

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie-Biologie Cellulaire et Moléculaire

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الكيمياء 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 Appliquée*

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

**Etude de la production cellulasique chez *Candida parapsilosis* :
purification partielle de l'enzyme et détermination de ses
paramètres physico-chimiques et cinétiques**

Présenté par : AIECH Sabrine
LAYAICHA Linda

Le 28/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : DAKHMOUCHE S (MCA – ENS Assia Djébar, Constantine 1).
Examineur 1 : BENNAAMOUN L (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur 2 : BAGHRICHE I (MAA - ENS Assia Djébar, Constantine 1).

**Année universitaire
2021 - 2022**



Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu **Dieu**, le tout puissant de nous avoir donné la volonté, la santé et la patience pour achever ce travail.

C'est avec grand plaisir que nous tenons à exprimer toute notre gratitude à Madame le professeur **Dakhmouche Scheherazed**, notre encadreur, qui a dirigé ce travail, nous a soutenus et nous a poussés à nous surpasser et à donner le meilleur de nous-même grâce à ses critiques constructives et avisées.

Nos vifs remerciements s'adressent également aux membres de jury qui ont accepté de juger ce travail.

Nous remercions également l'ensemble du personnel du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications du département de biochimie.

Nous remercions aussi la doctorante **Chaib Ibtissem** pour sa gentillesse et sa disponibilité, elle nous a beaucoup aidés au niveau du laboratoire.

Nos sentiments les plus profonds et remerciements infinis à tous nos enseignants pour leurs patiences et servitudes au cours des années d'études. Ainsi que toutes les personnes qui participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci



Dédicace

Tout d'abord, je remercie **Allah**, le tout puissant de m'avoir accordé la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce travail.

Je dédie ce modeste travail du fond de mon cœur :

A mes très chers parents : ma mère **Amel** et mon père **Ali**, ceux qui m'ont données l'espoir et le courage nécessaire pendant mon long trajet d'étude. Je vous remercie pour tout le soutien, la patience et l'amour que vous me portez.

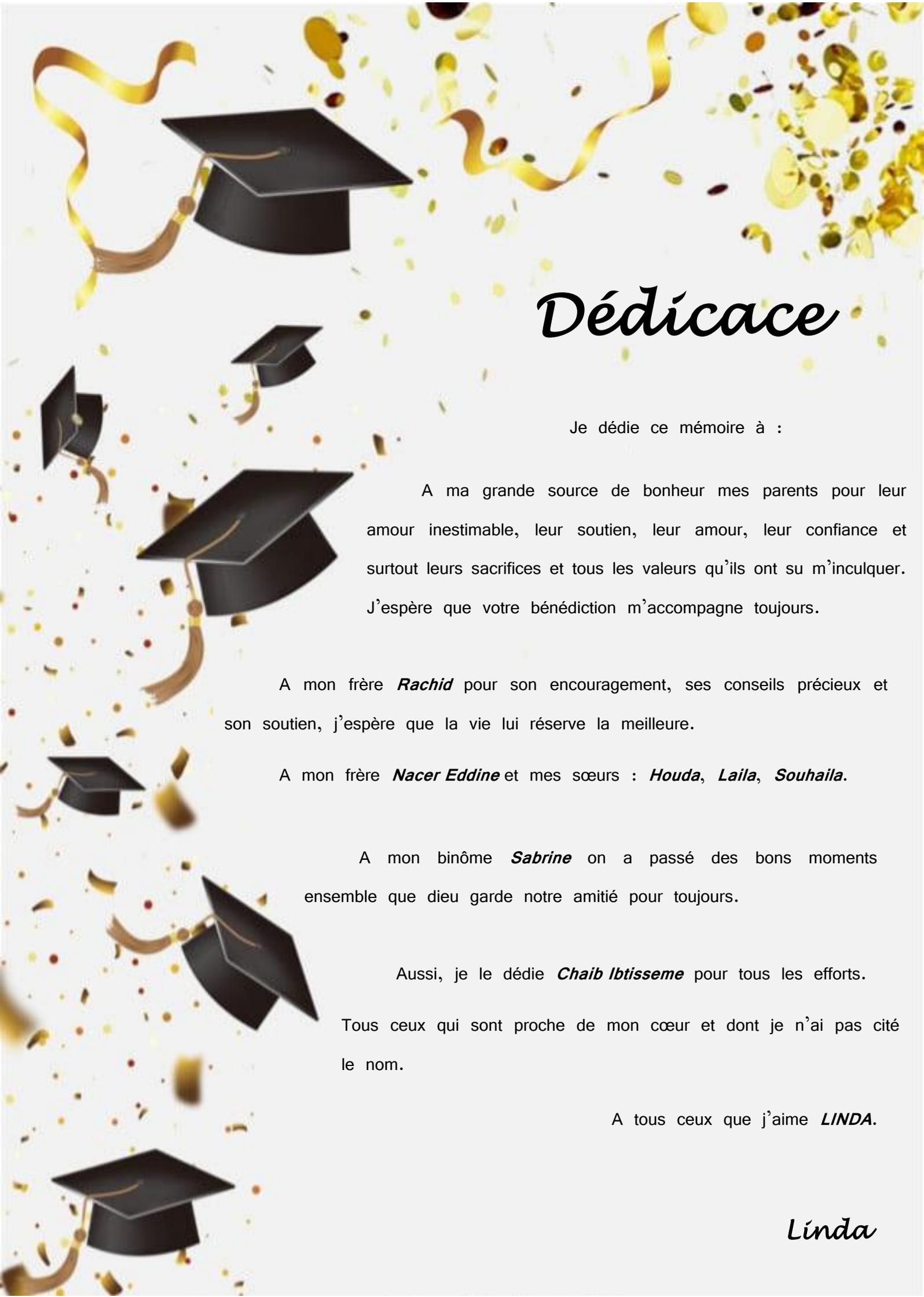
A mes chers frères : **Yacine** et **Oussama Amar**, pour leur amour. Dieu vous remplit de bonheur, santé et prospérité dans votre vie.

A mes chers grands-parents, et ma chère tante **Bariza**, je vous dédie ce travail en guise de remerciement pour vos soutiens. Merci énormément pour vos amours et vos tendresses.

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire et à tous ceux qui porte le nom **Aiech**.

A mon binôme **Linda**, qu'on a partagé ensemble tous les moments de travail. Et à tous les étudiants de ma promotion.

Sabrina



Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

A ma grande source de bonheur mes parents pour leur amour inestimable, leur soutien, leur amour, leur confiance et surtout leurs sacrifices et tous les valeurs qu'ils ont su m'inculquer. J'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A mon frère **Rachid** pour son encouragement, ses conseils précieux et son soutien, j'espère que la vie lui réserve la meilleure.

A mon frère **Nacer Eddine** et mes sœurs : **Houda, Laila, Souhaila**.

A mon binôme **Sabrina** on a passé des bons moments ensemble que dieu garde notre amitié pour toujours.

Aussi, je le dédie **Chaib Ibtisseme** pour tous les efforts.

Tous ceux qui sont proche de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom.

A tous ceux que j'aime **LINDA**.

Linda

Liste des tableaux

Tableau 1 : L'habitat de quelques levures.....	6
Tableau 2 : Clasification des levures.....	8
Tableau 3 : Levures produits l'enzyme cellulase.....	12
Tableau 4 : Produits industriels produits par les levures.....	14
Tableau 5 : Composition en cellulose, hémicelluloses et lignines de différentes biomasses végétales.....	17
Tableau 6 : Matériels de laboratoire utilisé.....	37
Tableau 7 : Tableau de la purification partielle de la cellulase par Candida parapsilosis strain CBS 604 T.....	52
Tableau 8 : L'effet de cellulase produite par Candida parapsilosis CBS 604 T sur le volume et le rendement du jus de pomme.....	68

Liste des figures

Figure 1 : Ultrastructure d'une levure. 5

Figure 2 : Morphologie d'une levure. 7

Figure 3 : Composition de la paroi cellulaire : a) organisation des constituants des parois végétales primaires. b) Organisation et mise en place des parois végétales primaires et secondaires. c) Organisation des couches de parois 16

Figure 4 : Structure de la paroi végétale. 18

Figure 5 : Structure des trois alcools composant les lignines : l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique 20

Figure 6 : Hydrolyse de la cellulose par les trois types de cellulases : l'endoglucanase, 26

Figure 7 : Hydrolyse enzymatique de la cellulose par l'action synergique de cellulases 27

Figure 8 : Différentes applications des cellulases en industrie alimentaire (Ejaz *et al.*, 2021). 33

Figure 9 : Observation macroscopique de la souche Y1 sur milieu YPGA après 48h à 30°C. 38

Figure 10 : Fermentation en milieu solide (substrat son de blé). 40

Figure 11 : Mélange substrat fermenté avec solution de tween 80. 40

Figure 12 : Courbe étalon de glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase. 42

Figure 13 : Courbe étalon pour le dosage des protéines. 44

Figure 14 : Préparation du jus de pomme. 46

Figure 15 : Déchets de banane en poudre. 47

Figure 16 : Effet du pH sur l'APF (A) et l'EG (B). 54

Figure 17 : Effet de la température sur l'APF (a) et l'endoglucanase (b) à pH 4. 54

Figure 18 : Effet de la température sur l'APF (a) et l'endoglucanase (b) à pH 7. 55

Figure 19 : effet de thermostabilité sur l'activité endoglucanase (a) et APF (b) à pH 4. 58

Figure 20 : Effet de thermostabilité sur l'activité endoglucanase (a) et APF (b) à pH 7. 58

Figure 21 : Effet des sels sur l'activité cellulasique (à pH 4). 59

Figure 22 : Effet des sels sur l'activité cellulasique (à pH 7). 60

Figure 23 : Effet des détergents sur l'activité cellulasique (à pH 4). 62

Figure 24 : Effet des détergents sur l'activité cellulasique (à pH 7).	63
Figure 25 : Effet de la concentration en substrat (papier filtre) sur l'activité papier filtre de <i>Candida parapsilosis</i> strain CBS 604 T (pH 4 et 7).	64
Figure 26 : Effet de la concentration en CMC sur l'endoglucanase de <i>Candida parapsilosis</i> strain CBS 604 T (pH 4 et 7).	65
Figure 27 : Paramètres cinétiques de l'APF partiellement purifiée de <i>Candida parapsilosis</i> strain CBS 604 T, selon la représentation de Lineweaver et Burk (pH 4 et 7).	66
Figure 28 : Paramètres cinétiques de l'endoglucanase partiellement purifiée de <i>Candida parapsilosis</i> strain CBS 604 T, selon la représentation de Lineweaver et Burk (à pH 4 et 7).	66
Figure 29 : Clarification du jus de pomme par la cellulase (C : Control, E : Echantillon)	67
Figure 30 : Clarification du jus de pomme par l'eau (C : Control, E : Echantillon)	68
Figure 31 : Saccarification des déchets agricoles de banane (à pH 4 et pH 7)	70

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

µl : microlitre

AG : Activité endoglucanase

APF : Activité papier filtre

BG : β-glucosidase

BSA : Solution de sérum albumine bovin

C : Carbone

CaCl₂ : Chlorure de Calcium.

CAZy : Carbohydrate Active Enzyme Database

CBH : Cellobiohydrolase

CBM : Carbohydrate Banding Module

CMC : Carboxymethyl-cellulose

CMCase : Carboxyméthylcellulase

DNS : Acide dinitrosalicylique

DS : Degré de synergie

EC : Enzyme commission.

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique.

FMS : Fermentation Milieu Solide

g : gramme

GH : Glycoside Hydrolase

GHL : Trichoderma longibrachiatum

GMA : Laboratoire de Génie Microbiologique et Application

h : Heures

HR : Humidité relative

IUBMB : Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire

K_m : Constante de Michaelis.

M : Molarité

mg : milligramme

min : minutes

ml : millilitre

mm : millimètre

MS : Matière sèche

N₂ : Azote

NaCl : Chlorure de sodium

nm : nanomètre

pH : potentiel d'hydrogène

SDS : Sodium dodécylsulfate.

SM : Solution mère

SmF : Submerged fermentation.

tr/min : Tour par minute

UI : Unité internationale

V_{max} : Vitesse maximale.

XO : Xylo-Oligosaccharides

YPGA : Yeast extract-Peptide-Glucose-Agar

Table des matières

Liste des tableaux	i
Liste des figures	ii
Liste des abréviations	iv
Introduction générale	1
Chapitre 1 : Levures	4
1 Habitat des levures.....	5
2 Morphologie et structure des levures.....	6
3 Classification des levures.....	7
3.1 Ascomycetes	8
3.2 Basidiomycetes	8
3.3 Deutéromycètes.....	8
4 Caractéristiques physiologique et biochimiques des levures.....	9
4.1 Caractéristiques physiologique et nutritionnelles	9
4.1.1 Besoins nutritifs	9
4.2 Facteur physico-chimiques.....	10
4.2.1 Température	10
4.2.2 PH	10
4.2.3 Aération	10
4.2.4 Pression osmotique et l'activité de l'eau	11
4.2.5 CO ₂	11
5 Micro-organismes cellulolytiques.....	11
5.1 Les bactéries.....	11
5.2 Les Champignons.....	12
5.2.1 Levures.....	12
5.2.2 Moisissure.....	13

6	Intérêt industrielle de levures.....	13
	Chapitre 2 : Etude de cellulase et leur substrat	15
1	Biomasse lignocellulosique	15
1.1	Composition et structure de la biomasse lignocellulosique	16
1.1.1	Cellulose	17
1.1.2	Hémicellulose	18
1.1.3	Lignine	19
1.2	Déchets Lignocellulosiques	20
1.2.1	Son de blé.....	21
1.2.2	Papier	21
2	Cellulases	21
2.1	Structure de la cellulase	22
2.2	Caractéristiques des cellulases	22
2.2.1	Réaction et spécificité.....	22
2.2.2	Substrats naturels	22
2.2.3	Inhibiteurs	23
2.2.4	Poids moléculaire.....	23
2.2.5	PH optimum.....	23
2.2.6	Température optimale	23
2.3	Classification des cellulases	23
2.3.1	Endocellulase (EC 3.2.1.4)	23
2.3.2	Exocellulase (EC 3.2.1.91)	24
2.3.3	Cellobiases (EC 3.2.1.21)	24
2.4	Mécanisme d'action de la cellulase.....	25
2.4.1	Synergie des activités cellulolytiques	26
2.5	Production de cellulase	27
2.5.1	Facteurs de production des enzymes cellulolytiques	29

2.6	Application de cellulase	31
2.6.1	Biocarburants	31
2.6.2	Industries alimentaires	32
2.6.3	Nutrition animale	33
2.6.4	Industrie des textiles	33
2.6.5	Papeterie.....	33
2.6.6	Gestion des déchets.....	34
2.6.7	Domaine thérapeutique	34
2.6.8	Industries agricoles	34
2.6.9	Industrie des détergents	35
2.6.10	Extraction de caroténoïdes.....	35
2.6.11	Industrie du vin et de la bière.....	36
	Chapitre 3 : Matériels et méthodes	37
1	Matériels de laboratoire	37
2	Microorganisme	38
2.1	Origine de la souche levurienne.....	38
2.2	Régénération de la souche.....	38
2.3	Préparation de l'inoculum	38
2.3.1	Préparation de la suspension.....	38
2.3.2	Dénombrement des cellules	39
3	Production de cellulase par Fermentation en milieu solide (FMS)	39
3.1	Son de blé substrat de la fermentation	39
3.2	Fermentation	39
3.2.1	Préparation des milieux de fermentation solide.....	39
3.3	Extraction	40
3.4	Détermination de la matière sèche (MS).....	41
4	Méthodes analytiques	41

4.1	Dosages des activités cellulolytiques	41
4.1.1	Activités cellulolytique totale (papier filtre (APF)).....	41
4.1.2	Activité endoglucanase	42
5	Purification partielle de la cellulase	43
5.1	Précipitation au sulfate d'ammonium (40%- 80%).....	43
5.1.1	Principe	43
5.1.2	Protocole	43
5.2	Dialyse.....	43
5.3	Dosage des protéines.....	43
5.3.1	Principe	43
5.3.2	Protocole de dosage	44
6	Caractérisation de la cellulase partiellement purifiée	45
6.1	Effet de pH sur l'activité de cellulase	45
6.2	Effet de la température	45
6.3	Etude de la thermo stabilité.....	45
6.4	Effet de différents sels sur l'activité de cellulase.....	45
6.5	Effet des détergents sur l'activité de cellulase	45
6.6	Effet de différentes concentrations en substrat sur l'activité enzymatique.....	46
7	Applications enzymatiques	46
7.1	Clarification du jus de pomme à l'aide de l'enzyme cellulase.....	46
7.2	Etude d'application saccharification des déchets agricoles de banane à l'aide de l'enzyme cellulase.....	47
Chapitre 4 : Résultats et discussions		49
1	Production de la cellulase	49
2	Purification partielle de la cellulase	50
2.1	Précipitation au sulfate d'ammonium (40 % - 80%).....	50
3	Caractérisation de la cellulase partiellement purifiée	52

Table de matières

3.1	Effet du pH sur l'activité de cellulase	52
3.2	Activité de cellulase en fonction de la température	54
3.3	Effet de thermo stabilité sur l'activité de cellulase	56
3.4	Effet des sels sur l'activité de cellulase.....	58
3.5	Effet des détergents sur l'activité de cellulase	61
3.6	Effet de différente concentration en substrats sur l'activité de cellulase	63
4	Applications enzymatiques	67
4.1	Clarification du jus de pomme	67
4.2	Saccharification des agro-déchets de banane à l'aide de l'enzyme cellulase ..	69
	Conclusion générale	71
	Références	74
	Annexes	90
	Résumé	96



Introduction générale

Introduction générale

Parmi les enzymes d'intérêt industriel, les cellulases représentent environ 20 % du marché mondial des enzymes, la plupart sont produites par de nombreux microorganismes surtout les levures et les moisissures. Ces enzymes attirent une attention particulière grâce à leur grand potentiel biotechnologique, industriel et le recyclage de la biomasse cellulosique (Korish, 2003 ; Moussa et Tharwat, 2007).

Les matières lignocellulosiques sont les matières premières les plus prometteuses en tant que ressources naturelles et renouvelées, essentielles au fonctionnement des industries modernes. Une quantité considérable de tels matériaux comme sous-produits et déchets sont générés par des pratiques agricoles principalement à partir de diverses industries agro-industrielles (Khelil, 2017).

La biomasse est une matière lignocellulosique provenant de sources telles que les déchets agricoles et les matières ligneuses, représente une source d'énergies renouvelable abondante, de nombreux chercheurs se sont concentrés sur la production de matériaux à valeur ajoutée à partir de la biomasse, et aussi de nouvelles technologies ont été développées. Cependant, avant que la biomasse puisse être utilisée, un prétraitement est nécessaire pour décomposer la lignocellulose en ses trois principaux constituants polymères : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (Joni *et al.*, 2009).

L'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique pour la production de sucres fermentescibles a été largement étudiée comme une étape critique pour la production de biocarburants et d'autres produits biosourcés (Yingfu *et al.*, 2013).

Au cours des dernières années, la demande d'enzymes industrielles est en augmentation continue. Dans cette optique, la cellulase est utilisée dans de nombreuses applications industrielles principalement dans le domaine de l'agriculture, de la bioénergie et du papier pour son traitement et son recyclage. Cependant, la contribution des coûts enzymatiques à l'économie de la production de biocarburants lignocellulosiques continue d'être un sujet controversé.

Chaque année, 2,12 milliards de tonnes de déchets sont produites par les différentes industries. De nombreuses méthodes pouvaient aboutir à un développement durable, également conduire à la production de produits chimiques, de matériaux et de carburants

d'importance industrielle, essentiellement des produits finis précieux issus des déchets (Khelil, 2017).

Alors que certains auteurs soutiennent que le coût des enzymes constitue un obstacle majeur à la production de biocarburants et pour surmonter cet obstacle, les chercheurs ont proposé d'utiliser des sources de carbone bon marché notamment les déchets lignocellulosiques comme un moyen prometteur de réduction significative du coût des enzymes (Khelil, 2017). La rentabilité économique est étroitement liée à la production de cellulases et les technologies enzymatiques de la saccharification de la cellulose. En effet, la dégradation de la cellulose par les microorganismes cellulolytiques a fait l'objet de nombreux travaux basant sur la sélection des microorganismes cellulolytiques pour l'obtention de souches hyper productrices à partir des milieux de production peu coûteux (Leghlimi, 2013).

En effet, en industrie, il ne s'agit pas seulement de sélectionner une souche hautement productrice, mais il est également nécessaire de définir les conditions de culture optimale. Le milieu doit être complet et contenir tous les éléments nécessaires à la croissance du microorganisme et il est en outre indispensable que ces éléments soient apportés à des concentrations optimales (Yaiche et Aidouni, 2018). Et il s'est avéré que la fermentation à l'état solide (FMS) est le processus le plus économique pour la production fongique d'enzymes cellulolytiques (Iwashita, 2002)

L'objectif principal de notre travail est :

- Purification partielle de la cellulase de *Candida Parapsilosis Strain CBS 604T* cultivée sur un milieu optimisé.
- Etude des caractéristiques physico-chimiques et des paramètres cinétiques de la cellulase de la levure *Candida Parapsilosis Strain CBS 604T*.
- Etude de l'effet des sels et des détergents sur l'activité cellulasique.
- Essais d'application industrielle comme la clarification des jus et aussi, traitement des déchets industriels.

Dans cette intention, notre manuscrit comporte deux parties dont la première est une synthèse bibliographique contenant trois chapitres, le premier renferme l'étude des levures cellulolytiques, la deuxième porte sur l'étude des cellulases et la troisième comprend la production cellulasique.

La deuxième partie rapporte la méthodologie adoptée lors de la présente étude, et expose nos résultats obtenus avec discussion. Finalement, on termine par une conclusion générale avec des perspectives.



Partie théorique

Chapitre 1 : les levures



Chapitre 1 : Levures

Les levures sont les premiers microorganismes à avoir été observés au microscope par Antoine Van Leeuwenhoek qui les a dessinés vers 1680. Ce sont des microorganismes eucaryotes faisant partie des champignons unicellulaires (Mayer *et al.*, 2004).

Le mot levure provient du mot latin «levare» qui se traduit par «lever » (Kutsman *et al.*, 2011). Les levures sont classiquement définies comme étant des champignons unicellulaires immobiles présentant une structure cellulaire, mais leurs cellules possèdent toutes les caractéristiques des eucaryotes mais se différencient des cellules végétales ou animales par leur petite taille (Bouchet *et al.*, 2005). Il existe plus de 1500 espèces de levures alimentaires, commensales ou pathogènes (Satyanarayana et Kunze, 2009).

Les enzymes produits par les levures à des propriétés et caractères différents de celle produits par d'autre microorganisme, elles disposent de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement, les levures adaptées dans le froid est produire des enzymes hydrolytiques extracellulaire pour utiliser les sources de carbone disponibles et ainsi contribuer au recyclage des nutriments. Les amylases et les cellulases actives à froid ont un grand potentiel pour être appliquées dans des processus qui peuvent nécessiter des températures basses telles que celles des industries alimentaires, des biocarburants et des détergents (Carrasco *et al.*, 2016).

Actuellement, les levures, en tant qu'usine cellulaire, sont les sources les plus exploitées dans une large gamme d'applications industrielles biotechnologiques (Singh *et al.*, 2015).

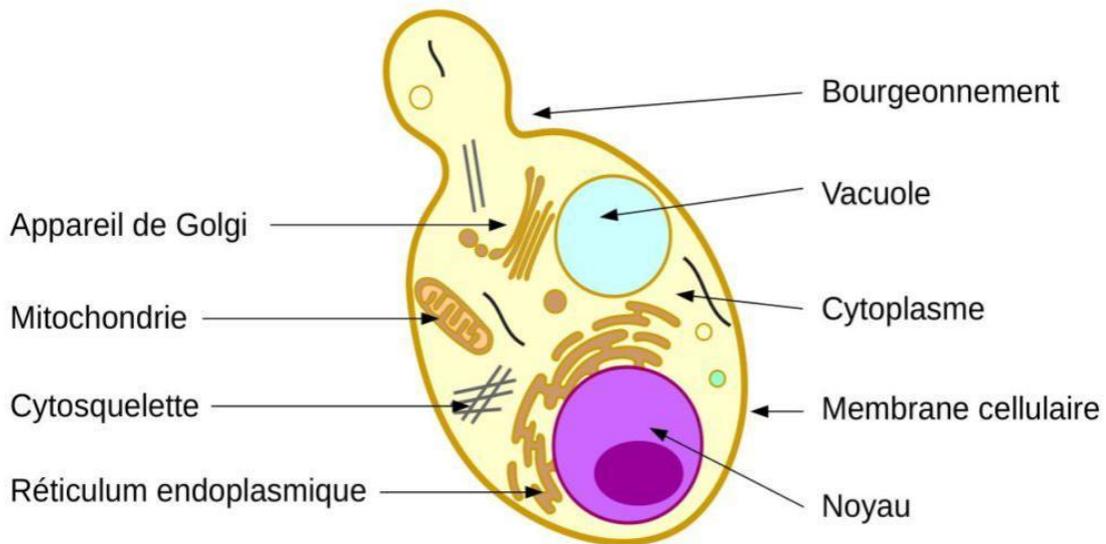


Figure 1 : Ultrastructure d'une levure.

1 Habitat des levures

Les levures sont des espèces ubiquitaires largement distribuées dans la nature et se trouvent beaucoup plus dans les milieux riches en sucres directement assimilables (Bui et Leveau, 1991). Les fruits de l'Amazonie péruvienne (cédraat, coco, pomme rose) constituent d'excellents habitats pour les levures : *Candida quercitrusa*, *Candida Tropicalis*, *Candida carpophila* (Carlos *et al.*, 2020). Les pulpes de mangue (*Hanseniasporathailandica*) et la pomme rose (*Rhodospordiobolus ruineniae*) (Mauricio *et al.*, 2019). *Metschnikowia reukaufii* est une espèce de levure très fréquemment isolée du nectar floral. Se trouve aussi dans le sol (sol dans un marais avec des arbres), bouse d'éléphant, larve d'insecte de ergates fabe, eau et gommier de cerisiers noirs sauvages (Gabor *et al.*, 2017). Il y a des bactéries lactiques : *Lactobacillus plantarum*, isolée à partir des différents fruits tels que la noix de cajou de l'ouest, la guave et l'aguajillo (Johanna *et al.*, 2019). Les levures se présentent sous forme de poudre blanche sur les fruits et les feuilles (Scriban, 2003), le tableau (2) présente différents habitats des souches levureuses.

Tableau 1 : L'habitat de quelques levures.

Habitats	Levures	Références
Yaourts artisanaux (partie nord de camérou)	- <i>Malassezia globosa</i> - <i>Parapsilose à Candida</i> - <i>Hanseniaspora uvarum</i> - <i>Galactomyces candidum</i>	(Maiworé <i>et al.</i> , 2019)
Lait fermenté traditionnel (partie nord de camérou).	- <i>Galactomyces candidum</i> - <i>Parapsilose à Candida</i> - <i>Torulaspóra delbrueckii</i> - <i>Kluyveromyces marxianus</i>	(Maiworé <i>et al.</i> , 2019)
Hémoculture des patients souffrant de candidémie (hôpitaux de téféran en Tran).	- <i>Candida. albicans</i> - <i>C. parapsilose</i> - <i>C. glabrata</i>	(Sayedeh <i>et al.</i> , 2018)
Fromage de chèvre (zone métropolitaine de porto Alger-Berésil).	- <i>Yarrowia lipolytica</i> - <i>Tricosporon spp</i> - <i>Rhodototula glutinosa</i>	(Andréia <i>et al.</i> , 2009)
Le lait cru de chèvre (zone métropolitaine de porto Alger-Berésil).	- <i>Candida aaseri</i> - <i>Candida catenulat</i> - <i>Parapsilose à Candida</i> - <i>Cryptococcus hungaricus</i>	(Andréia <i>et al.</i> , 2009)
Lait de bovin	- <i>Cryptococcus laurentii</i> - <i>Cryptococcus curvatus</i>	(Fedda <i>et al.</i> , 2013)

2 Morphologie et structure des levures

La cellule levurienne possède une paroi épaisse de 15 à 230 nm et rigide, en plus de conférer à la cellule sa forme caractéristique et sa rigidité, la paroi assure une protection physique externe et rend la cellule complètement perméable à l'eau, aux sels minéraux et

aux petites molécules. Les cellules sont généralement ovoïde ou sphériques, mais peuvent présenter autre forme parfois cylindrique, allongé, apicules ou des formes plus spécifique : ogivales (*Dekkera*), bouteille (*Malassezia*), triangulaire (*trigonopsis*), ou en forme de citron (*Hanseniaspor*). Les levures se regroupent en paires, en chaînes, en petites amas ou isolées. La taille des cellules est très variable (de taille de quelques microns à 30 μ). La masse cellulaire des levures est 100 fois plus grande que celle des bactéries. Leur morphologie est très variée. On distingue trois formes : la forme levure, la forme pseudomycélium et la forme mycélium (Derguine-Mecheri, 2019).

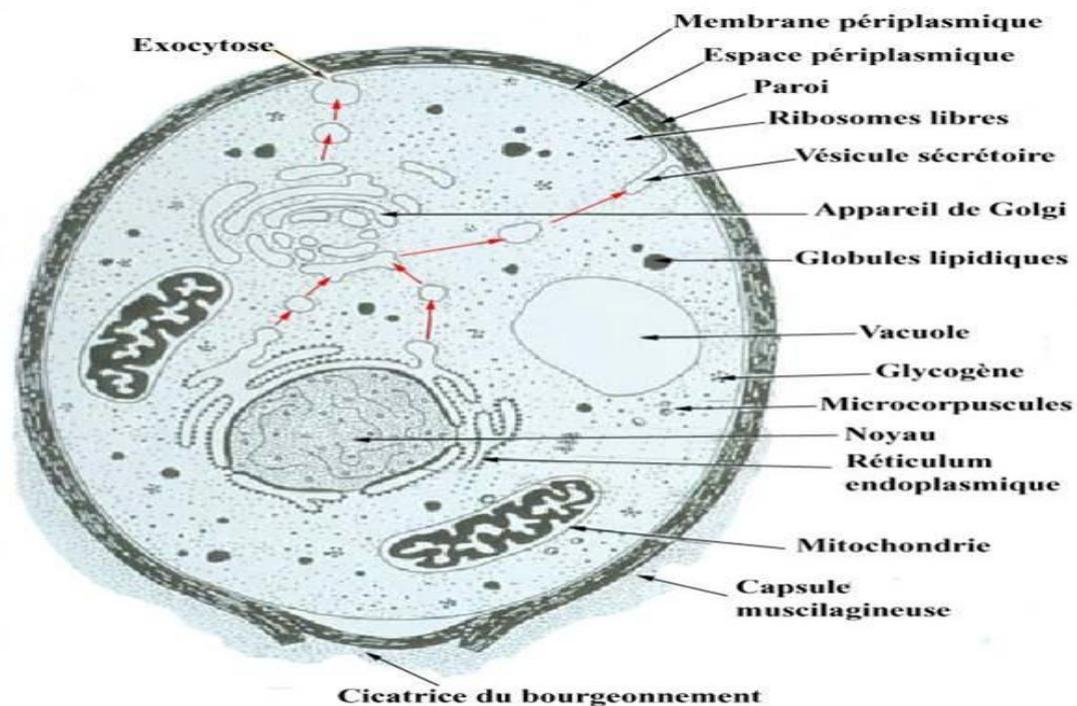


Figure 2 : Morphologie d'une levure.

La structure cellulaire des levures dépendant des conditions physicochimiques, l'âge de la culture et le type eucaryote. Elle possède une paroi épaisse et rigide, un noyau limité par une membrane nucléaire, un cytoplasme contenant divers organites dont des mitochondries et une grande vacuole (Rezki-Bekki, 2014).

3 Classification des levures

Il y a deux classifications. La Classification de référence des levures est celle de Kreger Van (1984) qui présente des changements sensible par rapport à la précédente

classification de l'offre (1970) (Derguine-Mecheri, 2019). Il y a environ 1500 espèces de levures connues, et environ 150000 espèces sur terre prévu (Buzzin et Margesin, 2014 ; Kurtzman *et al.*, 2011).

Selon leur mode de reproduction, les levures se divisent en trois grandes classes :

3.1 Ascomycetes

Les ascomycotina ou (levures vrais) ou (levures ascosporegène), caractérisé par une reproduction sexuée, ou le produit de la méiose sont endogène et enfermés dans une structure issue de zygote : l'asque (Suh *et al.*, 2006).

3.2 Basidiomycetes

Basidiomycotina ou (levures fausses), genres sexuée, où basidiospores (le produit de la méiose) sont exogènes et émis à l'extérieur zygote (Derguine-Mecheri, 2019).

3.3 Deutéromycètes

Levures imparfaites « fungiimperfecti » ou « levures asporgènes », genre asexués ne se multiplient que par reproduction asexuée, comprend des levures de fermentation et des levures pathogènes pour l'homme (Satyanarayana et Kuneze, 2009). La classification des levures est récapitulée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Clasification des levures (Kreger-Van Rij, 1984).

Ascomycète	Basidiomycètes	Deutéromycètes
1-Saccharomycetaceae Schizosaccharomycetoida <i>Schizosaccharomyces</i> 2-Saccharomycetoidea <i>Ambrosiozyma</i> <i>Arthroascus</i> <i>Arxiozyma</i> 3-lipomycetoideae <i>Lipomyces</i> 4-nadsonioideae <i>Hanseniaspora</i> <i>Nadsonia</i> 5-spermophthoraceae <i>Coccidiascus</i> <i>Metshnikowia</i> <i>Nematospora</i>	-Levures formant des telispores <i>Leucosporidium</i> <i>Rhodosporidium</i> <i>Sporidiobolus</i> -Filobasisaceae <i>Filobasidiella</i> <i>Filobasidium</i> -Levure non classés sterigmatosporidium <i>Sterigmatosporidium</i>	-Sporobolomycetaceae <i>Bullera</i> <i>Sporobolomyces</i> -Cryptococcaceae <i>Aciculoconidium</i> <i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>cryptococcus</i> <i>Eeniella</i> <i>Fellomyces</i>

4 Caractéristiques physiologique et biochimiques des levures

4.1 Caractéristiques physiologique et nutritionnelles

4.1.1 Besoins nutritifs

4.1.1.1 Besoin en carbone

Le carbone (C) constitue 50 % du poids sec de la levure (Derguine-Mecheri, 2019). Les composés carbonés sont d'une grande importance pour les levures puisqu'elles fournissent le carbone nécessaire pour la biosynthèse de constituants cellulaires et l'énergie. Les glucides sont les plus fréquemment utilisés, en particulier les monosaccharides comme les hexoses, les disaccharides et les trisaccharides. D'autres glucides abondants et peu coûteux comme les pentoses et les polysaccharides ont fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années (Waldron, 2010)

4.1.1.2 Besoin en azote

L'azote (N₂) compose 65 % de la matière sèche et donc sa présence, sous forme organique ou non, est indispensable lors de la multiplication (Barnet *et al.*, 2000). L'azote est le deuxième constituant important, jouant un rôle capital puisqu'il entre dans la composition de plusieurs molécules essentielles au fonctionnement cellulaires allant de plus simple comme les acides aminés, les sucres aminés et les nucléotides (Sanchez, 2008). L'azote peut être apporté sous deux formes :

- **Minérale** : toutes les levures sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ion ammonium (chlorure, nitrate, phosphate, mais surtout sulfate qui est le composé idéal puisqu'il apporte également du soufre nécessaire à la synthèse de certains acides aminés). Certaines levures dégradent les nitrites et les nitrates.

- **Organique** : les acides aminés des protéines et l'urée. La croissance est plus rapide en présence d'acides aminés, de préférence en mélange, ou des sels d'ammonium plutôt que des peptides (Derguine-Mecheri, 2019).

4.1.1.3 Besoin en sels minéraux, oligoéléments et vitamines

Les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux (potassium, sodium, magnésium, calcium, phosphore) et d'oligoéléments (fer, cuivre, zinc, sélénium) nécessaires à de très faibles concentrations. En addition, d'autres facteurs sont essentiels, comme les vitamines de groupe B (biotine,

acide pantothénique, inositol, thiamine) (Lourens et Reid, 2002). La souche *Candida lusitaniae* n'a pas besoin de vitamines pour sa croissance. Par contre, la levure *Sacharomyces cerevisiae* a besoin de biotine pour croître (Larpent-Gourgand et Sanglier, 1992).

4.2 Facteur physico-chimiques

Les capacités de croissance et de production des levures sont généralement affectées par les conditions environnementales qui peuvent ralentir ou arrêter leurs activités (Sainz *et al.*, 2003).

4.2.1 Température

Les micro-organismes thermophiles poussent à des températures comprises entre 45-80°C (Rudiger *et al.*, 1995 ; Madigan et Martino, 2006). Leur température minimale de croissance se situe entre 20°C et 50°C. Les micro-organismes capables de se développer à des températures comprises entre 50°C et 60°C sont désignés comme thermophiles modérés : étroitement liés phylogénétiquement aux microorganismes mésophiles (Bertoldo et Antranikian, 2002). Dans la majorité des cas, la température ne reste pas constante pendant la croissance. Certains travaux ont bien montré, chez certaines levures et en particulier chez *S. cerevisiae*, qu'une température supérieure à 30°C accroît la vitesse de production de certains métabolites comme l'éthanol (Aldiguié *et al.*, 2004).

4.2.2 PH

Le maintien du pH cytoplasmique est indispensable à la survie de la levure et les limites de leur pH reportées dans la littérature se situent entre 2,4 et 8,6 avec un pH optimal entre 4,4 et 6,5 (Jones *et al.*, 1981).

4.2.3 Aération

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène ; il n'y a pas de levures anaérobies strictes, certaines sont aérobies strictes : *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Lipomyces*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* et *Debaryomyces*. D'autres sont aéro-anaérobies facultatives :

-Des levures avec un métabolisme fermentaire même en présence d'oxygène : *Saccharomyces*, *Schizo saccharomyces* et *Brettanoyces* et quelques espèces de *Torulopsis*.

-Des levures avec un métabolisme respiratoire en présence d'oxygène : *Candida*, *Kluyveromyces*, la plupart des *Pichia* et *Hansenula* et quelques espèces de *Torulopsis* (Bouix et Leveau, 1991).

4.2.4 Pression osmotique et l'activité de l'eau

La pression osmotique intervient également sur le développement des levures dont l'effet varie d'une souche à une autre. La plupart des souches ne peuvent se développer qu'à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60 mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes car elles sont capables de synthétiser des osmoprotecteurs (glycérol et Bétaine) (Dakhmouche, 2016).

4.2.5 CO₂

Le CO₂ peut être à la fois activateur et inhibiteur du métabolisme levurienne (Rezki-bekki, 2014 ; Hirsawa *et al.*, 2007). Il initie les voies anaérotiques à faible concentration. Jones et Greenfield (1982) ont montré que le rendement de conversion du substrat augmentait de 25% lors d'une croissance en aérobie sur glucose sous une pression partielle de 0,2 bar de CO₂. Par ailleurs, une augmentation trop importante de la pression partielle en gaz carbonique semble entraîner une chute de la viabilité cellulaire (Chaabane, 2006).

5 Micro-organismes cellulolytiques

La cellolyse est étape fondamentale de la transformation de la cellulose en molécules (sucres) de petite taille comme le glucose (Xu *et al.*, 2000). Elle peut être réalisée par plusieurs microorganismes :

5.1 Les bactéries

Clostridium thermocellum de *Trichoderma reesei*. *Cl. Thermocellum* sont des bactéries anaérobies saprophytes, productrices de la cellulase, interviennent dans la conversion directe de la cellulose cristalline en éthanol, en acides organiques et en gaz (CO₂, H₂) (Rafaas, 2017). D'autre part, il y a des bactéries aérobies productrices cellulase sont : *Acinetobacter junii*; *A. amitratus*; *Acidothermus cellulolyticus*; *Anoxybacillus sp.*; *Bacillus subtilis*; *B. pumilus*; *B. amyloliquefaciens*; *B. licheniformis*; *B. circulans* ; *B. flexus* ; *Bacteriodes.sp*; *Cellulomonas biazotea*; *Cellvibrio gilvus*; *Eubacterium cellulosolvens* (Ramesh *et al.*, 2011).

5.2 Les Champignons

Les mycètes sont des agents bien connus pour la décomposition de la matière organique, en général, et des substrats cellulosiques (Béguin, 1990). De nombreux champignons sont cellulolytiques produisant des exoglucanases et des Bêta-glucosidases (Carlile et Watkinson, 1997). Quelques champignons producteurs de cellulase : *Aspergillus niger* ; *A. nidulans* ; *A. oryzae* ; *A. terreus* ; *Fusarium solani* ; *F. oxysporum* ; *Humicola insolens* ; *H. grisea* ; *Melanocarpus albomyces* ; *Penicillium brasilianum* ; *P. occitanis* ; *P. decumbans* ; *Trichoderma reesei* ; *T. longibrachiatum* (Ramesh *et al.*, 2011).

5.2.1 Levures

La levure est connue pour ses rendements d'expression élevés en protéines. La voie sécrétoire de la levure permet la formation de liaisons disulfure et la glycosylation favorisées et améliore également la stabilité et la fonctionnalité des enzymes (Lambert *et al.*, 2014 ; Wang et Hong, 2018).

Tableau 3 : Levures produisant l'enzyme cellulase.

Levures	Référence
- <i>S. cerevisiae</i> - <i>Trichosporon laibachii</i> - <i>Candida wickerhamii</i> - <i>C. tropicalis</i> - <i>Kluyveromyces lactis</i>	(Zamouche <i>et al.</i> , 2018 ; Sharma <i>et al.</i> , 2016).
- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MK-157 pour l'endoglucanase. - <i>Candida Tropicalis</i> MK-118 : pour la β -glucosidase.	(Qadir <i>et al.</i> , 2018).
- <i>Cryptococcus. Gastricus</i> ; <i>Cr. Gilvescens</i> ; <i>Cr. Victoriae</i> ; <i>Leuconeuospora.sp</i> ; <i>Cryptococcusgilvescens</i> ; <i>RH.glacialis</i> B19.	(Carrasco <i>et al.</i> , 2016).
- <i>Trichoderma reesei</i> . - <i>Trichoderma aviride</i> QM6a. - <i>Trichoderma longibrachiatum</i> .	(Vincent, 2013).

De nos jours, les cellulases de levure gagnent un intérêt, car elles sont actives dans une large gamme de pH et à des températures élevées. En effet, les levures peuvent produire de la cellulase thermostable, non dénaturée à des températures supérieures ou égales à 70 ° C, elle peut être utilisée dans les processus de saccharification de la Lignocellulose en sucres fermentes cibles pour la production de bioéthanol (Touijer *et al.*, 2019).

La cellulase a été issue de plusieurs espèces levuriennes et généralement ses propriétés diffèrent de celles produites par d'autres micro-organismes (Carrasco *et al.*, 2016).

5.2.2 Moisissure

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes filamenteux aérobies strictes et rarement anaérobies, formant une structure mycélienne et des thalles constitués par de nombreux filaments ramifiés, unis ou multicellulaires, immobiles, non chlorophylliens et sporogones. Elles sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, amylolytiques..), qui en font des agents de dégradation des matières organiques (Derguine-Mecheri, 2019).

6 Intérêt industrielle de levures

Grace à leur métabolisme diversifié, les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires, la production des enzymes, certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation des déchets agricoles, industriels et à la production des protéines (Walker, 2009). Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent ainsi largement ces microorganismes, pour la production de molécules d'intérêt médical (exemple : production de protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B) (Derguine-Mecheri, 2019). L'extrait de levure constitue un élément nutritionnel important (source azotée et apport en vitamines du groupe B indispensable), favorable en particulier la croissance de la plupart des microorganismes. Les levures participent également à la valorisation des déchets agricoles et industriels pour la production des protéines, des enzymes et de «SCP» (Spencer-Martins et Van Uden, 1979).

Tableau 4 : Produits industriels produits par les levures (Walker, 2009).

Exemple	Produit
De la nourriture et l'alimentation animale.	Levure de boulanger, extraits de levure, levure fourragère, facteur de croissance du bétail et pigments alimentaires.
Boissons.	Boissons alcoolisées potables : Bière, vin, cidre, saké et spiritueux (whisky, rhum, gin, vodka et cognac)
Enzymes	Cellulase, invertase, insulase, pectinase, lactase et lipase.
Hormones recombinante	-Hormones (insuline), vaccins viraux (vaccin contre l'hépatite B), anticorps (IgE récepteur), facteurs de croissance (tumeur facteur de nécrose), interférons (leucocyte interféron), protéines sanguines (albumine sérique) et des enzymes (gastrique lipase et chymosine).
Produits chimiques	Carburant éthanol (bioéthanol) dioxyde de carbone, glycérol et vitamines d'acide citrique; les levures utilisé comme catalyseurs bioréducteurs dans chimie organique.

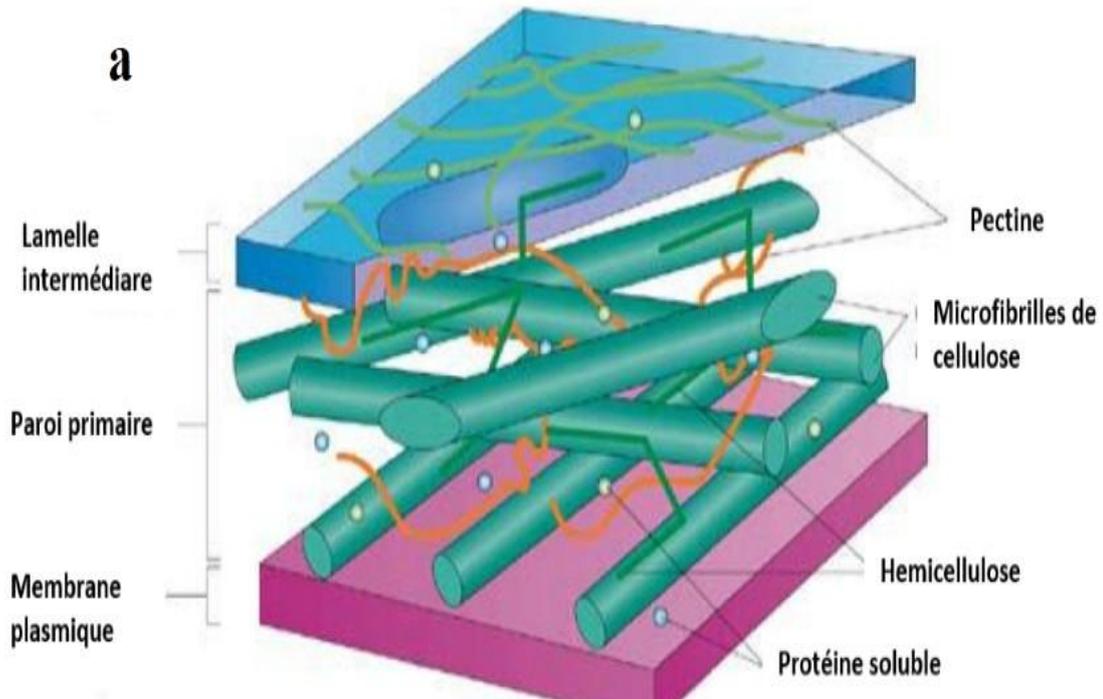
Chapitre 2 : la cellulase



Chapitre 2 : Etude de cellulase et leur substrat

1 Biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est la biomasse la plus importante et la plus abondante sur terre (Omar, 2017). La paroi cellulaire de la plante est principalement composée de deux parties : la paroi primaire et la paroi secondaire, et il existe aussi, une couche intercellulaire entre les cellules adjacentes (Xie *et al.*, 2021) (figures 3a, 3b, 3c). La lignocellulose, comme le bois dur, le bois tendre, l'herbe et les résidus agricoles, est l'un des biopolymères à base de carbone les plus abondants dans la nature (Wang *et al.*, 2019). C'est le principal composant structural des plantes ligneuses et des plantes non ligneuses (Saada et Hamdane, 2021). La lignocellulose est composée de trois polymères naturels, dont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Wang *et al.*, 2019). La cellulose et l'hémicellulose sont les principaux composants de la paroi primaire. La lignine existe principalement dans la couche intercellulaire, elle agit comme un adhésif et un support entre les cellules (Xie *et al.*, 2021).



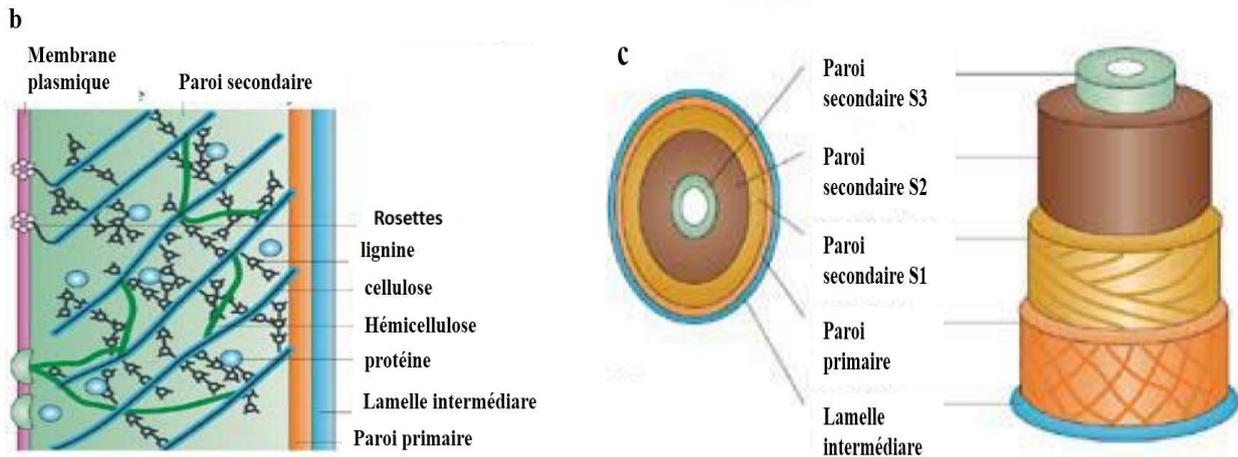


Figure 3 : Composition de la paroi cellulaire : a) organisation des constituants des parois végétales primaires. b) Organisation et mise en place des parois végétales primaires et secondaires. c) Organisation des couches de parois (Sticklen, 2008).

La cellulose est la ressource biologique renouvelable la plus abondante et une source d'énergie à faible coût. La production de produits biosourcés et de bioénergie à partir de matériaux lignocellulosiques renouvelables moins coûteux à des avantages sur l'économie locale, l'environnement et la sécurité énergétique nationale (Zhang et Zhang, 2013).

1.1 Composition et structure de la biomasse lignocellulosique

La majorité de la paroi végétale est composée de polymères appartenant à trois grandes familles : la cellulose (40-50%), les hémicelluloses (25-35%) et les lignines (15-20%). La proportion de chacun des constituants varie en fonction de nombreux facteurs tels que la nature du tissu considéré, le type de biomasse et le stade de croissance (Ben Ali, 2021) (Tableau 5).

Tableau 5 : Composition en cellulose, hémicelluloses et lignines de différentes biomasses végétales (Ben Ali, 2021)

Biomasse	Cellulose (%)	Hémicellulose (%)	Lignine (%)
Herbe	30-50	15-40	5-20
Bagasse	40-55	25-40	5-25
Bois dur	40-50	20-30	15-30
Bois tendre	40-55	10-15	25-30
Paille de blé	30-45	20-30	15-20

1.1.1 Cellulose

La caractéristique la plus distinctive de la paroi végétale est la cellulose (Keegstra, 2010). Un des trois composants majeurs de la biomasse végétale qui a attiré beaucoup d'attention (Xie *et al.*, 2021). La cellulose est un réservoir de carbone naturel reconnu pour le glucose et comme matière première pour la production de biocarburants et d'autres produits à valeur ajoutée (Ezeilo *et al.*, 2021). La cellulose est un homopolymère de glucose (Verma et Kumar, 2019). Elle a un rôle structurel, et présente sous forme de microfibrilles dans les parois des cellules végétales (figure 4), Le polymère de cellulose est composé d'unités de cellobiose ; un dimères de glucose (Siqueira *et al.*, 2019). Les groupes D-glucopyranosyl sont reliés par des liaisons 1,4- β -glycosidiques. Quant aux liaisons hydrogène, elles relient les chaînes polysaccharidiques pour former les microfibrilles de cellulose (Xie *et al.*, 2021).

L'utilisation d'un microscope électronique permet l'identification d'une chaîne d'association de cellulose formée par des liaisons hydrogène intra et intermoléculaires, résultant en des microfibrilles dures et insolubles (Hasper *et al.*, 2002). La cellulose est un polymère cristallin, une caractéristique inhabituelle parmi les biopolymères cellulose les chaînes dans les cristaux sont rigidifiées par des liaisons hydrogène inter et intra chaînes et les feuilles adjacentes qui se superposent sont maintenus ensemble par de faibles forces de Van-der Waals. Dans la nature, la cellulose est présente à l'état presque pur dans quelques cas, alors que dans la plupart des cas, les fibres de cellulose sont intégrés dans une matrice d'autres biopolymères structuraux, principalement des hémicelluloses

et de la lignine (Sharma *et al.*, 2016). Dans les régions plus amorphes, les polymères de cellulose sont éloignés les uns des autres et plus disponibles pour la liaison hydrogène à d'autres molécules. En raison de ces deux organisations moléculaires différentes, le polymère a une structure paracrystalline, dans laquelle les régions amorphe et cristalline sont reliées par des liaisons β -1,4 glycosidiques. Le degré de cristallinité varie selon la source de cellulose et est proportionnel à la taille latérale des microfibrilles de cellulose (Siqueira *et al.*, 2019).

La cellulose ou les vieux papiers sont en quelque sorte difficile à hydrolyser par voie enzymatique car ils sont associés aux hémicelluloses et à la lignine. L'hydrolyse acide diluée est un moyen simple et rapide de prétraiter ces matériaux lignocellulosiques (Verma et Kumar, 2019). La cellulose peut être utilisée pour fabriquer du papier, des matériaux à base de la cellulose et ses dérivés peuvent être appliqués dans le domaine des matériaux électriques (Xie *et al.*, 2021).

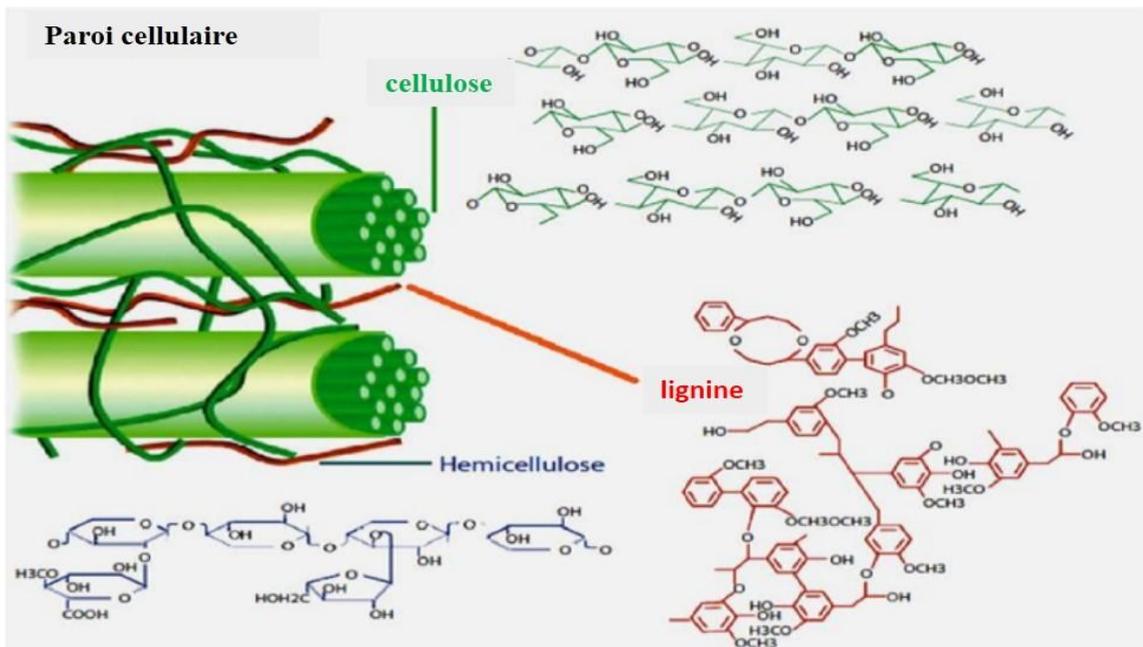


Figure 4 : Structure de la paroi végétale (Alonso *et al.*, 2012).

1.1.2 Hémicellulose

Les hémicelluloses sont des polysaccharides non cellulosiques dont la longueur varie de 100 à 200 unités (Qaseem *et al.*, 2021). L'hémicellulose est un hétéropolymère composé principalement de mannose, de galactose, de xylose et d'arabinose liés par diverses liaisons glycosidiques avec des branches (Verma et Kumar, 2019 ; Wang *et al.*,

2019). Alors que les principaux groupes de sucre de l'hémicellulose sont le d-xylose, le d-mannosyle, le d-glucosyle, le d-galactosyle, le l-arabinosyle, le groupe acide 4-O-méthyl-d-glucuronique, le groupe acide d-galacturonique et le groupe d-glucuronique. Parmi les groupes acides, deux ou plusieurs constituent des glycanes différents (Xie *et al.*, 2021). L'hémicellulose des plantes résineuses est constituée de pentosanes et d'hexosanes, alors que l'hémicellulose des feuilles est majoritairement constituée de pentosanes (Lachowicz *et al.*, 2019). Les hémicellulases sont un groupe diversifié d'enzymes qui hydrolysent les hémicelluloses, l'une des groupes de polysaccharides les plus abondants dans la nature (Sharma *et al.*, 2016).

D'autre part, le xylane est un composant majeur de l'hémicellulose. Les hémicellulases sont donc principalement composées d'endo- β -1,4-xylanase (xylanase) et β -xylosidase. La chaîne principale du xylane est clivée de manière aléatoire par la xylanase pour produire des xylo-oligosaccharides (XO). Les XO sont ensuite hydrolysés en xylose par β -xylosidase. De ce fait, l'accessibilité de la cellulose est grandement améliorée et les hémicellulases sont donc des composants enzymatiques accessoires essentiels dans le cocktail d'enzymes cellulolytiques (Wang *et al.*, 2019).

1.1.3 Lignine

Les lignines sont des composés naturels polyphénoliques indispensables à la structure des plantes (Janusz *et al.*, 2017). La lignine est étroitement liée à la structure polysaccharidique de la paroi cellulaire (Xie *et al.*, 2021), est le terme générique d'un vaste groupe de polymères aromatiques. Elle constitue le seul groupe de polymères bi-synthétisés à squelette aromatique. Ces polymères sont déposés principalement dans les parois secondaires des cellules, les rendant rigides et imperméables. La lignine protège, d'une part, les polysaccharides de la paroi cellulaire de la dégradation microbienne en leur conférant une résistance à la pourriture, et présente, d'autre part, un des facteurs limitant les plus importants à la conversion de la biomasse en pâte à papier ou en biocarburants. Elle est issue de la polymérisation des alcools p-coumarylique, coniférylique et sinapylique, qui sont des monolignols, ou 4-hydroxyphénylpropanoïdes, dérivés d'un acide aminé, la phénylalanine (figure 5). La polymérisation s'effectue par une radicalisation oxydative des monolignols suivie d'un couplage radicalaire combinatoire (Saada et Hamdane, 2021). La lignine présente une structure très complexe du fait de la présence de nombreuses fonctions hydroxyles (phénoliques ou non) qui donne une très grande réactivité. En formant des liaisons à la fois avec la cellulose et les

hémicelluloses, elle crée une barrière à toutes les solutions et empêche la pénétration des enzymes au sein de la structure lignocellulosique. Bien que la lignine résiste à l'attaque de la plupart des microorganismes, certains champignons basidiomycètes de la pourriture blanche sont capables de dégrader la lignine efficacement en employant une combinaison d'enzymes ligninolytiques extracellulaires, des acides organiques, des médiateurs et des enzymes accessoires (Ben Ali, 2021).

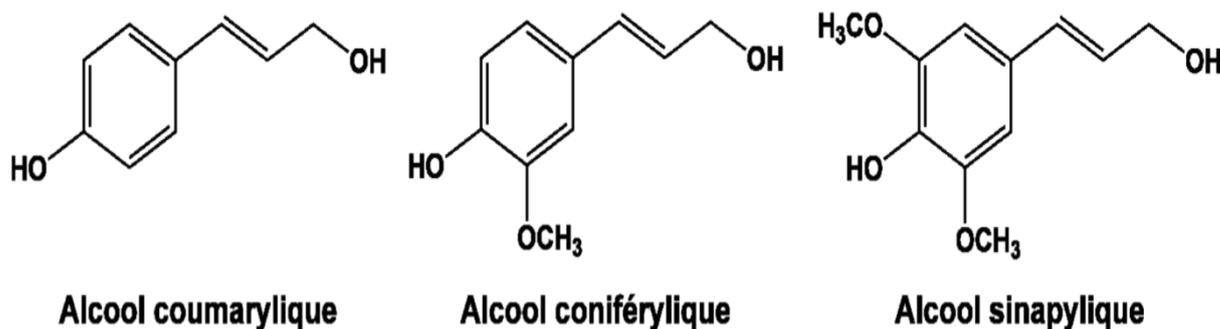


Figure 5 : Structure des trois alcools composant les lignines : l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Ben Ali, 2021).

1.2 Déchets Lignocellulosiques

Les déchets lignocellulosiques sont l'une des sources de carbone renouvelables bon marché et les plus abondantes (Swathy *et al.*, 2019). Les déchets de lignocellulose sont abondants et leur transformation en produits utiles sera un avantage supplémentaire pour l'économie (Amadi *et al.*, 2020). Elles sont constituées de cellulose, le principal constituant (35 à 50 %) des parois cellulaires, suivi de l'hémicellulose (20 à 35 %) et de la lignine (10 à 25 %) (Ezeilo *et al.*, 2021). Les déchets de fruits comme déchets de banane, déchets de pomme, déchets de raisin, déchets d'agrumes, déchets d'ananas sont, comme les biomasses à faible coût, des sources renouvelables et durables potentielles pour la production de produits à valeur ajoutée (Srivastava *et al.*, 2021). Les déchets de fruits sont une bonne source de cellulose, d'hémicellulose et de sucres réducteurs, En revanche, ces déchets cellulosiques ont une faible teneur en lignine, et leur grande abondance en fait une source économique et à faible coût pour la production de produits à valeur ajoutée comme les enzymes, les biocarburants. Ils favorisent la production rapide de l'enzyme cellulase en raison de l'absence de lignine. En plus, en raison de la richesse de ces déchets en sucres, les micro-organismes nécessitent moins de stress/ effort pour produire des enzymes en peu de temps (Srivastava *et al.*, 2021).

1.2.1 Son de blé

En raison de son contenu nutritionnel et de sa grande surface, il constitue une excellente source de carbone sans aucune source de carbone supplémentaire pour la production d'enzymes lignocellulolytiques. De plus, aucun prétraitement préalable n'est nécessaire pour l'utilisation du son de blé dans la production d'enzymes, sa grande teneur en protéines peut également réduire la biosynthèse de la cellulase, mais les oligosaccharides solubles, l'amidon et la cellulose présents dans le son de blé ont un impact significatif sur la production de cellulase (Verma et Kumar, 2019).

1.2.2 Papier

Le papier est l'un des principaux constituants des déchets solides, et il représente un grave problème d'élimination car la gestion des déchets solides est une tâche très importante et difficile. La matière première cellulosique à base de papier journal est devenue une option attrayante pour la production de produits chimiques à valeur ajoutée (Verma et Kumar, 2019).

2 Cellulases

Aujourd'hui, les cellulases représentent une part importante du marché mondial des enzymes industrielles (Zhang et Zhang, 2013). Le marché des enzymes est très prometteur dans les pays développés, comme les États-Unis, l'Europe occidentale, le Japon et le Canada. Dans ces pays, la demande d'enzymes industrielles est stable, contrairement aux économies en développement, aux régions d'Asie-Pacifique, d'Europe de l'Est, d'Afrique et du Moyen-Orient qui émergent récemment comme des marchés à croissance rapide pour les enzymes industrielles (Amadi *et al.*, 2020). Les cellulases sont les enzymes clés utilisées pour la dépolymérisation biocatalytique de la biomasse cellulosique en sucres fermentescibles (Srivastava *et al.*, 2021), elles sont largement utilisées dans la dégradation des déchets lignocellulosiques. C'est un complexe multienzymatique qui hydrolyse la cellulose est constitué d'endocellulase ou endoglucanase (EC 3.2.1.4). Les Trois types d'enzymes (endoglucanases, exoglucanases, β -glucosidase) agissent en synergie (Siqueira *et al.*, 2019). Leurs Synonymes sont : endoglucanase, endo-1,4- β -glucanase, cellulase carboxyméthylrique, β -1,4-endoglucanhydrolase, celludextrinase, Avicelase, etc. (Bara et Fergani, 2021 ; Saada et Hamdane, 2021).

Pour cette raison, l'étude de nouvelles souches productrices de cellulase combinée à l'utilisation des déchets agro-industriels comme substrat a fait l'objet des études les plus

récentes afin d'obtenir des rendements élevés à faible coût (Bezerra *et al.*, 2021). Les animaux, les plantes et les micro-organismes peuvent être des sources de cellulases. Cependant, la production industrielle d'enzymes est généralement réalisée par des micro-organismes. Par conséquent, la production moins coûteuse de cellulases est une approche intéressante pour ajouter de la valeur au marché des biocarburants et des enzymes (Siqueira *et al.*, 2019).

2.1 Structure de la cellulase

La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines à haute teneur en acides aminés et non des métalloprotéines (Bensmira, 2006). La structure des cellulases représente deux domaines distincts : un domaine catalytique et un module de liaison à la cellulose (CBM), rejoint par une région de liaison flexible. Il y a environ 35 acides aminés dans le CBM, tandis que de grandes quantités de sérine et la thréonine sont présentes dans le lieu. Un site actif en forme de fente/rainure est présent dans le module catalytique de la plupart des endoglucanases, permettant à l'enzyme de se lier également pour libérer du glucose, des cellodextrines et des fragments insolubles en clivant la chaîne. D'autre part, deux boucles de surface forment une structure tunnel dans le site catalytique des CBH (exoglucanase). Du fait que les BG ne contiennent pas de CBM, l'activité sur la cellulose insoluble est insignifiante. Cependant, les BG libèrent du glucose en hydrolysant le cellobiose et les protéines solubles. Cellodextrines. L'importance de cette dégradation réside dans le fait que le cellobiose est inhibiteur de la CBH ainsi que de l'endoglucanase. Une variété de BG avec différents sites catalytiques sont synthétisés par un certain nombre de bactéries, archées, champignons, plantes et animaux (Sharma *et al.*, 2019).

2.2 Caractéristiques des cellulases

Les enzymes cellulolytiques possèdent plusieurs caractéristiques telles que :

2.2.1 Réaction et spécificité

La réaction des cellulases est représentée par l'endohydrolyse des liaisons 1,4-D-glucosidiques dans la cellulose et la lignine, ainsi que l'hydrolyse des liaisons 1,4 et 1,3-D-glucane.

2.2.2 Substrats naturels

La cellulase peut avoir différents substrats naturels tels que : la cellulose dont la dégradation complète nécessite une action complémentaire des enzymes cellulolytiques.

Il en est de même pour d'autres substrats cellulosiques tels que les xyloglucanes ainsi que le coton.

2.2.3 Inhibiteurs

La cellulase est inhibée par une variété de facteurs, y compris : Hg^{2+} et qui peut être restauré par la cystéine ou NaCl.

2.2.4 Poids moléculaire

Les cellulases ont un poids moléculaire très varié qui est principalement déterminé par leurs origines. Certaines endoglucanases ont des poids moléculaires de 30 à 90 KDa, alors que d'autres ont des poids moléculaires beaucoup plus faibles de l'ordre de 13 KDa. Les exoglucanases sont de 30 à 50 KDa, tandis que les β -glucosidases ont une masse moléculaire de 90 à 240 KDa.

2.2.5 PH optimum

La majorité des préparations cellulolytiques étudiées ont un pH compris entre 3 et 7. Les cellulases d'origine fongique ont une gamme de pH plus étroite (pH 4-5) alors que les cellulases ont un pH optimum proche de la neutralité.

2.2.6 Température optimale

La meilleure température pour les cellulases de champignons se situe entre 40 et 70 %, pour celles d'origine bactériennes se situe entre 50 et 100 %, ce qui explique leur utilisation dans l'industrie du textile (Bensmira, 2006).

2.3 Classification des cellulases

Selon CAZy (la Carbohydrate Active Enzyme Database), les cellulases appartiennent à la famille GH (glycoside hydrolase) qui renferment les enzymes hydrolysant la liaison glycosidique entre deux glucides ou plus ou entre un glucide et un groupe non glucidique. Le classement des cellulases est basé sur leur mode d'action, les propriétés structurelles de l'enzyme (Panchapakesan et Shankar, 2016) et la dépolymérisation du substrat (Siqueira *et al.*, 2019). L'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) a classé les cellulases en trois types selon la similitude de séquence (Panchapakesan et Shankar, 2016).

2.3.1 Endocellulase (EC 3.2.1.4)

Elles hydrolysent les liaisons glycosidiques dans les régions amorphes de la cellulose de manière ordonnée, ce qui donne des oligomères avec différents degrés de

polymérisation (Siqueira *et al.*, 2019). L'attaque au hasard entraîne la libération de cellodextrines, de cellobiose et de glucose. L'endocellulase est active sur la région amorphe qui est plus soluble dans la structure de la cellulose (Ezeilo *et al.*, 2021). L'activité est d'autant plus importante que le degré de polymérisation est élevé. Par contre, son activité est très faible sur la cellulose cristalline. L'attaque au hasard entraîne la formation de nouvelles extrémités non réductibles qui, à leur tour, deviennent des sites actifs pour les cellobiohydrolases (Bensmira, 2006). Ces enzymes n'agissent pas sur la cellulose cristalline (Prevot, 2013). Cependant, certaines endoglucanases peuvent agir de manière « processuelle », en fonction de leur capacité à hydrolyser la cellulose cristalline et à générer les principaux produits sous forme de cellobiose ou de cellodextrines plus longues (Zhang et Zhang, 2013).

2.3.2 Exocellulase (EC 3.2.1.91)

Elle clive les extrémités des chaînes exposées en oligosaccharides (Swathy *et al.*, 2019). Les cellobiohydrolases agissent de manière possessive sur les extrémités réductrices et non réductrices de la cellulose pour libérer soit du glucose (glucanohydrolases) soit du cellobiose (cellobiohydrolase) comme principaux produits (Zhang *et al.*, 2020 ; Saada et Hamdane, 2021). Ces enzymes sont actives contre le substrat cristallin tel que l'avicel, les celluloses amorphes et les cellooligosaccharides. Cependant, ils sont inefficaces contre le cellobiose ou les celluloses de substitution solubles telles que la CMC (Sadhu et Maiti, 2013). Ce sont les seules enzymes agissant sur la cellulose cristalline (Prevot, 2013). Le rôle essentiel de cet enzyme est de permettre l'action de l'endocellulase sur la cellulose cristalline, seuls quelques champignons filamenteux (*Trichoderma resei*, *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani*, *Chaetomium thermophile*, *Sporotrichum pulverulentum*) semblent disposer d'une cellobiohydrolase (Bensmira, 2006).

2.3.3 Cellobiases (EC 3.2.1.21)

Les β -glucosidases (BG) hydrolysent les β - terminales non réductrices-résidus glucosyle en glucose (Zhang, *et al.*, 2020). Selon sa spécificité, la cellobiase peut être active sur les β (1-4) oligoglucosides, mais l'activité diminue rapidement quand la longueur de la chaîne augmente (Bensmira, 2006). Pertinemment, le rôle catalytique clé de la β -glucosidase est d'hydrolyser le cellobiose en glucose, assurant la saccharification complète de la cellulose, car le cellobiose est un puissant inhibiteur de la cellulase (Ezeilo *et al.*, 2021). L'activité de BG sur la cellulose insoluble est négligeable. Les BGs

dégradent le cellobiose, qui est un inhibiteur connu de la CBH et de l'endoglucanase. Différentes BG sont produites par diverses archées, bactéries, champignons, plantes et animaux. La plupart du temps, les champignons aérobies produisent des BG extracellulaires et les bactéries anaérobies conservent leurs BG dans le cytoplasme. Les BG ont un site actif en forme de poche, ce qui leur permet de se lier à l'unité de glucose non réductrice et de détacher le glucose du cellobiose ou de la cellodextrine (Zhang et Zhang, 2013). Les microorganismes à forte activité cellulasique, en particulier *Trichoderma viridae*, sont déficients en cellobiase. Ceci se traduit par une accumulation de cellobiose et par une baisse de la vitesse de saccharification (Bensmira, 2006).

2.4 Mécanisme d'action de la cellulase

Le mode d'action de la cellulase est hydrolytique car elle hydrolyse les liaisons glycosidiques β -1,4 au sein de la chaîne qui composent le polymère cellulosique (Chakraborty *et al.*, 2016). Les Trois types d'enzymes (endoglucanases, exoglucanases, β -glucosidase) agissent en synergie (figure 6), en utilisant le même mécanisme d'action chimique, à savoir la catalyse acide. Cependant, ce type de catalyse peut se produire de deux manières différentes : mécanismes d'inversion et de rétention. La voie par laquelle la cellulase agit dépend de la distance entre les sites catalytiques (Siqueira *et al.*, 2019). Les deux mécanismes nécessitent deux chaînes latérales carboxyle, une protonée (la chaîne catalytique Acide) et l'autre non protoné (la base catalytique) (Wilson, 2016). Dans le mécanisme d'inversion, il n'y a pas de formation de complexe enzyme-substrat tout au long de la réaction. L'hydrolyse est réalisée directement par déprotonation séquentielle (Siqueira *et al.*, 2019). La base catalytique active une molécule d'eau en enlevant un proton et la molécule d'eau attaque la liaison β , 1-4 par derrière provoquant l'inversion de sa position, tandis que l'acide catalytique cède un proton au produit de clivage (Wilson, 2016). Le mécanisme de rétention est réalisé par l'extrémité carboxylique des résidus d'acides aminés, qui agit comme une base nucléophile et attaque la liaison glycosidique, rompant la liaison et se liant à une fraction de l'oligomère, formant un complexe enzyme-substrat (Siqueira *et al.*, 2019). La base catalytique Attaque la liaison β , 1-4 formant un intermédiaire covalent qui est inversé. Ensuite, l'acide catalytique se dissocie et active une molécule d'eau, qui attaque l'intermédiaire par derrière en libérant le produit final (Wilson, 2016).

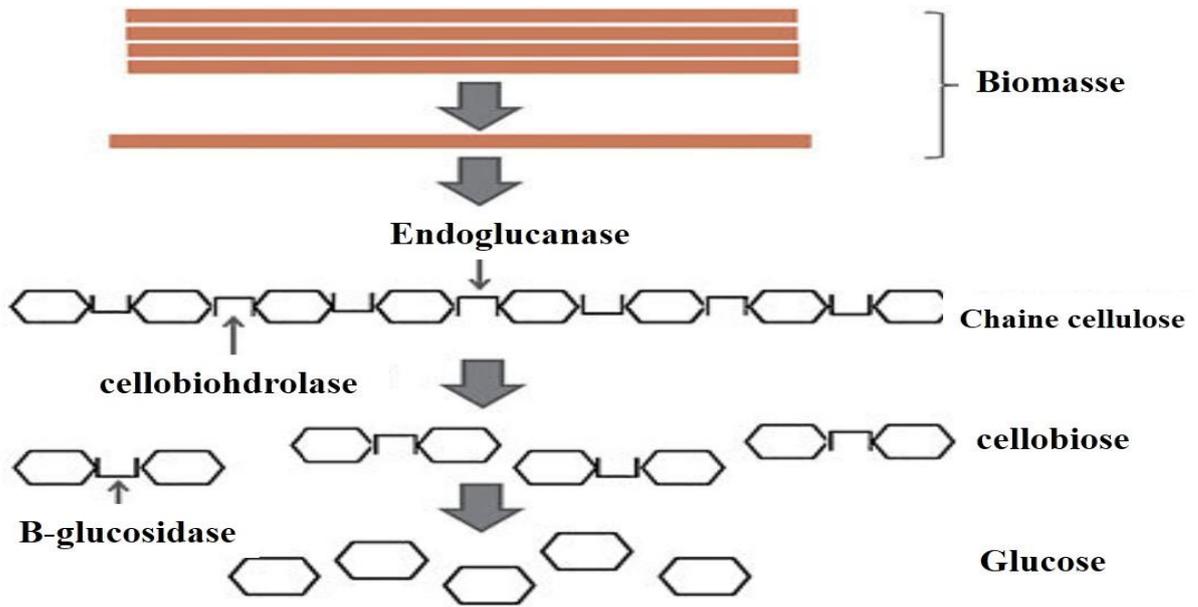


Figure 6 : Hydrolyse de la cellulose par les trois types de cellulases : l'endoglucanase, la cellobiohydrolase et la β -glucosidase (Pulgar et Saadeddin, 2013).

2.4.1 Synergie des activités cellulolytiques

Le système de cellulases montre une activité collective plus élevée que la somme des activités de différentes autres enzymes, un phénomène connu sous le nom de synergie, quatre formes de synergisme ont été rapportées : synergie endo-exoglucanase, synergie exo-exoglucanase, synergie exoglucanase et β -glucosidase (la cellobiose en tant que produit final), synergie intramoléculaire entre les domaines catalytiques et le « linker » (Bensmira, 2006). La synergie entre les enzymes est un phénomène essentiel lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (figure 7). Elle se produit lorsque l'action combinée de deux ou plusieurs enzymes conduit à une activité supérieure à la somme des activités des enzymes séparées (Dali et Hamame, 2016). La synergie exo-endo s'explique facilement car l'attaque aléatoire par les endoglucanases conduit à la libération de nouveaux bouts de chaînes de cellulose qui deviennent alors disponibles pour l'attaque par les cellobiohydrolases, la synergie exo-exo a également été observée mais aucun mécanisme n'a été clairement établi pour expliquer ce phénomène et plusieurs théories sont proposées. On exprime souvent le degré de synergie (DS) comme le ratio de l'activité du mélange d'enzymes sur la somme des activités des enzymes utilisées séparément (Boulares et Boulham, 2014). Plus la saturation du substrat par les enzymes est importante, plus le degré de synergie est faible. Ayant montré que le ratio influence la

synergie tandis que, ont montré que le degré de synergie était indépendant de ce ratio et l'augmentation de la cristallinité du substrat entraînant l'augmentation de la synergie (Dali et Hamame, 2016).

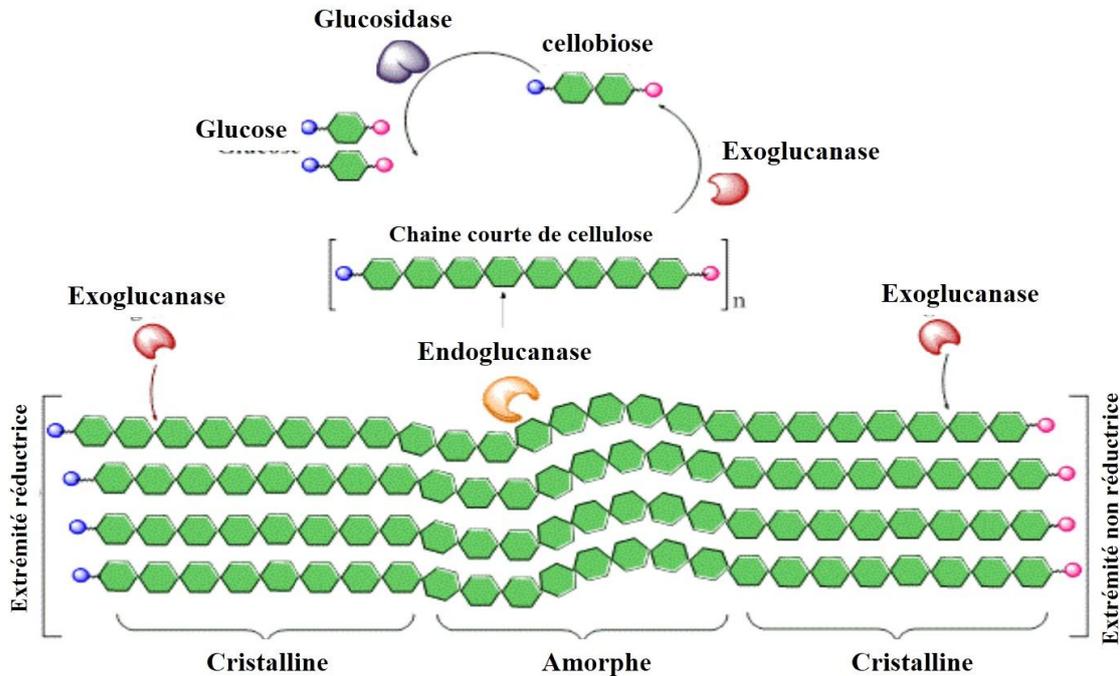


Figure 7 : Hydrolyse enzymatique de la cellulose par l'action synergique de cellulases (Sajith *et al.*, 2016).

2.5 Production de cellulase

La production microbienne de cellulase à partir de source organique a acquis une importance significative ces dernières années (Swathy *et al.*, 2019). Le choix du substrat à faible coût, l'optimisation des milieux de culture et des conditions de fonctionnement est cruciale pour la production de cellulase à haut rendement (Bezerra *et al.*, 2021). Plusieurs micro-organismes peuvent produire des cellulases, en utilisant une grande variété de substrats. Les bactéries et les champignons peuvent produire des complexes cellulolytiques (Siqueira *et al.*, 2019). Même si plusieurs micro-organismes comme *Bacillus*, *Cytophaga*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Microbacterium Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium solani*, *Penicillium Sclerotium rolfsii*, *Trichoderma* sont connus pour leur propriété cellulolytique, *Cellulomonas Uda* est le meilleur candidat pour la production industrielle de cellulase (Swathy *et al.*, 2019). Industriellement, cependant, la majorité des cellulases sont produites à partir de champignons en raison de leurs

caractéristiques extracellulaires (Siqueira *et al.*, 2019). Du fait de leurs capacités polyvalentes et de la frugalité de leurs besoins, les levures sont, aujourd'hui, l'une des sources les plus importantes d'enzymes produites commercialement pour avoir une grande biomasse à moindre coût (Bara et Fergani, 2021).

La fermentation en milieu solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux et des champignons supérieurs, en permettant leur développement à la surface d'un support organique (Holker *et al.*, 2005).

Le coût de la fermentation pour la production de cellulase par FMS est de de 0,2 \$/kg, généralement inférieur à celui de FML estimé à environ de 20 \$/kg (Swati, 2017). Du point de vue fondamental, la fermentation en milieu solide est définie comme une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou presque d'eau libre et diffère de la fermentation en milieu liquide, où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau, et de la fermentation en milieu submergé où le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide. La principale différence entre ces procédés réside dans la variation des proportions (de l'équilibre) des phases solide, liquide et gazeuse (Prevot, 2013).

Adinarayana *et al.* (2004) ont rapporté que les fermentations en milieu solide favorisent une productivité élevée, un coût de production et récupération relativement facile de l'enzyme extracellulaire par rapport au FML.

L'enzyme brute préparée par FMS est concentrée et pourrait être utilisée ouvertement dans des applications agro-biotechnologiques telles que l'hydrolyse lignocellulosique, les additifs alimentaires et les fibres naturelles. FMS utilise des substrats solides, comme le son, la paille de paddy, la bagasse, d'autres les déchets agricoles et les déchets de papier. L'avantage de ces substrats est que ce sont des déchets riches en nutriments qui peuvent être facilement recyclés en tant que substrats moins chers. La FMS est la mieux adaptée aux techniques de fermentation impliquant des champignons et les micro-organismes qui nécessitent une faible teneur en humidité (Swati, 2017).

Les cellulases sont produites en utilisant la méthode de fermentation submergée (SmF) traditionnellement, où la culture de micro-organismes se produit dans une solution aqueuse contenant des nutriments. La FMS est une alternative à la SmF traditionnelle,

elle implique la croissance de microbes sur matériaux solides en l'absence de liquides libres.

Le FMS offre de nombreux avantages tels qu'une concentration plus élevée du produit dans le milieu, une production d'enzymes deux à trois fois plus élevée, une utilisation directe des solides fermentés, une réduction du coût du processus de la production enzymatique par l'utilisation directe de déchets cellulosiques naturels comme substrat et la possibilité de réaliser fermentation dans des conditions non aseptiques. En plus, FMS nécessite une faible quantité d'eau et aussi une faible teneur énergétique alors qu'elle donne un produit hautement concentré (Zhuang *et al.*, 2007).

2.5.1 Facteurs de production des enzymes cellulolytiques

La croissance et la production d'enzymes par les micros -organismes sont influencées par une variété de facteurs environnementaux. Il existe des divers paramètres de croissance affectant la production de cellulase tels que le pH, la température d'incubation et la période d'incubation, la source de carbone, la source d'azote, la méthode de fermentation affectent largement les productions enzymatiques, ils doivent donc d'abord être optimisés (Sain *et al.*, 2017). Donc optimisation du bioprocédé paramètres est essentielle pour produire un cadre de bioprocédé plausible et acquérir des rendements maximaux pour des applications industrielles (Ghazanfar *et al.*, 2019). En conséquence, une étude systématique des meilleures circonstances pour une meilleure production de cellulase est nécessaire afin d'envisager une fabrication de cellulase rentable à l'échelle industrielle.

2.5.1.1 Effet du pH

Le pH du milieu de fermentation est l'un des facteurs significatifs pour la production de cellulase. Toutes les enzymes ont un pH optimal où elles ont une activité maximale et leur activité diminue avec l'augmentation ou la baisse du pH. L'effet du pH sur la cellulase peut être examiné en utilisant des milieux de production de différentes valeurs de pH dans un procédé de fermentation (Ghazanfar *et al.*, 2019). La variation du pH affecter la stabilité et la solubilité des enzymes (Saada et Hamdane, 2021).

2.5.1.2 Effet de la température

La température est un paramètre physiologique important qui influence la croissance et le métabolisme microbiens. La température d'incubation pendant le processus de fermentation est l'un des principaux facteurs influençant la production enzymatique.

Chaque micro-organisme à une température optimale à laquelle la croissance se déroule avec la plus grande rapidité et l'activité est maximale, et cette dernière diminue lorsqu'ils sont cultivés à des températures plus élevées ou plus basses. L'influence de la température sur la production de l'enzyme cellulase peut être vérifiée en inoculant et en incubant les milieux à divers températures comprises entre 25° et 100°C (Ghazanfar *et al.*, 2019). L'activité de la plupart des enzymes est optimale entre 15°C et 45° (Saada et Hamdane, 2021).

2.5.1.3 Effet de la période d'incubation

Le temps de fermentation a un rôle important dans la formation du produit (Ghazanfar *et al.*, 2019). Il est défini comme le temps mis par un micro-organisme pour synthétiser une enzyme en utilisant les nutriments du milieu. Cela dépend également de type de fermentation et du micro-organisme utilisé pour la production. Le FMS prend plus de temps à préparer que le SmF, tandis que les bactéries nécessitent moins de temps pour se cultiver que les champignons (Ahmed et Bibi, 2018). La production d'enzymes est réduite en dépassant le temps d'incubation optimal. Cependant, selon les caractéristiques et les conditions de culture, la période de fermentation optimale peut varier d'une souche à l'autre. Cette influence est due à l'épuisement des nutriments ou l'accumulation d'autres sous-produits dans les milieux de fermentation au fil du temps, ce qui provoque la réduction de l'activité cellulolytique (Ghazanfar *et al.*, 2019).

2.5.1.4 Effet de la source de carbone

Le facteur le plus important pour la synthèse des enzymes est la disponibilité du carbone, et toute la production d'enzymes en dépend (Sain *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2017). Divers produits agricoles , tels que le blé, le riz, le maïs, la paille de blé et de riz, la tige de maïs, les tiges de coton, les épis de maïs et la bagasse de canne à sucre, sont fréquemment utilisés comme sources de carbone (Prasanna *et al.*, 2016).

2.5.1.5 Effet de la Source d'azote

Dans les fermentations, l'azote est un besoin pour une utilisation efficace des sucres solubles lors de la synthèse enzymatique. Ils favorisent la synthèse des protéines, nécessaire à la génération extracellulaire d'enzymes (Ahmed et Bibi, 2018). Les sources d'azote, composés organiques et inorganiques, ont un effet marqué sur la production de l'enzyme cellulase. Certains des composés azotés organiques comprennent l'urée, La peptone, l'extrait de levure et l'extrait de bœuf, et les composés inorganiques

comprennent le nitrate d'ammonium, le sulfate d'ammonium, le nitrate de sodium et le chlorure d'ammonium. Les sources d'azote organique sont plus adaptées que les sources inorganiques et sont utilisées pour une production élevée et un rendement élevé des cellulases. L'effet de l'azote sur la production de cellulase peut être vérifié en ajoutant différents composés azotés au niveau de 0,5 % à 5,0 % dans le milieu et en étudiant la production et le rendement. Plusieurs études ont montré que les composés azotés augmentaient la production et provoquaient une amélioration de l'activité enzymatique (Sarsan et Merugu, 2019).

2.5.1.6 Effet de la teneur en humidité

Dans les procédés FMS, la teneur en humidité est un paramètre crucial car ce facteur affecte la croissance, la biosynthèse et la production d'enzymes (Ghazanfar *et al.*, 2019). Le contenu en eau, ou plutôt la quantité d'eau disponible, est vraiment 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 réduirait la porosité (espace interparticulaire), le volume des gaz et les échanges gazeux, tout en favorisant la contamination bactérienne, le maintien d'une teneur en eau optimale est par conséquent essentiel. Les levures ont besoin d'une certaine humidité relative (HR%) pour se développer. Certaines espèces, les « osmophiles », peuvent se développer à une HR inférieure à 65 %. La teneur en humidité de 75% a un effet significatif sur l'augmentation d'APF (Bara et Fergani, 2021).

2.6 Application de cellulase

Les cellulases sont considérées comme la troisième plus grande enzyme industrielle en raison de sa large gamme d'applications dans divers domaines tels que les biocarburants, l'alimentation, l'alimentation animale, le textile, l'industrie du papier, la gestion des déchets et la dépollution, l'industrie médicale/ pharmaceutique, la production de protoplastes, le génie génétique, et l'industrie chimiques (Srivastava *et al.*, 2021).

2.6.1 Biocarburants

L'une des applications les plus importantes de la cellulase est la production de biohydrogène dans laquelle l'enzyme aide à la fermentation du polymère de cellulose en glucose (Swathy *et al.*, 2019). La bioconversion de la biomasse cellulosique en biocarburants implique plusieurs étapes qui comprennent le prétraitement (mécanique, chimique, biologique) du substrat cellulosique, son hydrolyse enzymatique en sucres via

des enzymes cellulases, la conversion de ces sucres en biocarburants par la fermentation et enfin, la séparation et la purification des biocarburants. L'hydrolyse de la biomasse cellulosique par les cellulases implique l'action combinée d'un cocktail de cellulases comprenant l'exo-glucanase, l'endo-glucanase qui convertit la cellulose en oligosaccharides. Et finalement les β -glucosidases les convertissent en sucres réducteurs monomères. De plus, ces sucres sont convertis en biocarburants via un processus de fermentation (Srivastava *et al.*, 2021).

2.6.2 Industries alimentaires

Les enzymes cellulolytiques jouent également un rôle important dans la transformation des aliments (Kunamneni, 2016) (figure 8). Elles sont utilisées dans l'extraction et la clarification des jus des fruits et des légumes, la production de nectars et des purées, l'extraction d'huile de graines oléagineuse. Elles sont aussi recommandées pour l'amélioration de l'efficacité du trempage et l'absorption homogène de l'eau par les céréales, de la qualité nutritive des aliments fermentés, de la réhydratation des légumes secs et des soupes. Les cellulases sont également utilisées dans l'extraction des caroténoïdes, la production des colorants alimentaires (Sharma *et al.*, 2016). Dans l'industrie de la boulangerie, augmenter la résistance du réseau de gluten et sa capacité à absorber l'eau (Swathy *et al.*, 2019). D'autre part, ces enzymes peuvent modifier le jus de fruit (couleur) pour un meilleur rendement (Ezeilo *et al.*, 2021).

2.6.3 Nutrition animale

Le prétraitement de l'ensilage agricole et des aliments céréaliers par des cellulases ou des hémicellulases peut augmenter la quantité de nutrition, en diminuant ainsi le prix de la chair. L'utilisation des cellulases et xylanases dans l'industrie de l'alimentation animale (en particulier pour les animaux monogastriques et les volailles de chair) est également importante (Kunamneni, 2016). Et décomposer les chaînes de polysaccharides dans les aliments pour oiseaux afin d'améliorer la digestibilité des aliments (Swathy *et al.*, 2019).

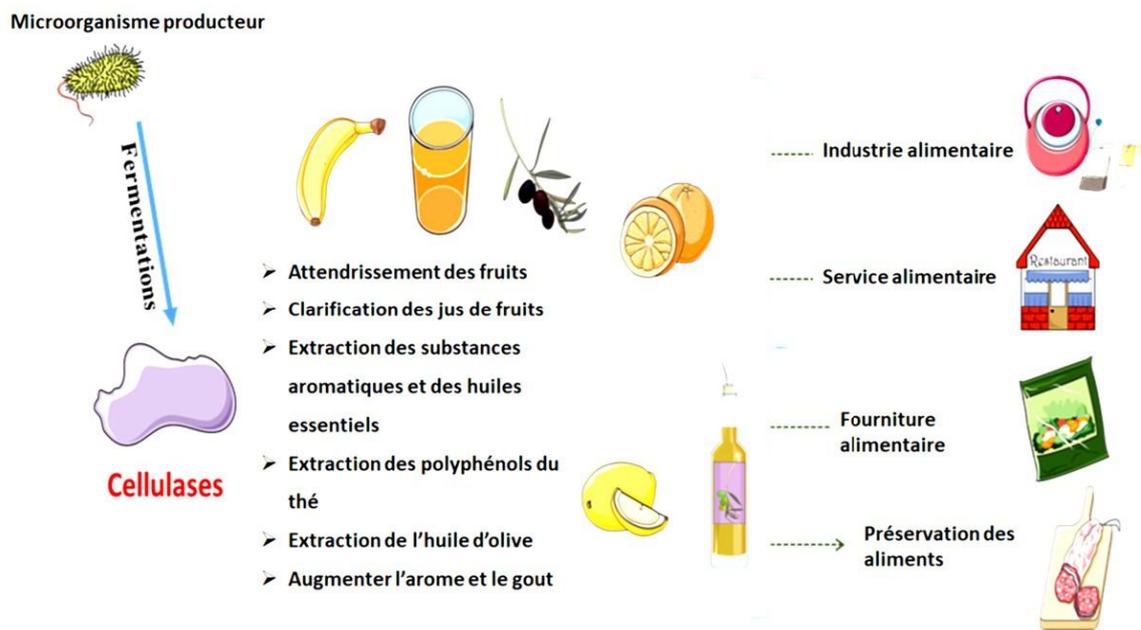


Figure 8 : Différentes applications des cellulases en industrie alimentaire (Ejaz *et al.*, 2021).

2.6.4 Industrie des textiles

Les cellulases, notamment les cellulases monocomposants (endoglucanases) sont très utilisées dans l'industrie du textile (Kunamneni, 2016). Elles ont été utilisées avec succès dans le traitement humide et la finition des textiles à base de cellulose, afin d'améliorer le toucher et l'apparence (Salem *et al.*, 2016). Les cellulases ont été utilisées dans le biostoning des jeans, ainsi que dans le biopolissage du coton et d'autres textures cellulosiques. Ces enzymes digèrent les petites extrémités des fibres de cellulose à la surface du tissu lors du processus de biostoning, libérant le colorant du textile, par conséquent, il est facilement éliminé par le lavage mécanique.

2.6.5 Papeterie

L'application des cellulases dans l'industrie des pâtes et papiers a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie en raison de plusieurs avantages à savoir la réduction en pâte biomécanique à l'aide de cellulases : ceci a entraîné des économies

d'énergie substantielles (20 à 40 %) en comparaison avec les procédés de réduction en pâte mécanique, lors du raffinage et du broyage de la matière première ligneuse. L'amélioration des propriétés de résistance à la main : le traitement enzymatique facilite la fixation des filtrats dans les fibres thermomécaniques en pâte en déstabilisant leurs extraits lipophiles. Ces enzymes sont également utilisées dans la fabrication de papiers souples dont des essuie-tout et du papier hygiénique, l'élimination du papier collé et préparation de carton facilement biodégradable (Salem *et al.*, 2016). La cellulase est également appliquée comme agent de pré-blanchiment dans le traitement des pâtes kraft et dans le désencrage des déchets de journaux (Swathy *et al.*, 2019). Les cellulases participent au recyclage du papier (Siqueira *et al.*, 2019). Le désencrage de vieux papiers mélangés à de vieux journaux et magazines, ainsi que dans le désencrage de vieilles pâtes de magazines, pour améliorer l'efficacité du désencrage dans des conditions douces (Xie *et al.*, 2021). De plus, les cellulases sont importante pour éliminer les colorants des vieux papiers (Kunamneni, 2016).

2.6.6 Gestion des déchets

Une grande quantité de déchets est générée par les forêts, les champs agricoles et les agro-industries contenant des déchets inutilisés ou sous-utilisés. La cellulose, qui pollue l'environnement. Un certain nombre de précieux tels que les enzymes, les sucres, les biocarburants, les produits chimiques, les sources d'énergie bon marché pour la fermentation, les aliments pour animaux améliorés et nutriments humains, sont produits de nos jours grâce à une utilisation judicieuse de ces déchets (Salem *et al.*, 2016).

2.6.7 Domaine thérapeutique

Certaines cellulases sont utilisées dans des formulations pharmaceutiques pour faciliter la digestion. Pour éviter les dysepsies et les fermentations intestinales, les cellulases de *Trichoderma viridae* sont associées à des α -amylases fongiques (Bensmira, 2006).

2.6.8 Industries agricoles

Différentes préparations enzymatiques (diverses combinaisons de cellulases, d'hémicellulases et de pectinases) ont de nombreuses applications en agriculture afin d'améliorer le rendement des cultures et de réduire les maladies des plantes. Les cellulases de champignons saprophytes sont capables de dégrader la paroi cellulaire des agents pathogènes des plantes, contrôlant ainsi les maladies des plantes. De nombreux champignons cellulolytiques, tels que les espèces de *Trichoderma*, les espèces de

Gliocladium, les espèces de *Chaetomium* et les espèces de *Penicillium* sont connues pour leurs performances exceptionnelles en agriculture en favorisant la germination des graines, la croissance et la floraison des plantes, ceci améliore le système racinaire et les rendements des cultures (Kunamneni, 2016). Les cellulases ont également été utilisées pour améliorer la qualité du sol en accélérant la décomposition de la paille, qui a été incluse pour améliorer la qualité du sol et réduire la dépendance à l'engrais minéral. En conséquence, la cellulase exogène a le potentiel d'augmenter la fertilité du sol en accélérant la décomposition de la paille (Salem *et al.*, 2016).

2.6.9 Industrie des détergents

Une application plus récente des cellulases est dans l'industrie des détergents, où la protéase et la lipase sont utilisées. Les cellulases sont capables de modifier les fibrilles de cellulose en améliorant l'éclat de la couleur, le toucher et l'élimination de la saleté des vêtements en coton mélangé. Les cellulases alcalines peuvent entrer en contact de manière sélective avec la cellulose à l'intérieur des fibres et éliminer les salissures dans les espaces interfibrilles en présence des ingrédients détergents plus conventionnels. Cette propriété de la sélectivité a conduit la cellulase à devenir un additif détergent potentiel. De nombreux des produits chimiques et des réactifs sont utilisés pour améliorer la stabilité des cellulases de nos jours, tels que les détergents à lessive liquides contenant un tensioactif anionique ou non ionique, de l'acide citrique ou un sel hydrosoluble, de la protéase, et un mélange de propane-diol et acide borique ou son dérivé (Salem *et al.*, 2016).

2.6.10 Extraction de caroténoïdes

Les caroténoïdes sont le type de composant colorant le plus courant dans la nature, et ils fournissent une gamme de couleurs allant du rouge au jaune. Les caroténoïdes possèdent des propriétés telles que l'origine naturelle, la toxicité nulle et une grande polyvalence, et fournissent des colorants lipo- et hydrosolubles, qui ont développé leur marché en tant que colorants alimentaires. De plus, ces pigments présentent une activité provitamine A, et présentent des propriétés anticancéreuses. La combinaison des pectinases et des cellulases accélère la vitesse d'hydrolyse et est utilisée pour perturber la paroi cellulaire de l'écorce d'orange, de la patate douce et de la carotte, ce qui libère les caroténoïdes dans les chloroplastes et dans les fluides cellulaires. Ces pigments sont laissés à l'état naturel et sont liés à des protéines. Cette structure collée empêche l'oxydation des pigments et maintient la stabilité des couleurs, tandis que l'extraction par

les solvants dissocient les pigments des protéines et provoquent une insolubilité dans l'eau suivie d'une oxydation (Salem *et al.*, 2016).

2.6.11 Industrie du vin et de la bière

Les glucanases de micro-organismes ont été utilisées avec succès dans l'industrie de la fermentation pour produire des boissons alcoolisées (bières et vins). Ces enzymes ont le potentiel d'améliorer la qualité et le rendement des produits fermentés. Les glucanases sont administrées pour hydrolyser le glucane, réduire la viscosité de la farine et améliorer la filtrabilité (Kunamneni, 2016). Les enzymes telles que les glucanases, les pectinases et les hémicellulases jouent un rôle important dans le rendement et l'amélioration du vin dans les industries de fabrication de boissons alcoolisées. Ces enzymes sont nécessaires pour clarifier, décolorer et adsorber la foudre, ainsi que pour maintenir la supériorité et la stabilité du vin (Roohi *et al.*, 2019).



Partie expérimentale

Chapitre 3 : Matériels et méthodes



Chapitre 3 : Matériels et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Génie Microbiologique et Application (GMA). Université des Frères Mentouri Constantine 1. Il consiste dans un premier temps, à l'étude de la production de cellulase par fermentation solide sur des déchets lignocelluloytiques à partir de la levure isolée à partir du yaourt par Dr Dakhmouche Scheherazad. Et dans un deuxième temps, à la purification et la caractérisation de l'enzyme étudié et un essai de son application industrielle dans plusieurs domaines.

1 Matériels de laboratoire

Le matériel utilisé pour la réalisation des différentes manipulations effectuées dans ce travail est présenté dans le tableau 6.

Tableau 6 : Matériels de laboratoire utilisé.

Appareils	Consommable	Autres
Autoclave	Béchers	Cellule de thomas
Etuve	Fiole joggée	Micropipettes +
Centrifugeuse réfrigérée	Baguette en verre	embouts stériles
Balance précision	Tubes à essai	Papier filtre
Spectrophotomètre	Tubes à vis stériles	Portoirs
Agitateur-plaque chauffante	Flacons	barreau magnétique
pH mètre	Erlenmeyers	Bec bunsen
Microscope + lames +	Pipettes pasteurs	Anse de platine
lamelles	Eprouvettes	pissette
Vortex	Verre de montre	spatule
Bain Marie	Pipettes	Entonnoirs + toile de gaz
		Boites de pétri
		Cuve de spectrophotomètre

2 Microorganisme

2.1 Origine de la souche levurienne

La levure utilisée est *Candida parapsilosis strain* CBS 604 T. provient de la mycothèque du laboratoire de Génie Microbiologique et Application (GMA), Université des frères Mentouri Constantine 1, Algérie. Elle est isolée à partir du yaourt, conservée sur milieu YPG additionné du glycérol et stockées à -20°C.

2.2 Régénération de la souche

La souche est repiquée sur milieu YPGA (annexe 1) en boîtes de pétri par la méthode des stries dont le substrat est le glucose à 2%, comme une seule source de carbone pour la croissance de la levure. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 30°C pendant 48h.

2.3 Préparation de l'inoculum

2.3.1 Préparation de la suspension

La souche Y1 est repiquée sur milieu YPGA (annexe 1), incubée à 30°C pendant 48h. Après la croissance de la levure, la morphologie et l'aspect des colonies ont été observés à l'œil nu au recto-verso sur les boîtes (figure 9). Les cellules sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillé stérile sous agitation vigoureuse. À l'aide d'une agitation manuelle, la suspension des cellules de la souche est obtenue et conservée dans un flacon stérile à 4°C.



Figure 9 : Observation macroscopique de la souche Y1 sur milieu YPGA après 48h à 30°C.

2.3.2 Dénombrement des cellules

Une dilution de 1/10 de la solution mère (SM) de cellules a été réalisée. Le nombre de cellules est déterminé par la technique de comptage en utilisant la cellule de thoma (annexe 2). La cellule de comptage a un volume défini et est subdivisée en carrés à la surface de la lame. Une goutte de suspension est déposée à la surface d'une cellule de thomas couverte par une lamelle. Le dénombrement s'effectue au microscope optique au grossissement (x40) sous lame et lamelle.

3 Production de cellulase par Fermentation en milieu solide (FMS)

3.1 Son de blé substrat de la fermentation

Dans cette étude, le son de blé est la matière première principalement utilisée comme substrat de fermentation. Nous l'avons apporté du marché Daksi, Constantine, Algérie. La biomasse de son de blé a été tamisée avec un tamis à mailles et a été utilisé comme lit solide pour les études de la production de cellulase. Ensuite le son de blé a été conservé dans des boîtes en métal hermétiquement fermé à température ambiante.

3.2 Fermentation

3.2.1 Préparation des milieux de fermentation solide

La production de l'enzyme a été effectuée sur un milieu optimisé (annexe 4). Dans des erlenmeyers de 500 ml, on introduit 21,04 g de son de blé comme source de carbone, le substrat est humidifié à 71,6% avec le tampon citrate (0,5 M ; pH 6,68) (annexe 4). Ensuite il est homogénéisé à l'aide d'une baguette en verre, les erlenmeyers ont été bouchée avec du coton cardé et enveloppé avec papier aluminium et stérilisés à 121°C pendant 20 minutes dans l'autoclave.

Après stérilisation et refroidissement à température ambiante, les erlenmeyers sont ensemencés avec l'inoculum à raison de 4.10^6 cellules/gramme (annexe 2). Les cultures sont incubées à 30°C dans une étuve pendant 48h (figure 10).

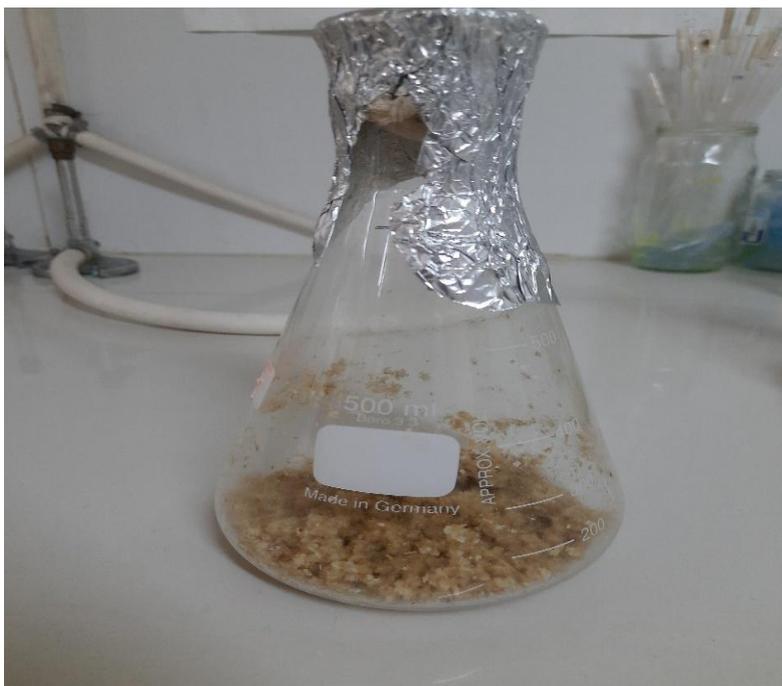


Figure 10 : Fermentation en milieu solide (substrat son de blé).

3.3 Extraction

Après 48h d'incubations, le complexe de cellulase a été extrait de la biomasse fermentée; une quantité connue de 10,52 g de substrat fermenté est mélangé avec 100 ml de solution de tween 80 (0,02%) (annexe 3). Le mélange est mixé pendant 3 minutes puis centrifugé à 10000 g à 4°C pendant 20 minutes (figure 11).

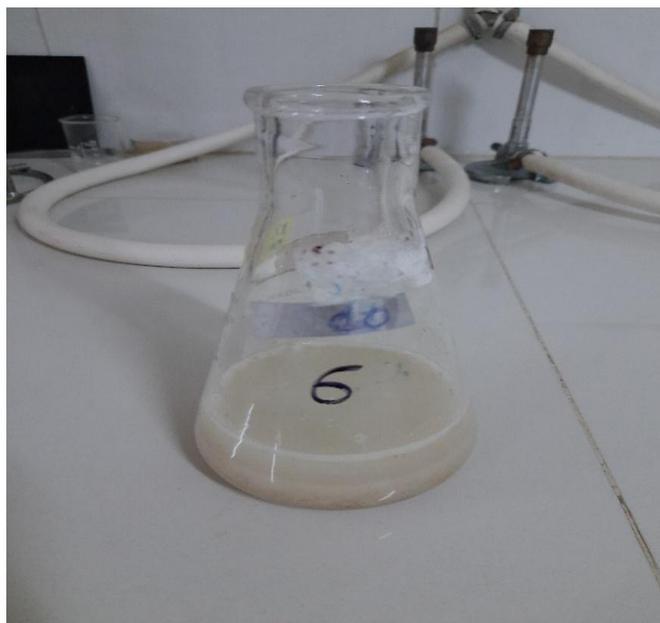


Figure 11 : Mélange substrat fermenté avec solution de tween 80.

Le surnageant obtenu constitue l'extrait enzymatique, il est récupéré, filtré filtration sur papier wattman n°1 et conservé à 4°C.

Le dosage des deux activités enzymatiques APF et endoglucanase est réalisé par la méthode de DNS (annexe 5).

3.4 Détermination de la matière sèche (MS)

Afin d'évaluer l'activité enzymatique par rapport au substrat de FMS, la matière sèche (MS) est déterminée. Après fermentation, une quantité connue de substrat fermenté est pesée dans des creusets secs, puis incubée à 105°C jusqu'à poids constant.

$$\text{Matière sèche} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

m0 = creuset vide.

m1 = creuset vide + échantillon avant séchage.

m2 = creuset vide + échantillon après séchage.

4 Méthodes analytiques

4.1 Dosages des activités cellulolytiques

La quantité des sucres réducteurs libérée de l'hydrolyse de papier filtre et du carboxyméthyl-cellulose est mesurée selon la méthode de Miller ; une réaction colorimétrique due à la présence du réactif : acide dinitrosalicylique (DNS) (annexe 5).

4.1.1 Activités cellulolytique totale (papier filtre (APF))

L'activité totale du complexe cellulase est déterminée selon la méthode de Ghose (1987)

Le mélange réactionnel est constitué de 50 mg de papier filtre wattman n°1 découpé en bandes, de 0,5 ml de l'extrait enzymatique, de 1 ml de tampon citrate (0,5 M ; pH 6,68) (annexe 3). La réaction est incubée à 50°C pendant 1 h. Après, 1,5 ml de réactif DNS sont ajoutés afin de stopper la réaction (annexe 5). Après incubation à 100°C pendant 10 minutes. Les tubes sont refroidis dans un bain de glace. Prélevée de ce mélange réactionnel 0,5 ml et ajouter 1 ml de l'eau distillé et agiter. L'absorbance de la coloration développé est lue à 540 nm.

4.1.2 Activité endoglucanase

Pour mesurer l'activité endoglucanase, la méthode de DNS est aussi utilisée. Le milieu réactionnel est composé de : 500 μ l d'une solution de CMC à 1% préparé dans du tampon citrate (0,5 M ; pH 6,68) (annexe 5), et 500 μ l de l'extrait enzymatique de cellulase dilué dans un tampon citrate PH 6,68. Après incubation à 50°C pendant 30 minutes, la réaction est stoppée par addition de 1 ml de réactif de DNS (annexe 5). La réaction est incubée à 100°C pendant 10 minutes, puis refroidi dans un bain de glace. Après l'ajout de 10 ml d'eau distillé, l'intensité de la coloration a été mesurée à 540 nm contre le blanc.

L'unité internationale de l'activité enzymatique (U) est définie par la quantité de cellulase nécessaire pour produire 1 μ mol de glucose par 1 min (Bano *et al.*, 2019). Chaque dosage est effectué en triplicate.

Pour les deux activités enzymatiques (APF et endoglucanase), la concentration en sucres réducteurs correspondants est déterminée à partir d'une courbe étalon de glucose dont les concentrations varient de 0-0,025 M (figure 12).

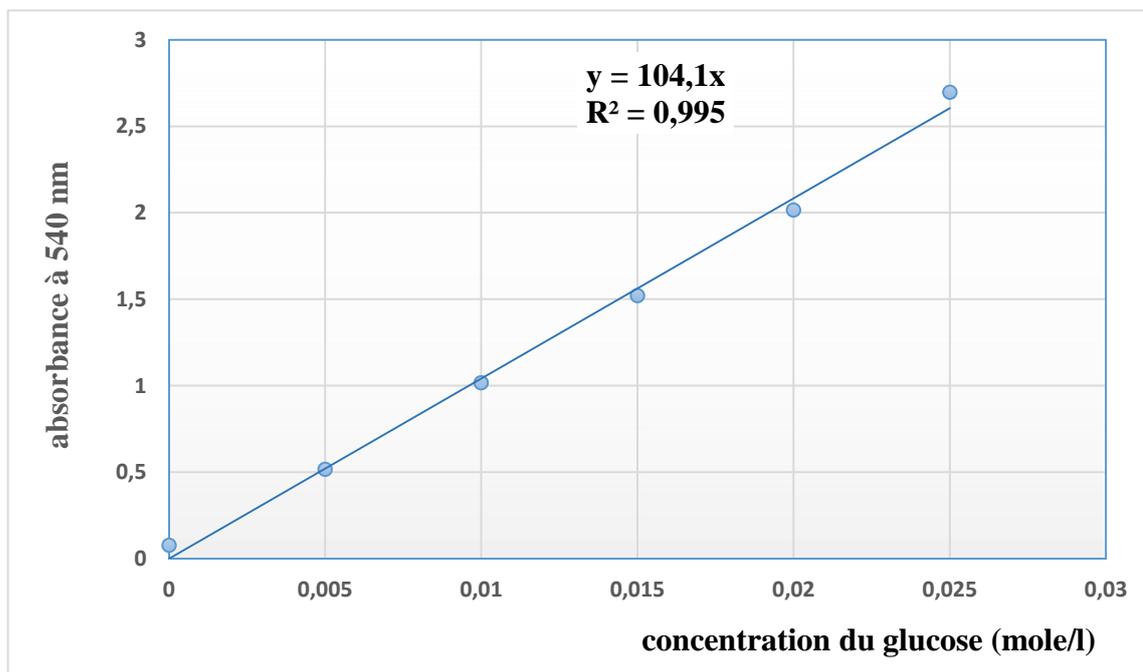


Figure 12 : Courbe étalon de glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase.

5 Purification partielle de la cellulase

5.1 Précipitation au sulfate d'ammonium (40%- 80%)

5.1.1 Principe

Le salage (concentration excessive en sel) fait précipiter les protéines. Beaucoup de types de sels ont été utilisés pour effectuer la séparation et la purification de protéine par le salage. De ces sels, le sulfate d'ammonium a été le produit chimique le plus largement répandu de par sa solubilité élevée et son cout relativement bas, mais aussi pour son pouvoir peu dénaturant vis-à-vis des enzymes (Wang, 2003).

La solubilité de la protéine dépend, entre autres, la concentration en sel dans la solution. À basses concentrations, la présence du sel stabilise les divers groupes chargés sur une molécule de protéine, de ce fait attirant la protéine dans la solution et augmentant la solubilité de la protéine.

Ceci est généralement connu comme salting out. Cependant, au fur et à mesure que la concentration en sel augmente, de moins en moins d'eau est disponible pour solubiliser la protéine entraînant ainsi sa précipitation.

5.1.2 Protocole

L'extrait enzymatique brut, obtenu après filtration, subit une précipitation par l'addition progressive de sulfate d'ammonium (40%- 80% de saturation). La précipitation est agité pendant 1 h à 4°C, afin d'éviter la dénaturation de l'enzyme. Le précipité est récupéré par centrifugation à 4°C pendant 20 minutes. Le culot récupéré est dissous dans volume minimal du tampon citrate (0,5 M ; pH 6,68) (annexe 3) et les activités endoglucanase et APF sont mesurées.

5.2 Dialyse

Et transféré dans des boudins pour une dialyse ce même tampon à 4°C pendant une nuit. Des mesures de l'activité enzymatique ainsi que le dosage des protéines sont effectuées après dialyse par les méthodes citées précédemment.

5.3 Dosage des protéines

5.3.1 Principe

La concentration en protéines est mesurée selon la méthode de Lowry, qui consiste en un dosage colorimétrique, cette méthode est basée sur deux méthodes colorimétriques :

- ❖ La réaction de biuret dans laquelle Cu^{2+} , en présence d'une base, réagit avec la liaison peptidique en donnant une couleur bleu-profond.
- ❖ La réaction du réactif de folin-ciocalteu dans laquelle un mélange complexe de sels inorganiques réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une intense couleur bleue.

L'intensité de la coloration est mesurée à la longueur de 650 nm.

5.3.2 Protocole de dosage

- ❖ 0,5 ml extrait enzymatique (dilué 1/10 ème).
- ❖ Ensuite, 2,5 ml de solution D.
- ❖ Agitation et incubation des tubes à température ambiante pendant 10 minutes sur la paillasse.
- ❖ En ajoutant 0,5 ml de la réactif de folin-ciocalteu dilué 1/3 ème.
- ❖ Agitation.
- ❖ Incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes.
- ❖ Lire l'absorbance à 650 nm.

La solution de sérum albumine bovin (BSA) dont les concentrations variant de 0 à 0,5 mg/ml, est utilisée comme protéine de référence pour la gamme d'étalonnage (figure 13).

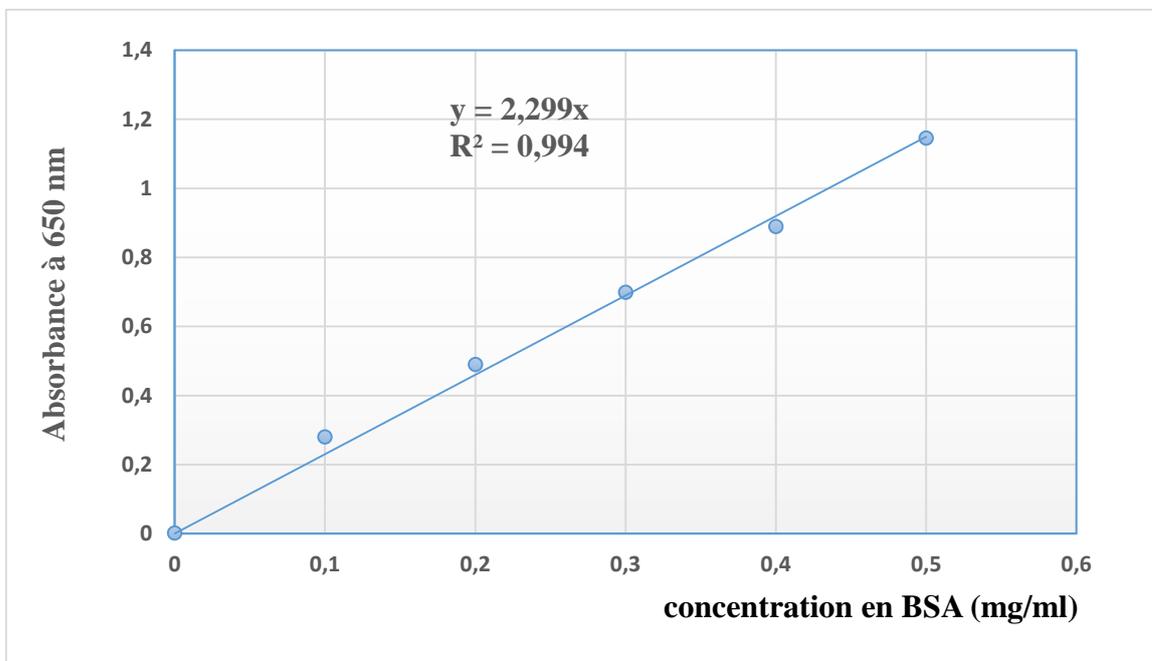


Figure 13 : Courbe étalon pour le dosage des protéines.

6 Caractérisation de la cellulase partiellement purifiée

6.1 Effet de pH sur l'activité de cellulase

L'étude de l'effet du pH sur l'activité cellulasique et la détermination le pH optimal de l'enzyme a été réalisée par une gamme de pH de 2 à 12 à 50°C. Pour cela, le tampon citrate-phosphate (0,5 M) est préparé pour les pH de 2 à 8 (annexe 3), et le tampon glycine-NaOH (0,1 M) pour les pH de 9 à 12 (annexe 3).

6.2 Effet de la température

Pour déterminer la température optimale, l'effet de la température d'incubation sur l'activité cellulasique a été étudié dans l'intervalle de 30°C à 80°C à pH optimum de 4 pour le papier filtre et de 7 pour l'endoglucanase.

6.3 Etude de la thermo stabilité

L'étude de la stabilité thermique de la cellulase est effectuée à la température optimale de 50°C et à 100°C pour un intervalle de temps allant jusqu'à 180 minutes, des prélèvements sont effectués chaque 30 minutes. Après incubation, les activités enzymatiques résiduelles (APF et endoglucanase) sont déterminées selon les conditions standards.

6.4 Effet de différents sels sur l'activité de cellulase

Pour déterminer l'effet de différents sels sur l'activité cellulasique, l'extrait partiellement purifiée est près-incubé pendant 10 minutes à 60°C en présence de différents sels tel que : NaCl (150 mM), ZnSO₄ (0,75 Mm), (NH₄)₂SO₄ (0,75 mM), KCl (150 mM), CaCl₂ (7,5 mM), MgSO₄ (5 mM), Na₂SO₃ (5 mM), MnSO₄ (5 mM), BaCl₂ (5 mM), FeSO₄ (5 mM), CuSO₄ (5 mM). Les activités d'hydrolyse du papier filtre et du CMC sont mesurées à 50°C dans un tampon citrate (0,5 M ; pH 4 et pH 7). Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage par rapport à l'activité mesurée sans addition des sels.

6.5 Effet des détergents sur l'activité de cellulase

Parmi les composants qui affectent l'activité de la cellulase les détergents, pour cela l'extrait partiellement purifiée est près-incubé pendant 10 minutes à 60°C en présence de différents types de détergents tel que : tween 20 (1%), tween 80 (1%), B-mercapto-éthanol (1%), éthanol (1%), EDTA (5 mM), SDS (5 mM) et urée (5 mM). Puis les activités enzymatiques sont mesurées selon les conditions standards.

6.6 Effet de différentes concentrations en substrat sur l'activité enzymatique

L'enzyme partiellement purifiée est incubée avec différentes concentrations du papier filtre de 10 à 60 mg pour l'activité APF, et avec différentes concentrations de solution CMC allant de 10 à 100 mg/ml pour l'activité endoglucanase. Les mesures sont réalisées à la température optimale de 50°C, dans du tampon citrate (0,5 M ; pH 4 et pH 7) (annexe 3). Les paramètres cinétiques (V_{max} , K_m) de chaque enzyme de la cellulase partiellement purifiée sont déterminés graphiquement par la représentation de lineweaver-burk (1934).

7 Applications enzymatiques

7.1 Clarification du jus de pomme à l'aide de l'enzyme cellulase

a. Préparation du jus de pomme

Les pommes ont été coupées en cubes d'environ 5 mm de côté. On a ajouté environ 10 g de poids dans chaque bécher ainsi que 24 ml d'eau dans le premier bécher, 24 ml d'enzyme cellulase ont été ajoutés au deuxième bécher (figure 14).

Les béchers ont été mis dans bain-marie à 40°C pendant 2 heures. Après avoir retiré les béchers du bain-marie, on remue les morceaux de pommes dans chacun d'eux.



Figure 14 : Préparation du jus de pomme.

b. Effet de la cellulase sur la clarification du jus de pomme

La cellulase est l'une des enzymes les plus largement utilisées pour clarifier les jus de fruits. Généralement, la paroi cellulaire de la pomme est constituée de pectine, afin de produire du jus de pomme clair, il est absolument nécessaire d'en retirer la pectine.

La clarification du jus de pomme a été réalisée selon la méthode de (Nehad *et al.*, 2019) comme suit : deux éprouvettes ont été utilisées, l'une comme témoin et l'autre comme test.

- 1ml d'eau et 5 ml de jus de pomme trouble ont été prélevés dans un premier tube.
- De même 1 ml d'enzyme cellulase et 5 ml de jus de pomme trouble ont été placés dans le second tube.
- Le contenu des tubes a été agité afin de bien mélanger les enzymes avec le jus. Après incubation au bain-marie à 50°C pendant 1 heure, la clarification du jus de pomme est observée.

7.2 Etude d'application saccharification des déchets agricoles de banane à l'aide de l'enzyme cellulase

Les déchets agricoles de banane (pseudo-tiges et les feuilles,...etc.) utilisés pour la saccharification ont été fraîchement collectés et lavés soigneusement à l'eau et séchés à l'air. Après broyage et tamisage, la poudre est utilisée comme substrat pour la saccharification (figure 15).



Figure 15 : Déchets de banane en poudre.

Une suspension de substrat (1g/100 ml) a été préparée dans du tampon citrate (0,5 M ; à pH 4 pour l'APF et à pH 7 pour l'endoglucanase) et autoclavée à 120°C pendant 20 min pour stérilisation et également pour traitement thermique avant la libération du sucre.

Chapitre 3: Matériels et méthodes

15 ml de suspension de substrat sont ajoutés à 5 ml de filtrat de culture. La saccharification a été effectuée au bain-marie à 27°C pendant 24 heures et centrifugée à 2500 tr/min pendant 15 min. Le surnageant est utilisé pour le dosage des sucres réducteurs totaux en utilisant la méthode DNS. Différentes périodes d'incubation (1 à 8 h) ont été réalisées pour la libération du sucre.

La libération des sucres a été exprimée en équivalent de glucose. Le pourcentage de saccharification est calculé comme suit :

$$\text{Saccharification (\%)} = \frac{\text{Glucose (mg/ml)} \times 100}{\text{Substrat (mg/ml)}}$$

Chapitre 4 : Résultats et discussions



Chapitre 4 : Résultats et discussions

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Génie Microbiologique et Applications (GMA), Université des Frères Mentouri Constantine. C'est un axe d'un projet de recherche (Code D01N01UN250120190009) visant la production microbienne d'enzymes.

Dans ce chapitre, nous exposons les résultats de la production de la cellulase de la levure *Candida parapsilosis* CBS 604 T, de son optimisation et des caractéristiques de l'enzyme.

1 Production de la cellulase

Différents micro-organismes au cours de leur développement et de leur croissance sur des substrats cellulose conduisent à la production de protéines inductibles appelées cellulases (Nikita *et al.*, 2020).

La fermentation en milieu solide est facile à utiliser, nécessite un équipement minimal et présente l'avantage de pouvoir traiter des substrats solides insolubles. La production de cellulase à partir de la levure *Candida parapsilosis* CBS 604 T est réalisée en fermentation solide sur un milieu optimisé (Bara et Fergani, 2021) à base de son de blé.

La culture de *Candida parapsilosis*, pendant 48h à 30°C, a donné des activités enzymatiques d'endoglucanase (CMCase) et d'activité papier filtre (APF) de 7,044 UI/min et 320,20 UI/min, respectivement.

La production de la cellulase par FMS en présence de son de blé est importante, parce que ce milieu est riche et proche du milieu naturel des microorganismes. Cette production est inférieure à celle obtenue par *Micromonospora.sp* cultivé sur le riz traité et incubé 3 jours à pH 7.0 (33,8 UI/min) (Chowdhary *et al.*, 1991).

Différentes études sur la production des cellulases ont été réalisées. Onyetugo *et al.*, (2020) ont trouvé chez *Saccharomyces cerevisiae* SCPW 17, sur l'épi de maïs par la souche, les activités enzymatiques d'endoglucanase (1.45 UI/min) et d'APF (17.73 UI/min) inférieurs à nos résultats.

La production cellulolytique de la moisissure *Trichoderma reesei* est réalisés sur le son de blé à 28°C et à pH optimum de 5,5 (Tanver *et al.*, 2015). L'activité d'endoglucanase

de obtenue est de 5,89 UI/min, elle est proche de notre résultat (7.044 UI/min). Par contre l'activité de l'APF (4.32 UI/min) est très faibles par rapport à notre résultat (320.20 UI/min).

Il a été trouvé que *Trichoderma reesei* a bien poussé sur le bagasse traité, à 26°C pendant 4 jours, la production de cellulase obtenue est de 10,3 et 24,9 UI/min pour FPase et CMCase respectivement (Nitin *et al.*, 2020).

Après l'incubation de 72 h à 37°C, la production de cellulase par la bactérie *Bacillus subtilis* est de 32,37 UI/min pour l'AG (Atef *et al.*, 2021). Ce résultat est supérieur à nos résultats (les deux activités).

Nikita *et al.*, (2020) ont montré que *Penicillium citrinum* FMS sur le son de blé comme support a monté une activité d'endoglucanase de 1,89 UI/min et d'APase de 1,72 UI/min. Aussi, Les déchets de banane ont été utilisés par *Bacillus subtilis* pour la production des deux activités : l'endoglucanase (9.6 UI/min) et l'APF (2,8 UI/min).

L'*Aspergillus niger* produit la cellulase en fermentation solide après l'incubation de 4 jours à 26°C et à pH 7, l'activité endoglucanase est 14,80 UI/min (Palmarola-Adrado, 2005). Les activités enzymatiques obtenir à partir de la même souche après 5 jours d'incubation est 21,5 UI/min pour l'endoglucanase est supérieure à l'activité de notre souche *Candida parapsilosis* alors que celle de l'APF (7,6 UI/min) est inférieure (Nitin *et al.*, 2020).

Trichoderma reesei cultivées à pH 5 à 30°C en utilisant le DDBG (matière première prometteuse riche en cellulose) comme source de carbone. Sur papier filtre, l'activité cellulasique est entre 0,11 et 0,28 UL/min (Deniz et Ali, 2020).

On conclut, la production de cellulase dépend des conditions de culture, de la composition du milieu de culture, des souches productrice et du support utilisé.

2 Purification partielle de la cellulase

2.1 Précipitation au sulfate d'ammonium (40 % - 80%)

Beaucoup de sels sont utilisés pour effectuer la précipitation des protéines telles que les enzymes, par le phénomène de relargage (Salting out). Cependant, le sulfate d'ammonium est le produit le plus répandu par sa forte solubilité, son faible coût et son pouvoir non dénaturant (Laiche, 2019).

Les résultats de la précipitation par le sulfate d'ammonium sont présentés dans le tableau 7 :

L'extrait brut montre les deux activités cellulasiqye à savoir : l'activité de papier filtre de 128080 UI/min et d'endoglucanase de 50464 UI/min, et les activités spécifiques sont de 205,38 UI/mg et 80,92 UI/mg respectivement. Après la précipitation de l'extrait brut par le sulfate d'ammonium à 40-80 %, le degré de purification obtenu est de 3,39 pour l'activité papier filtre et de 2,41 pour l'activité d'endoglucanase. Pour les rendements sont de 75,26 % et 53,46 % respectivement.

La dialyse a permis une augmentation du degré de purification et de rendement de 3,4 ; 67,10 % et 2,42 ; 47,09 % respectivement. Cette technique permet l'amélioration de la séparation de la substance d'intérêt par élimination des sels de sulfate d'ammonium du milieu.

Abdul-hadi *et al.* (2016), ont rapporté que la précipitation de la cellulase de *Trichoderma.reesi* par le sulfate d'ammonium a donné un rendement de 59,51 %.

Amadi *et al.* (2020), ont été observé que l'activité enzymatique de la cellulase produite par *Saccharomyces cereviae* SCPW 17 augmentait avec l'augmentation de la concentration de (NH₄)₂SO₄ jusqu'à 80 % montrant de meilleures performances pour la précipitation du complexe enzymatique.

Selon kumar *et al.* (2018), ont noté le traitement de la cellulase de *Schizophyllum* par le sulfate d'ammonium à 60% a donné 13,9 mg/ml de protéines totaux, une activité spécifique de 73 UI/ mg et un degré de purification de 6,1 fois. Quat à Sultana. (1997), ont étudié la cellulase d'*Aspergillus sp.* Et 'ils ont révélé que l'activité spécifique de 13,71 UI/mg est augmentées d'environ 32 fois. Sulyman *et al.* (2020), ont également rapportées que la cellulase d'*Aspergillus niger* est 2,06 fois purifiées par sulfate d'ammonium à 80 %, avec une activité spécifique de 14,68 UI/mg.

Selon Yin *et al.* (2010), ont montrées que l'extrait brute de la fermentation de *Bacillus subtilis* Yj 1 a été précipité par le sulfate d'ammonium (saturation de 60 à 80 %), la cellulase brute avait une activité totale de 150296,0 UI/min et une activité spécifique de 24,2 UI/mg, et après précipitation, la cellulase est 50,4 fois purification avec une activité spécifique de 220,0 UI/mg.

Tableau 7 : Tableau de la purification partielle de la cellulase par *Candida parapsilosis* strain CBS 604 T.

		Volume (ml)	Activité totale (UI/ml)	Protéines totales (mg/ml)	Activité spécifique (UI/mg)	Rendement (%)	Degré de purification (n fois)
Extrait brute	APF	400	128080	623,6	205,38	100	1
	CMC	400	50464	623,6	80,92	100	1
Précipitation (NH ₄) ₂ SO ₄	APF	61,5	96395,29	138,12	697,90	75,26	3,39
	CMC	61,5	26978,86	138,12	195,32	53,46	2,41
Dialyse	APF	55	85943	121,55	707,05	67,10	3,44
	CMC	55	23768,25	121,55	195,54	47,09	2,42

3 Caractérisation de la cellulase partiellement purifiée

L'étude de la caractérisation physico-chimique de la cellulase partiellement purifiée est importante pour prévoir sa destination industrielle. Pour cela, l'effet de différents paramètres sur l'activité cellulasique de *Candida parapsilosis* CBS 604 T a été réalisé à savoir : pH, température, thermostabilité, sels, détergents, et des différentes concentrations en substrats (CMC et papier filtre).

3.1 Effet du pH sur l'activité de cellulase

L'étude des activités d'endoglucanase et de papier filtre en fonction de pH a été réalisée. Les résultats de la figure 16 montrent que :

- L'activité papier filtre (APF) augmente pour atteindre la valeur maximale de 272,174 UI/min à pH 4 puis elle diminue jusqu'au pH 6 ou elle remonte pour atteindre une deuxième valeur maximale de 214,537 UI/min à pH 7. Au-delà de ce pH, l'APF diminue jusqu' à 30,42 UI/min à pH 12.
- L'activité endoglucanase (AG) est active dans une large gamme de pH acide (3 à 5) et l'activité maximale de 73,006 UI/min est atteinte à pH 4. Au-delà, l'activité diminue

jusqu'au pH 7 où, on remarque une légère augmentation de l'activité de 24,975 UI/min. A partir de pH 8, l'activité diminue progressivement jusqu'à pH 12 atteignant la valeur la plus faible de 2.24 UI/min.

D'après ces résultats, on suggère qu'il existe deux isoenzymes pour l'activité papier filtre : une à pH4 et l'autre à pH7. Alors que pour l'activité endoglucanase, l'activité à pH4 est la plus importante.

Selon leghlimi, (2013), l'activité papier filtre est maximale (103 UI/min) à pH 4 (tampon citrate) et aussi à pH 5 (tampon citrate-phosphate), l'activité endoglucanase est active sur une large gamme de pH (3 à 6) et avec une activité maximale (98 UI/min) à pH 4 par l'isolat *Trichoderma longibrachiatum* (GHL). Il a été révélé que le pH optimum des enzymes cellulolytiques est souvent situé entre pH 4 et pH 6 et que la nature du tampon a une influence sur les activités enzymatiques.

Cependant, les pH optimaux de 4 et 5 sont très répandus chez les cellulases de divers micro-organismes comme *Trichoderma reesei* (Krishna *et al.*, 2000) et *Geotrichumcandidum* (Witkowska et Piegza, 2006).

L'activité enzymatique de la souche *Auréobasidium pullulan* LB 83 a été réalisée à différents pH. Les activités maximales de FPase (3,45 UI/min) et de CMCase (8,84 UI/min) ont été observées à Ph optimum de 5,5 (Matheus *et al.*, 2020). D'autre part, un pH optimum de 7 a été signalé pour la cellulase de *Bacillus pumilus* (Kinmani *et al.*, 2011). La souche bactérienne *Bacillus subtilis* possède une activité endoglucanase maximale de 100 UI/min à pH 8 (Atef *et al.*, 2021).

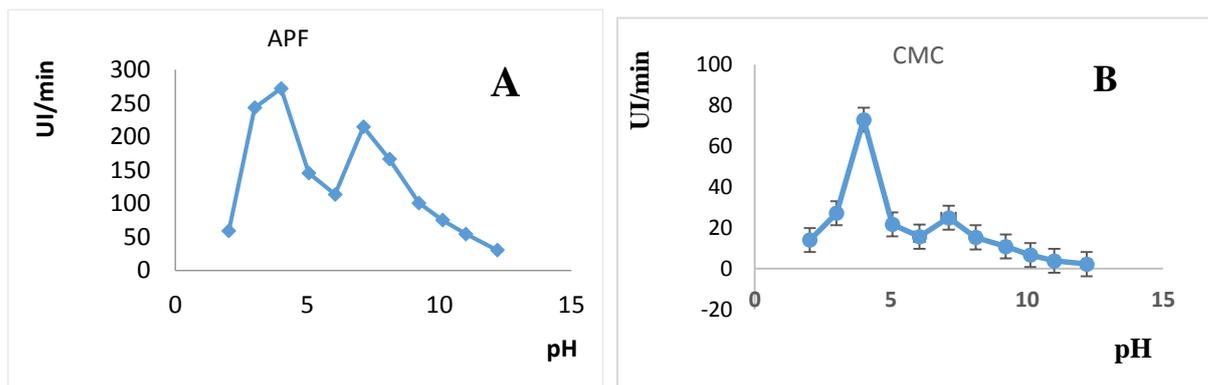


Figure 16 : Effet du pH sur l'APF (A) et l'EG (B).

3.2 Activité de cellulase en fonction de la température

L'étude de l'influence de la température de 30 à 80°C sur l'activité de cellulase produite par *Candida parapsilosis* CBS 604T est effectuée. Les résultats sont présentés dans les figures 17 et 18.

La mesure des activités à différentes températures est réalisée à pH 4 et à pH 7 (tampon citrate phosphate 0,5 M) pour une incubation de 30 min pour l'activité endoglucanase et 60 min pour l'activité papier filtre.

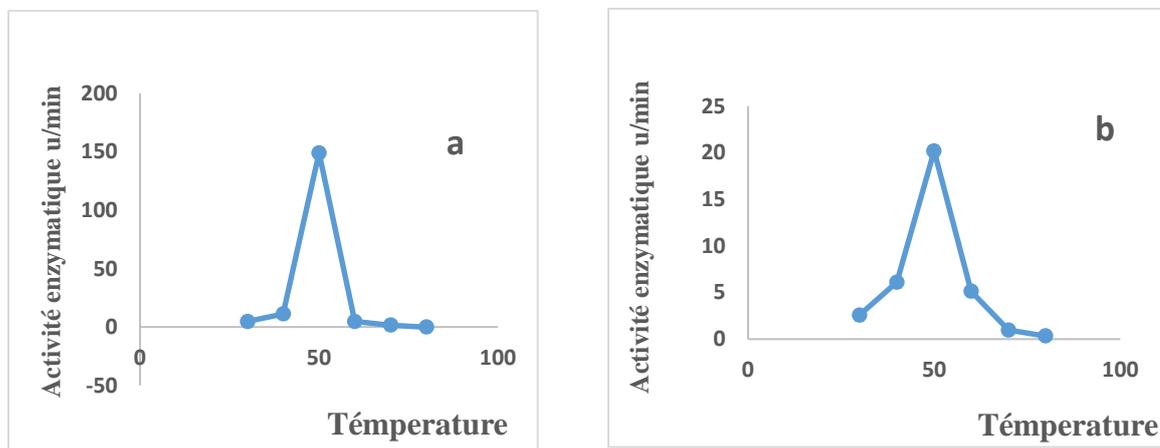


Figure 17 : Effet de la température sur l'APF (a) et l'endoglucanase (b) à pH 4.

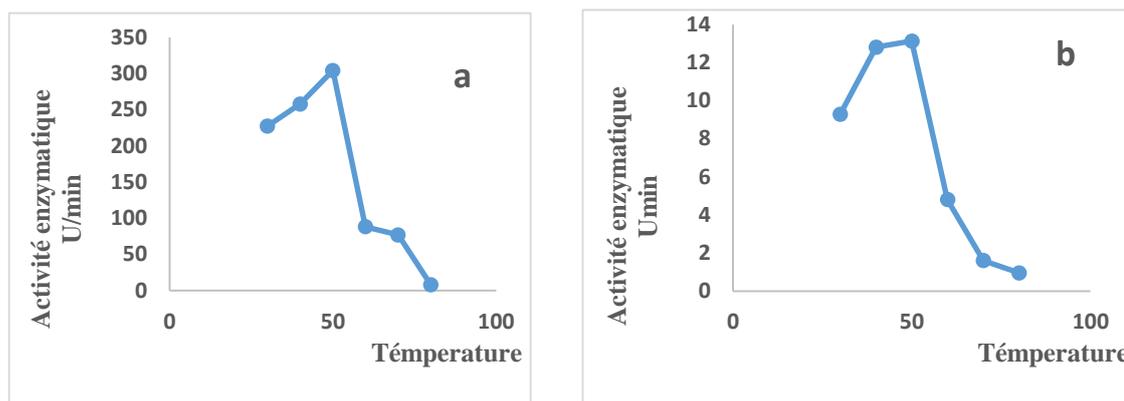


Figure 18 : Effet de la température sur l'APF (a) et l'endoglucanase (b) à pH 7.

A pH 4, les deux activités enzymatiques : APF et AG augmentent avec la température de 30 à 50°C où elles atteignent leur valeur maximale de 148,89 UI/min et 20,17 UI/min respectivement. Au-delà de 50°C, les activités cellulases diminuent avec l'augmentation de la température pour atteindre 0,32 UI/min pour l'activité endoglucanase et 0 UI/min pour APF à la température 80°C.

De même à pH7 l'activité papier filtre et l'activité endoglucanase s'améliorent avec l'augmentation de la température de 30°C jusqu'à 50°C. A cette valeur les activités atteignent leur pic avec la valeur de 304,19 UI/min pour l'APF et de 13,13 UI/min pour l'endoglucanase.

Puis l'activité diminue avec l'augmentation de la température jusqu'à 80°C (8.008 UI/min pour l'APF, et 0.96 UI/min pour l'AG) en raison de la dénaturation des protéines.

Nous remarquons que les activités cellulases étudiées de la souche *Candida Parapsilosis* CBS 604 T sont maximales à 50°C pour les deux pH 4 et 7.

Leghlimi, (2013), noté que 60°C est la température optimale pour l'activité papier filtre (95 UI/min), est 55°C pour l'activité endoglucanase (80 UI/min) par *Trichoderma longibrachiatun* (GHL) sous fermentation liquide.

La température optimale des cellulases varie en fonction de l'espèce microbienne et de son biotope. En général, les cellulases ont des températures optimales élevées par rapport à d'autres systèmes enzymatiques (Tong *et al.*, 1980).

L'activité endoglucanase la plus élevée a été enregistrée à 50°C (98,94 UI/min) par la souche *Bacillus subtilis* (Atef *et al.*, 2021). Cependant, des résultats similaires ont été

obtenus par Regmi *et al.*, (2020) et Zubair *et al.*, (2019) sur leurs travaux sur l'endoglucanase de *Bacillus subtilis*.

Nos résultats corroborent ceux de selon Matheus *et al.*, (2020), qui ont montré que chez la souche *Auréobasidium pullulan* LB 83, la température optimale est 50°C pour l'APF (3,45 UI/min) et l'endoglucanase (8,74 UI/min).

Ando *et al.*, (2002) ont montré que la température optimale des cellulases fongiques varie de 40 à 70°C, alors que celle des bactéries est comprise entre 50 et 100°C.

L'étude de Busto *et al.* (1996) a montré une température optimale de 60°C pour l'activité CMCCase produite par *Trichoderma reesei*. Jun *et al.* (2009) rapportent 50°C comme la température optimale des activités FPase et CMCCase produites par le mutant NU6 de *Trichoderma reesei* Rut C-30.

L'effet de la température sur l'activité et la stabilité de la CMCCase produite par la bactérie marine *Bacillus subtilis* a été étudié par Kinamani *et al.* (2011). la température optimale de l'activité est de 50°C. Aussi, l'activité de CMCCase de la souche fongique mutant d'*Aspergillus sp.* SU14-M1 est maximale à 35°C (Van *et al.*, 2010).

3.3 Effet de thermo stabilité sur l'activité de cellulase

La stabilité thermique de l'enzyme est étudiée après son incubation à différentes températures pendant 30-180 min dans les deux tampons pH 4 et 7,12 pour les l'APF et l'EG.

A pH 4, l'APase maintient 50 % de son activité initiale, après l'incubation de 160 min à 100°C, après 180 min elle perd de 64,92 % de son activité. A 50°C, après 3 h de traitement thermique elle maintient 81,87 % de son activité. L'endoglucanase maintient 50,05% de son activité initiale, après incubation de 160 min à 100°C. Après 180 min, elle perd 57,17% de son activité. A 50°C et après 3h de traitement thermique, l'enzyme maintient 64,32% de son activité. Avec une demi-vie de 160 min.

A pH 7, l'APase conserve 50% de son activité après incubation de 165 min, elle perd 59,19% de son activité après 180 min avec une demi-vie de 165 min d'incubation. A 50°C, elle garde 85,71% de son activité après 180 min d'incubation. L'enzyme endoglucanase maintient 78,93% de son activité après l'incubation de 3h à 50°C. Après une incubation de 155 min à 100°C, l'endoglucanase garde 50,01% de son activité initiale

et après 180 min dans les mêmes conditions elle perd 73,69%. Avec une demi-vie de 155 min.

Les résultats obtenus révèlent que l'enzyme produit par notre souche est thermostables.

En résumé, l'enzyme cellulasique produite par notre souche *Candida parapsilosis* conserve plus de 80 % de son activité initiale après un traitement thermiques de 50°C pendant 3 heures. Klose *et al.*, (2012), ont noté que *Solfolobussol fataricus* est une hyper thermophile. Elle produit une endoglucanase sur l'avicel comme substrat. Cette enzyme a une demi-vie de 100 min à 90°C et pH 4,5.

L'endoglucanase GH5 (PHGH5) produit par *Pyrococcus horikoshii*, utilise le carboxyméthyle cellulose (CMC) comme substrat à pH 6,4 montre une demi-vie de 24h à 80°C (Datta *et al.*, 2010 ; Rahikainen *et al.*, 2018). D'autre part, Ando *et al.* (2002) décrivent une cellulase hyper thermostable produite par l'archaebactérie *Pyrococcus horikoshii*, qui est stables à 97 °C avec une activité résiduelle de 80% après 3 heures d'incubation.

L'étude de Datta *et al.* (2010) a montré que *Thermato gamaritima* produit l'endoglucanase GH5 (Cel5A) ayant un pH optimum de 4,8, une température optimale de 80°C et une demi-vie de 20h.

Nos résultats sont en parfait accord avec ceux de Margaritis et Cresse, (1981) qui ont signalé que les activités papier filtre et CMCcase produites par *Sporotrichum thermophile*, maintiennent 88% et 98% de leurs activités initiales respectivement, après 48 heures d'incubation à 50°C.

Aussi, Xu *et al.*, (2000) ont trouvé que la cellulase d'origine animale extraite de la moule bleue *Mytilus edulis* résiste à 100°C pendant 10 minutes et conserve 100% de son activité, mais son exposition à 100°C pendant 30 minutes, permet la perte de 50% de son activité initiale. En revanche, la cellulase de notre souche conserve 50 % de son activité après incubation à 100°C pendant 150 min à pH 4 et 7.

Donc, la thermostabilité élevée des enzymes permet leur utilisation dans l'industrie, à des températures élevées. Ceci offre plusieurs avantages, notamment une vitesse de réaction accrue et un déplacement de la réaction équilibre vers le produit final, ce qui contribue à la réduction du temps de réaction et de la charge enzymatique (Hakim *et al.*, 2021).

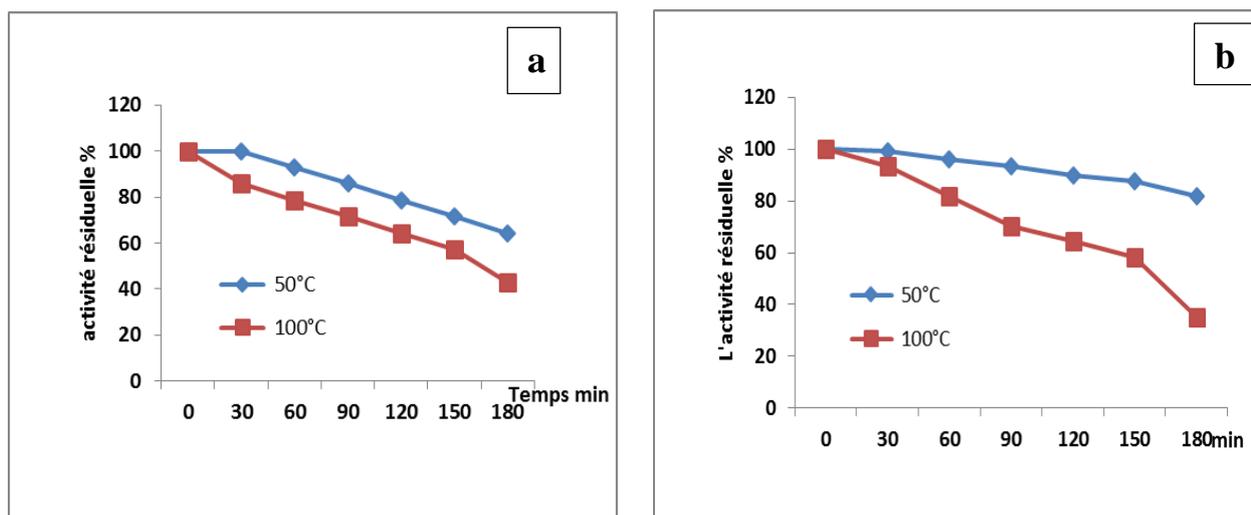


Figure 19 : effet de thermostabilité sur l'activité endoglucanase (a) et APF (b) à pH 4.

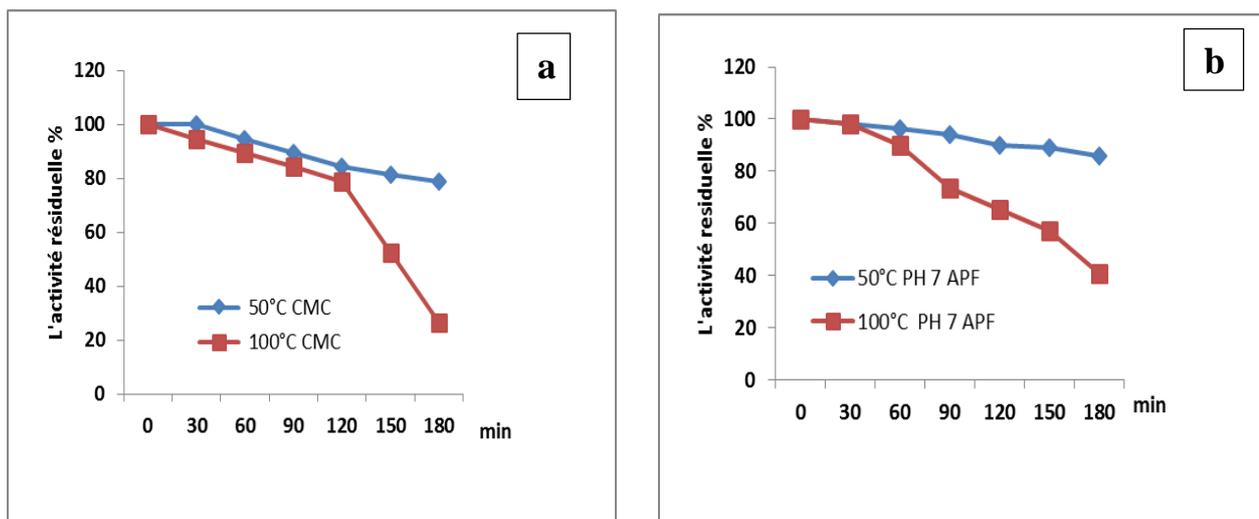


Figure 20 : Effet de thermostabilité sur l'activité endoglucanase (a) et APF (b) à pH 7.

3.4 Effet des sels sur l'activité de cellulase

Les résultats de les figures 21 et 22 indique que :

A pH4, l'activité endoglucanase est augmentée par MgSO₄ (117,85 %) et MnSO₄ (121,42 %), elle diminue en présence de Na₂SO₃ (60,71 %) alors que le reste des sels l'inhibent fortement.

Pour l'APF, elle est améliorée par BaCl₂ (109,35 %), les sels : ZnSO₄, (NH₄)₂SO₄, MnSO₄, KCl et Na₂SO₃ inhibent légèrement l'activité tandis que le CaCl₂ et MgSO₄ sont de fort inhibiteurs. FeSO₄ et CuSO₄ ne présentent aucun effet sur l'activité.

A pH7, l'activité de l'endoglucanase (CMCase) a doublée par le ZnSO₄. Cette activité a diminué en face de MgSO₄ (55,29 %), de CaCl₂ (44,76 %) et de KCl (71,09 %). Na₂SO₃, (NH₄)₂SO₄, BaCl₂, MnSO₄, CuSO₄ exercent un effet inhibiteur sur l'endoglucanase. Pour le NaCl et le FeSO₄ sont de fort inhibiteur.

L'APF est augmentée en présence de MgSO₄ (117,85 %) et MnSO₄ (121,42 %), elle est diminuée par le Na₂NO₃ (60,71 %), et elle est fortement inhibée par le NaCl, ZnSO₄, (NH₄)₂SO₄, KCl, CaCl₂, Na₂SO₃, BaCl₂, FeSO₄, CuSO₄.

Les ions qui stimulent l'activité cellulasique comme Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ peuvent agir comme cofacteurs nécessaires pour augmenter l'activité enzymatique. L'effet inhibiteur provoqué par les ions Fe²⁺, Cu²⁺, Na²⁺, K⁺, Ca²⁺, NH₄⁺, sur l'activité de cellulase peut être dû à la compétition entre les cations exogènes et les cations associés à la protéine, conduisant à une diminution de l'activité (Dakhmouche, 2016).

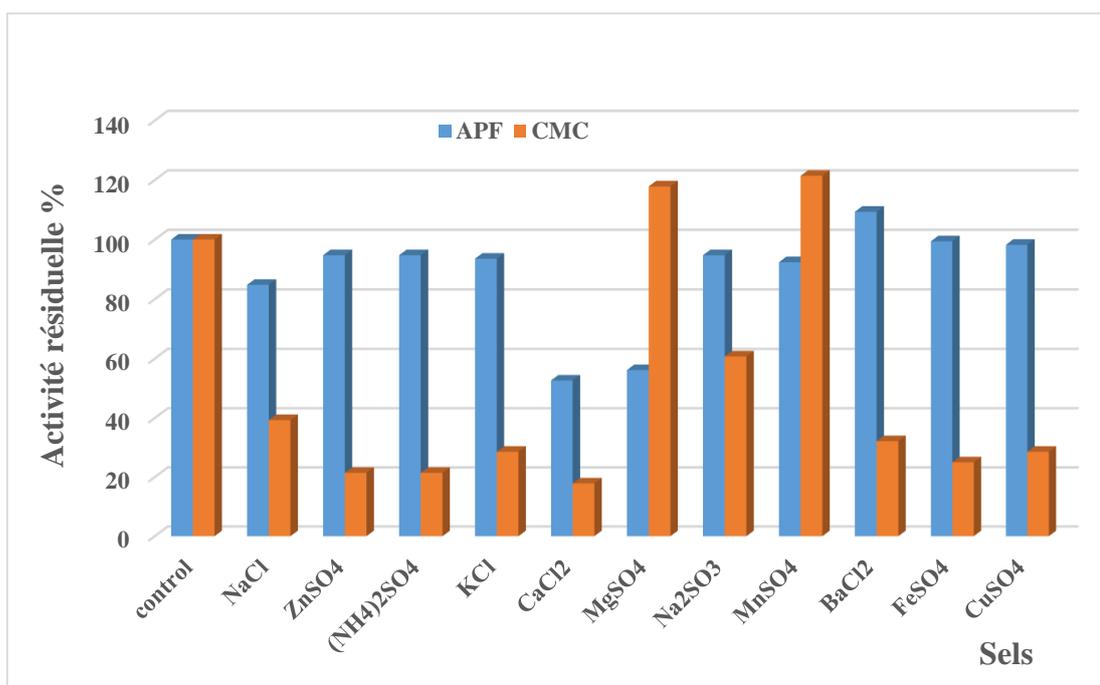


Figure 21 : Effet des sels sur l'activité cellulasique (à pH 4).

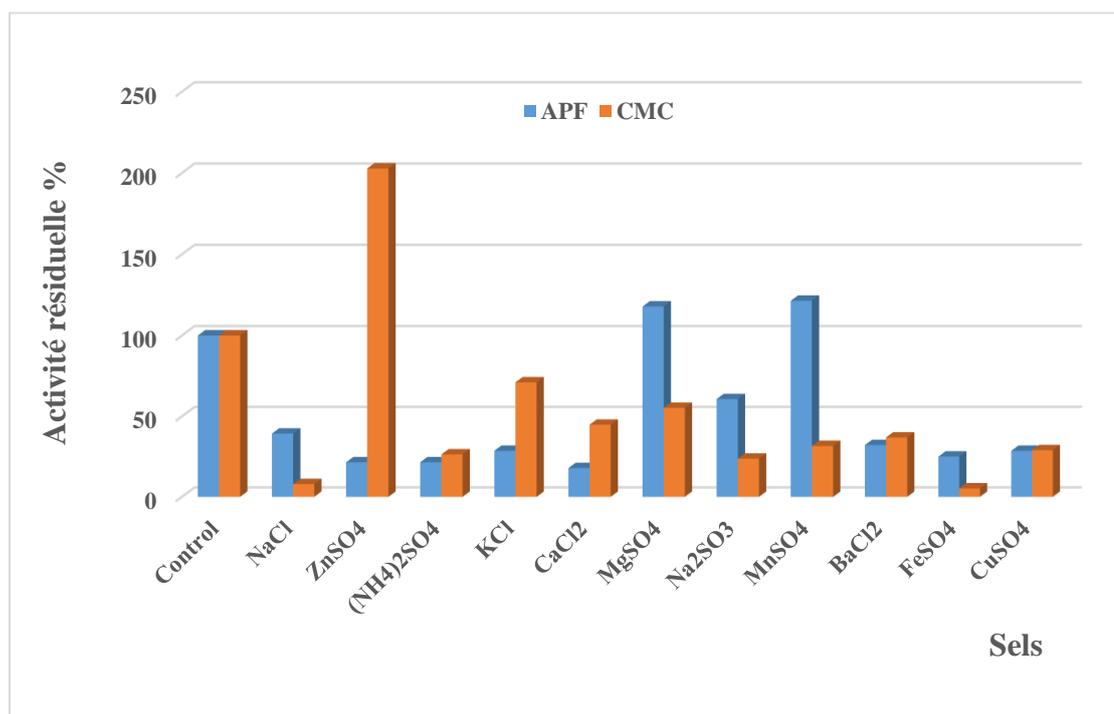


Figure 22 : Effet des sels sur l'activité cellulosique (à pH 7).

Soeka et Ilyas, (2020) ont montré que Mg^{2+} et Cu^{2+} sont des activateurs de la cellulase de *Penicillium babaiae* Ina cc 716. Selon Prasanna *et al.* (2016), plusieurs ions métalliques pourraient avoir un effet positif ou négatif contre l'activité de l'enzyme cellulase. L'effet positif se produit lorsque les enzymes peuvent interagir avec les ions métalliques en tant que cofacteur (activateur) afin que l'activité enzymatique puisse augmenter. Dans le même temps, l'effet négatif peut diminuer l'activité enzymatique puisque l'ion métallique agit comme un inhibiteur.

Selon Sea *et al.* (2006), ont montré que l'ion Mn^{2+} active les deux formes de la cellulase de *Macrotermes subhyalinus*. Yin *et al.* (2010), ont révélé que les ions tels que K^+ , NH_4^+ n'affectent pas l'activité de la cellulase de *Bacillus subtilis* Yj 1, tandis que Mn^{2+} a un effet très significative, cependant Fe^{2+} inactive l'activité de la cellulase purifiée.

Selon les études de Saha, (2004) et Murashima *et al.* (2002), les ions K^+ , NH_4^+ n'ont pas d'effet sur la cellulase de *Rhizopus oryzae*, tandis que Mn^{2+} activent l'enzyme de *Mucor circinelloides*.

3.5 Effet des détergents sur l'activité de cellulase

Les résultats des activités cellulases (APF et CMCCase), en fonction des détergents testés, sont consignés dans les figures 23 et 24.

D'après les résultats, il ressort que :

A pH4, le tween 80, EDTA, l'acétone et l'urée sont des activateurs pour les deux activités : APF (155.55%, 149.12%, 156.14% et 156,72 respectivement) et CMCCase (292.87%, 146.43%, 178.58 et 132.14%). Le tween 20 est un activateur important pour la CMCCase (275.01%) alors qu'il n'a pas d'effet sur l'APF (104.09). Le β -mercaptoéthanol est un activateur pour l'APF (150.29) et un inhibiteur pour CMCCase (96.43%). L'éthanol a une augmentation très significative sur la CMCCase (253.58%) et il inhibe l'APF (76.46%). Pour le SDS, il n'a aucun effet sur la l'endoglucanase alors qu'il exerce un effet inhibiteur sur l'APF (93.56%).

A pH 7, l'activité papier filtre est légèrement augmentée en présence du tween 20 (113.46%) et l'urée (114.28%). Le tween 80, le β -mercaptoéthanol, le SDS et l'éthanol n'exerce aucun effet sur l'APF. Et cette dernière est inhibée par l'EDTA, et l'acétone. Concernant l'endoglucanase, son activité est diminuée en présence de tous les détergents.

L'EDTA inhibent les deux activités APF et CMCCase à pH7. Ceci permet de conclure les deux enzymes neutres sont des métalloenzymes (Dakhmouche, 2016).

L'agent chélateur d'ions l'EDTA provoque une diminution de l'activité des enzymes (APF et endoglucanase) à pH 7, ce qui semble indiquer la présence d'un métallo enzyme (les cations sont impliqués dans le site catalytique actif de l'enzyme). Par contre, une activation en présence de l'EDTA, de l'activité CMCCase produite par *Bacillus sub.sp, subtilis* A-53 (187 %) a été rapportée par kim *et al.*, (2009).

En présence de SDS, il en est de même, les activités enzymatiques sont inhibées pour les activités papier filtre et endoglucanase (à pH 4 et 7). Selon la littérature, une inhibition complète des endoglucanases (0 % d'activité) chez *Bacillus* CH 43 et HR 68 a été signalé, en présence de SDS (1%) (Mawadza *et al.*, 2000) et une activité CMCCase de 3.2% d'activité est obtenue chez *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104) (Roy *et al.*, 1990).

En présence du β -mercapto-ethanol, qui est un agent réducteur des liaisons disulfures, on note une augmentation de l'activité papier filtre à pH 4 jusqu'à 155,55 %, et une diminution de l'endoglucanase. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Leghlimi,

(2013), qui a indiqué qu'une stimulation de l'activité papier filtre de *Trichoderma longibrachiatum* jusqu'à 148 % en présence du β -mercapto-ethanol, ainsi que pour l'endoglucanase a été observée.

Cette augmentation de l'activité enzymatique en présence du β -mercapto-ethanol, suggère la possibilité qu'un ou plusieurs groupes thiol sont impliqués dans le site actif de l'enzyme (Leghlimi, 2013).

Les solvants organiques testés ont stimulés les activités enzymatiques mesurées, pour l'activité papier filtre : l'acétone à pH 4 et l'éthanol à pH 7, et pour l'activité endoglucanase, l'acétone et l'éthanol à pH 4.

Avec l'éthanol, on note une diminution importante pour l'activité endoglucanase à pH 7. L'acétone supprime 51,03 % d'activité papier filtre et 76,31 % d'endoglucanase à pH 7. Ces résultats corroborent ceux de Leghlimi, (2013), qui a révélé qu'une inhibition, en présence de l'acétone, de l'activité papier filtre d'environ 87 % et 80 % d'endoglucanase produite par *Trichoderma longibrachiatum* est observée.

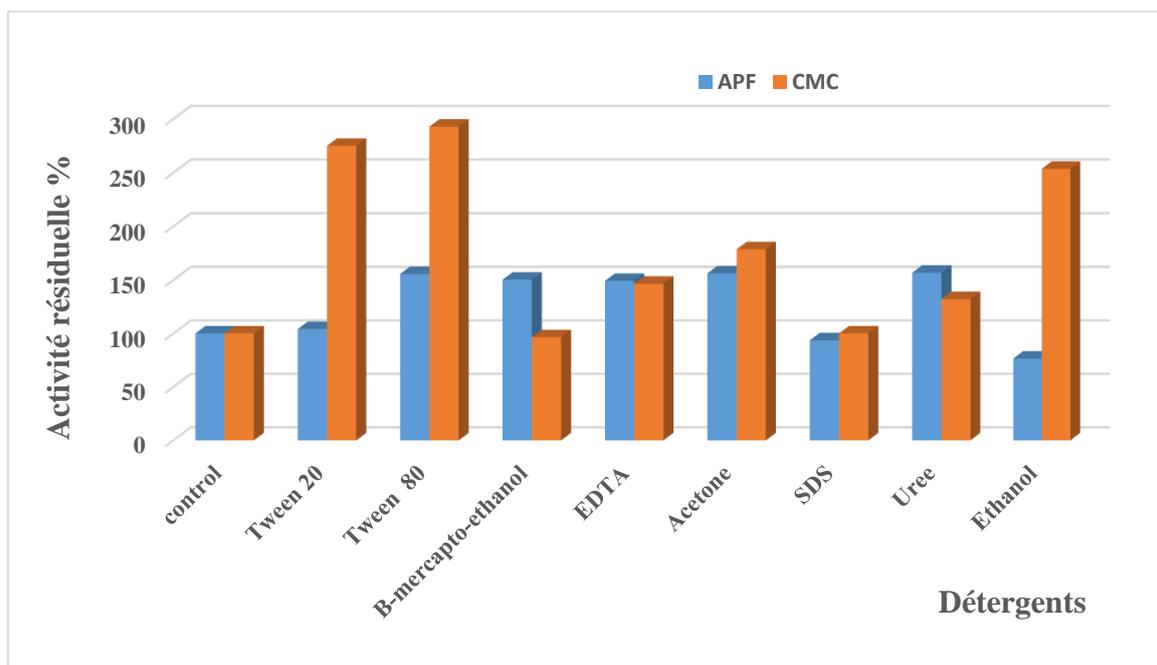


Figure 23 : Effet des détergents sur l'activité cellulosique (à pH 4).

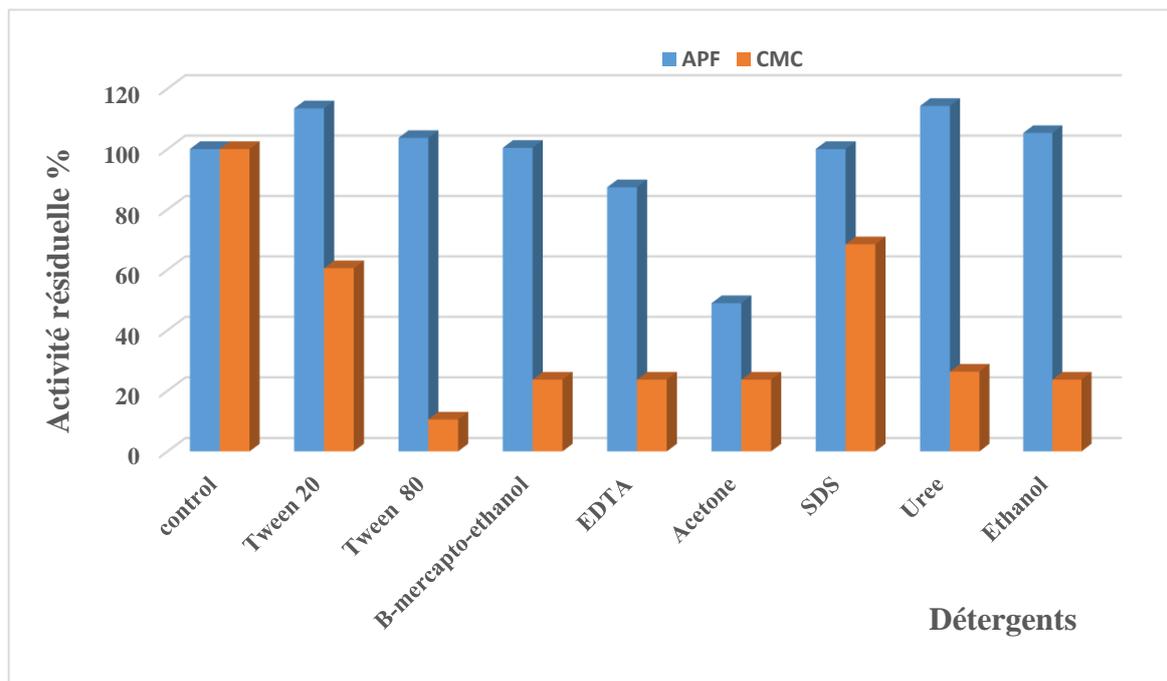


Figure 24 : Effet des détergents sur l'activité cellulasique (à pH 7).

3.6 Effet de différente concentration en substrats sur l'activité de cellulase

L'activité de la cellulase en fonction de la concentration en substrat a été étudiée, et les résultats sont présentés dans les figures 25 et 26. Nous remarquons que l'enzyme partiellement purifiée suit la cinétique de Michaelis-Menten.

Avec les différentes concentrations en papier filtre (de 10 à 60 mg), la variation de la vitesse initiale est en fonction de la concentration en substrat (figure 25), l'activité enzymatique augmente progressivement et atteint son maximum à une concentration de papier de 50 mg à pH 4 et 7 puis elle devient constante ceci s'explique par la saturation des sites actifs de l'enzyme et la courbe obtenue est une hyperbole.

D'autre part, l'activité endoglucanase est mesurée à différentes concentrations de CMC (de 10 à 100 mg/ml), la courbe hyperbole est obtenue et l'endoglucanase atteint la saturation à 0,7 % (70 mg/ml) de CMC à pH 4 et à 0,6 % (60 mg/ml) à pH 7.

Les paramètres cinétiques (V_{max} : vitesse maximale et K_m : constante de Michaelis) sont déterminées par la représentation de Lineweaver et Bruk, (1934). D'après les figures 27 et 28, les valeurs de K_m et V_{max} de la cellulase purifiée de *Candida parapsilosis*

strain CBS 604 T sont de 279,33 mg/ml et 3333,33 UI/min et 52,606 mg/ml et 15,79 UI/min pour le papier filtre et l'endoglucanase à pH 4, respectivement. Et à pH 7 Km est de 130,2 mg/ml et 40,91 mg/ml et Vmax est de 2000 UI/min et 19,41 UI/min pour le papier filtre et l'endoglucanase, respectivement.

Selon sulyman *et al.* (2020), les valeurs Km et Vmax de la cellulase purifiée d'*Aspergillus niger* sont de 0,23 mg/ml et 9,26 UI/ml respectivement.

Sea *et al.* (2006), ont rapporté que les cellulases C1 et C2 produites par *Macrotermes subhyalinus* représentent des Kms de 3,84 mg/ml et de 6,66 mg/ml.

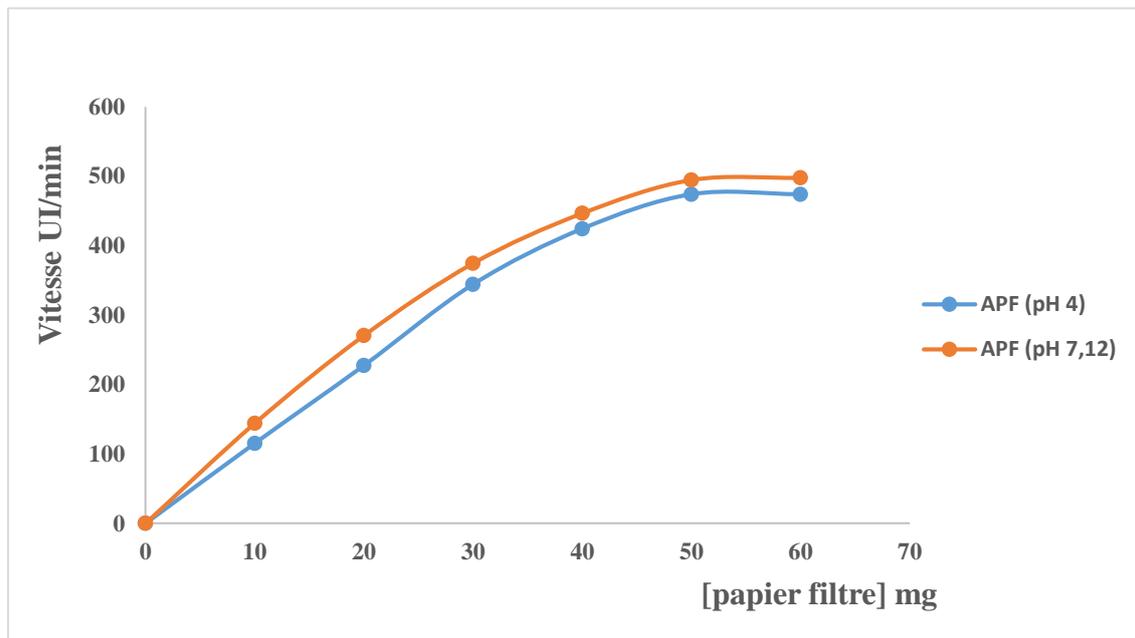


Figure 25 : Effet de la concentration en substrat (papier filtre) sur l'activité papier filtre de *Candida parapsilosis* strain CBS 604 T (pH 4 et 7).

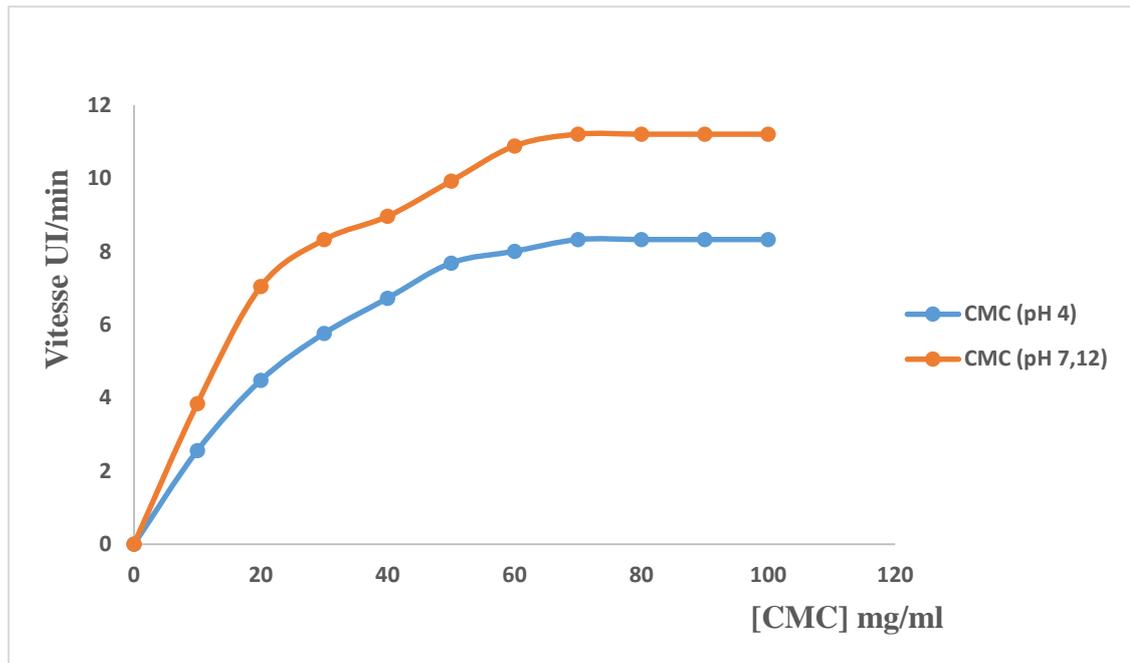


Figure 26 : Effet de la concentration en CMC sur l'endoglucanase de *Candida parapsilosis* strain CBS 604 T (pH 4 et 7).

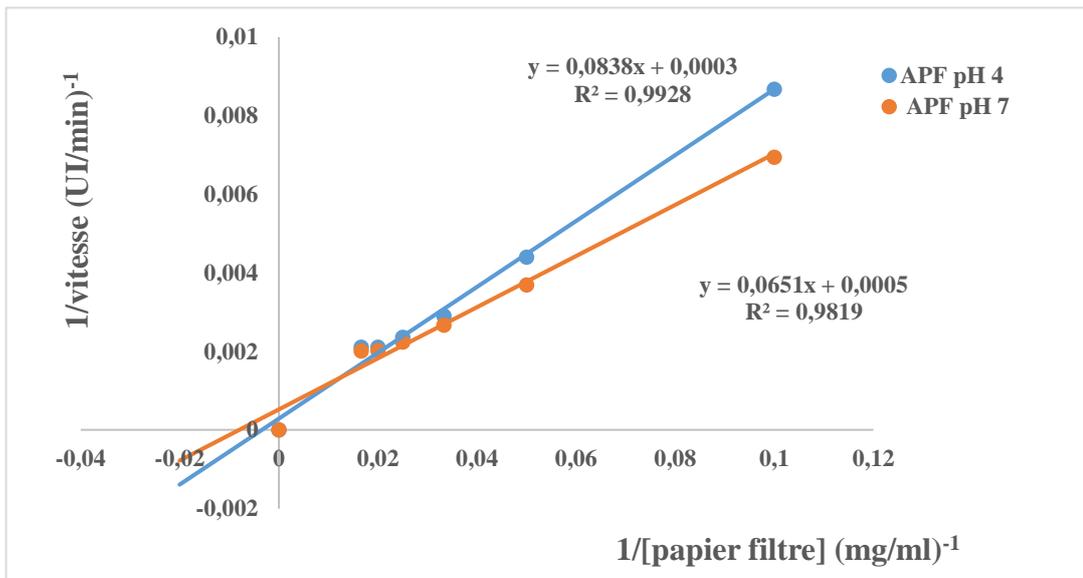


Figure 27 : Paramètres cinétiques de l'APF partiellement purifiée de *Candida parapsilosis* strain CBS 604 T, selon la représentation de Lineweaver et Burk (pH 4 et 7).

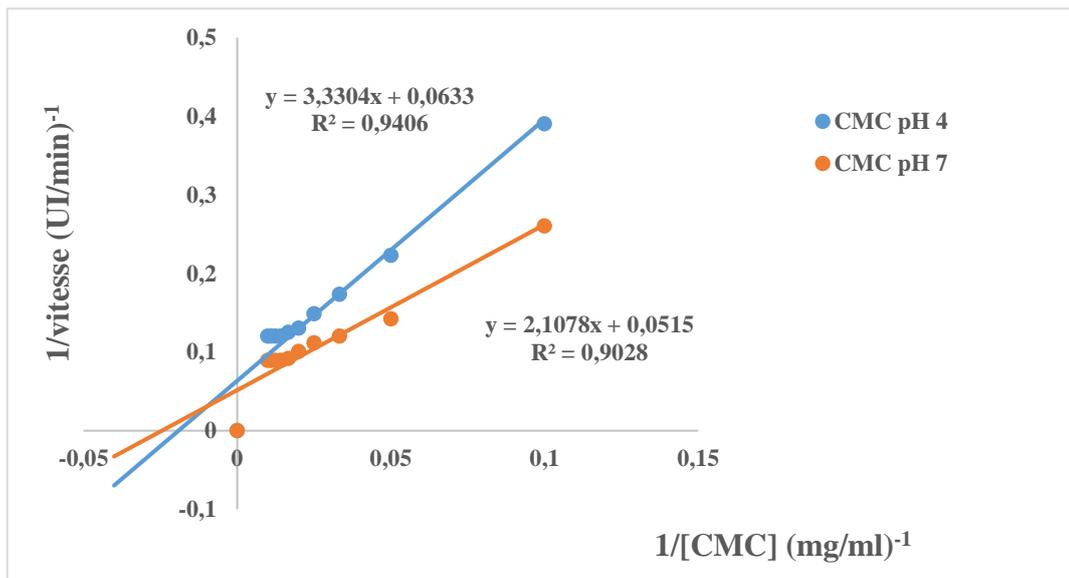


Figure 28 : Paramètres cinétiques de l'endoglucanase partiellement purifiée de *Candida parapsilosis* strain CBS 604 T, selon la représentation de Lineweaver et Burk (à pH 4 et 7).

4 Applications enzymatiques

4.1 Clarification du jus de pomme

La cellulase est l'une des enzymes les plus largement utilisées pour clarifier les jus de fruits, la paroi cellulaire de la pomme est généralement constituée de pectine. Afin de produire un jus de pomme clair, il est absolument nécessaire d'en retirer la pectine. L'utilisation de l'enzyme cellulase dans des conditions particulières aide à clarifier le jus de pomme (Kanmani *et al.*, 2011).

Le premier tube est le témoin et le second représente l'échantillon dans lequel la clarification du jus de pomme est clairement observée (figures 29 et 30). Un jus de pomme clair a été obtenu par élimination de la pectine. L'activité dure environ 1 h à 50°C.

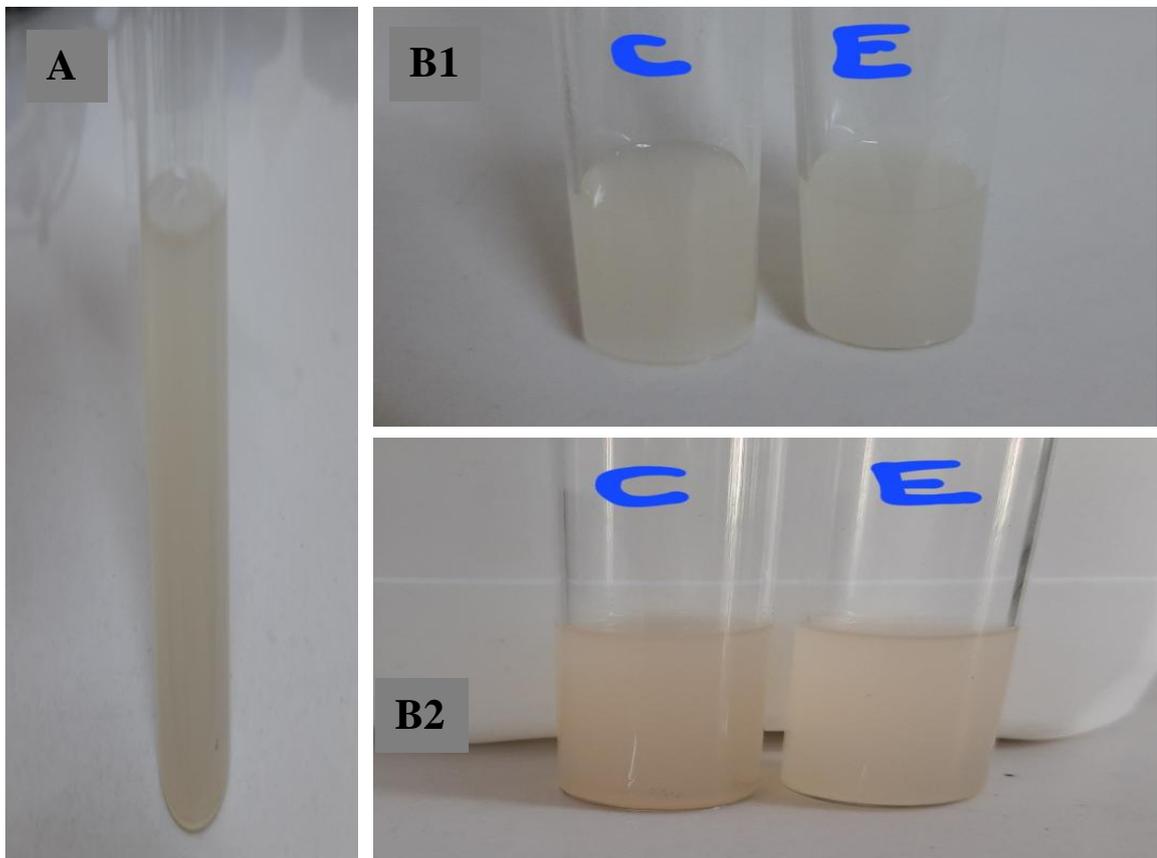


Figure 29 : Clarification du jus de pomme par la cellulase (C : Control, E : Echantillon)
A : Avant le traitement enzymatique
B1 : Après le traitement enzymatique (avant l'incubation)
B2 : Après le traitement enzymatique (après l'incubation)

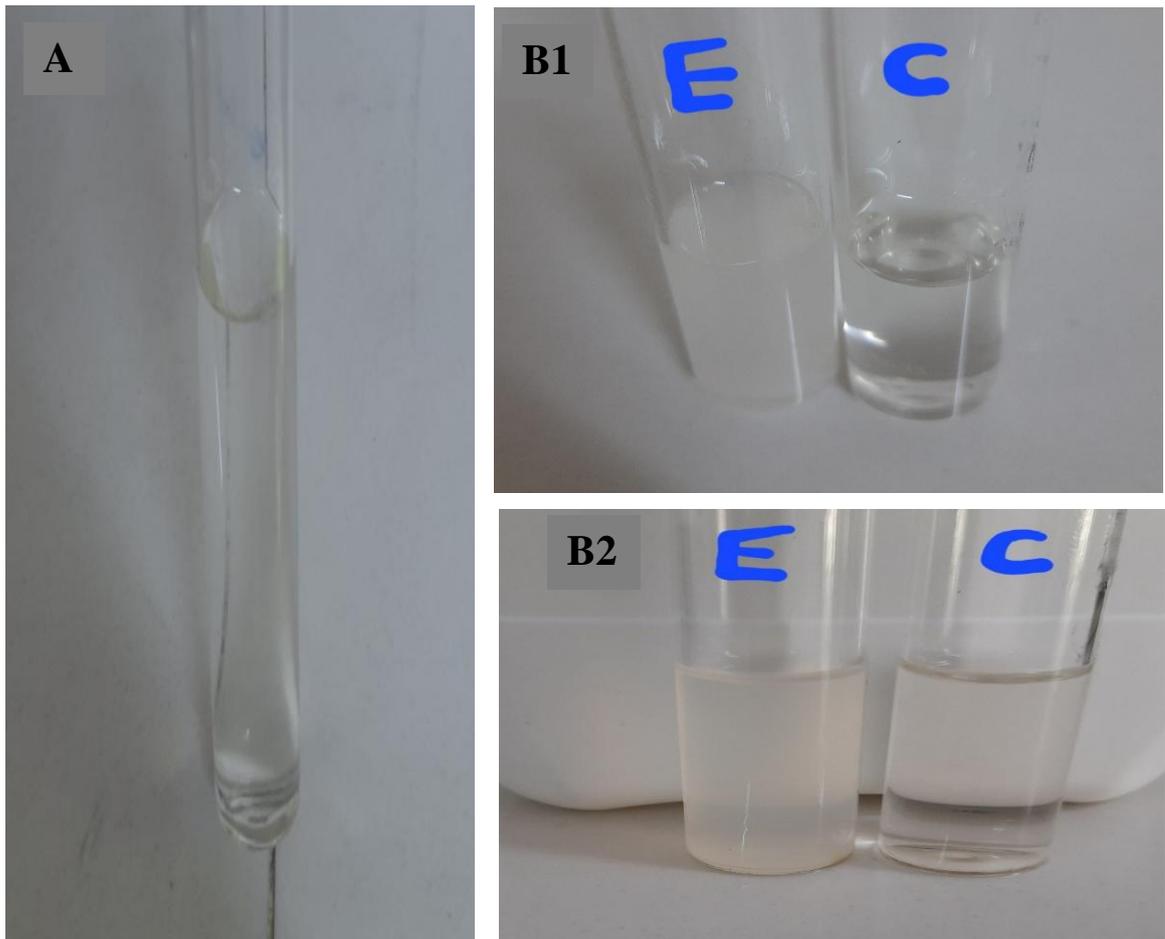


Figure 30 : Clarification du jus de pomme par l'eau (C : Control, E : Echantillon)
A : Avant le traitement enzymatique
B1 : Après le traitement enzymatique (avant l'incubation)
B2 : Après le traitement enzymatique (après l'incubation)

Le rendement du jus de pomme affecté par le traitement à la cellulase. Les données présentées au tableau 8 montrent l'effet de l'ajout de cellulase produite sur le rendement du jus de pomme par rapport à l'eau.

Tableau 8 : L'effet de cellulase produite par *Candida parapsilosis* CBS 604 T sur le volume et le rendement du jus de pomme.

Traitements	Volume du jus (ml) après incubation	Augmentation du rendement %
Eau	26	8,33
Cellulase	30	12,5

D'après les résultats du tableau 8, on peut observer que la cellulase a augmenté la quantité de jus de pomme produite. Il y a une augmentation du jus de pomme lorsque l'enzyme cellulase a été ajoutée, il a amélioré le rendement jusqu'à 6 ml/10 g et une augmentation d'environ 12,5 % a été détectée à la suite de traitement par cellulase purifié.

Selon Bara et Fergani, (2021), le rendement du jus de pomme traitée par la cellulase produite par *Candida sp* est de 37,5 %.

4.2 Saccharification des agro-déchets de banane à l'aide de l'enzyme cellulase

La saccharification permettant la dégradation des déchets lignocellulosiques des bananes a été testée par les cellulases de la souche *Candida parapsilosis* CBS 604 T selon la méthode de Biag *et al.* (2004).

Le complexe enzymatique cellulolytique, lorsqu'il est incubé avec les déchets agricoles, libère des sucres. Le degré de saccharification a été dosé sur la base de la libération du groupe réducteur. La quantité de sucres réducteurs augmente avec le temps d'incubation en la présence de l'enzyme.

La quantité maximale de sucres réducteurs a été libérée au bout de 8 h et le pourcentage de saccharification est de 2.43% à pH4 et 1.13% à pH7 pour l'APF (figure 31 A). Pour l'endoglucanase, le pourcentage de saccharification est de 10.8% et 7.09% à pH4 et pH7 respectivement (figure 31 B).

Pour cela, la cellulase synthétisée de *Candida parapsilosis* CBS 604 T peut être recommandée pour la saccharification des agro-déchets de banane.

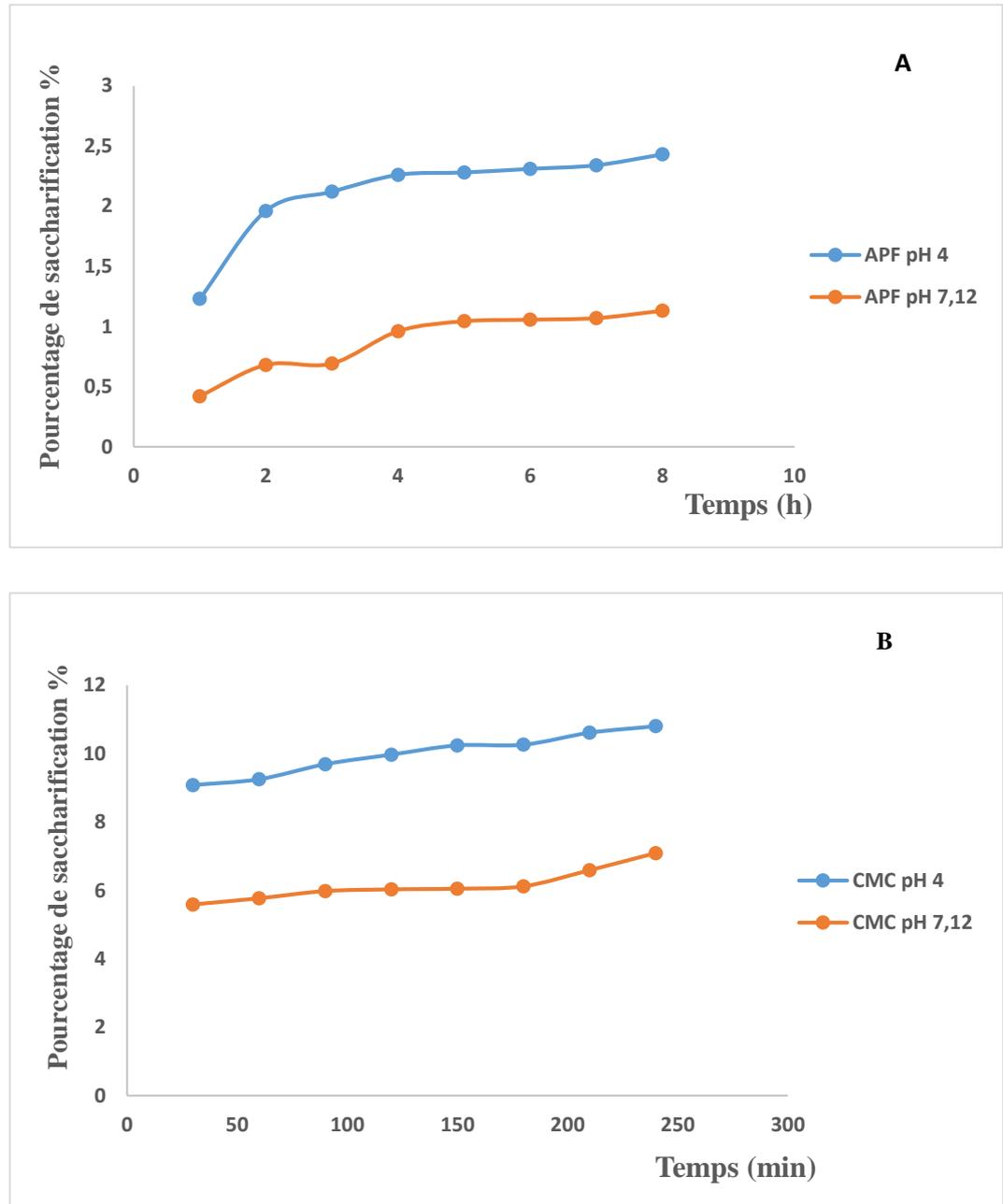


Figure 31 : Saccharification des déchets agricoles de banane (à pH 4 et pH 7)

A: APF; B: Endoglucanase (CMCase)



*Conclusion
générale*

Conclusion générale

Au niveau du laboratoire GMA, plusieurs études sur la production d'enzymes d'origine fongique. Parmi ces enzymes, les enzymes du complexe cellulase dérivées de microorganismes présentent un intérêt biotechnologique extrêmement important, et ce pour deux raisons :

- Premièrement, la décomposition de la cellulose en sucres simples, constitue une solution pour des problèmes graves tels que : l'alimentation, l'énergie et la pollution de l'environnement.
- Deuxièmes, il n'existe pas sur le marché de cellulases suffisamment thermoactives et thermostables pour supporter les conditions de la saccharification enzymatique des celluloses.

L'objectif principal de cette étude est la production de la cellulase de la souche *Candida parapsilosis* CBS 604 T sur un milieu optimisé. Le déchet lignocellulosique utilisé comme substrat de la fermentation solide est le son de blé, aucun prétraitement n'était nécessaire pour induire la production maximale de composants enzymatiques.

Après FMS, la production d'APF est de 320,20 UI/min et celle d'endoglucanase a atteint 7,044 UI/min.

La purification partielle de l'extrait enzymatique brut a été partiellement été réalisée par la précipitation par le sulfate d'ammonium à 40-80 % et la dialyse. Ceci a permis l'obtention d'une activité totale de 96395,29 UI/min et de 26978,86 UI/min, et un degré de purification de 3,39 et de 2,41 pour l'APF et CMCase respectivement.

L'étude des caractéristiques physico-chimiques de la cellulase partiellement purifiée montre que les activités enzymatiques papier filtre et endoglucanase possèdent deux pH optimum de 4 et 7 probablement des isoenzymes : une acide et l'autre neutre. Les activités papier filtre et endoglucanase ont une température optimale de 50°C pour les deux isoenzymes. Après un traitement de 180 min à 50°C, l'activité papier filtre acide a maintenu 81,87 % et l'APF neutre garde 85,71% de leur activité initiale. A 100°C pendant 03 heures, l'APF acide et neutre ont conservé respectivement 64,92 % et 59,19%, avec des demi- vie 160 min et 165 min . Par le même traitement, l'endoglucanase (pH4) a perdu 57,17% de son activité et 73,69% de l'endoglucanase (pH 7) ont disparu. Par

ailleurs, leurs demi-vie est de 160 min et 155 min. D'après ces résultats, il ressort que la cellulase de la souche *Candida parapsilosis* CBS 604 T est thermostable.

Parmi les différents sels testés, l'APF acide est activée par le MgSO₄ et le MnSO₄, l'APF neutre augmente en présence de MgSO₄, MnSO₄ et par le ZnSO₄ et activé par pour les deux activités APF (pH 4) et CMCCase (pH 7). Cette enzyme inhibé par quelques sels telles que : NaCl, (NH₄)₂SO₄, KCl, Na₂SO₃, FeSO₄ pour les deux activités APF et CMCCase a pH 4 et 7, et les sels qui n'est pas un effet sur l'activité cellulasique sont : BaCl₂ (pH 4) et CaCl₂, CuSO₄ (pH 7) pour l'APF.

A pH 4, le tween 80, EDTA, l'acétone et l'urée sont des activateurs pour les deux activités : APF (155,55 %, 149,12%, 156,14% et 156,72% respectivement) et CMCCase (292,87%, 146,43%, 178,58% et 132,14%). Le tween 20 est un activateur important pour la CMCCase (275,01%) alors qu'il n'a pas d'effet sur l'APF (104,09 %). Le β-mercapto-ethanol est un activateur pour l'APF (150,29%) et un inhibiteur pour CMCCase (96,43%). L'éthanol a une augmentation très significative sur la CMCCase (253,58%) et il inhibe l'APF (76,46%), pour le SDS, il n'a aucun effet sur l'endoglucanase alors que il exerce un effet inhibiteur sur l'APF (93,56%). A pH 7, l'activité endoglucanase est diminuée en présence de tous les détergents, et l'activité papier filtre est légèrement augmentée en présence de tween 20 et l'urée. Le tween 80, β-mercapto-ethanol, SDS, et éthanol n'exerce aucun effet sur l'APF et cette dernière inhibée par EDTA et l'acétone.

Les paramètres cinétiques de l'enzyme partiellement purifiée de *Candida parapsilosis* strain CBS 604 T sont déterminés, le Km pour l'activité papier filtre et la CMCCase est respectivement de 279,33 mg/ml et de 52,60 mg/ml à pH 4 et de 130,2 mg/ml et de 40,91 mg/ml à pH 7. Les valeurs de Vmax sont de 3333,33 UI/min et 15,79 UI/min pour l'APF et CMCCase à pH 4 respectivement, et de 2000 UI/min et 19,41 UI/min à pH 7.

L'essai de l'application industrielle des deux activités, APF et l'endoglucanase a montré que les deux enzymes partiellement purifiées sont capables d'améliorer la clarification du jus de pomme et la saccharification de déchets de banane. Cette étude nous a démontré que le papier filtre et endoglucanase possède des propriétés uniques, rendant cette enzyme précieuse à l'échelle industrielle.

Et comme perspectives, il serait intéressant :

-D'étudier la cinétique de la production de l'APF et l'endoglucanase.

-De produire l'enzyme en fermenteur semi-pilote.

-De purifier les deux enzymes en utilisant les différents types de la chromatographie.



Références

Références

- Adinarayana, K., Jyoti, B., & Ellwiah, P. (2004). Production of alkaline proteases with immobilized cell of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapped technique. *AAPS Pharma science technology*, 6, 391-397.
- Ahmed, A., & Bibi, A. (2018). Fungal cellulase; production and application: mini review. *Life: international journal of health and life-sciences*, 4(1), 19 - 36. <https://dx.doi.org/10.20319/lijhls.2018.41.1936>.
- Aldiguié, A. S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., Uribelarrea, J. L., Guillouest, S. E., & Molina-jouve, C. (2004). Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces Cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess biosyst eng*, 26 :217-222.
- Alonso, D. M., Wettstein, S. G., & Dumesic, J. A. (2012). Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chem soc rev* 41, 8075–8098.
- Amadi, O. C., Egong, E. J., Nwagu, T. N., Okpala, G., Onwosi, C. O., Chukwu, G. C., Moneke, A. N. (2020). Process optimization for simultaneous production of cellulase, xylanase and ligninase by *Saccharomyces cerevisiae* SCPW 17 under solid state fermentation using Box-Behnken experimental design. *Heliyon*, 6, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04566>.
- Ando, S., Ishia, H., Kosugi, Y., & Ishikawa, K. (2002). Hyperthermostable endoglucanase from *pyrococcus horikoshii*. *Applied and environmental microbiology*. 68(1): 430-433.
- Andréia, S., Jesus, P. R., Orílio, L., Sydney, H. A., & Patrícia, V. (2009). High frequency of potentially pathogenic yeast species in goat's raw milk and creamed cheese in southern Brazil. *Acta scientiae veterinariae*.
- Atef, M., Ibrahim, R. A., Hamouda, N. E., & Fatma, M. A. (2021). Bioprocess development for enhanced endoglucanase production by newly isolated bacteria, purification, characterization and in-vitro efficacy as anti-biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87901-9>. Scientific reports.
- Baig, M. M., & Baig, M. L. (2004). Saccharification of banana agro waste by cellulolytic enzymes. *Afri.J.Biotechno*, 3(9), 447-450.

- Bano, A., Chen, X., Prasongsuk, S., Akbar, A., Lotrakul, P., Punnapayak, H., & Ali, I. (2019). Purification and characterization of cellulase from obligate halophilic *Aspergillus flavus* (TISTR 3637) and its prospects for bioethanol production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 189(4), 1327-1337.
- Bara, C., & Fergani, H. (2021). Etude de la production de l'endoglucanase par fermentation solide chez *Candida sp.* Optimisation et purification. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Biochimie Appliquée.
- Barnet, G. A., Payne, R. W., & Yarrow, D. (2000). *Yeasts: characteristics and identification*, (thirdEd) cambridge University Press. P. 163-172.
- Béguin, P. (1990). Moléculaire biologie of cellulose de dégradation. *Annu.Rer.Microbiol.*, 44 P: 219-248.
- Belmessikh, A. (2011). Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine 1, Microbiologie Appliquée.
- Ben Ali, W. (2021). Criblage de la diversité fongique marine visant à identifier de nouvelles oxydases pour les biotechnologies et le développement durable. Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille et Université de Sfax à Tunisie.
- Bensmira, S. (2006). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (Sol et Sebka de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel. Mémoire de Magistère, Université Mentouri Constantine 1. Microbiologie Appliquée.
- Bertoldo, C., & Antranikian, G. (2002). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current opinion in chemical biology*, 6: 151-160. .
- Bezerra, C. O., Carneiro, L. L., Carvalho, E. A., Pereira das Chagas, T., Ribeiro de Carvalho, L., Uetanabaro, A. P., Miura da Costa, A. (2021). Artificial intelligence as a combinatorial optimization strategy for cellulase production by *Trichoderma stromaticum* AM7 using peach-palm waste under solid-state fermentation. *BioEnergy research*, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10234-4>.

- Bhatt, S. M., & Shilpa. (2019). Down stream processing technology for cellulase production. Dans N. Srivastava, M. Srivastava, P. K. Mishra, P. W. Ramteke, & R. L. Singh, New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering from cellulose to cellulase: strategies to improve biofuel production (pp. 1-300). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00012-6>.
- Bouichet, P., Guignard, J. L., & Pouchus, Y. F. (2005). Les champignons mycologie fondamentale et appliquée. Masson: 2^{ème} édition.
- Bouix, M., & Leveau, J. y. (1991). Les levures Ds : Bourgeois C.M., LeveauJ.Y., Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier- Tec& Doc,paris. paris.
- Boulares, D., & Boulham, S. (2014). Production de la cellulase par *Trichoderma longibrachiatum* sur milieu solide à base de la paille de blé et le son de blé. Mémoire de Master, Université Constantine 1.
- Buzzin, P., & Margesin, R. (2014). Cold-Adapted Yeasts : A lesson from the Cold and a Challenge for the XXI Century. Springer. Doi : 10.1007/978-3-642-39681-6-1.
- Carlile, M. J., & Watkinson, S. C. (1997). The fungi. Academic Press, New York, N.Y., P:269-275.
- Carlos, V., Amparoi, Z., Ppmela, E. C., & Braulio, E. (2020). Yeasts associated with various amazonian native fruits. <https://doi.org/10.33073/pjm-2020-027>. Polish journal of microbiology.
- Carrasco, M., Villarreal, P., Barahona, S., Alcaino, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2016). Criblage et caractérisation des activités amylase et cellulase chez les levures psychrotolérantes. BMC Microbiology, 16 (1), 1-9. Doi : 10.1186 / s12866-016-0640-8.
- Chaabane, B. (2006). Intensification de la production d'éthanol biocarburant dans un bioréacteur bi-étagé avec recyclage cellulaire : Modélisation et stratégie de conduite. Thèse doctorat, INSA, Toulouse.
- Chakraborty, S., Gupta, R., Jain, K. K., Hemansi, Gautam, S., & Kuhad, R. C. (2016). Cellulases : Application in wine and brewery industry. Dans V. K. Gupta, new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering

- microbial cellulase system properties and applications (pp. 1-274).
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00017-4>.
- Chowdhary, N. A., Monruzzaman, M., Nahar, N., & Chowdhary, N. (1991). Production of cellulase and saccharification of lignocellulosic by *A. micromonospora* sp.7:603-606. *World J Microbiol Biotechno.*
- Dakhmouche, D. S. (2016). Thèse doctorat en sciences Co-tutelle production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stoké en zone arides. Université des Frères Mentouri, Constantine 1, Algérie et Université de Technologie Compiègne, France.
- Dali, N. S., et Hamame, A. (2016). Recherche de levures productrices d'enzymes glycolytiques exocellulaires thermostables : Production (sur boîte de Pétri et en batch) et caractérisation des enzymes produites. Mémoire de master, Université Mentouri Constantine 1, Biochimie / Analyse Protéomique et Santé.
- Datta, S., Holmes, B., Park, J. I., Che, Z., Dibble, D. C., Had, M., Sapra, R. (2010.). Ionic liquid toler-ant hyperthermophilic cellulases for biomass pretreatment and hydrolysis. *Green Chem.* 12(2):338-345.
- Deniz, C., & Ali, D. (2020). Production of cellulase and xylanase enzymes using distillers dried grains with solubles (DDGS) by *Trichoderma reesei* shake-flaskscale and the validation in the benchtop scale bioreactor. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00934-5>. Waste and biomass valorization.
- Derguine-Mecheri, L. (2019). Production et caractérisation des biosurfactants par des levurs et des moisissures. Filière: Science Biologique. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.
- 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>.
- Ezeilo, U. R., Wahab, R. A., Huyop, F., David, E. E., & Tin, L. C. (2021). Solid-state valorization of raw oil palm leaves by novel fungi *Trichoderma asperellum* UC1 and *Rhizopus oryzae* UC2 for sustainable production of cellulase and xylanase. *Society of chemical industry (SCI)*, 1-14. Doi: 10.1002/jctb.6713.

- Fadda, M. E., Pisano, M. B., Scaccabarozzi, L., Deplano, M., Moroni, P., Liciardi, M., & Cosentino, S. (2013). Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species isolated from bovine intramammary infection. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6996>. American dairy science association.
- Gabor, P., Masako, T., & Neza, C. (2017). Yeast habitats: different but global. Doi : 10.1007/978-3-319-61575-2_2. e-mail: Peter.Gabor@etk.szie.hu. Springer International Publishing AG.
- Ghazanfar, M., Irfan, M., Nadeem, M., & Syed, Q. (2019). Role of bioprocess parameters to improve cellulase production : part I. Dans N. Srivastava, M. Srivastava, P. K. Mishra, P. W. Ramteke, & R. L. Singh, New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering from cellulose to cellulase: strategies to improve biofuel production (pp. 1-300). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00005-9>.
- Hakim, H., Nawel, B., Baris, B., & Ossi, T. (2021.). Activity and stability of hyperthermostable cellulases and xylanases in ionic liquids. <https://doi.org/10.1080/10242422.2021.1882430>. Biocatalysis and biotransformation.
- Hasper, A. A., Dekkers, E., Mil, M., Peter, J. I., Vondervoort, V., & Leo, H. (2002). EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity to wards xyloglucan. 68(4), 1-6. Doi:10.1128/AEM.68.4.1556–1560.2002.
- Hirsawa, T., Yoshikawa, K., Nakakura, Y., Nagahisa, K., Furusawa, C., Katakura, Y., & Shioya, S. (2007). Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis, J Biotechnol,131:34-44.
- Holker, Udo, Lenz, & Jürgen. (2005). Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? 8(3), 301-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.006>
- Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdarska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. FEMS microbiology reviews, 41(6), 941-962.

- Johanna, S., Carlos, V., Amparo, I. Z., & Braulio, E. Z. (2019). Predominance of *Lactobacillus plantarum* strains in peruvian amazonian fruits. <https://doi.org/10.21307/pjm-2019-015>. Polish journal of microbiology.
- Jones, R. P., Pmmment, N., & Greenfield, P. F. (1981). Alcohol fermentation by yeasts-the effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry*, 16 : 42-49.
- Jun, H., Bing, Y., Keying, Z., Xuemei, D., & Daiwen, C. (2009). Strain improvement of *Trichoderma reesei* Rut C-30 for increased cellulase production. *Indian J Microbiol.* 49: 00-00.
- Keegstra, K. (2010). Plant cell walls. *Plant physiology*, 154(2), 483-486.
- Kim, D. W., Lee, B. H., Lee, Y. J., Jin, I. H., Chung, C. H., & Lee, J. W. (2009). Purification and characterization of carboxymethyl cellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* A-53. *Enzyme and microbial technology*, 44, 411-416.
- kinmani, R., Vijayabaskar, P., & Jayalakshmi, S. (2011). Saccharification of banane-agro waste and clarification of apple juice by cellulase enzyme produced from *Bacillus pumilis*. *World applied sciences journal*.
- Klose, H., Roder, G., Girfoglio, M., Fischer, R., & Commandeu, U. (2012). Hyperthermophilic endoglucanase for in planta lignocellulose conversion. *Biotechnol biofuels.* 5(1):63.
- Kreger-Van Rij, N. J. (1984). *The yeasts : a taxonomic study*. 3rd edn Amsterdam : Elsevier.
- Krishna, S. H., Rao, K. C., Babu, J. S., & Reddy, D. S. (2000.). Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414. *Biop. Eng.* 22: 467-470.
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Alam, A., Agrawal, K., Prasad, H., & Verma, P. (2018). Production, purification. 8, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0696-y>.
- Kunamneni, A. (2016). Cellulase in biomedical research. Dans V. K. Gupta, *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering microbial cellulase system properties and applications* (pp. 1-274). <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00023-X>.

- Kurtzman, C. p., Fella, j. w., & Boekhout, T. (2011). *The yeasts : a taxonomic study*. 5th edn Amsterdam : Elsevier.
- Lachance, M. A. (2012). Defense of yeast sexual life cycles : the forma asexualis – an informal proposal. *Yeast Newsletters*.
- Lachowicz, H., Wróblewska, H., Wojtan, R., & Sajdak, M. (2019). The effect of tree age on the chemical composition of the wood of silver birch (*Betula Pendula* Roth.) in poland. *Wood science and technology*, 53(5), 1135-1155.
- Laiche, A. T. (2019). Production d'enzymes amylolytiques chez des souches levuriennes. Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah-Ouargla.
- Lambertz, C., Garvey, M., Klinger, J., Heesel, D., Klose, H., Fischer, R., & Commander, U. (2014). Défis et progrès de l'expression hétérologue des enzymes cellulolytiques : revue, *Biotechnologie pour les biocarburants*,7 (135), 1-15. Doi : org / 10.1186 / s13068-014-0135-5.
- Larpent-Gourgand, M., & Sanglier, J. J. (1992). *Biotechnologies. Principes et méthodes*,p. 574-581.
- Leghlimi, H. (2013). Cellulase de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de doctorat, Université Constantine 1. Algérie, Département de Microbiologie.
- Lourens, K., & Reid, G. (2002). Yeast nutrient management in winemaking. *The australian & New zealand grapegrower & Winemaker. Annual technical*. 5. 50 – 54.
- Madigan, M. T., & Martino, J. M. (2006). *Brock biology of microorganisms*. Pearson education. Upper saddle river, NJ, USA.
- Maiworé, J., Tatsadjieu, N. L., Piro-Metayer, L., & Montet, D. (2019). Identification of yeasts present in artisanal yoghurt and traditionally fermented milks consumed in the northern part of Cameroon. <http://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00159>. Journal pre-proof, 09.

- Margaritis, A., & Creese, E. (1981.). Thermal stability characteristics of cellulase enzymes produced by *Sporotrichum thermophile*. *Biotechnology letters*. 3(9): 471-476.
- Matheus, M. V., Elen, K., ernando, S., Slvio, S., da, S., & Anuj, K. C. (2020.). Production of cellulases by *Aureobasidium pullulans* LB83: optimization, characterization, and hydrolytic potential for the production of cellulosic sugars. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1799393>.
- Mauricio, R. C., Esteban, O. C., & Lina, M. S. (2019). Dominant yeasts associated to mango (*Mangifera Indica*) and rose apple (*Syzygium Malaccense*) fruit pulps investigated by culture-based methods. Doi :10.1590/0001-3765201920190052.
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., & Mattiasson, B. (2000). Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus strains*. *Journal of biotechnology*, 83, 177-187.
- Meyer, A., Deiana, J., & Bernard, A. (2004). *Biosciences et techniques*. Edition. DOIN. France.
- Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, N., Kono, T. (2002). Purification and characterization of new endo-1,4-beta-D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme and microbial technology*, 30(3), 319-326.
- Nehad, E. A., Yoness, M. F., & Reem, A. A. (2019). Optimization and purification of cellulase produced by *Penicillium decumbens* and its application. *Egyptian pharmaceutical journal*, 18(4), 391. https://doi.org/10.4103/epj.epj_31_19.
- Nikita, B., Shreya, & Arun, K. S. (2020). Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. Doi : 10.1111/jfpe.13623. Department of bioscience and biotechnology, Banasthali Vidyapith, Vanasthali, India. *Food process engineering*.
- Nitin, V., Vivek, K., B, C, & Bansal. (2020). Valorization of waste biomass in fermentative production of cellulases: a review. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01048-8>. *Waste and Biomass Valorization*.
- Omar, K. (2017). Production de cellulase et d'enzymes associées par des souches de *Bacillus sp* : Le rôle des prétraitements et l'effet des polyphénols, des

- flavonoïdes et des biosurfactants. Thèse de doctorat, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed-Boudiaf.
- Onyetugo, C., Amadi, E. J., Egong, T. N., Tochukwu, N., Nwagu, G. O., Onwosi, G. C., Moneke. (2020). Process optimization for simultaneous production of cellulase, xylanase and ligninase by *Saccharomyces cerevisiae* SCPW 17 under solid state fermentation using Box-Behnken experimental design. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04566>. Research article.
- Palmarola-Adrados, B., Choteborska, P., Galbe, M., & Zacchi, G. (2005). Production d'éthanol à partir de glucide non amylicés de son de blé. *Bioresource technol.*96,843-850.
- Panchapakesan, A., & Shankar, N. (2016). Fungal cellulases: An Overview. Dans V. K. Gupta, new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering microbial cellulase system properties and applications (pp. 1-274). <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00002-2>.
- Pandiyani, K., Tiwari, R., Singh, S., Nain, P. K., Rana, S., Arora, A., Nain, L. (2014). Optimization of enzymatic saccharification of alkali pretreated parthenium sp. Using response surface methodology. *Enzyme research*, 2014, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/764898>.
- Pol, D. (1996). Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire. ellipses édition marketing S.A, Paris.
- Prasanna, H. N., Ramanjaneyulu, G., & Reddy, B. R. (2016). Optimization of cellulase production by *Penicillium sp.* *Biotech*, 3(162), 1-11. Doi:10.1007/s13205-016-0483-x.
- Prevot, V. (2013). Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne-Ardenne, microbiologie industrielle.
- 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>.

- Qadir, F., Shariq, M., Ahmed, A., & Sohail, M. (2018). Évaluation d'une co-culture de levure pour la production de cellulase et de xylanase sous fermentation à l'état solide de bagasse de canne à sucre en utilisant une approche multivariée. *Cultures et produits industriels*, 123, 407–415. Doi : 10.1016 / j.
- Qaseem, M. F., Shaheen, H., & Wu, A. M. (2021). Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. *Renewable and sustainable energy reviews*, 144, 110-996.
- Rafaas, F. Z. (2017). Isolement et caractérisation de bactéries productrices de cellulase. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle en science. Département de Biologie. Microbiologie moléculaire et proteomics. Université Djillani Liabes de Sidi Bel Abbes.
- Rahikainen, J., Anbarasan, S., Wahlstrom, R., Parviainen, A., King, A., Purane, T., Suurnakki, A. (2018.). Screening of glycoside hydrolases and ionic liquids for fibre modification. *J Chem technol biotechnol*.93(3):818-826.
- Ramesh, C. K., Rishi, G., & Ajay, S. (2011). Cellulases microbiennes et leurs applications industrielles. Doi: 10.4061/2011/280696.
- Regmi, S., Choi, Y., Yong, K., Md, M. K., Sang, H. L., Seung-Sik, C., Suh, J. (2020). endoglucanase produced by *acillus subtilis strain* CBS31: biochemical characterization, thermodynamic study, enzymatic hydrolysis, and bio-industrial Applications. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*25(1), 104–116. Doi:10.1007/s12257-019-0338-5.
- Rezki-Bekki, M. A. (2014). Thèse de doctorat en biotechnologie. Production de métabolites par les levures: Caractérisation et identification des arômes et des alcools. Université d'Oran.
- Roohi, Bano, K., Parveen, S., Khan, F., Zaheer, M. R., & Kuddus, M. (2019). Advancements in bioprocess technology for cellulase production. Dans N. Srivastava, M. Srivastava, P. K. Mishra, P. W. Ramteke, & R. L. Singh, new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering from cellulose to cellulase: strategies to improve biofuel production (pp. 1-300). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00008-4>.

- Roy, S. K., Dey, S. K., Raha, S. K., & Chakrabarty, S. L. (1990). Purification and properties of an extracellular endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104). *Journal of general microbiology*, 136, 1967-1971.
- Rudiger, A., Jorgensen, P. L., & Antranikian, G. (1995). Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 61(2):567-575.
- Saada, S., & Hamdane, S. (2021). Optimisation de la production cellulase par des souches bactériennes isolées de différentes sources. Mémoire de Master. Université Mohamed Khider de Biskra.
- Sadhu, S., & Maiti, T. K. (2013). Cellulase Production by Bacteria: A Review. *British microbiology research journal*, 3(3), 235-258.
- Sain, A., Aggarwal, N. K., & Yadav, A. (2017). Cost-effective cellulase production using *Parthenium hysterophorus* biomass as an unconventional lignocellulosic substrate. *Biotech*, 3, 1-11. Doi:10.1007/s13205-017-0604-1.
- Sainz, J., Pizarro, F., Pèrez-Correa, J. R., & Agosin, E. (2003). Modeling of yeast metabolism and Process dynamics in batch fermentation. *Wiley periodicals Inc*, 8 : 818-828.
- Sajith, S., Priji, P., Sreedevi, S., & Benjamin, S. (2016). Un aperçu sur les celluloses fongiques dans une perspective industrielle. 6(1), 1-13.
- Salem, K. S., Rashid, T. U., Asaduzzaman, M. D., Minhajul Islam, M., Khan, N., Sharmeen, S., . . . Haque, P. (2016). Recent updates on immobilization of microbial cellulase. Dans V. K. Gupta, *new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering microbial cellulase system properties and applications* (pp. 1-274). <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00011-3>.
- Sanchez, Y. G. (2008). Etude de l'adaptation et de la gestion de l'activité cellulaire dans un bioréacteur biétagé : intensification de la production d'éthanol. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.

- Sarsan, S., & Merugu, R. (2019). Role of bioprocess parameters to improve cellulase production : part II. Dans N. Srivastava, M. Srivastava, P. K. Mishra, P. W. Ramteke, & R. L. Singh, new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering microbial cellulase system properties and applications (pp. 1-300). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00006-0>.
- Satyanarayana, T., & Kunze, G. (2009). Yeast biotechnology : diversity and applications. springer science, New Delhi.
- Scriban, R. (2003). Biotechnologier. 4ème édition Technologie et documentation-lavoisier. Paris.
- Sea, T. B., Saki, S. J., Coulybaly, A., Yeboua, A. F., et Diopoh, J. (2006). Extraction, purification et caracterisation de deux cellulases du termite *Macrotermes subhyalinus* (Termideae). Agronomie Africaine, 18(1), 57-65.
- Seyedeh, Z. S., Mohammad, G., Abbas, A. I., Shirin, S., Sedigheh, B., & Zohre, B. (2018). Phenotypic and genotypic characterization of *Candida species* isolated from candidemia in Iran. <http://Doi.org/10.18502/cmm.4.2.64>. Current medical mycology.
- Sharma, A., Choudhary, J., Singh, S., Singh, B., Kuhad, R. C., Kumar, A., & Nain, L. (2019). Cellulose as potential feedstock for cellulase enzyme production: Versatility and properties of various cellulosic biomasses. Dans N. Srivastava, M. Srivastava, P. K. Mishra, P. W. Ramteke, & R. L. Singh, new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering microbial cellulase system properties and applications (pp. 1-300). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00002-3>.
- Sharma, A., Tewari, R., Rana, S., Sonia, R., & Sonia, S. K. (2016). Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. Applied biochemistry and biotechnology, 179(8).
- Sharma, H. P., Patel, H., & Sugandha. (2016). Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits – a Review. Critical reviews in food science and nutrition, 1-65. Doi:10.1080/10408398.2014.977434
- Siqueira, J. G., Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P., Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2019). Current advances in on-site cellulase production and application on

- lignocellulosic biomass conversion to biofuels: a review. *Biomass and bioenergy*, 132((2020) 105419), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>.
- Soeka, Y. S., & Ilyas, M. (2020). Production and characterization of cellulases. 591, 1-11. Doi:10.1088/1755-1315/591/1/012015.
- Spencer-Martins, I., & Van Uden, N. (1979). Extracellular amylyolytic system of the yeast *lypomyces kononenkoae*. *European journal applied microbiology and biotechnology*.6: 241-250.
- Srivastava, N., Srivastava, M., Alhazmi, A., Kausar, T., Haque, S., Singh, R., Gupta, V. K. (2021). Technological advances for improving fungal cellulase production from fruit wastes for bioenergy application: a review. *Environmental Pollution*, 287, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117370>.
- Sticklen, M. B. (2008). Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. 433–443.
- Suh, S. O., Kurtzman, C. P., & Lachance, M. (2006). Phylogenetics of saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia*, 98 : 1006-1017.
- Sultana, S. (1997). Isolation of cellulolytic microorganism and their activities. Thése, Rajshahi Université Bangladesh.
- Sulyman, A. O., Igunnu, A., & Malomo, S. O. (2020). Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Trichoderma*. *Heliyon*, 6, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05668>.
- Swathy, R., Rambabu, K., Fawzi Banat, Shih-Hsin Ho, Dinh-Toi Chu, & Pau Loke Show. (2019). Production and optimization of high grade cellulase from waste date seeds by *Cellulomonas uda* NCIM 2353 for biohydrogen production. *International journal of hydrogen energy*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.06.171>.
- Tanver, B., Bisma, M., Reaiaz, U., & Manoj, K. (2015.). Influence of various parameters on cellulase and xylanase production by different strains of *Trichoderma species*. *Journal of analytical and pharmaceutical chemistry*.

- Tong, C. C., Cole, A. L., & Shephred, M. J. (1980). Purification and properties of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem Jnl.* 191: 83-94.
- Touijer, H., Benchemsi, N., Ettayebi, M., Jantildrisi, A., Chaouni, B., & Bekkari, H. (2019). Cellulases thermostables de la levure *Trichosporonsp.* *Recherche enzymatique*, 2019, 1–6. Doi : 10.1155 / 2019/2790414.
- Van, H. V., Tuan, A. P., & Keun, K. (2010.). Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid state fermentation. Doi:10.4489/MYCO.2011.39.1.020. *Mycobiology* 39(1): 20-25.
- Verma, N., & Kumar, V. (2019). Impact of process parameters and plant polysaccharide hydrolysates in cellulase production by *Trichoderma reesei* and *Neurospora crassa* under wheat bran based solid state fermentation. *Biotechnology reports*, 25(2020), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00416>.
- Vincent, P. (2013). Comparais de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de doctorat. Université de Reims.
- Waldron, K. (2010). Bioalcohol production: biochemical conversion of lignocellulosic biomass. Wood head publishing limited and CRC Press LLC,. cornwall,476.
- Walker, G. M. (2009). Yeasts. University of Abertay Dundee, Dundee, Scotland. Elsevier Inc.
- Wang, D., & Hong, J. (2018). Expression des enzymes cellulolytiques dans la levure. *Enzymes cellulolytiques fongiques*, 201–221. Doi : 10.1007 / 978-981-13-0749-2_11.
- Wang, H., Zhai, L., & Geng, A. (2019). Enhanced cellulase and reducing sugar production by a new mutant strain *Trichoderma harzianum* EUA20. *Journal of bioscience and bioengineering*, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.08.016>.
- Wang, N. S. (2003). Enzyme purification by salt precipitation (Ammonia Sulfate). University of Maryland. Department of chemical engineering.
- Wilson, D. B. (2016). Microbial diversity and cellulase production. Dans V. K. Gupta, *new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*

- microbial cellulase system properties and applications (pp. 1-274).
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00005-8>.
- Witkowska, D., & Piegza, M. (2006.). Capability of *Geotrichum candidum* yeasts for cellulases and xylanases biosynthesis. EJPAU, 9(4): 41.
- Xie, Z., Tian, Z., Luis, S., Hao, Ji, X., & Si, C. (2021). Effects of different amounts of cellulase on the microstructure and soluble substances of cotton stalk bark. Advanced composites and hybrid materials, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s42114-021-00400-3>.
- Xu, B., Hellaman, U., Ersson, B., & Janson, J. C. (2000). Purification, characterization and aminoacid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo β -1,4-glucanase from *Blue Mussel, Mytilus edulis*. Euro J. Biochem. 267:4970-4977.
- Yin, L.-J., Lin, H.-H., & Xiao, Z.-R. (2010). Purification and characterization of a cellulase from. Journal of marine science and technology, 18, 466-471. Doi:10.51400/2709-6998.1895.
- Zamouche, K., et Nedjar, L. R. (2018). Contribution à l'étude de la microflore levure du lait de chamelle d'algerie. Mémoire de Master en Biochimie de la Nutrition. Université des Frère Mentouri, Constantine 1.
- Zhang, X. Z., et Zhang, Y. H. (2013). Cellulases : Caractéristiques, sources, production et applicatios.
- Zhang, Y., Tang, B., & Du, G. (2017). Self-induction system for cellulase production by cellobiose produced from glucose in *Rhizopus stolonifer*. Scientific reports, 7(10161). Doi:10.1038/s41598-017-10964-0.
- Zhang, Y., Yang, J., Luo, L., Wang, E., Wang, R., Liu, L., Yuan, H. (2020). International journal of molecular sciences, 21, 1-18. Doi:10.3390/ijms21020371.
- Zhuang, J., Marchant, M. A., Nokes, S. E., & Strobel, H. J. (2007). Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. Applied Engineering in agriculture, 23, 679-687.

Zubair, A., Nadeem, M., Shah, A. A., & Nelofe, R. (2019.). Statistical optimization, production and characterization of CMCase from mutant *Bacillus Subtilis* ML-1UVb. *Multidiscip. Appr. Sci.*11, 18–37.

Sites web:

<https://souslemicroscope.com/levures/> . La photo ultra-structure de levure.

http://parasitoweb.free.fr/Cours_Parasito/mycologie/morphologie_levure

La photo de la morphologie d'une levure.



Annexes



Annexes

Annexe 1 : Milieu de repiquage utilisée

Milieu YPGA : utilisé pour la conservation de la souche, il contient le glucose comme source de carbone.

Extrait de levure : 5 g

Peptone : 0,5 g

Glucose : 10 g

Agar : 20 g

Eau distillé : 1000 ml

Protocole

Dissoudre les constituants dans l'eau distillée, compléter le volume à 1000 ml, stériliser le mélange à 121°C pendant 20 minutes dans l'autoclave.

Annexe 2 : Le dénombrement cellulaire par comptage sur la cellule de thomas

La cellule de thomas possède un grand carré central (1mm²), ce qui son volume est de 0, 1 mm³ (0, 0001 ml), ce grand carré est subdivisé en 16 carrés, eux même subdivisés en 16 petites carrés, les petites carrés ont 0, 05 mm de côté et une profondeur de 0,1 mm, de sorte que le volume de chaque petit carré est de 0, 00025 mm³ ($2, 5 \cdot 10^{-7}$ ml).

Profondeur : 0, 1 mm

Surface : 0, 0025 mm²

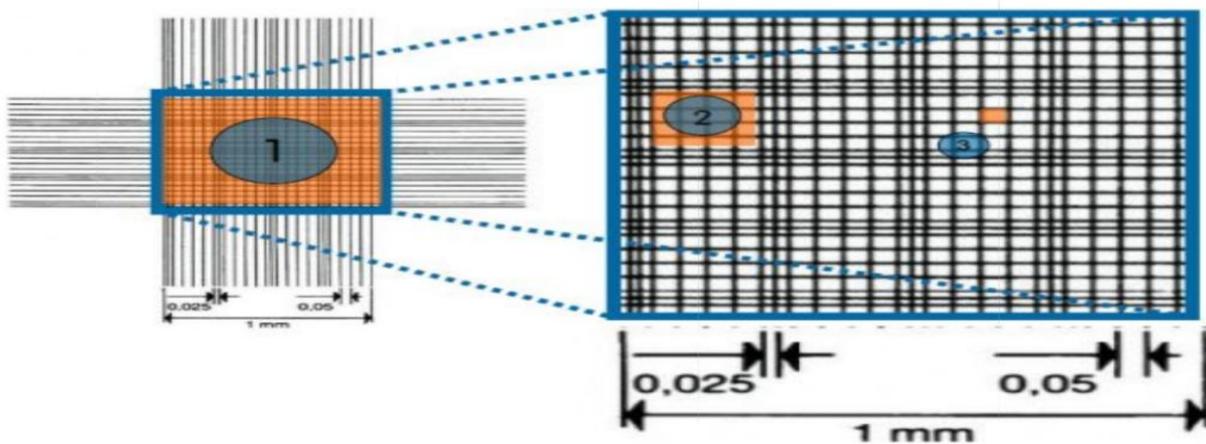
Volume : $0, 0025 \cdot 0,1 = 2, 5 \cdot 10^{-4}$ mm³ = $2, 5 \cdot 10^{-7}$ ml

<p>Nombre des cellules comptés par petit carré x 10³</p> <p>Nombre des cellules/ml = _____</p> <p style="text-align: center;">Volume</p>

$$\text{Nombre des cellules/ml} = \frac{147 \times 10^3}{0,00025} = 588000000 \text{ cellules/ml}$$

$$= 588 \times 10^6 \text{ cellules/ml}$$

Pour une concentration cellulaire de 4×10^6 et par application numérique, nous aurons besoin de : 150 ul



Annexe 3 : Solutions et tampons préparés

Solutions tampon citrate 0,5 M, pH 6,68

Acide citrique (0,5 M) : 5,25 g

Phosphate de sodium (0,5 M) : 29 g

Eau distillé : 1000 ml

Protocole

Dissoudre 5,25 g acide citrique dans 500 ml d'eau distillé.

Dissoudre 29 g phosphate de sodium dans 500 ml d'eau distillé.

Titration à l'aide d'un pH mètre jusqu'à pH 6,68, la solution tampon est conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

Préparation solution de tween 80 (0,02%)

Tween 80 (0,02%) : 0,2 ml

Eau distillé : 1000 ml

Solution tampon phosphate citrate (pH 2-8)

Phosphate de sodium (0,5 M) : 35,505 g

Acide citrique (0,5 M) : 52,532 g

Eau distillé : 1000 ml

Protocole

Dissoudre 35,505 g phosphate de sodium dans 500 ml d'eau distillé.

Dissoudre 52,532 g d'acide citrique dans 500 ml d'eau distillé.

Titration à l'aide d'un pH mètre jusqu'à pH concerné. La solution tampon est conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

Solution tampon glycine NaCl- NaOH (pH 9-12)

Glycine : 3,753 g

NaCl (0,1 N): 2,922 g

NaOH (0,1 N): 2 g

Eau distillé : 1000 ml

Protocole

Solution A

Dissoudre 3,753 g de glycine et 2,922 g NaCl dans 500 ml d'eau distillé.

Solution B

Dissoudre 2 g NaOH dans 500 ml d'eau distillé.

Titration à l'aide d'un pH mètre jusqu'à pH concerné. La solution tampon est conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

Annexe 4 : Milieu de production des enzymes dans les erlenmeyers

Milieu de production optimisé

Dans des erlenmeyers de 500 ml, ajouter :

Son de blé : 21,04 g

CMC : 0,5 g (comme inducteur)

NaNO₃: 2, 5 g

MgSO₄, 7 H₂O: 0, 1 g

PH 6, 68

Humidité 71, 6 % (15 ml)

Annexe 5 : Méthodes de dosage

Dosage d'activité enzymatique

Réactif DNSA

Acide 3,5 dinitrosalicylique : 1 g

NaOH (2N) : 20 ml (dissoudre 40 g de NaOH dans 500 ml d'eau distillé)

Tartrate double Na, K : 30 g

Eau distillé : 50 ml

Protocole

- Dissoudre 1 g d'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillé.
- Ajouter 30 g de tartrate double Na, K.
- Compléter à 100 ml avec l'eau distillé.
- Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière dans un flacon fumé.

Dosage des protéines

Réactifs

Solution A : Carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 2% dans NaOH (0.1N)

Solution B : Tartrate double de sodium et potassium à 2% dans l'eau distillé.

Solution C : Sulfate de cuivre (CuSO_4) à 1% dans l'eau distillé.

Préparer extemporanément la solution réactive D en respectant l'ordre d'addition des réactifs et en agitant bien après chaque addition :

Solution D :

0,5 ml de la solution C.

0,5 ml de la solution B.

50 ml de la solution A.

Réactif de Folin : Le Folin Ciocalteu commercial à dilué au (1/3^{ème}) dans l'eau distillée au moment de l'emploi.

Protocole pour la préparation de la gamme d'étalonnage

- Ajouter à 1 ml d'échantillon, 5 ml de la solution D.
- Agitation et incubation à température ambiante pendant 10 minutes sur la paillasse.
- Ajouter 0,5 ml de réactif de Folin et agiter extemporanément.
- Incuber les tubes à l'obscurité pendant 30 minutes, pour laisser la réaction colorée se développer.
- Lecture de l'absorbance à 650 nm.

Solution de carboxyméthylcellulose (CMC) à 1%

CMC : 0,5 g

Tampon citrate (0,5 M ; pH 6,68) : 50 ml

Protocole

0,5 g de CMC est dissout dans 50 ml de tampon citrate (0,5 M ; pH 6,68), compte-tenu de la grande viscosité et afin une solution homogène, il faut agiter et chauffer jusqu'à dissolution complète.

Annexe 6 : Précipitation au sulfate d'ammonium

Le tableau ci-dessous donne les quantités de sulfate d'ammonium requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C (le tableau indique aussi combien de sel ajouter à une solution qui en contient déjà).

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100



Résumé

Abstract

The objective of this work is the production of cellulase from the yeast *Candida Parapsilosis* CBS 604 T in FMS on an optimized medium based on wheat bran as supports. This medium is enriched with 0.5% of CMC and NaNO₃ and 0.02% of MgSO₄.7H₂O, humidified with a rate of 71.59% and inoculated with 4×10⁶ cells/ml. Also, our attention was accentuated on the study of the characterization of the enzyme and the test of its industrial application.

After incubation of the cultures at 30°C for 48 h, the extracted enzyme exhibits an endoglucanase activity of 7.04 IU/min and a filter paper activity of 320.20 IU/min. Partial purification is carried out by precipitation with ammonium sulphate (40-80%) and dialysis. The enzyme was 3.39 and 2.41 times purified with a specific activity of 697.90 IU/mg and 195.32 IU/mg and a yield of 75.26% and 53.46% for the two activities APF and CMCase respectively.

The results of the enzyme characterization study show that the endoglucanase and APF activities are influenced by several parameters. The effect of pH revealed the presence of two optimum pH of 4.0 and 7.0 for filter paper activity and for endoglucanase, it is maximal (73.006 IU/min) at pH 4.0. We suggest the existence of two APF isoenzymes: APF1 and APF2. Temperature too has an effect on both activities. Their optimal values are obtained at 50°C (184.89 and 20.17 IU/min for endoglucanase and APF at pH 4.0 respectively, and 304.19 IU/min for APF and 13.13 IU/min for AE at pH 7.0).

The results show that *Candida Parapsilosis* cellulases are thermostable. After 180 min at 50°C, APF1 and APF2 maintain 81.87% and 85.71% of the initial activity, while the endoglucanase maintains 56.32%. The divalent cations Mg²⁺, Mn²⁺ and Zn²⁺ cause an increase in cellulase activity, on the other hand Fe²⁺, Na²⁺ and Ca²⁺ inhibit the enzyme. At pH 4, EDTA, ethanol and urea are activators for both activities.

Saccharification of agricultural waste of bananas using cellulase enzymes in which the release of sugar at different incubation periods was achieved and the reducing sugar obtained was 10.8%. On the other hand, the clear juice obtained from the clarification of apple juice indicating the effects of the cellulase enzyme in the mixture. By these characteristics, the cellulase of *Candida Parapsilosis* and it can be intended for several industries to degrade cellulolytic biomass and for other industries such as the agro-food industry for the clarification of juices, namely apple juice.

Keywords : *Candida Parapsilosis*, Endoglucanase, APF, FMS, industrial application.

Résumé

L'objectif de ce travail est la production de cellulase de la levure *Candida Parapsilosis* CBS 604 T en FMS sur un milieu optimisé à base de son de blé comme supports. Ce milieu est enrichi de 0,5% de CMC et NaNO_3 et de 0.02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, humidifié avec un taux de 71,59 % et ensemencé avec 4×10^6 cellules/ml. Aussi, notre attention s'est accentuée sur l'étude de la caractérisation de l'enzyme et l'essai de son application industrielle.

Après l'incubation des cultures à 30°C pendant 48h, l'enzyme extraite présente une activité endoglucanase de 7,04 UI/min et une activité papier filtre de 320,20 UI/min. La purification partielle est effectuée par la précipitation par le sulfate d'ammonium (40-80 %) et la dialyse. L'enzyme a été 3,39 et 2,41 fois purifiée avec une activité spécifique de 697,90 UI/mg et 195,32 UI/mg et un rendement de 75,26% et 53,46 % pour les deux activités APF et CMCcase respectivement.

Les résultats de l'étude de la caractérisation de l'enzyme montrent que les activités endoglucanase et APF sont influencées par plusieurs paramètres. L'effet du pH a révélé la présence de deux pH optimum de 4.0 et 7.0 pour l'activité papier filtre et pour l'endoglucanase, elle est maximale (73,006 UI/min) à pH 4.0. Nous suggérons l'existence de deux isoenzymes de l'APF : APF1 et APF2. La température, aussi, a un effet sur les deux activités. Leurs optimales sont obtenus à 50°C (184,89 et 20,17UI/min pour l'endoglucanase et l'APF à pH 4.0 respectivement, et 304,19UI/min pour l'APF et 13,13 UI/min pour l'AE à pH 7.0).

Les résultats montrent que les cellulases de *Candida Parapsilosis* sont thermostables. Après 180 min à 50°C, l'APF1 et l'APF2 maintiennent 81,87 % et 85,71 % de l'activité initiale, alors que l'endoglucanase maintient 56,32 %. Les cations divalents Mg^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} provoque l'augmentation de l'activité cellulastique, par contre le Fe^{2+} , Na^{2+} et Ca^{2+} inhibe l'enzyme. A pH 4, l'EDTA, l'éthanol et l'urée sont des activateurs pour les deux activités. A pH 7.0, l'APF est inhibé par l'EDTA.

La saccharification de déchets agricoles de bananes à l'aide d'enzymes cellulase dans lesquelles la libération de sucre à différentes périodes d'incubation a été réalisée et le sucre réducteur obtenu était de 10.8%. D'autre part, le jus clair obtenu à partir de la clarification de jus de pomme indiquant les effets de l'enzyme cellulase dans le mélange. Par ces caractéristiques, la cellulase de *Candida Parapsilosis* et elle peut être destinée à plusieurs industries pour dégrader la biomasse cellulolytique et pour d'autres industries comme l'industrie agro-alimentaire pour la clarification des jus à savoir le jus de pomme.

Mots-clefs : *Candida Parapsilosis*, Endoglucanase, APF, FMS, application industrielle.

الملخص

الهدف من هذا العمل هو إنتاج السليلوز من خميرة *Candida Parapsilosis* CBS 604 T في FMS على وسط محس يعتمد على نخالة القمح كدعامات. يتم إثراء هذه الوسيطة بـ 0.5% من CMC و NaNO₃ و 0.02% من MgSO₄·7H₂O، وترطيبها بمعدل 71.59% وتلقيحها بـ 4 × 10⁶ خلية / مل. كما تم التركيز على دراسة توصيف الإنزيم واختبار تطبيقه الصناعي.

بعد حضانة المزارع عند 30 درجة مئوية لمدة 48 ساعة، يُظهر الإنزيم المستخلص نشاط إندوجلوكاناز يبلغ 7.04 وحدة دولية / دقيقة ونشاط ورق ترشيح 320.20 وحدة دولية / دقيقة. يتم التنقية الجزئية عن طريق الترسيب بكبريتات الأمونيوم (40-80%) وغسيل الكلى. كان ال انزيم 3.39 و 2.41 مرة واحدة مع نشاط معين من 697.90 وحدة دولية/ مجم و 195.32 وحدة دولية / مجم وعائد 75.26% و 53.46% للنشاطين APF و CMCCase على التوالي. أظهرت نتائج دراسة توصيف الإنزيم أن أنشطة endoglucanase و APF تتأثر بعدة عوامل. أظهر تأثير الأس الهيدروجيني وجود اثنين من الأس الهيدروجيني الأمثل 4.0 و 7.0 لنشاط ورق الترشيح، أما بالنسبة للاندوغلوكاناز، فهو أقصى (73.006 وحدة دولية / دقيقة) عند الرقم الهيدروجيني 4.0. نقترح وجود اثنين من نظائر APF: APF1 و APF2. تؤثر درجة الحرارة أيضًا على كلا النشاطين. يتم الحصول على القيم المثلى عند 50 درجة مئوية (184.89 و 20.17 وحدة دولية / دقيقة للاندوغلوكاناز و APF عند درجة الحموضة 4.0 على التوالي، و 304.19 وحدة دولية / دقيقة لـ APF و 13.13 وحدة دولية / دقيقة لـ AE عند درجة الحموضة 7.0). تظهر النتائج أن المبيضات السليلوزية هي مقاومة للحرارة. بعد 180 دقيقة عند 50 درجة مئوية، يحافظ APF1 و APF2 على 81.87% و 71.85% من النشاط الأولي، بينما الإندوغلوكاناز يحافظ على 56.32%. تسبب الكاتيونات ثنائية التكافؤ Mg²⁺ و Mn²⁺ و Zn²⁺ زيادة في نشاط السليولاز، من ناحية أخرى، تمنع Fe²⁺ و Na²⁺ و Ca²⁺ الإنزيم. عند درجة الحموضة 4، يعتبر EDTA والإيثانول واليوريا منشطات لكلا النشاطين. عند درجة الحموضة 7.0، يتم تثبيط APF بواسطة β-mercaptoethanol و EDTA. ليس لهما أي تأثير على النشاطين.

تهدئة المخلفات الزراعية للموز باستخدام إنزيمات السليولاز والتي تم فيها إطلاق السكر في فترات حضانة مختلفة وكان السكر المختزل الناتج 10.8%. من ناحية أخرى، يشير العصير الصافي الناتج من تصفية عصير التفاح إلى تأثيرات إنزيم السليولاز في الخليط. من خلال هذه الخصائص، يمكن أن يكون السليولاز من *Candida Parapsilosis* ويمكن أن يكون مخصصًا للعديد من الصناعات لتحطيم الكتلة الحيوية السيلولوليتية والصناعات أخرى مثل صناعة الأغذية الزراعية لتصفية العصائر، أي عصير التفاح.

الكلمات المفتاحية: داء المبيضات، Endoglucanase، APF، FMS، التطبيقات الصناعية.

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : AIECH Sabrine
LAYAICHA Linda

Etude de la production cellulasique chez *Candida parapsilosis* : purification partielle de l'enzyme et détermination de ses paramètres physico-chimiques et cinétiques

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée

L'objectif de ce travail est la production de cellulase de la levure *Candida Parapsilosis* CBS 604 T en FMS sur un milieu optimisé à base de son de blé comme supports. Ce milieu est enrichi de 0,5% de CMC et NaNO_3 et de 0.02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, humidifié avec un taux de 71, 59 % et ensemencé avec 4×10^6 cellules/ml. Aussi, notre attention s'est accentuée sur l'étude de la caractérisation de l'enzyme et l'essai de son application industrielle.

Après l'incubation des cultures à 30°C pendant 48h, l'enzyme extraite présente une activité endoglucanase de 7,04 UI/min et une activité papier filtre de 320,20 UI/min. La purification partielle est effectuée par la précipitation par le sulfate d'ammonium (40-80 %) et la dialyse. L'enzyme a été 3,39 et 2,41 fois purifiée avec une activité spécifique de 697,90 UI/mg et 195,32 UI/mg et un rendement de 75,26% et 53,46 % pour les deux activités APF et CMCcase respectivement.

Les résultats de l'étude de la caractérisation de l'enzyme montrent que les activités endoglucanase et APF sont influencées par plusieurs paramètres. L'effet du pH a révélé la présence de deux pH optimum de 4.0 et 7.0 pour l'activité papier filtre et pour l'endoglucanase, elle est maximale (73,006 UI/min) à pH 4.0. Nous suggérons l'existence de deux isoenzymes de l'APF : APF1 et APF2. La température, aussi, a un effet sur les deux activités. Leurs optimales sont obtenus à 50°C (184,89 et 20,17UI/min pour l'endoglucanase et l'APF à pH 4.0 respectivement, et 304,19UI/min pour l'APF et 13,13 UI/min pour l'AE à pH 7.0).

Les résultats montrent que les cellulases de *Candida Parapsilosis* sont thermostables. Après 180 min à 50°C, l'APF1 et l'APF2 maintiennent 81,87 % et 85,71 % de l'activité initiale, alors que l'endoglucanase maintient 56,32 %. Les cations divalents Mg^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} provoque l'augmentation de l'activité cellulasique, par contre le Fe^{2+} , Na^{2+} et Ca^{2+} inhibe l'enzyme. A pH 4, l'EDTA, l'éthanol et l'urée sont des activateurs pour les deux activités. A pH 7.0, l'APF est inhibé par l'EDTA.

La saccharification de déchets agricoles de bananes à l'aide d'enzymes cellulase dans lesquelles la libération de sucre à différentes périodes d'incubation a été réalisée et le sucre réducteur obtenu était de 10.8%. D'autre part, le jus clair obtenu à partir de la clarification de jus de pomme indiquant les effets de l'enzyme cellulase dans le mélange. Par ces caractéristiques, la cellulase de *Candida Parapsilosis* et elle peut être destinée à plusieurs industries pour dégrader la biomasse cellulolytique et pour d'autres industries comme l'industrie agro-alimentaire pour la clarification des jus à savoir le jus de pomme.

Mots-clefs : *Candida Parapsilosis*, Endoglucanase, APF, FMS, application industrielle

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Génie Microbiologique et Application (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : DAKHMOUCHE S (MCA – ENS Assia Djébar, Constantine 1).

Examineur 1 : BENNAAMOUN L (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : BAGHRICHE I (MAA - ENS Assia Djébar, Constantine 1).