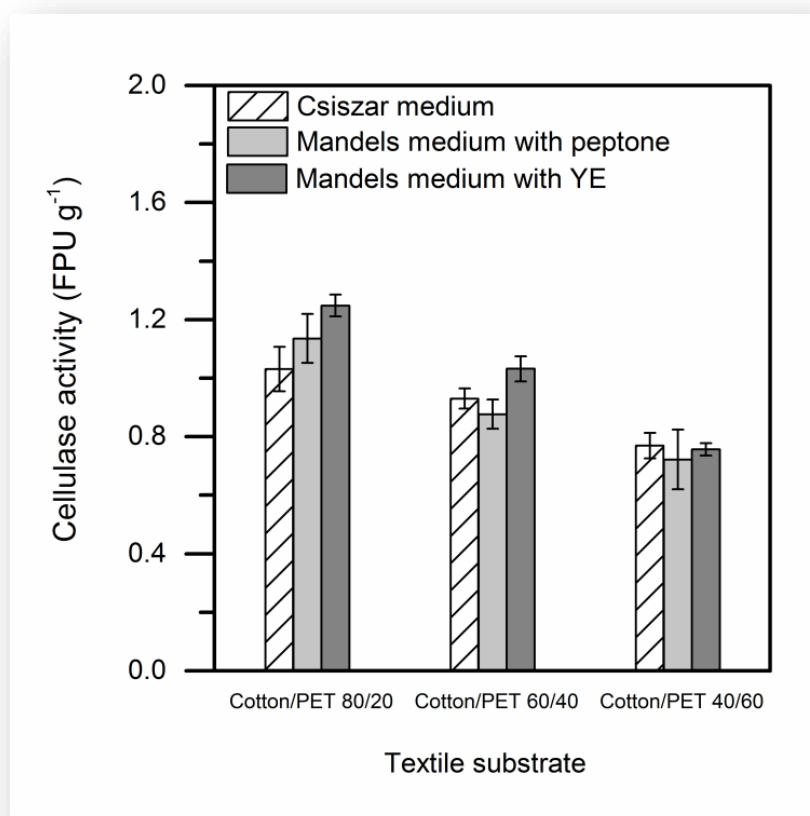
Parmi ces plans, les plans de Plackett–Burman (1946), les plans de Box et Wilson (1951) et les plans de Box-Behnken couplés à la RMS sont les plus appliqués en biotechnologie, pour améliorer la production enzymatique.

Plackett et Burman ont publié leur étude en 1946, dans *Biometrika*, ils expliquent comment construire des plans permettant d'étudier un grand nombre de facteurs avec peu d'essais. Chaque facteur est étudié à deux niveaux en supposant que toutes les interactions entre facteurs sont négligeables devant les effets principaux (**Bouzaouit, 2016**), ce plan est utilisé pour l'optimisation de la production des amylases et protéases (**Yahya et al, 2016 ; Ghorri et al, 2022**). Le plan composite centré est un outil expérimental efficace permettant l'identification des facteurs effectifs, l'étude de leurs interactions et la sélection des conditions optimales d'un système multi variable. Il a été utilisé pour l'optimisation de la production d'amylase et de cellulase (**Arouak et Zenad, 2019**). Le plan de Box-Behnken (BB) présente l'avantage d'être moins coûteux avec nombre d'essais réduits et ressources à investir pour l'expérimentation, tous les facteurs ne prennent que trois niveaux : - 1, 0 et + 1, en variables codées. Il est utilisé dans divers domaines physique, chimie et pour évaluer l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance des micro-organismes agroalimentaires pour la production du bioéthanol, des pectinases, les esters de sucres...etc (**Bouzaouit, 2016**).

Dans le cadre de développement d'une nouvelle méthode de recyclage de déchets de textiles, le projet « Textile Waste Recycling By Biological Method » à Hong Kong vise l'étude de recouvrement de cellulose et polyester PET (**Hu et, 2017**).

L'optimisation de différents facteurs de la production des cellulases à partir de déchets de textile est importante. 2g de textile (coton/PET) sec avec les portions : 80/20, 60/40, 40/60 a été mis en culture en présence de milieu de culture et en évaluant les différents paramètres physiques selon la méthode : Response Surface Methodology (RSM) (**Hu et, 2017**).

Pour le choix du meilleur milieu de culture, 3 milieux ont été testés : csiszar, Mandels avec peptone et Mandels avec extrait de levure (YE) comme source d'azote incubés avec  $3.10^7$  spores  $g^{-1}$  d'*Aspergillus niger* CKB avec 75% d'humidité, pH 6 pendant 9j à 28 °C. Le milieu Mandels avec extrait de levure a été sélectionné en FMS avec une meilleure activité cellulastique de 1.24 FPU  $g^{-1}$  obtenue par la portion 80/20 coton/PET (**Figure 10**) (**Hu et, 2017**).



**Figure 10 :** Fermentation à l'état solide sur six types de textiles en utilisant différents milieux de culture (Hu et, 2017).

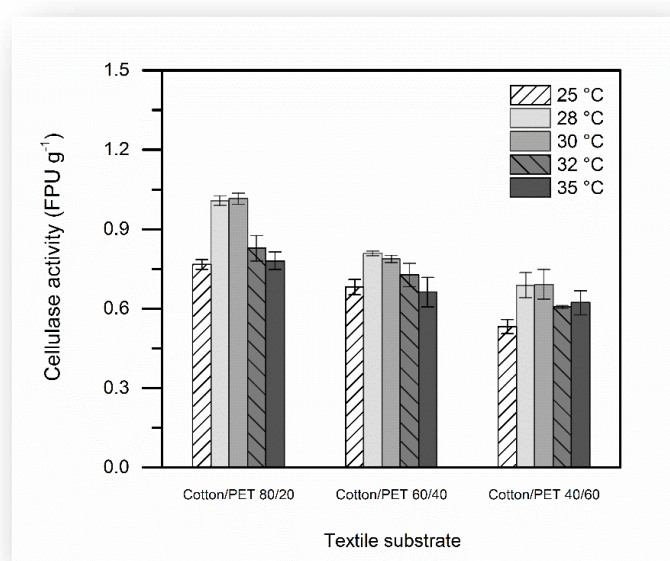
Quatre facteurs ont été évalués par RSM : pH, concentration de l'extrait de levure, concentration d'inoculum et le taux d'humidité **Tableau 2**.

**Tableau 2:** Conception de la composition centrale de quatre facteurs sur FMS pour la production de cellulase (Hu et, 2017).

Facteur numérique	Unité	Niveau du facteur			
		-1	+1	- $\alpha$	+ $\alpha$
(A) pH	-	5	7	4	8
(B) Extrait de levure	w/w %	1	4	0	5.5
(C) Inoculum	Spores/g	1.6 E+007	4.6 E+007	1 E+006	6.1 E+007
(D) Humidité	%	60	80	50	90

Sur la base de la conception des facteurs ci-dessus, un total de 30 expériences avec six points centraux (fixés à la valeur médiane de chaque facteur) ont été suggérés par le logiciel. L'influence de chaque condition de fermentation sur la production de cellulase a été évaluée par l'analyse de variance (ANOVA) basée sur le test de Fisher. Le traitement des données et l'analyse statistique ont été réalisés par le logiciel Design-Expert® 8.0.

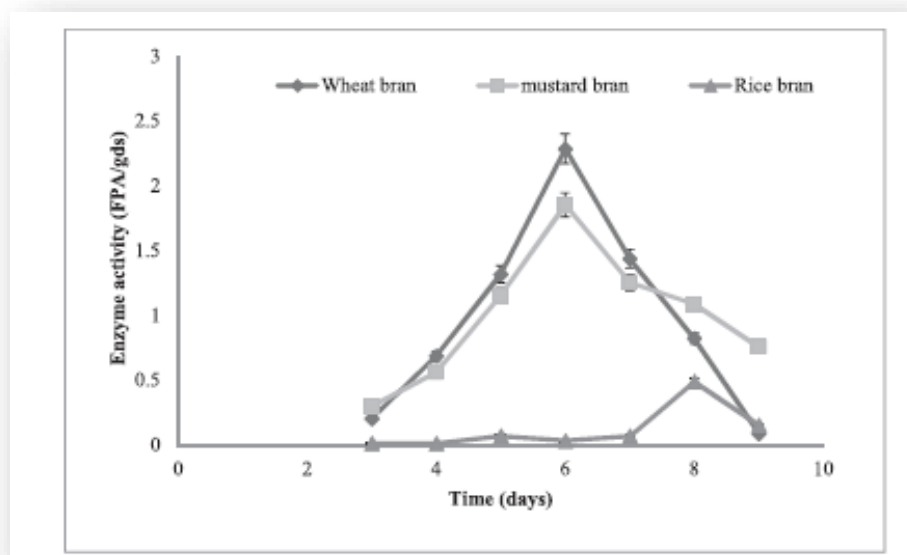
La meilleure production de cellulase par *A.niger* en utilisant les déchets de textile a été observée à 28 et 30 °C pour les portions de Coton/PET 80/20, 60/40, 20/80 dans l'ordre : 0.15 FPU g<sup>-1</sup>, 0.84 FPU g<sup>-1</sup>, 0.75 FPU g<sup>-1</sup> (**Fig 11**).



**Figure 11** : Production de cellulase sur des déchets textiles à différentes températures (**Hu et, 2017**).

Les facteurs typiques affectant la fermentation ont été optimisés grâce à une méthode à un variable (OFAT) et à la méthodologie de surface de réponse (RSM), qui suggéraient les conditions FMS optimales en utilisant le milieu de Mandels avec de l'extrait de levure (2,24 w/w%), la teneur en humidité de 78%, la taille de l'inoculum de  $3,10 \times 10^7$  spores g<sup>-1</sup> et pH 7,29 à 28°C.

L'ajout d'amidon (0,5 % p/p) et d'Avicel (1 % p/p) a encore augmenté l'activité de la cellulase à 1,56 FPU g<sup>-1</sup> avec une efficacité de production considérablement améliorée (**Fig 12**).

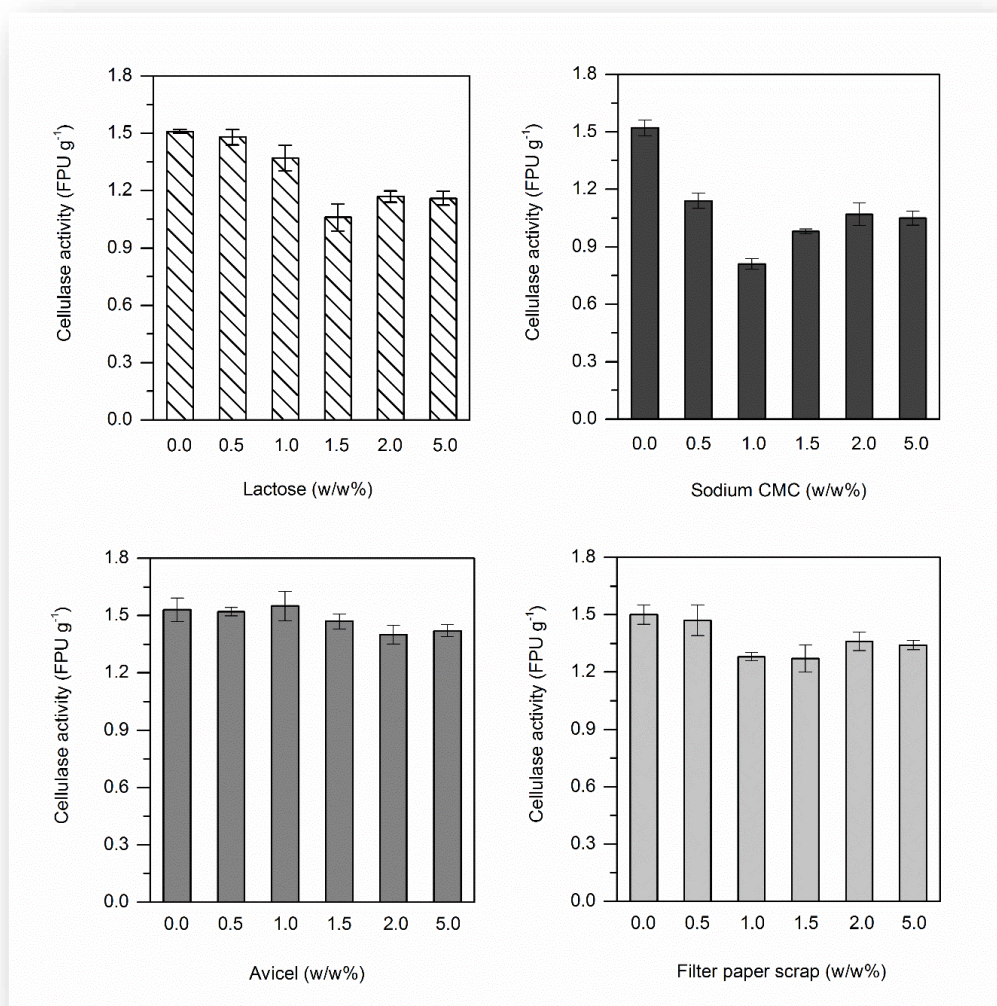


**Figure 12** : Effet des inducteurs sur la production de cellulase à partir de déchets textiles (mélange 80/20 coton/PET) (**Hu et al, 2017**).

Les résultats rapportés dans cette étude pourraient contribuer à une approche innovante des textiles circulaires, qui permet la transition du modèle linéaire actuel vers un modèle d'économies circulaires plus fortes.

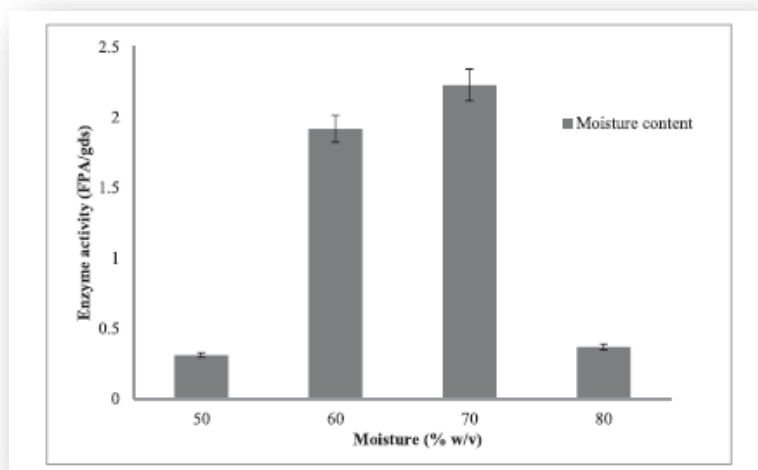
L'étude de **Lodha et al (2020)** est menée dans le but de l'hyperproduction des cellulases par la co-culture de *Trichoderma reesei* et *Penicillium citrinum* en utilisant des déchets industrielles à faible coût sur un milieu solide. Divers paramètres physico-chimiques ont été optimisés pour induire la production. A savoir : le substrat ; différents substrats ont été testés comme le son de riz, le son de blé et le son de graine de moutarde.

Il a été démontré que la meilleure production a été observée au 6<sup>ème</sup> jour en utilisant le son de riz : 2.284 FPU/gds (**Fig 13**). Ceci est dû à la richesse de son de blé en celluloses es en comparaison à d'autres substrats utilisés



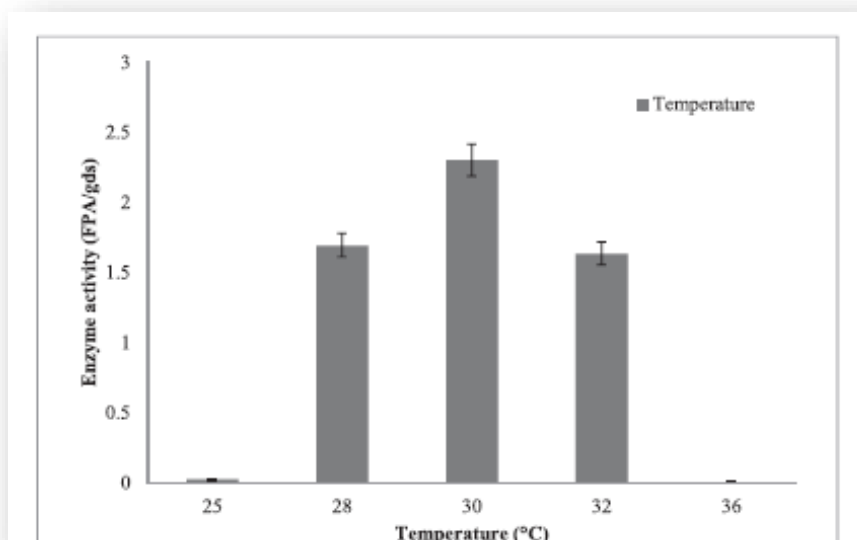
**Figure 13** : Production de cellulase par fermentation à l'état solide à l'aide de différents substrats à 30°C et concentration de 10<sup>5</sup> spores (Lodha et al, 2020).

Le taux d'humidité a été optimisé en étudiant différents taux de 50%, 60%, 70% et 80% pendant 6 jours. La **figure 14** a montré que 70% était la teneur optimale d'humidité.



**Figure 14 :** Effet du pourcentage d'humidité (p/v) sur la production de cellulase après 6 jours d'incubation lorsque le son de blé a été inoculé avec  $10^5$  spores concentration à  $30^{\circ}\text{C}$  (Lodha et al, 2020).

Le profil de l'activité cellulosique à différentes températures a montré que le rendement de la co-culture de *T. reesei* et *P. citrinum* était au maximum à  $30^{\circ}\text{C}$  (2.302 FDU/ gds) voir Fig 15.



**Figure 15 :** Effet de la température sur la production d'enzymes cellulosique après 6 jours d'incubation (substrat : le son de blé, taux d'ensemencement de  $10^5$  spores/g, taux d'humidité 70 % (p/v) à  $30^{\circ}\text{C}$  (Lodha et al, 2020).

Au départ, plusieurs souches fongiques isolées ont été criblées pour la production de cellulase en milieu minimal. Parmi ceux-ci, *P. oxalicum* a produit un maximum de 0,7 UI/mL FPase, 6,96 UI/mL CMCase, 8,17 UI/ mL de xylanase, 4,96 UI/mL de BGL et 4,27 mg/mL de protéines après 8 jours. Ainsi, il a produit les différents composants de la cellulase qui sont nécessaires pour une action synergique sur la biomasse afin que l'hydrolyse soit efficace. Cependant, l'activité cellulase doit être renforcée pour les biocarburants applications. Par conséquent, l'optimisation des paramètres de processus importants a été réalisée pour améliorer la production des cellulases. Sur la base d'expériences préliminaires sur la production de cellulase par *P. oxalicum* IODBF-5, quatre paramètres significatifs ont été sélectionnés pour l'optimisation dans des cultures agitées et la méthode RSM a été adoptée pour maximiser les paramètres culturels et nutritionnels. Le logiciel Concoeur Expert (version 7.0) a été employé pour analyser les résultats de 29 expériences selon le plan de Box – Behnken de quatre variables différentes. Chacune est étudiée à trois niveaux différents ; niveau inférieur (-1), intermédiaire (0) et supérieur (+1). Les résultats montrent différents variables indépendantes et l'activité cellulase (FPU/mL) comme réponse. Les données obtenues à partir de la matrice Box – Behnken Design (BBD) à quatre facteurs et à trois niveaux ont donné l'équation de régression suivante, qui indique une relation empirique entre l'activité cellulase (FPU/mL) et les variables test significatives :

$$Y = +0.19 - 0.32 * A + 0.080 * B + 0.081 * D - 0.10 * A * B - 0.11 * A * D + 0.23 * A^2 - 0.085 * D^2$$

L'ANOVA pour le modèle quadratique réduit de surface de réponse a montré que le Fisher modèle était significatif. Les résultats pour la production de cellulase prévues par le logiciel Design Expert ont montré que le modèle est « significatif » avec une valeur  $P < 0,0001$  et un manque de valeur d'ajustement "non significatif".

Sur la base du modèle développé et de l'analyse de la surface de réponse, les conditions de culture optimales pour une production maximale de cellulase de 1,26 FPU/mL ont été prédites comme suit : Avicel 0,5 % (p/v), son de blé 2,5 % (p/v), sulfate d'ammonium 0,53 % (p/v) et temps d'incubation de 8 jours (**Saini et al, 2015**).

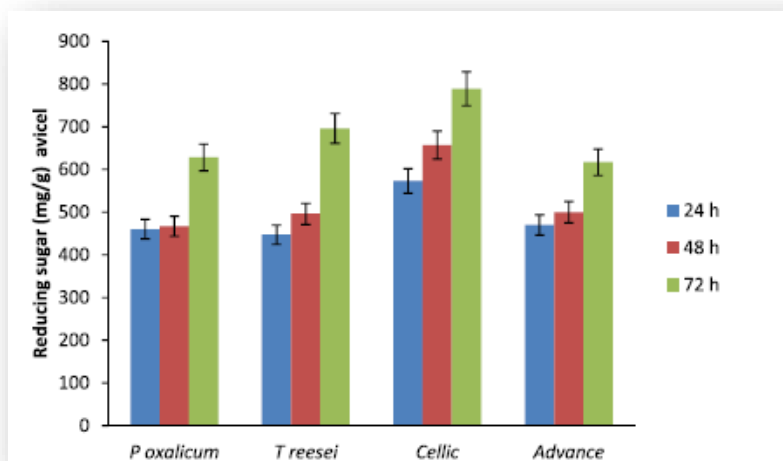
L'effet du pH sur les activités cellulase et  $\beta$  glucosidase (BGL) du pétrole brut cellulase de *P. oxalicum* a été étudiée en réalisant FPase et dosages BGL à 50 °C et à différents

pH 3 à 8. Les activités maximales de cellulase et de BGL étaient observé à pH 5,0 et les activités des deux enzymes ont fortement diminué lorsque le pH diminu ou augmente loin de 5 (Saini et al, 2015).

A 50 °C, 50% de l'activité cellulase était conservé jusqu'à 48 h ce qui est un bon indicateur de l'hydrolyse de la biomasse. La proportion la plus élevée de BGL par rapport à l'activité papier filtre, montre une bonne stabilité des cellulases de la souche IODBF-5. La température représente un facteur important pour obtenir une hydrolyse efficace de la biomasse lignocellulosique sans aucune supplémentation d'autres enzymes (Saini et al, 2015).

L'efficacité de l'hydrolyse des cellulases de *P. oxalicum* a été comparée avec d'autres préparations commerciales comme Cellic CTec3 de Novozyme et SacchariSEB C6 d'Advanced Enzymes et la préparation de cellulase de *T. reesei* RUT C-30 et les résultats sont exposés dans la **Fig.16**. Les résultats de l'hydrolyse de l'avicel indiquent que l'efficacité hydrolytique de la cellulase de *P. oxalicum* était comparable à SacchariSEB C6 ainsi qu'à la cellulase de *T. reesei* RUT C-30. Il convient de noter ici que *T. reesei* RUT C-30 est un souche fongique hypercellulolytique qui a été améliorée et développé sur une longue période de temps; considérant que *P. oxalicum* est une espèce naturelle, isolat fongique indigène. L'efficacité de saccharification de la cellulase brute de *P. oxalicum* était inférieure d'environ de 20 % à celle de CTec3. Une meilleure efficacité d'hydrolyse de Cellic CTec3 peut être attribuée à la présence d'activités enzymatiques accessoires, y compris Composés GH61 ainsi que BGL beaucoup plus élevé ainsi que l'activité l'hémicellulase. Dans l'ensemble, on peut conclure que la cellulase de *P. oxalicum* est une espèce pour la production de cellulase, sa cellulase a potentiel d'hydrolyse de la biomasse dans les applications de bioéthanol. L'efficacité d'hydrolyse de la préparation de l'IODBF-5 pourrait être encore améliorée en le mélangeant avec d'autres préparations d'enzymes fongiques (Saini et al, 2015).

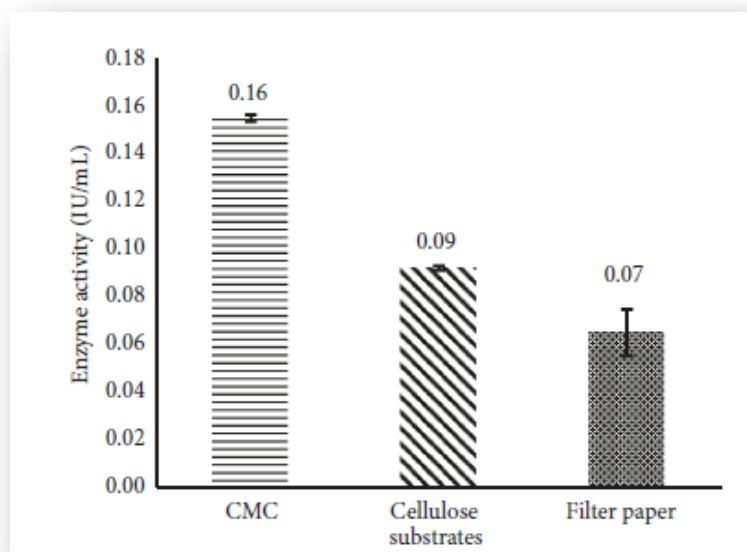




**Figure 16 :** Comparaison du potentiel d'hydrolyse de différentes préparations de cellulase (Saini et al, 2015).

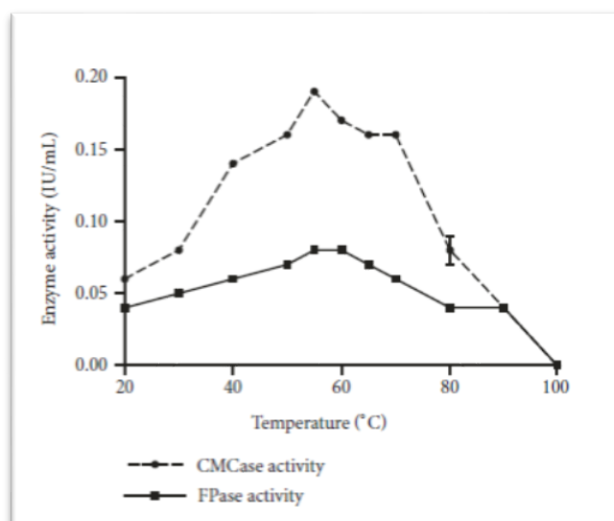
Dans l'étude de **Touijer et al. (2019)**, 55 de levures ont été isolées à partir de du tractus digestif du corophage «*gymnopleurus sturmi*». Parmi eux 30 ont montrés une activité cellulasique. Une levure de ces isolats identifié comme *Trichosporon sp.* montré une activité hyperhydrolytique, cette production sera optimisé par l'étude de différents facteurs : effet de température, de pH, de temps ...etc.

La levure a montré une activité CMCCase, activité fibre cellulase et FPase de 0.16 IU/ml ; 0.09 IU/ml et 0.07 IU/mml respectivement, voir **Fig 17**.



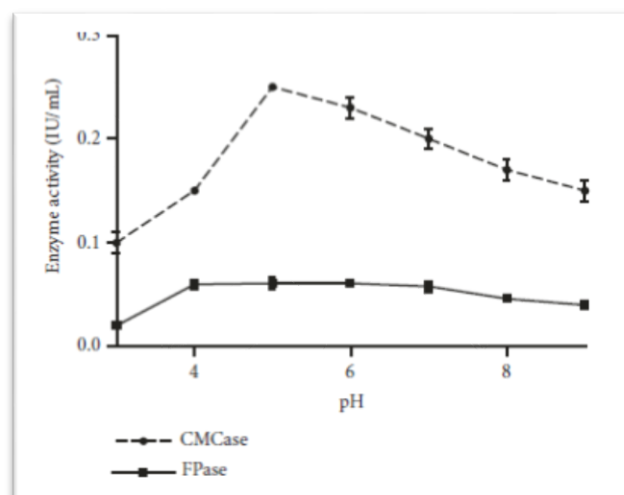
**Figure 17 :** Hydrolyse de substrats cellulosiques (Touijer et al, 2019).

L'effet de la température sur l'activité CMCase et FPase est représenté dans la **Fig 18**, les deux activités sont actifs entre 20 °C à 90 °C mais la température optimale est à 55 °C ou l'optimum de l'activité CMCase était de 0,19 UI/mL et celui de l'activité FPase était de 0,08 UI/mL à 60°C.



**Figure 18** : Effet de la variation de température d'incubation sur la CMCase (Touijer et al, 2019).

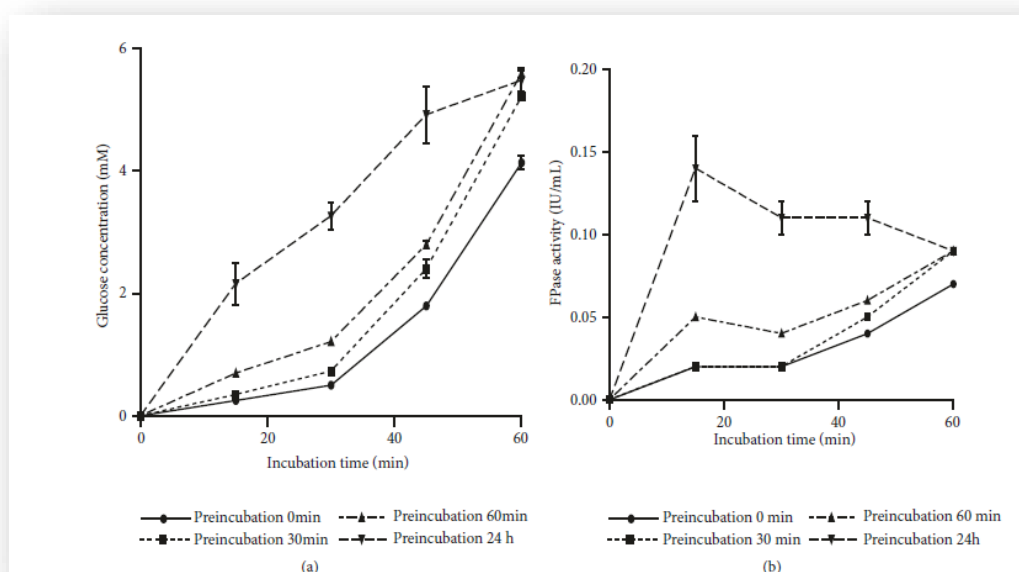
La **figure 19** montre l'effet de pH sur l'activité CMCase et FPase de *Trichosporon sp.* Cette levure est active dans une large gamme de pH de 3 à 9. Le pH optimal de CMCase est 5 (0.25 IU/ml) alors que celle de FPase est maximale et stable (0.06 IU/ml) à pH de 4 à 7 ; au-delà de la valeur maximale, l'activité diminue progressivement.



**Figure 19** : Effet du pH sur l'activité CMCase et FPase (température 50 °C, 10 mg/mL CMC et 50 mg/mL papier filtre) (Touijer et al, 2019).

L'effet de la concentration de substrats sur l'activité CMCase et FPase a montré que les meilleures valeurs obtenues sont 0.1IU/ml à 100 mg/μl pour la CMCase et 0.1IU/ml pour FPase.

L'effet du temps de pré incubation sur l'activité FPase a aussi été étudié (**Figure 20**) entre 0, 10, 30 ou 60min. La meilleure concentration de glucose (5,6 mM) et l'activité FPase la plus élevée (0,1 UI/mL) n'a été enregistrée qu'après 60 min, alors que (0,14 UI/mL) était la meilleure activité FPase à 24 heures de pré incubation du papier filtre et a été obtenu après 15 minutes. Par conséquent, il était intéressant d'appliquer la pré incubation de 24 heures du papier filtre afin d'augmenter l'activité FPase, ce qui était probablement dû à une meilleure absorption de l'enzyme milieu à travers le papier filtre.

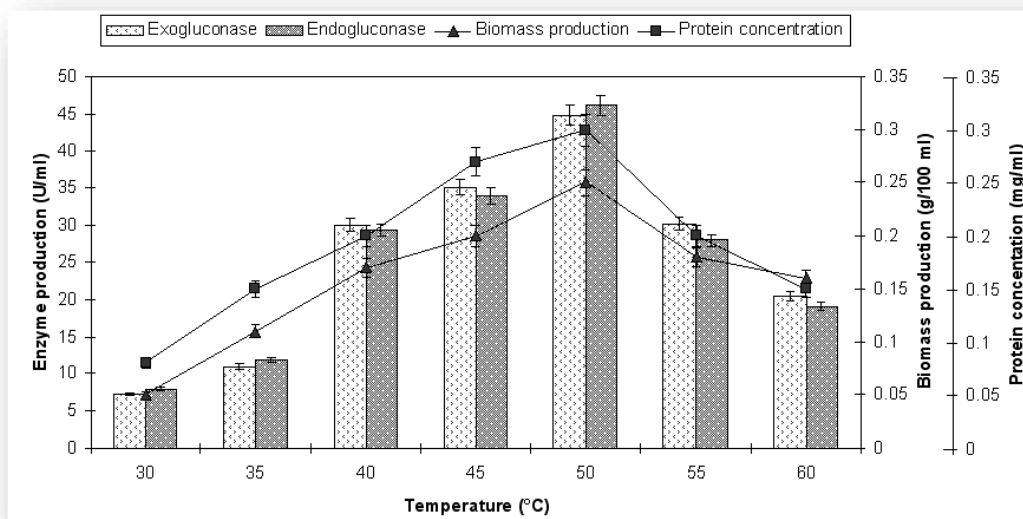


**Figure 20 :** (a) Effet du temps de pré incubation du papier filtre sur la concentration de glucose ; (b) la cinétique de la FPase (pH 4,8, température 50°C, et papier filtre 50 mg/mL) (Touijer et al, 2019).

Le but de l'étude de Rai et al. (2012) est de produire et optimiser les paramètres de la production des cellulases à partir d'une levure thermo tolérante et à faible cout.

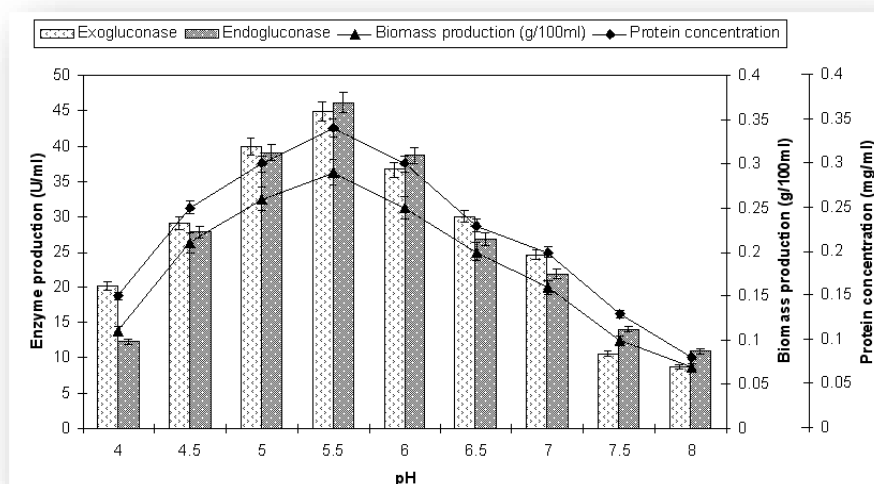
A partir de 25 isolats seulement 10 ont une activité maximale sur un milieu contenant la cellulose et le meilleur isolat a été identifié comme *Candida*. L'optimisation de la production de cellulase C<sub>1</sub> (exo-glucanase) et C<sub>x</sub> (endo-glucanase) a été examiner à différentes températures de 30 °C à 60 °C. La température efficace était 50 °C pour une production optimale de cellulase C<sub>x</sub> 44,84 et C<sub>1</sub> 46,15 unités/ml avec une production de biomasse de 0,25 g/100 ml et une concentration de protéines de 0,3 mg/ml à 50 °C. Au-dessus et en dessous de

cette température, la production d'enzymes était moins importante (**Fig 21**). D'après ces résultats, il a été conclu que la souche de levure pourrait être capable de tolérer une large gamme de températures pour une production de cellulase plus élevée.



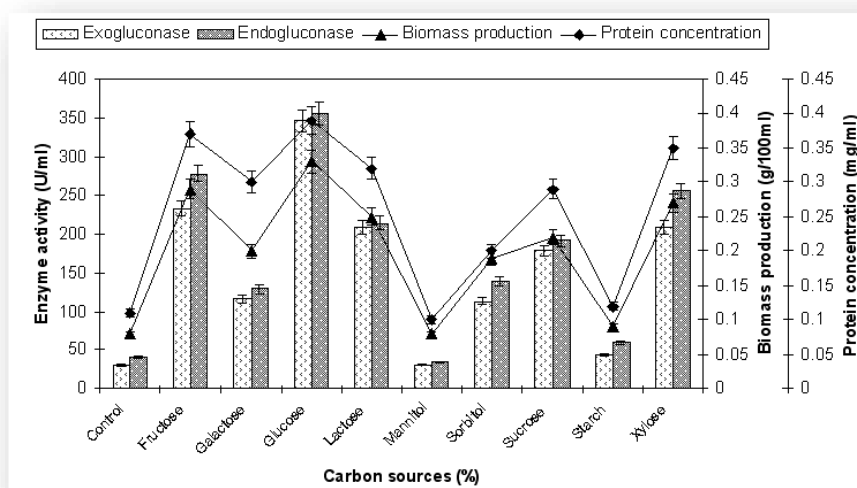
**Figure 21 :** Effet de la température sur la production de cellulase ; Les cultures ont été inoculés et incubés à différentes températures pendant 72 heures dans des conditions statiques. Les barres d'erreur présentées sont des valeurs moyennes de  $\pm$  écart type des doublons de trois expériences indépendantes (**Rai et al, 2012**).

L'effet du pH sur la production d'enzyme cellulase par l'isolat de levure *Candida sp* a été examiné à différentes valeurs de pH allant de pH 4,0 jusqu'à pH 8,0 (**Fig.22**). La souche a montré une large gamme de capacité de tolérance au pH (pH 5,0 à 6,5) pour la production d'enzymes cellulase, mais la production maximale d'enzymes a été atteinte à pH 5,5. L'isolat de levure R-1 a montré une production maximale d'enzymes Cx 44,84 et C1 46,15 unités/ml avec une production de biomasse de 0,29 g/100 ml et une concentration de protéines de 0,34 mg/ml à pH 5,5. Au-dessus et en dessous de ce pH, la production d'enzymes était plus faible.



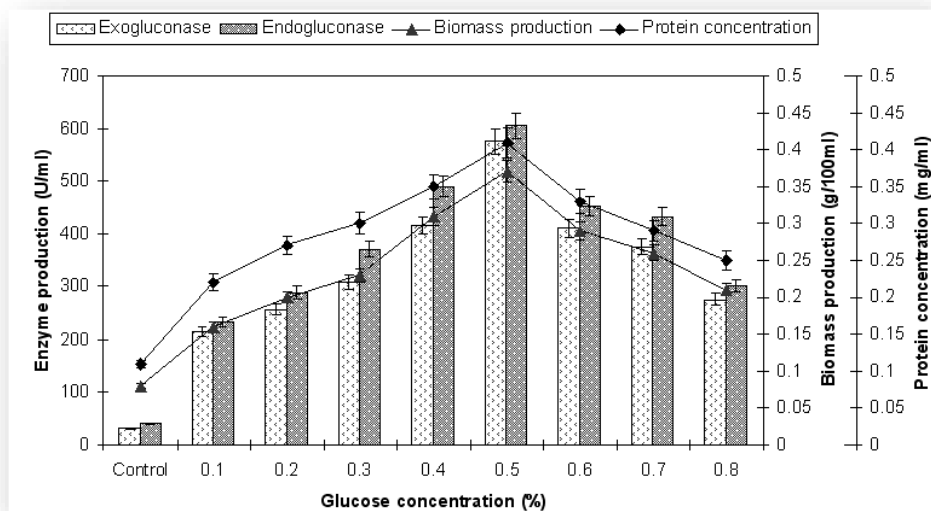
**Figure 22 :** Effet du pH sur la production de cellulase ; Les milieux stériles ont été inoculés et incubés à 50 °C à différents pH pendant 72 heures dans des conditions statiques. Les barres d'erreur présentées sont des valeurs moyennes  $\pm$  écart type des doublons de trois expériences indépendantes (Rai et al, 2012).

L'ajout de différentes sources de carbone a eu des effets à la fois positifs et négatifs sur la production de cellulase (**Fig. 23**). La production maximale de cellulase a été obtenue avec du glucose (Cx 345,4 et C1 355,5 unités/mL) suivi de saccharose, de fructose et de xylose. L'effet de l'amidon, le galactose, le sorbitol, le mannitol et le lactose a été négatif sur la production de cellulase.



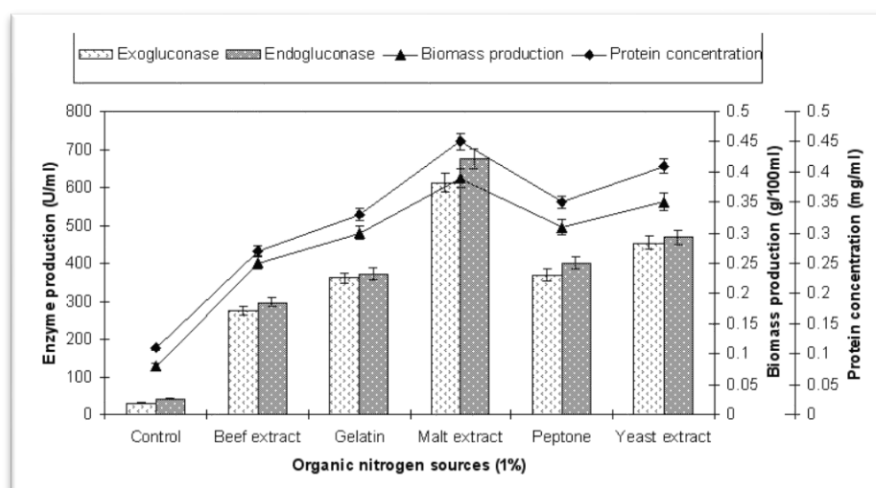
**Figure 23 :** Effet de différentes sources de carbone sur la production de cellulase (Rai et al, 2012).

Différentes concentrations de glucose de 0,1 à 0,8 %, p/v ont également été étudiées sur la production de cellulase. Il a été observé que 0,5 % (p/v) donnait de meilleurs résultats dans la production de cellulase (Cx 575,9 et C1 605,5 U/ml) ainsi que dans la production de biomasse (**Fig. 24**). Il a été remarqué que lorsque la concentration de glucose a augmentée, l'activité de la cellulase a progressivement diminué



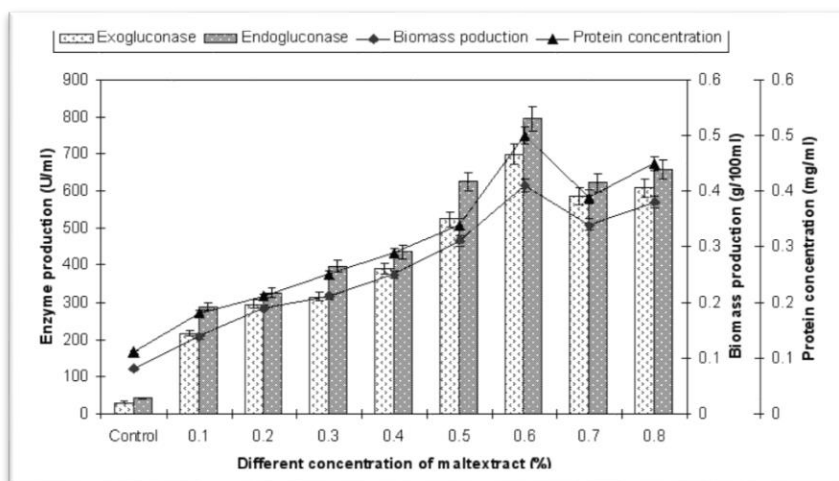
**Figure 24 :** Effet de différentes concentrations de glucose sur la production de cellulase ; le milieu de contrôle ne contient pas de glucose. Les erlen -Meyers ont été additionnés d'une concentration différente de glucose de 0,1 à 0,8 % p/v. Après l'inoculation, les milieux sont incubés à 50 °C pendant 72 heures à pH 5,5 (**Rai et al, 2012**).

L'influence de différentes sources d'azote organique a également été optimisée pour une meilleure production de cellulase. Il a été observé à partir de la **Fig. 25** que toutes les sources d'azote organique présentaient une production de cellulase réduite, sauf l'extrait de malt qui a présenté une production de cellulase Cx 610,9 et C1 675,5 U/mL.



**Figure 25 :** Effet de différentes sources d'azote organique sur la production de cellulase ; le milieu témoin ne contenait aucune source d'azote organique. Les erlen-Meyers ont été complétés avec différentes sources d'azote organique dans le milieu (1,0 % p/v) (Rai et al, 2012).

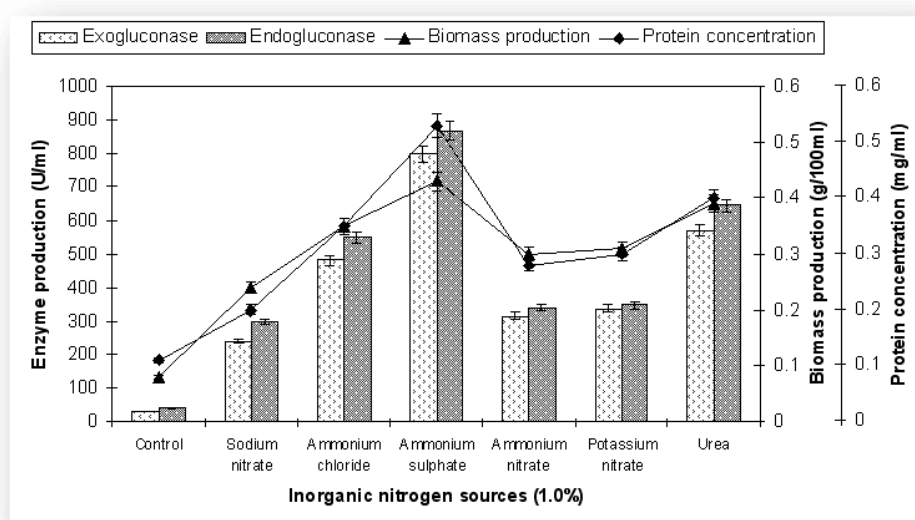
L'ajout de différentes concentrations (0,1 à 0,8 %, p/v) d'extrait de malt au milieu, n'a pas influencé la production de cellulase. La **figure 26** indique que la production maximale de cellulase (Cx 698,9 et C1 796,4 U/mL) a été atteinte avec une production de biomasse de 0,41 g/100 mL et une concentration de protéines de 0,5 mg/mL en présence d'extrait de malt à 0.6 %.



**Figure 26 :** Effet de différentes concentrations d'extrait de malt sur la production de cellulase ; le flacon témoin ne contient pas d'extrait de malt. Les erlen-Meyers contenant de différentes concentrations d'extrait de malt (0,1 à 0,8 % p/v) les milieux ont été inoculés et incubés à 50 °C pendant 72 heures à pH 5,5 (Rai et al, 2012).

La **figure 27** montre que la production de cellulase par la levure *candida* a été affectée par les différentes sources d'azote inorganique ; cependant, la production de cellulase maximale (Cx 798,8 et C1 867,6 U/mL) a été atteinte en présence de sulfate d'ammonium, les autres sources d'azote ont montré des effets inhibiteurs sur la production enzymatique.

Lorsque les différentes concentrations (0,1 à 0,8 %, p/v) de sulfate d'ammonium ont été ajoutées au milieu, des augmentations significatives de la production de cellulase ont été observées, et un rendement maximal de cellulase (Cx 907,5 et C1 995,8 U/mL) a été obtenu à une concentration de 0,5 %.



**Figure 27** : Effet de différentes sources d'azote inorganique sur la production de cellulase ; le flacon témoin ne contient aucune source d'azote inorganique. Flacons d'essai modifiés avec différentes sources d'azote inorganique dans le milieu (1,0 % w/v) (Rai et al, 2012).

Précédemment l'utilisation de ces enzymes a été limitée pour la transformation du textile et la fabrication de la pâte à papier, la production alimentaire et la brasserie, la production des détergents et la transformation des aliments pour animaux. Due à la demande de la production de biocarburants et de produits chimiques à partir de ressources renouvelable et le problème énergétique mondiale de l'approvisionnement durable des combustibles ont démontré leur besoin dans la production de sucres fermentescibles issus de la bioraffinerie de cellulose (Bhati et al, 2021).



# **Chapitre III**

## **Applications des cellulases fongiques**

### 1. Industrie du textile

L'industrie du textile a commencé par l'utilisation de la technologie du cellulase au début 1980 pour le processus de biostone (**Arja, 2007**). Les industries des textiles sont sous pression pour passer aux technologies vertes et propres, des en raison de sa pollution environnementale, besoins en énergie et consommation d'eau, des problèmes environnementaux tels que la libération de produits chimiques toxiques et de colorants dans l'eau ou l'air au cours de divers traitements (**Singh et al, 2021**).

L'intérêt d'utiliser la cellulase est pour l'élimination la pilosité de fils de cellulose, pour donner un aspect brillant et soyeux à tissu ainsi que le développement de la luminosité des couleurs, les cellulases peuvent être utilisé pour divers processus comme l'assouplissement du coton, la finition du denim, biopolissage, biostonewashing, etc. Les cellulases neutres de *H. insolens* et les cellulases acides de *T. reesei* sont impliquées dans le lavage enzymatique des chiffons en coton. Les cellulases riches en endoglucanases sont plutôt efficaces pour améliorer le toucher, l'apparence et l'ombre des tissus afin de supprimer le besoin de tout produit chimique revêtement en fibres. De plus, l'endoglucanase conduit également à une biofinition améliorée (**Kuhad et al., 2011**).

### 2. Industries agro-alimentaires

Dans les industries agroalimentaires, la cellulase en association avec la pectinase et la xylanase agit comme des enzymes de macération qui aident à l'extraction et la purification des jus de légumes et de fruits pour améliorer leur production. Ces enzymes de macération jouent un rôle dans réduction de la viscosité et amélioration de la propriété aromatique de la pulpe et des jus de fruits pendant la transformation. L'action synergique des  $\beta$ -glucosidases et les pectinases entraînent des changements de saveur, de texture, ainsi que des caractères supplémentaires tels que l'arôme et les propriétés volatiles des légumes et fruits (**Karmakar & Ray, 2011**).

L'utilisation de cellulase donne un avantage des antioxydants élargis, retardés un rancissement, un rendement amélioré et un produit de bonne qualité (**Singh et al, 2021**).

### 3. Industrie des détergents

Dans l'industrie des détergents, les cellulases alcalines présentent dans la composition passant entre les espaces interfibrillaires en douceur et aide de l'élimination efficace des taches de tissu. La cellulase fonctionne en conférant une luminosité de couleur, traitement des fibrilles de cellulose et maintient la douceur du tissu même après des lavages fréquents (**Kuhad et al., 2011**).

### 4. Industrie de l'alimentation animale

Dans l'industrie de l'alimentation animale, la production de volaille et d'aliments pour animaux implique l'utilisation combinée de cellulases et d'hémicellulases. L'ajout de ces dernières dans le traitement des aliments entraîne une hydrolyse partielle de composants de la cellulose et de l'hémicellulose présents dans l'ensilage et d'une amélioration des aliments par émulsification et élimination des coques des grains de céréales. Dans le tube digestif de l'animal les aliments partiellement digérés sont digérés entièrement de manière à fournir des nutriments supplémentaires résultant en une meilleure croissance (**Jacobs & McAllan, 1991**).

### 5. Bioraffinerie

En bioraffinerie, le préalable de base est la dépolymérisation de la plante (matière végétale comme cellulose). Cette biomasse accorde une grande importance aux énergies renouvelables ressources en carbone car elle peut être convertie en de nombreux produits à valeur ajoutée, par exemple les biocarburants et les réactifs chimiques qui sont également rentables (**Agbor et al, 2011**).

### 6. Industrie des pâtes et des papiers

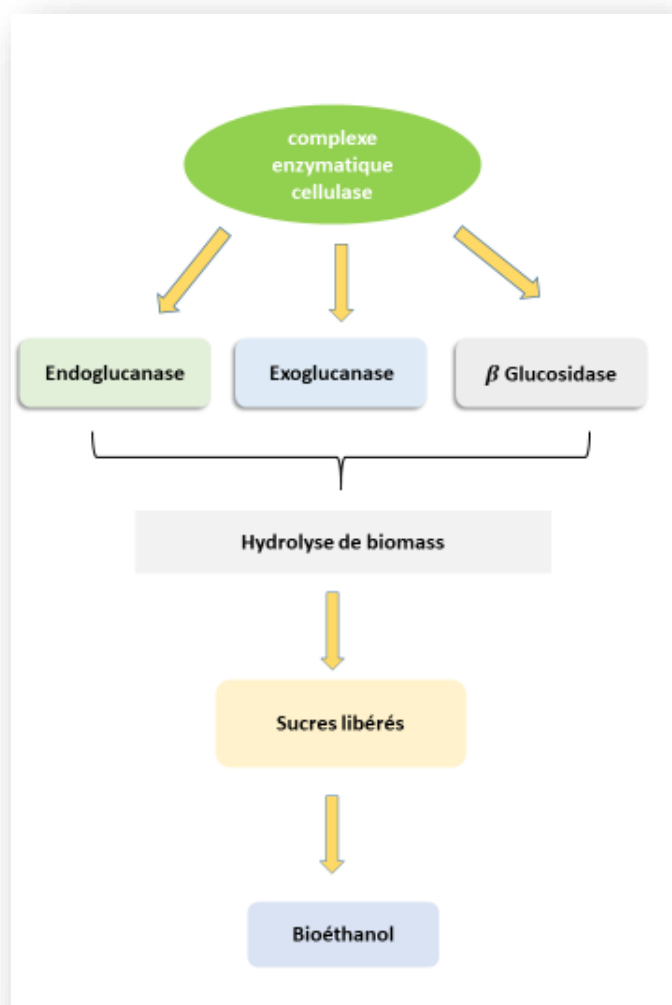
La cellulase est utilisée dans divers procédés de l'industrie des pâtes et des papiers, comme la réduction en pâte, le raffinage, le désencrage, la déshydratation, la biocaractérisation des fibres de pâte qui améliore la brillance de la pâte, le bio-blanchiment du Procédé kraft, le drainage amélioré, etc. L'utilisation de cellulase peut augmenter le taux de production ainsi qu'améliorer la performance globale, la cellulase Novozyme 342 et Novozyme 613 peut être utilisé dans le processus de désencrage des vieux papiers avec une efficacité de désencrage de 95 à 99% (**Singh et al, 2021**).

**Pathak et al. (2014)** ont étudié la production des enzymes (cellulase et xylanase) par *Trichoderma harzianum* dans le but de leur utilisation pour le désencrage des vieux papiers de photocopieur. Ceci a permis d'obtenir 3,2 % de luminosité supérieure, 6,7 % de résistance élevée à la traction, 13,4 % d'indices d'éclatement, 10,3 % d'endurance au pliage, 21,6 % d'indice de liberté et de déchirure diminué de 10,3 % avec un temps de drainage réduit de 13,9 % (**Singh et al, 2021**).

## 7. Industrie du bioéthanol

Le biocarburant de deuxième génération ; l'éthanol peut être produit à partir de plusieurs résidus connus : les résidus forestiers, les déchets agro-industriels, etc. Le processus de bioconversion implique de nombreuses étapes comme le prétraitement (physique, chimique, physico-chimique et biologique), hydrolyse (acide et enzymatique) et fermentation. Le complexe cellulolytique contient de l'exoglucanase, l'endoglucanase et la  $\beta$ -glucosidase et leur action combinée est nécessaire pour compléter le processus d'hydrolyse de la biomasse cellulosique (comme illustré dans la **figure 28**) (**Singh et al, 2021**).

Le grand défi de l'utilisation de la cellulase dans le processus lignocellulosique de la conversion de biomasse est le coût. Il existe de nombreuses façons par lesquelles le problème de coût peut être résolu comme l'optimisation des conditions de croissance pour la production de la cellulase, l'utilisation d'enzymes brutes. D'autres stratégies telles que l'évolution adaptative, les mutations et le génie génétique pour la production de micro-organismes hyper-producteurs de cellulase, la réutilisabilité d'enzymes par l'immobilisation etc (**Singh et al, 2021**).



**Figure 28 :** Action du complexe enzymatique cellulase dans la bioconversion de la biomasse en bioéthanol (Singh et al, 2021).

## 8. Industrie du vin et de la brasserie

Les étapes du processus de fabrication de la bière comprennent le maltage, le broyage, brassage, filtration, ébullition, fermentation, maturation, conditionnement, filtration et conditionnement (Singh et al, 2021).

L'étape de maltage principalement pivoté sur la germination des graines et l'amélioration de la qualité du malt qui représente une quantité importante de sucres fermentescibles, de vitamines et acides aminés. L'orge est utilisée comme source de sucre dans les brasseries se composant de polysaccharide non amylicé (6–10%), avec une fraction de  $\beta$ -glucanes. Les mauvaises qualités de l'orge provoquent une inflation de la quantité de  $\beta$ -glucanes ce qui conduit à la création d'un précipité gélatineux de la bière ce qui augmente la

viscosité, diminue donc le rendement de l'extrait, et de la production de bière. Pour éliminer le problème de filtrabilité, de drainage du moût et de la formation du gel, l'utilisation de la cellulase s'est avérée efficace être efficace pour améliorer l'extraction du malt (**Singh et al, 2021**).

L'utilisation d'hémicellulases et de pectinases avec la cellulase en vinification se traduit par une remarquable extraction de la couleur, donne une meilleure clarification et filtration, et améliore la qualité et la stabilité du vin (**Singh et al, 2021**).

### **9. Extraction de pigments et de composés bioactifs**

L'extraction de pigments et des composés bioactifs (comme les flavonoïdes, les caroténoïdes, la chlorophylle, les peptides et les alcaloïdes) présents dans les plantes est assez difficile car ces composés se trouvent en association proche de la plante de la paroi cellulaire ou dans le cytoplasme. Une méthode classique d'extraction conduit à une faible efficacité et petite qualité du produit. Ainsi, l'utilisation des enzymes donne une meilleure alternative durable pour l'extraction de ces composés. La cellulase dégrade le composant de la paroi cellulaire (cellulose) et conduit à la libération des composés bioactifs (**Singh et al, 2021**).

### **10. Industrie pharmaceutique**

Les êtres humains prennent des enzymes digestives supplémentaires comme aide digestifs ayant une enzyme cellulase pour la digestion des fibres de car ils sont incapables de digérer la fibre de la cellulose. Ces produits digestifs sont très importants pour la digestion ainsi que la santé des cellules (**Singh et al, 2021**).

# **Conclusion**

### Conclusion et perspectives :

La lignocellulose, composant principal des parois cellulaires végétales, comprend de la lignine polyaromatique et des matières fermentescibles, de la cellulose et de l'hémicellulose. C'est une matière première abondante et renouvelable pour les produits chimiques et l'énergie. Il peut servir de matière première pour la production de divers produits à valeur ajoutée, notamment la cellulase. Cette dernière est essentiellement requise dans les bioraffineries à base de lignocellulose et est appliquée dans de nombreux procédés commerciaux.

En raison de l'application généralisée des cellulases, de nombreux procaryotes et eucaryotes ont été exploités pour produire de la cellulase avec de bons rendements, mais les levures ont été rarement explorées pour leurs activités de dégradation des parois cellulaires des plantes. Cette étude se concentre sur la synthèse des rapports sur les levures cellulolytiques, leur isolement, leur production ainsi que son optimisation et leurs applications biotechnologiques.

L'isolement des souches cellulolytiques peut être réalisé à partir de différents biotopes : sol, forêt, bagasse, fumier de vache, etc. La sélection des espèces fongiques est généralement réalisée par la méthode de rouge Congo. Les principales souches productrices de la cellulase sont : *Penicillium*, *Aspergillus* et *Trichoderma*, la production des cellulases peut être réalisée par FMS ou FML en utilisant des milieux à faible coût constitués de déchets. Ces milieux sont enrichis par des sources d'azote, de sels et de vitamines.

La production de la cellulase peut être améliorée par l'optimisation du milieu de production en utilisant des plans statistiques comme ceux de Plackett–Burman, Box et Wilson et Box-Behnken couplés à la RMS ou par le génie génétique (enzyme recombinante, mutagénèse).

Les cellulases fongiques ont un grand intérêt suite à leur utilisation dans divers industries : textile, pharmaceutique, agroalimentaire...

Et comme perspectives, il serait intéressant de faire une synthèse sur la comparaison de la production de la cellulase levurienne en FML et FMS, sa purification et ses propriétés physico-chimiques.



# **Références bibliographiques**

### Références bibliographiques

**Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011).** Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology advances*, 29(6), 675-685.

**Alves, T. P., Triques, C. C., da Silva, E. A., Fagundes-Klen, M. R., & Hasan, S. D. (2022).** Multi-enzymatic recovery of fungal cellulases (*Aspergillus niger*) through solid-state fermentation of sugarcane bagasse. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 100(8), 1930-1940.

**Arouak, L., Zenad, A. (2019).** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de cellulase sur son de blé. [Mémoire de master, Université de Constantine 1].

**Bhati, N., & Sharma, A. K. (2021).** Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. *Journal of Food Process Engineering*, 44(2), e13623.

**Bouzaouit, N (2016).** *Optimisation de la synthèse enzymatique d'esters de sucres par la méthodologie des plans d'expériences* (Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba).

**Carrasco, M., Villarreal, P., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2016).** Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC microbiology*, 16(1), 1-9.

**Ghorri, S., Benslama, O., BENSERRADJ, O., & Mihoubi, I. (2022).** Application of Plackett-Burman design for the optimization of protease production by *Aspergillus niger*. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 12(4), 515-521.

**Goldbeck, R., Andrade, C. C. P., Pereira, G. A. G., & Maugeri Filho, F. (2012).** Screening and identification of cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes. *African Journal of Biotechnology*, 11(53), 11595-11603.

**Hu, Y., Du, C., Pensupa, N., & Lin, C. S. K. (2018).** Optimisation of fungal cellulase production from textile waste using experimental design. *Process Safety and Environmental Protection*, 118, 133-142.

## Références bibliographiques

---

- Imran, M., Anwar, Z., Irshad, M., Asad, M. J., & Ashfaq, H. (2016).** Cellulase production from species of fungi and bacteria from agricultural wastes and its utilization in industry: a review. *Advances in Enzyme Research*, 4(2), 44-55.
- Jacobs, J. L., & McAllan, A. B. (1991).** Enzymes as silage additives. 1. Silage quality, digestion, digestibility and performance in growing cattle. *Grass and Forage Science*, 46, 63–73.
- Jain, L., & Agrawal, D. (2018).** Performance evaluation of fungal cellulases with dilute acid pretreated sugarcane bagasse: a robust bioprospecting strategy for biofuel enzymes. *Renewable Energy*, 115, 978-988.
- Karmakar, M., Ray, R., 2011.** Current trends in research and application of microbial cellulases. *Res. J. Microbiol.* 6 (1), 41–53.
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A., 2011.** Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res.* 2011.
- Lodha, A., Pawar, S., & Rathod, V. (2020).** Optimised cellulase production from fungal co-culture of *Trichoderma reesei* NCIM 1186 and *Penicillium citrinum* NCIM 768 under solid-state fermentation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 103958.
- Mandels, M., & Reese, E. T. (1957).** Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *Journal of bacteriology*, 73(2), 269-278.
- Pathak, P., Bhardwaj, N.K., Singh, A.K., 2014.** Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (8), 3776–3797.
- Rai, P., Tiwari, S., & Gaur, R. (2012).** Optimization of process parameters for cellulase production by novel thermotolerant yeast. *BioResources*, 7(4), 5401-5414.
- Saini, R., Saini, J. K., Adsul, M., Patel, A. K., Mathur, A., Tuli, D., & Singhania, R. R. (2015).** Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. *Bioresource technology*, 188, 240-246.
- Salomão, G. S. B., Agnezi, J. C., Paulino, L. B., Hencker, L. B., de Lira, T. S., Tardioli, P. W., & Pinotti, L. M. (2019).** Production of cellulases by solid-state fermentation using natural

## Références bibliographiques

---

and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 1-6.

**Singh, A., Bajar, S., Devi, A., & Pant, D. (2021).** An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*, 14, 100652.

**Thapa, S., Mishra, J., Arora, N., Mishra, P., Li, H., Bhatti, S., & Zhou, S. (2020).** Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(3), 621-648.

**Thongekkaew, J., & Kongsanthia, J. (2016).** Screening and identification of cellulase producing yeast from rongkho forest, ubon Ratchathani University. *Bioeng. Biosci*, 4(3), 29-33.

**Thongekkaew, J., & Kongsanthia, J. (2016).** Screening and identification of cellulase producing yeast from rongkho forest, ubon Ratchathani University. *Bioeng. Biosci*, 4(3), 29-33.

**Touijer, H., Benchemsi, N., Ettayebi, M., Janati Idrissi, A., Chaouni, B., & Bekkari, H. (2019).** Thermostable Cellulases from the Yeast *Trichosporon* sp. *Enzyme research*, 2019.

**Vázquez-Montoya, E. L., Castro-Ochoa, L. D., Maldonado-Mendoza, I. E., Luna-Suárez, S., & Castro-Martínez, C. (2020).** Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. *Revista Argentina de microbiología*, 52(1), 4-12.

**Vyas, S., & Chhabra, M. (2017).** Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: a cellulase and lipase producing oleaginous yeast. *Bioresource technology*, 223, 250-258.

**Yahya, S., Jahangir, S., Shaukat, S. S., Sohail, M., & Khan, S. A. (2016).** Production optimization by using Plackett-Burman design and partial characterization of amylase from *Aspergillus tubingensis* SY 1. *Pak. J. Bot*, 48(6), 2557-2561.

**Yan, Q., Liu, X., Wang, Y., Li, H., Li, Z., Zhou, L., ... & Bao, X. (2018).** Cow manure as a lignocellulosic substrate for fungal cellulase expression and bioethanol production. *Amb Express*, 8(1), 1-12.

**Chaouche Chirine Lilia**

**Date de soutenance : 30/11/2022**

***Thème : Etude de la cellulase fongique***

***Nature du diplôme : Master***

***Option : Biochimie***

**Résumé :**

La cellulose est un biopolymère naturel abondant sur terre et le déchet agricole le plus dominant. Cette biomasse cellulosique est une ressource renouvelable et abondante avec un grand potentiel de bioconversion en bioproduits à valeur ajoutée. Il peut être dégradé par la cellulase produite par différents microorganismes cellulolytiques. Cette enzyme a diverses applications industrielles et est maintenant considérée comme un groupe majeur d'enzymes industrielles. Notre travail traite dans le premier chapitre l'isolement des souches fongiques cellulolytiques et les différents biotopes utilisés pour leur screening. Les milieux extrêmes peuvent renfermer des souches productrices des cellulases résistantes ayant un grand intérêt dans l'industrie. Le deuxième chapitre décrit les connaissances actuelles sur la production de cellulase par fermentation submergée et fermentation à l'état solide, Sa production est améliorée par le clonage et l'expression du gène de la cellulase ou par l'optimisation par la méthode « OFAT » ou par les méthodes statistiques. Les différentes applications industrielles de des cellulases sont récapitulées dans le troisième chapitre.

**Mots clés :** Cellulase, champignons, production, optimisation.

**Encadreur :** Mme DAKHMOUCHE Scheherazad (MCA- ENS Assia Djebar).

**Examinatrice 1 :** Mme BENNAMOUN Leila (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 2 :** M. NOUADRI Tahar (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1).