



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie, Option : Biotechnologie des Mycètes : Fermentation  
et production de substances fongiques

Intitulé :

---

**Activités hydrolases des souches fongiques.  
Production par fermentation de cellulase et d' $\alpha$ -amylase par  
*Penicillium. sp* sur substrat solide**

---

Présenté et soutenu par : MEZIANI Amina

Le : 12/06/2017

MAHCENE Hadjer

Jury d'évaluation :

Présidente : Mme. MIHOUBI Ithem.

Prof. Univ. Des Frères Mentouri Constantine1

Rapporteur : Mme. LEGHLIMI Hind.

MC B. Univ .Des Frères Mentouri Constantine1

Examinatrice: Melle. ABDELAZIZ Wided.

MAA. Univ. Des Frères Mentouri Constantine 1.

*Année universitaire  
2016 - 2017*

## Table des matières :

**Abréviation**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction générale.....1**

### **Revue bibliographique**

#### **Partie 01 : Les Enzymes Hydrolases**

1. L'α-amylase.....	3
1.1. Définition .....	3
1.2. Nomenclature .....	3
1.3. Mode d'action de l'α-amylase.....	3
1.4. Les microorganismes producteurs de l'α-amylase.....	5
1.5. Utilisation industrielle de l'α-amylase.....	5
2. La cellulase.....	6
2.1. Définition.....	6
2.2. Nomenclature.....	7
2.3. Mode d'action de la cellulase.....	7
2.4. Les microorganismes producteurs de la cellulase.....	8
2.5. Utilisation industrielle de la cellulase.....	8
3. La pectinase.....	10
3.1. Définition.....	10
3.2. Nomenclature.....	10
3.3. Mode d'action de la pectinase.....	10
3.4. Les microorganismes producteurs de la pectinase.....	12
3.5. Utilisation industrielle de la pectinase.....	12

#### **Partie 02 : Les Moisissures**

1. Principaux genres fongiques.....	13
2. Identification des moisissures.....	14
2.1. Analyse morphologique.....	14
3. Rôle des moisissures.....	15
3.1. L'industrie alimentaire.....	15

3.2. L'industrie pharmaceutique .....	15
---------------------------------------	----

## **Partie 03 : fermentation sur milieu solide et matière première**

### **1. La fermentation sur milieu solide**

1.1. Définition.....	16
1.2. Avantages de la fermentation solide.....	16
1.3. Inconvénients des fermentations solides.....	17
1.4. Les étapes suivies en fermentations solides.....	18
1.4.1. La préparation du substrat carboné.....	18
1.4.2. L'inoculation du milieu de culture .....	19
1.4.3. Les facteurs influençant la fermentation en milieu solide.....	19
1.5. Applications de la fermentation solide.....	20

### **2. La matière première**

2.1. Le Son de blé.....	21
2.2. Rôle de son de blé.....	22
2.3. Utilisation du son de blé.....	22

### **Matériels et méthodes**

1. Origines et réactivation des souches fongiques.....	23
2. Mise en évidence des activités hydrolases sur milieux gélosés.....	24
2.1. Activité amylolytique.....	24
2.2. Activité cellulolytique.....	24
2.3. Activité pectinolytique .....	24
3. Etude de la production des enzymes cellulase et $\alpha$ -amylase par la souche <i>Penicillium. sp</i> par fermentation en milieu solide.....	25
3.1. Matière première.....	25
3.2. Microorganisme.....	25
3.2.1. Identification de la souche <i>penicillium. sp</i> .....	25
3.2.2. Préparation de l'inoculum.....	26
3.2.3. Dénombrement des spores.....	26
3.2.4. Conservation des souches.....	26
3.3. Préparation des fermentations en milieu solide.....	26

4. Méthodes analytiques.....	28
4.1. Dosage des activités cellulolytiques.....	28
4.2. Dosage de l'activité $\alpha$ -amylasique.....	29
4.3. Mesure de l'humidité.....	30

## **Résultats et discussion**

1. Activités hydrolases sur milieux gélosés.....	31
1.1. Activité amylase.....	32
1.2. Activité cellulase.....	33
1.3. Activité pectinase.....	34
2. Identification de la souche <i>Penicillium.sp.</i> .....	35
3. Production des enzymes cellulase et $\alpha$ -amylase par <i>Penicillium chrysogenum</i> cultivé sur substrat solide.....	38
3.1. Suivi cinétique de la production de la cellulase par <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	38
3.2. Suivi cinétique de la production de l' $\alpha$ -amylase par <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	40
3.3. Humidité à la fin de la fermentation.....	42
<b>Conclusion et perspective</b> .....	43
<b>Résumé</b> .....	44
<b>Références bibliographiques</b> .....	47
<b>Annexes</b> .....	55

# Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout puissant, qui en son nom et avec*

*Sa protection, nous avons réussi à réaliser ce travail.*

*Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect au jury*

*Pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce mémoire :*

*M<sup>me</sup> MIHOUBI ILHEM .En tant que présidente du jury*

*M<sup>lle</sup> ABDELAZIZ WEDED en tant qu'examinatrice*

*Nos profonds remerciements et notre gratitude s'adressent à notre encadreur*

*M<sup>me</sup> LEGHLIMI HIND pour sa précieuse aide, ses orientations et le temps qu'elle*

*Nous a accordé pour notre encadrement.*

*Nous remercions également l'ensemble du personnel du laboratoire de*

*Microbiologie et de Zoologie surtout :*

*Mr BOUDERSA YACER, et Mme BOUHOUCHE MOUNA*

## *Dédicace*

*Grace à Allah et avec sa faveur, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie  
A celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse et le courage*

*A celle qui attend chaleureusement ce jour:*

*«Ma grand-mère hadja ZEINEB »*

*A mes chers parents : ma mère WASSILA et mon père BACHIR,*

*Pour leur aide et ceux qui m'ont toujours encouragé.*

*A mes adorables sœurs : SOUSSOU et HANANE*

*A mes cousines : NORHEN, SARA, MALEK, INESS*

*A mon petit prince : NISSOU*

*A mes oncles, tantes et toute la famille MEZIANI et GUENDOZ*

*A mes adorables copines : FAYZA, HALLA, IMENE, AMIRA, FATIHA,  
YOUSSRA, LOUBNA, NASSIRA, pour leurs gentillesse, leurs tendresses et*

*leurs grand cœur, merci les filles vous étiez toujours là pour*

*me soutenir, m'aider et m'écouter.*

*À mon binôme HADJER, on a passé des bons moments ensemble*

*A toute la promotion de Biotechnologie des Mycètes 2016-2017*

*A toutes les personnes qui de près et de loin m'ont apportée leur aide A tous, du  
fond de mon cœur je vous dédie ce travail*

*AMINA*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail ...*

*Au meilleur papa du monde, mon héros, l'homme qui s'est sacrifié pour me voir réussir dans ma vie, et pour me rendre heureuse, que Dieu le garde dans son vaste paradis.*

*A mon paradis sur terre, ma femme unique, ma vie et la source de mon bonheur « ma mère », qui m'a guidé vers le bon chemin, et qui a fait le possible pour me voir réaliser mes rêves.*

*Aux personnes qui m'ont énormément aidée et encouragée : Mes très chers frères « OUSSAMA, ISSLEM, KHALIL » et ma petite ange « MALEK », que Dieu les garde et les protège.*

*A mon grand père et ma grande mère, ainsi à mes chères tantes MIMI et SORAYA pour leur soutien moral le long de ce travail.*

*A mes adorables copines « ROKIA, KHAOULA, SARA SANDRA, SOUMIA, NESRINE, YOUSRA, LOUBNA », celles qui ont toujours été présente pour moi et toujours m'aidée, écoutée et encouragée tout au long de mon parcours.*

*A CHEMS EDDINE qui m'a soutenu et encouragé pendant tous les moments difficiles vécus.*

*À mon binôme AMINA, On a vécu cette aventure ensemble. On est devenu plus patient et on a appris que tout est possible quand on a la bonne volonté.*

*A tous nos professeurs qui nous ont enseigné et tous ceux qui nous sont chers.*

*Hadjer*

## Abréviations

**APF** : Activité papier filtre

**A<sub>w</sub>** : Activité de l'eau

**CMC** : Carboxyméthylcellulose

**DNS** : Acide 3,5 dinitrosalicylique

**EC** : Enzyme commission

**EG** : Endoglucanases

**ES** : Le complexe enzyme - substrat

**G** : Grossissement

**PDA**: Potato dextrose agar

**PE**: Pectines estérases

**PGL** : Polygalacturonate lyase

**PGA** : Acide polygalacturonique

**PG** : Polygalacturonases

**PMG** : Polyméthyl-galacturonase

**PMGL** : Polyméthyl-galacturonate lyase

**Sab** : Sabouraud

**SSF** : Fermentation de substrats solides

**UFC** : Unités formatrices de colonies

## Liste des figures

### Revue bibliographique

<b>Figure 1</b> : Mode de d'action de l' $\alpha$ -amylase.....	4
<b>Figure 2</b> : Mode d'action de divers composants de la cellulase.....	7
<b>Figure 3</b> : Mode d'action de la pectinase.....	11
<b>Figure 4</b> : Les différentes couches cellulaires constitutives du son de blé industriel.....	21

### Matériel et méthodes

<b>Figure 5</b> : <i>Penicillium sp</i> (A), <i>Aspergillus terreus</i> (B) et <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (C) après 7 jours d'incubation à 30°C.....	22
<b>Figure 6</b> : Préparation de l'inoculum et fermentation sur milieu solide.....	26
<b>Figure 7</b> : Courbe étalon du glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase.....	28
<b>Figure 8</b> : Courbe étalon du maltose pour le dosage de l'activité $\alpha$ -amylase.....	29

### Résultats et discussion

<b>Figure 9</b> : Principe de révélation de l'activité amylase par le lugol.....	31
<b>Figure 10</b> : Révélation par le « Rouge Congo » de l'activité cellulase.....	32
<b>Figure 11</b> : Principe de révélation de l'activité pectinolytique par l'acétate de cuivre.....	33
<b>Figure 12</b> : Observation microscopique de <i>penicillium chrysogenum</i> a, b et c : notre résultat au microscope Optique au Gx40, d : photo de référence.....	36
<b>Figure 13</b> : Activités cellulolytiques produites par <i>Penicillium chrysogenum</i> sur son de blé à 30°C (a : activité APF, b : activité endoglucanase).....	37
<b>Figure 14</b> : Activités amylolytiques produites par <i>Penicillium chrysogenum</i> sur son de blé à 30°C.....	39

## Liste des tableaux

### Revue bibliographique

<b>Tableau 1</b> : Les principaux microorganismes producteurs d'α-amylase.....	5
<b>Tableau 2</b> : Les Applications industrielles de l'alpha- amylase.....	6
<b>Tableau 3</b> : Exemples de microorganismes producteur de cellulase.....	8
<b>Tableau 4</b> : Les Applications industrielles de la cellulase.....	9
<b>Tableau 5</b> : Exemples des microorganismes producteur de la pectinase.....	12

### Discussion et résultat

<b>Tableau 6</b> : Zones d'hydrolyse des souches testées après 5 jours incubation à 30°C.....	30
<b>Tableau 7</b> : Diamètre (mm) des zones d'hydrolyse des souches testées.....	31
<b>Tableau 8</b> : Caractères macroscopiques de la souche <i>Penicillium. sp</i> sur milieu Sabouraud...	35
<b>Tableau 9</b> : Humidité mesurée après chaque prélèvement.....	41



*Introduction  
Générale*

Jusqu'au début des années 1970, on a considéré que les plantes et les animaux étaient les meilleures sources d'enzymes. Cependant, différents microorganismes ont été intensivement utilisés pour la biosynthèse des enzymes hydrolytiques (Fogarty et Kelly, 1980 ; Nigam et Singh, 1995).

Les enzymes d'origine microbienne présentent des propriétés et des spécificités diverses. Ces propriétés reflètent de plus en plus leurs utilisations dans divers domaines d'applications, tels que l'industrie alimentaire humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (Botton *et al.*, 1990). Appartenant aux enzymes de la famille des hydrolases telles que, l' $\alpha$ -amylase, la cellulase, la pectinase sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (Little, 2004).

Toutefois, la production des enzymes hydrolases particulièrement les amylases et les cellulases par des procédés biotechnologiques (fermentations), nécessite non seulement l'identification et la sélection des microorganismes amylolytiques, et cellulolytiques mais également le choix d'un substrat de fermentation à faible coût d'une part, et convenable en point de vue composition en élément nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et la production des enzymes, d'autre part.

Les moisissures disposent des potentialités d'applications biotechnologiques très étendues, grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé (Leveau et Bouix, 1993). Ces microorganismes peuvent cohabiter dans des environnements extrêmes où les conditions de vie sont particulières : température et pression élevées, pH acides, représentent une importante source à exploiter pour développer des procédés biotechnologiques nouveaux (Bhat, 2000 ; Peciulyte, 2007). La culture des champignons pour la production d'enzymes s'effectue soit sur substrat solide, soit en culture submergée comme c'est le cas pour la production de la plupart des métabolites d'origine microbienne. Au cours des trente dernières années, un nombre important de ces fermentations est réalisé sur des déchets agroalimentaires pour produire principalement des hydrolases.

Nous avons choisi les moisissures comme agents de fermentation, vu leur place importante sur le marché des enzymes amylolytiques, cellulolytiques et pectinolytiques et leur remarquable capacité à coloniser et à exploiter une grande variété de substrats (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron 1996).

Le son de blé est un des substrats les plus attractifs, est utilisé en fermentation en milieu solide pour la production d'enzymes, de métabolites secondaires et autres produits d'intérêt

biotechnologiques. Il a pour avantage de faciliter la pénétration du mycélium dans le substrat et d'être bon marché.

Le son de blé a une bonne capacité de rétention de l'eau pouvant aller jusqu'à 80% (Abdullah *et al.*, 1985). Ainsi, il est possible de travailler avec une humidité importante permettant une bonne croissance des champignons.

Dans de notre étude :

Nous avons étudié les activités hydrolases de souches fongiques sur milieux gélosés, afin de sélectionner la souche la plus performante dans la production des enzymes hydrolases. Après, nous procédons à identifier la souche de *Penicillium. sp.* Enfin, étudier les profils cinétiques de production, par fermentation solide sur son de blé, de la cellulase et de l'alpha-amylase par la souche sélectionnée dont le but est de déterminer le temps optimal de cette production.



*Revue  
bibliographique*

*Partie01 :*  
*Les enzymes hydrolases*

---

Les enzymes hydrolases ce sont des enzymes de dégradation. Elles provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes, elles sont activables par des cations. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, liaisons O-O des peroxydes, C-N des amides (Bornscheuer, 2002). Il est très difficile de les classer. Le plus simple est d'étudier leur action sur quelques groupes de molécules. Généralement les hydrolases, sont produites par les champignons. Il s'agit d'enzymes endocellulaires (catalase, lactase et invertase) ou exocellulaires (amylases, cellulases, pectinases et protéases).

## 1. Alpha-amylase

### 1.1. Définition

L' $\alpha$ -amylase, comme toute enzyme, est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est d'hydrolyser l'amidon (Mercier, 1985).

L' $\alpha$ -amylase [ $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4)-D-glucaneglucanohydrolase (E.C.3.2.1.1)] est une endoamylase qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques de (1  $\rightarrow$  4) l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et de du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes (Mercier, 1985 et Keating *et al.*, 1998).

### 1.2. Nomenclature

- **Nom codifié:** EC 3.2.1.1
- **Nom commun:**  $\alpha$ -amylase
- **D'autre nom (s):** glycogénase,  $\alpha$ -amylase; endoamylase ; Taka-amylase A, maxilase...
- **Nom systématique:** 1,4 – alpha -D-glucane, 4glucanohydrolase (Schwimmer et Balls, 1949, Fischer et Stein, 1960 et Manners, 1962)

### 1.3. Mode d'action

L'amidon est un composé glucidique abondant et peu coûteux, dont la fonctionnalité et la valeur ajoutée peuvent être améliorées par un ensemble de modifications physiques, chimiques et/ou enzymatiques, afin de répondre à des besoins technologiques ou nutritionnels spécifiques (Buelon *et al.*, 1990). L' $\alpha$ - amylase par sa capacité à modifier un certain nombre des propriétés de l'amidon, participe à de nombreuses applications, permettant de fabriquer des sucres adaptés aux demandes spécifiques des utilisateurs en industrie alimentaire (Palmer,

## Revue bibliographique

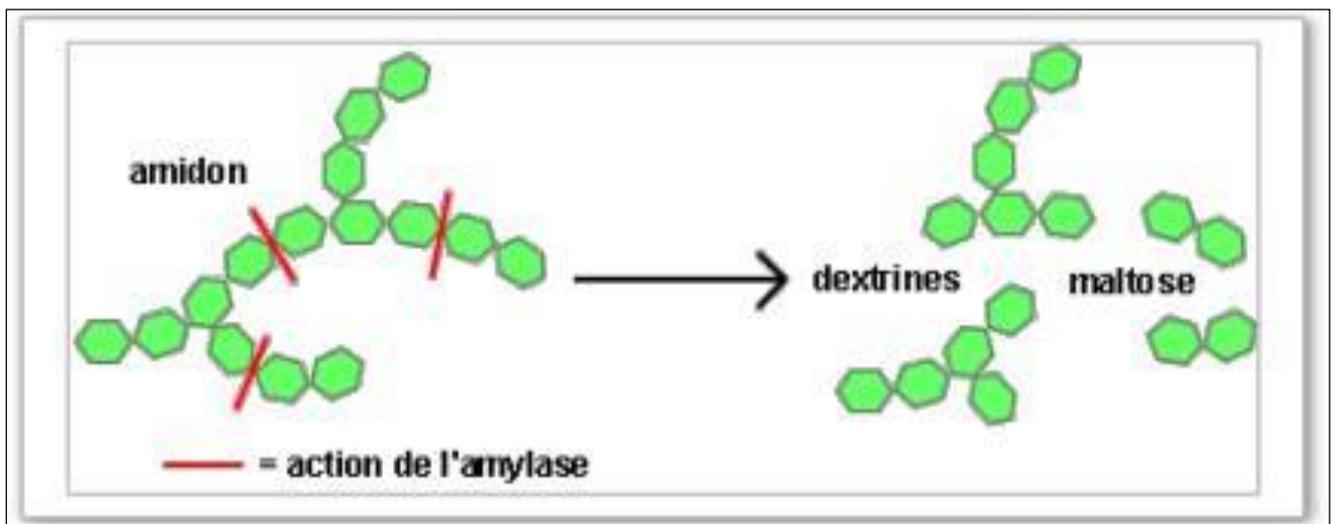
1975). L' $\alpha$ -amylase agit sur les polysaccharides (amidon, glycogène) et les oligosaccharides (figure 1). Elle hydrolyse les liaisons glucosidiques ( $\alpha$ -1,4) de l'amidon et des substrats relatifs (Heslot, 1996). Son action peut se faire de différentes façons :

-Attaque aléatoire, en coupant les liaisons ( $\alpha$ -1,4) à partir de l'extrémité non réductrice. Il en résultera, principalement, la formation de glucose, de maltose et surtout d' $\alpha$  -dextrines (Scriban, 1999).

- Mécanisme uni-chaîne où l' $\alpha$ -amylase dégrade une chaîne avant de passer à l'autre. Cette action est due à la formation du complexe actif avec le premier substrat. L'enzyme catalyse la réaction et ne forme pas de complexes actifs, jusqu' à l'achèvement de la dégradation de la première chaîne (Berry et Paterson, 1990).

- Mécanisme multi-chaîne, la dégradation des chaînes est simultanée (Pazur et Marchetti, 1992).

- Attaque multiple ou répétitive, le déplacement de l'enzyme, fixée tout au long de la chaîne, conduit à plusieurs hydrolyses avant la dissociation du complexe enzyme-substrat (Nakatani, 1996 ; Kandra *et al.*, 1997).



**Figure 1:** Mode de d'action de l' $\alpha$ -amylase (Florimont, 2013).

## 1.4. Les microorganismes producteurs de l' $\alpha$ -amylase

Les principaux microorganismes producteurs de l' $\alpha$ -amylase sont consignés dans le tableau 1.

**Tableau 1:** Les principaux microorganismes producteurs d' $\alpha$ -amylase.

Microorganismes	Espèces	Références
<b>Moisissures</b>	<i>Penicillium fellutanum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Kathiresan et Mannivanan (2006) ; Ertan et Balkan (2007).
	<i>Rhizopus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i>	Akbache et Bariout, 2007; Mama, 2009; Açourène et Ammouche , 2011)
	<i>Alternaria Alternata</i>	Lateef <i>et al.</i> , (2004)
<b>Levures</b>	<i>Candida guilliermondii</i>	Akbache et Bariout, 2007; Mama, 2009; Açourène et Ammouche , 2011)
	<i>Candida tropicalis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Liese <i>et al.</i> , 2000).
<b>Bactéries</b>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Lanuginosus thermomyces</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Tamura (1993).  (Liese <i>et al.</i> , 2000).

## 1.5. Utilisation industrielle de l' $\alpha$ -amylase

Les  $\alpha$ -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels autres qu'alimentaires (industrie pharmaceutique, textile, papeterie et détergents), en raison de leur productivité et thermostabilité (Burhan *et al.*, 2003) (tableau 2).

# Revue bibliographique

**Tableau 2:** Les Applications industrielles de l'alpha- amylase.

<b>Industries</b>	<b>Applications</b>
<b>Glucoserie</b>	Solubilisation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité (liquéfaction).
<b>Sucrierie</b>	Réduction de la viscosité des sirops de cannes à sucre, en hydrolysant les contaminants amylicés pour réussir le processus de cristallisation.
<b>Biscuiterie et Panification</b>	Amélioration de la propriété rhéologique et fermentaires de la pâte, ainsi que la coloration de la croûte.
<b>Industrie textile</b>	Le désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage.
<b>Papeterie</b>	Liquéfaction de l'amidon pour préparer des sauces découchage, permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille.
<b>Détergents</b>	Dégradation des taches à base d'amidon. Les oligosaccharides et les dextrans libérés de l'action hydrolytique sont solubles, par conséquent, la tâche est physiquement découpée.
<b>Industrie Pharmaceutique</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Agent anti-inflammatoire.</li><li>- Traitement du diabète et de l'obésité.</li></ul>

## 2. La cellulase

### 2.1. Définition

La cellulase se rapporte à un groupe d'enzymes qui, agissant ensemble. Elle est produite principalement par les moisissures, les bactéries et autres organismes cellulolytiques. L'enzyme de cellulase qui peut hydrolyser la cellulose en sucres simples (Kader ,1999 ; Korish, 2003), formant un système enzymatique complexe.

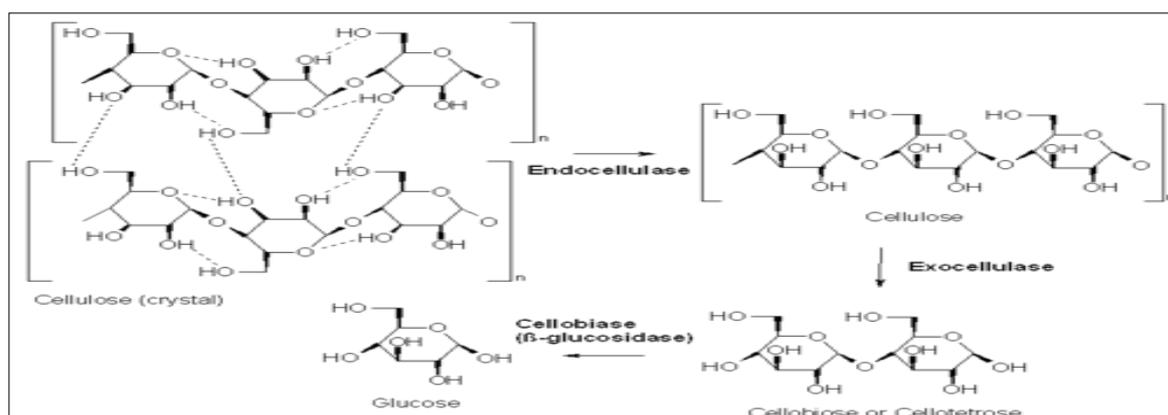
## 2.2. Nomenclature

- **Nom codifié** : E.C.3.2.1.4
- **Nom systématique** : 1,4-(1,3 ; 1,4)-  $\beta$ -D-Glucan 4-glucanohydrolase.
- **Nom recommandé** : Cellulase.
- **Synonymes** : Endoglucanase, Endo-1,4- $\beta$ -Glucanase, Cellulase carboxyméthylque, ect. (Schamburg and Salzman, 1991).

## 2.3. Mode d'action

Les cellulases sont maintenant classées selon leur structure, comme toutes les enzymes agissant sur les sucres. Il existe trois types d'activités enzymatiques cellulolytiques complémentaires pour l'hydrolyse totale de la cellulose (figure 2) (Scriban, 1993).

- **Endo-1,4- $\beta$ -glucanases**: Ces endoglucanases (EG) attaquent au hasard les liaisons Oglycosidiques internes donnant ainsi des chaînes glucanes de différentes longueurs.
- **Exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases**: Agissent sur les extrémités de la chaîne de la cellulose et libèrent le  $\beta$ -cellobiose comme produit final.
- **$\beta$ -glucosidases**: Douées d'une action spécifique sur les disaccharides «  $\beta$ -cellobiose » et produisent le glucose (E.A.Bayer et *al.*, 1994 ; Singh, 1999).



**Figure 2:** Mode d'action de divers composants de la cellulase ([Karmakar et Ray2011](#)).

### 2.4. Les microorganismes producteurs de la cellulase

Le tableau 3 regroupe les différents microorganismes producteurs de la cellulase.

**Tableau 3:** Exemples des microorganismes producteur de la cellulase (Béguin et Aubert, 1992).

Microorganismes	Espèces
<b>Moisissures</b>	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i> , <i>Piromonas commmunis</i> , <i>Chytridomycètes</i> , <i>Trichoderma viridae</i> , <i>T. reesei</i> , <i>T. koningii</i> , <i>Aspergillus aculeatus</i> , <i>A.nidulans</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Sporotrichumpulver lentum</i> , <i>Chaetomium cellulolyticum</i> , <i>Humicolain solens</i>
<b>Levures</b>	<i>Candida molischiana</i> , <i>C. pulcherrima</i> , <i>C. stellata</i> , <i>C. wickerhamii</i> , <i>Cryptococcus flavus</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Rhodotorulaglu</i> , <i>Saccharomyces fibuligeratinis</i> , <i>Trichosporon cutanum</i>
<b>Bactéries</b>	<b>Aérobies :</b> <i>Sporocytophaga</i> , <i>Myxococcoides</i> , <i>Baccillussubtilis</i> , <i>Cellulomonas</i> et <i>Pseudomonas</i> <b>Anaérobies strictes :</b> <i>Clostridium thermocellum</i> , <i>C. stercorarium</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>R. flavefasciens</i> , <i>Bactéroï des succinogenes</i> <b>Anaérobies facultatives :</b> <i>Erwinia chrysantharum</i> <b>Anaérobies strictes:</b> <i>Clostridium thermocellum</i> , <i>C. stercorarium</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>R. flavefasciens</i> et <i>Bactéroï des succinogenes</i>
<b>Actinomycètes</b>	<i>Thermomonospora fusca</i> , <i>Cellulomonas fimi</i> , <i>C.bioazotea</i> , <i>C.uda</i> , <i>Streptomyces drozdowiczii</i> , <i>S.lividans</i>

### 2.5. Utilisation industrielle de la cellulase

En outre, les cellulases étaient commercialement valables pour plus de 30ans, et présentaient une cible pour les recherches académiques comme celles industrielles (Singh.A, 1999 *et al.*, 2007).son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui une fois fermentée permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et

## Revue bibliographique

---

acides organiques notamment des gras volatiles d'où l'importance, écologique et industrielle, considérable des cellulases (Receveur *et al.*, 2002) ce qui revoie à différentes applications industrielles (tableau 04).

**Tableau 4:** Les Applications industrielles de la cellulase.

<b>Industries</b>	<b>Applications</b>
<b>Alimentaires</b>	Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993). Des traitements de différents produits pour améliorer leurs qualités, où les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes.
<b>des textiles et des détergents</b>	Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par élimination des tâches (Gusakov <i>et al.</i> , 2007). Elles sont utilisées aussi dans les lessives afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (Maurer, 1997 ; Cavako-Paulo, 1998).
<b>Papeterie</b>	Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1993).
<b>Nutrition animale</b>	utilisées comme additifs dans l'alimentation animale car l'addition des cellulases, aux aliments pour porcins, améliore leur digestibilité, ce qui réduit l'excrétion de cellulose non digérée (et donc diminue la charge polluante des excréments) (Scriban, 1993 ; Gusakov <i>et al.</i> , 2000)
<b>Thérapeutique</b>	L'utilisation quasi confidentielle de certaines cellulases dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive (Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1993).

## 3. La pectinase

### 3.1. Définition

Les enzymes pectinolytiques « pectinases » constituent un groupe unique, complexe et hétérogène de différentes enzymes agissant spécifiquement sur les substrats pectinolytiques, notamment les polymères de pectine qui représentent le polysaccharide majeur de la paroi cellulaire primaire et la lamelle moyenne de la paroi végétale. Cette action se résume dans le scindement de l'acide polygalacturonique (PGA) en acide monogalacturonique, ouvrant ainsi les liaisons glycosidiques, réduisant l'adhésion intracellulaire et la rigidité tissulaire (Tatiana dacosta et Flevo, 2005 ; Fogarty et Kelly, 1983). Ce qui aboutit par conséquent à la dégradation de la paroi cellulaire, l'éclatement des cellules, et donc, au symptôme de macération (Bateman et Basham, 1976).

### 3.2. Nomenclature

- **Nom:** polygalacturonase
- **Réaction:** hydrolyse aléatoire de (1 → 4) -α- D des liens -galactosiduronic dans pectate et autres galacturonanes
- **Autre nom :** pectine dépolymérase ; pectinase; endopolygalacturonase; pectolase; hydrolase de pectine; polygalacturonase pectine.

### 3.3. Mode d'action

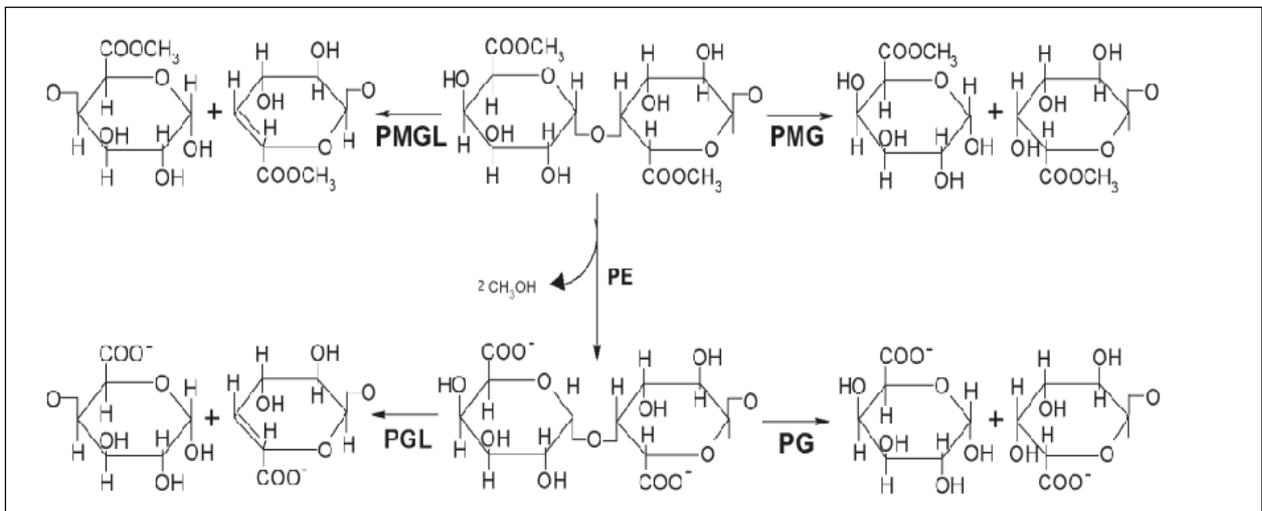
il est important de mentionner que les pectinases peuvent être classées en se basant sur la nature du substrat (pectine, acide pectique et oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (Favela-Torres et al., 2006) en deux groupes principaux d'enzymes dont les propriétés et le mode d'action sont les pectines estérases (PE) et dépolymérases (polygalacturonases et lyases) (figure 3).

- **Les pectines estérases (PE) :** Catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques adjacents à un groupe carboxyle libre des pectines, enlevant ainsi les groupes méthyles de la chaîne les uns après les autres dans une direction donnée. Le résultat est la libération du méthanol et la formation du PGA (Sakai *et al*, 1993). Leur mode d'action reste toujours mal élucidé. Selon Jayani *et al* (2005), le mécanisme d'attaque des PE varie en fonction de

## Revue bibliographique

leur origine. L'activité des PE peut être suivie soit par le dosage du méthanol libéré, soit par la détermination de l'augmentation du nombre des carboxyles libres, ou encore en utilisant un régulateur du pH puisque, l'ionisation du groupe carboxyle produit dans le milieu un proton causant une variation du pH (Jayani *et al*, 2005).

- **Dépolymérase (polygalacturonases et lyases) :** Sont des hydrolases qui possèdent des activités endo- ou exogalacturonases. En fonction du substrat et du mécanisme de clivage des liaisons glycosidiques, on distingue quatre catégories différentes : Les PG et les PMG: qui agissent respectivement sur les pectates et les pectines par hydrolyse. Les PGL et les PMGL: agissant par  $\beta$ -élimination sur les pectates et les pectines respectivement. (Alkorta *et al*, 1998). Suivant le mode d'attaque, la réaction peut se faire soit de manière aléatoire ou bien de l'extrémité de la chaîne. Ce qui permet la distinction des endo- et des exo-dépolymérase (Jayani *et al*, 2005).



**Figure 3:** Mode d'action de la pectinase (Jayani *et al*, 2005).

### 3.4. Les microorganismes producteurs de la pectinase

Les microorganismes producteurs de la pectinase sont récapitulés dans le tableau 5.

**Tableau 5:** Exemples des microorganismes producteur de la pectinase.

Microorganismes	Espèces	Références
Moisissures	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Mucor racemosus</i> , <i>Penicillium jenseni</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>trichoderma viride</i>	Priya.and Sashi., (2014).
Levures	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida tropicalis</i>	Djouldé Darman <i>et al.</i> , (2005).
Bactéries	<i>Bacillus</i> sp <i>Lactobacillus cellobiosus</i>	Djouldé Darman <i>et al.</i> , (2005).

### 3.5. Utilisation industrielle de la pectinase

Ces enzymes sont classées parmi les enzymes les plus importantes dans le secteur industriel (Kashyap, D.R *et al.*, 2001), en raison de leurs fréquentes et multiples utilisations. Comme titre d'exemple, on cite les pectinases acides utilisées dans l'extraction et la clarification des jus de fruit (Rombouts et Pilnik, 1986) et les pectinases alcalines faisant l'objet d'une immense utilisation dans le dégommeage des fibres de ramie (Cao *et al.*, 1992), Pourtant en réponse à l'extrême usage biotechnologique de ces enzymes, ces dernières sont produites par plusieurs organismes comme les champignons (Aguilar et Huitron, 1990), les levures (Gainvors et Belarbi, 1995) ainsi que, les bactéries (Horikoshi, 1972 ; Karbassi et Vaughn, 1980).

Les principaux obstacles associés à la production de ces enzymes sont liés à leur isolement cellulaire, à la répression catabolique et à une récupération inefficace et coûteuse.

*Partie02 :*  
*Les moisissures*

---

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes dépendants d'une source de carbone organique. Globalement peu exigeants sur les conditions environnementales du substrat, ces champignons peuvent contaminer les milieux les plus divers comme : les céréales, les produits d'origine animale (lait, viande) mais aussi le papier, les tissus, les matières organiques en décomposition, où elles trouvent une source de carbone et d'azote accessible.

## 1. Principaux genres fongiques

Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Trichoderma* qui représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale.

- **Le genre *Aspergillus***

C'est un genre appartenant à la classe des Ascomycètes. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Raper et Fennell, 1965).

Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton *et al.*, 1990 ; Roquebert, 1998). Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002) ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales.

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses (*Aspergillus fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires, *Aspergillus niger* responsable d'aspergillose du conduit auditif) (Morin, 1994).

Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques (Botton *et al.*, 1990).

- **Le genre *Penicillium***

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des Ascomycètes. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988). Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales. Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*. À des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées.

- **Le genre *Trichoderma***

Le terme « *Trichoderma* » a été introduit dans la mycologie en 1974 par Petersoon (Rousso, 1985 ; Bisset, 1991). Ce terme désigne des champignons microscopique considéré durant 200 ans comme étant « gastéromycètes » (Fujita *et al.*, 1994 ; Roquebert, 1996 ; Benkada, 2006). Les *Trichoderma* sont des agents potentiels surtout en agroalimentaire grâce à leur production d'enzymes, de substance bioactives et leur développement rapide (Prieto *et al.*, 1997 ; Benkada 2006). Plusieurs genre de *Trichoderma* en montré durant les années passées des effets appréciables en lutte biologique en raison de leur effet antagoniste vis-à-vis d'autre espèces fongiques pathogènes tel que *Botrytis*, *Rhézoctania*, *Fusarium*... (Grondona *et al.*, 1997 ; cité par Benkada 2006). Les espèces du genre *Trichoderma* se développent à une température optimale qui se situe entre 25°C et 30°C avec un minimum de 0°C et un maximum de 30 à 37°C (Gary *et al.*, 2011).

## **2. Identification des moisissures**

### **2.1. Analyse morphologique**

L'identification des moisissures repose sur des critères essentiellement morphologiques ; tels que la taille, la forme, la couleur des colonies sur des milieux définis et étude microscopique des caractères du mycélium et des fructifications.

Cette dernière fait appel à des techniques particulières comme la culture sur lame gélosée directement observable au microscope. Si la détermination du genre est assez simple, celle des espèces de nombreux genres est l'affaire de spécialiste (Guiraud & Rosec, 2004).

Les moisissures peuvent être identifiées et quantifiées à l'aide d'un microscope. Elles sont quantifiées en unités formatrices de colonies (UFC).

### **3. Rôle des moisissures**

#### **3.1. L'industrie alimentaire**

Les moisissures sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, amylolytiques, etc....) qui en font des agents de dégradation dangereux mais parfois des agents technologiques utilisés dans l'affinage des fromages et dans la production d'enzymes (Guiraud, 1998 ; Guiraud & Rosec, 2004). Selon Webster & Weber (2009), les *Aspergillus* et les *Penicillium* jouent un rôle primordial en biotechnologie grâce à leur aptitude à produire de grandes quantités d'enzymes extracellulaires tels que les protéases, amylases, lipases et pectinases utilisés dans de nombreux processus industriels y compris la fabrication de produits de boulangerie, les produits laitiers, les jus et dans l'industrie de l'amidon. Ainsi, des souches sélectionnées de moisissures sont utilisées dans la fabrication du Roquefort *Penicillium roquefortii* (Delarras, 2007). En outre, d'autres souches appartenant au genre *Aspergillus* interviennent dans la production des sauces de soja dont la matière première est un mélange de grains de soja et de blé, la dégradation de ce substrat est appelée le processus de Koji et consiste l'un des meilleurs exemples pour la fermentation d'un substrat solide où l'on utilise les deux espèces *A.oryzae* et *A.sojae* (Webster & Weber, 2009).

#### **3.2. L'industrie pharmaceutique**

Certaines moisissures sont utilisées pour la production d'antibiotiques telle que la découverte de l'activité antibiotique très importante de la pénicilline (Filtenborg et al., 1996) contre les bactéries à gram-négatif, produite naturellement par l'espèce *Penicillium notatum* (Webster & Weber, 2009).

*Partie 03 :*  
*Fermentation sur milieu solide et*  
*matière première*

---

## 1. La fermentation sur milieu solide

### 1.1. Définition

La fermentation solide (fermentation de substrats solides, fermentation humide, culture solide, etc. et en anglais : solid-state fermentation ou SSF) est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (Durand, 2003 ; Gervais *et al.*, 2003 ; Rahardjo *et al.*, 2006). De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. (Rahardjo *et al.*, 2006) expliquent la diffusion des moisissures filamenteuses dans le substrat solide humide.

Selon les substrats considérés, l'apparition d'eau libre se manifeste pour des teneurs en eau comprises entre 12 et 90 %, soit 0,65 et 0,98 d'activité d'eau ( $a_w$ ) (Mathot, 1996 ; Gervais *et al.*, 2003).

### 1.2. Avantages de la fermentation solide

Les avantages des fermentations solides sont nombreux :

- ✓ Ceux-ci incluent la simplicité de cette technologie (applicable en milieu rural) et ne nécessitant pas d'équipement sophistiqué pour les contrôles permanents des paramètres environnementaux (facultatifs). Le cout des équipements et des opérations est donc faible.
- ✓ L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes. En effet, la majorité des bactéries réclame des taux d'humidité élevés pour survivre. Le peu d'eau disponible favorise la production de certains métabolites qui n'apparaissent pas ou peu en culture liquide. Par exemple, *Monascus* produit dix fois plus de pigment rouge en milieu solide qu'en fermentation liquide (Mathot, 1996).
- ✓ De plus, les opérations de mélange étant facilement modulables, il n'y a pas de production de mousses lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides.

Etant donné que la plupart des procédés de fermentation solide mettent en œuvre des moisissures, ils ne nécessitent pas de stérilisation préalable du substrat. Ce qui réduit le cout énergétique nécessaire. En calibrant bien les particules du substrat (hachage, broyage, tamisage, etc.)

## Revue bibliographique

---

- ✓ l'aération peut être assurée passivement et/ou sans agitation ou par agitation discontinue. En cas d'aération active ou forcée, une porosité bien étudiée facilite le passage de l'air qui entre facilement en contact avec les moisissures installées en surface des particules.
- ✓ En revanche, les moisissures filamenteuses rendent souvent les milieux liquides fortement visqueux. Ce qui entraîne des problèmes à l'agitation et au transfert d'oxygène
- ✓ En cas de production d'aliments pour animaux, tout le produit est utilisé, sans rejet d'eau usée. Les frais de séchage éventuels sont réduits (Mathot, 1996).
- ✓ Bref, selon la littérature, la fermentation solide possède une réputation de technique simple à mettre en œuvre, facilement applicable en milieu rural, de moindre coût car peu exigeante en matériel
- ✓ ne nécessitant pas obligatoirement une stérilisation énergétique du substrat de culture et requiert un faible espace.
- ✓ Elle assure une forte productivité en métabolites. La faible teneur en humidité empêche la contamination bactérienne.

Cependant, cette renommée est largement surfaite, surtout lors du développement d'applications pilotes ou en vraie grandeur. Dans ces conditions et bien d'autres, la fermentation solide présente de nombreux inconvénients.

### **1.3. Inconvénients des fermentations solides**

- ✓ Les microorganismes utilisés sont limités. En effet, seuls les microorganismes se développant bien aux basses humidités peuvent être employés.
- ✓ Les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur milieux solides sont faibles.
- ✓ Les problèmes de transfert d'oxygène et de chaleur rendent difficile l'augmentation d'échelle des procédés. En effet, la faible quantité d'eau ralentit les échanges de chaleur, pouvant créer des problèmes de surchauffe lorsque des masses importantes sont mises en fermentation. L'évaporation compense partiellement cet échauffement, mais en réduisant l'eau disponible. L'évacuation des calories métaboliques peut donc poser un problème qu'il s'agit de résoudre lors du passage de petits essais de laboratoire aux applications en vraie grandeur.

- ✓ La nature solide et hétérogène des substrats utilisés complique le suivi direct des paramètres de fermentation. Les sondes utilisées en fermentation liquide ne sont pas utilisables, même si (Bellon-Maurel *et al.*, 2003) proposent de nouveaux types de sondes adaptées aux cultures solides.
- ✓ Il est pratiquement difficile d'assurer une distribution parfaitement homogène de substances ajoutées au substrat et donc du milieu de culture. Ce qui rend le contrôle *on line* des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration des nutriments, assez aléatoire.
- ✓ Les microorganismes étant inséparables du substrat, l'estimation de la biomasse est délicate. Etant donné la forte concentration des métabolites obtenus, des produits inhibiteurs générés par les microorganismes peuvent s'accumuler en concentration élevée dans le milieu de culture.

### 1.4. Les étapes suivies en fermentations solides

Les étapes suivies au cours d'une fermentation solide sont :

- La préparation du substrat ou du milieu de culture, la stérilisation facultative du milieu (généralement à 120 °C pendant 20 minutes) suivie par le refroidissement de celui-ci, l'inoculation du milieu de culture, l'incubation du milieu inoculé en maintenant dans la mesure du possible les conditions environnementales optimales (température, pH, teneur en eau).

#### 1.4.1. La préparation du substrat carboné

Les substrats carbonés utilisés en fermentation solide proviennent essentiellement des résidus agricoles et agroalimentaires. Ce sont les substrats lignocellulosiques (sous forme de paille, de son, de bagasse, de pulpe, etc.), les féculents (résidus de banane, de soja, les graines, etc.), les supports synthétiques (mousse de polyuréthane, résine polymérique, etc.), etc.

La préparation du substrat carboné vise à lui faire subir divers traitements physique, chimique ou biologique (enzymes) afin de favoriser une grande accessibilité des constituants aux microorganismes.

### 1.4.2. L'inoculation du milieu de culture

L'inoculation du milieu de culture se fait le plus souvent à partir d'une suspension de spores (Mathot, 1996). Celles-ci restent viables plus longtemps que du mycélium, sont moins sensibles aux conditions externes et se conservent plus facilement. La quantité optimale de spores à inoculer diffère selon les cas. Un excès de spores peut parfois inhiber la germination. Les spores sont cependant métaboliquement dormantes, impliquant que la dégradation du substrat ne peut s'installer qu'après la germination. Pour minimiser cet inconvénient, une pré-germination des spores est parfois envisagée. Des inocula spores + mycélium + substrat de production peuvent être utilisés également.

### 1.4.3. Les facteurs influençant la fermentation en milieu solide

- **La température**

A l'échelle industrielle, les contrôles de la température de culture et de l'humidité du milieu sont très importants pour le *scaling up* (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). La faible conductibilité thermique des substrats utilisés et leur faible teneur en eau réduisent le transfert de chaleur, qui lui-même dépend de la taille des particules de la couche solide. Une élévation de la température dans la masse fermentable due à un dégagement de chaleur métabolique peut aller jusqu'à atteindre 80° C, causant un assèchement de la culture et une baisse de l' $a_w$  et de la disponibilité en nutriments. La température de la culture à l'échelle industrielle est généralement régulée par l'injection d'air forcé, l'agitation du réacteur ou par le phénomène d'évaporation. Au laboratoire, la température du milieu de culture est généralement régulée par une simple régulation de la température de la pièce où se trouve le bioréacteur (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

- **La teneur en eau**

L'eau est impliquée dans la croissance cellulaire et les réactions métaboliques, les activités enzymatiques, les transports des éléments nutritifs, des métabolites extracellulaires et des gaz au cours de la fermentation solide (Bellon-Maurel *et al.*, 2003 ; Gervais *et al.*, 2003). Les variations de la teneur en eau sont dues à l'évaporation causée par la chaleur métabolique, à l'hydrolyse du substrat et aux productions d'eau métabolique. La teneur en eau est habituellement déterminée *off-line* par les mesures de la matière sèche, laquelle, cependant, ne différencie pas l'eau disponible pour les activités microbiennes (c'est-à-dire l'activité d'eau  $a_w$ ) de l'eau liée au substrat indisponible aux microorganismes.

A l'échelle du laboratoire, l'activité d'eau est contrôlée en plaçant le bioréacteur dans une chambre de culture dont l'humidité de l'atmosphère est régulée par des solutions salines saturées. A grande échelle, le bioréacteur est généralement aéré avec de l'air saturé en eau.

- **Le pH**

Des variations de valeur du pH résultent d'une consommation en substrat (exemple de l'hydrolyse des protéines) et/ou des synthèses métaboliques (exemple des acides organiques). Les variations de pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Il est ainsi difficile de contrôler le pH efficacement en fermentation solide. Lorsque cela est nécessaire, la méthode standard est de tamponner le milieu de culture avec un mélange adéquat de composés azotés (urée, sels ammoniacaux), des sels de  $\text{Ca}^{2+}$  ou des solutions alcalines. Pendant la fermentation, le pH peut être régulé par l'addition d'acides ou de bases à l'eau de refroidissement de la masse fermentable.

- **L'aération de la culture**

L'aération des cultures solides joue quatre fonctions, à savoir le maintien des conditions d'aérobies, l'élimination du dioxyde de carbone, la régulation de la température de culture et la régulation de la teneur en eau (Raimbault, 1998). En fermentation liquide, l'aération est souvent le facteur limitant de la croissance microbienne à cause de la faible solubilité de l'oxygène dans l'eau. L'aération en fermentation solide est plus facile qu'en fermentation liquide à cause d'une part, de la diffusion rapide de l'oxygène dans le film humide entourant les particules de substrat, et d'autre part à cause aussi des grandes surfaces de contact entre la phase gazeuse, le substrat et les mycéliums aériens. Généralement, l'oxygène ne constitue pas un facteur limitant en fermentation solide lorsque le substrat est particulaire.

### **1.5. Applications de la fermentation solide**

De manière générale, les applications de la fermentation solide concernent :

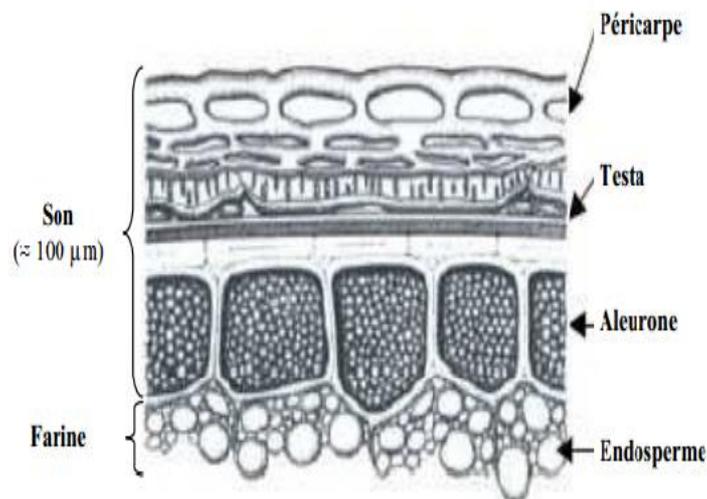
- L'alimentation humaine (fromages, production de champignons comestibles, Koji, choucroute et saucissons secs)
- Le compostage et l'ensilage
- La bio-filtration de gaz malodorants
- La production d'aliments riches en protéines pour l'alimentation animale
- La production d'enzymes (amylases, cellulases, xylanases, etc.) et de métabolites spécifiques (éthanol, acides organique, citrique, etc.).

## 2. La matière première

### 2.1. Le Son de blé

Le son de blé est une enveloppe externe multi-lamellaire composée des tissus maternels (bande hyaline, testa, péricarpe et cuticule), au sens anatomique du terme, additionné de la couche aleurone et de restes de l'endosperme. La composition biochimique du son de blé industriel comprend de 22 à 25% de (glucurono) arabinoxylanes, de 14 à 17% de protéines, de 7 à 11% de cellulose, de 3 à 10% de lignine, des  $\beta$ -glucanes à liaisons mixtes et de 11 à 30% d'amidon résiduel selon le mode de fractionnement (Kabel *et al.*, 2001). Au total, les polysaccharides hors amidon représentent environ 46% du son de blé industriel, dont près de 70% sont des (glucurono) arabinoxylanes (Maes *et al.*, 2001). Le son de blé est un coproduit des minoteries et des semouleries. Actuellement, il est principalement destiné à l'alimentation animale et pour une petite part à l'alimentation humaine. Le son de blé est histologiquement composé des couches cellulaires (figure 4) suivantes :

- **La couche à aleurone ou assise protéique**
- **La bande hyaline ou couche nucellaire**
- **La testa ou endotesta ou tégument séminal**
- **Le péricarpe**



**Figure 4:** Les différentes couches cellulaires du son de blé constitutives industriel. (Surjte *et al.*, 2005 ; Hemery *et al.*, 2009).

### 2.2. Rôle de son de blé

Le son de blé est un des substrats les plus attractifs. Il a pour avantage de permettre une bonne circulation de l'air, de ne pas présenter d'agglomération des particules entre elles, de faciliter la pénétration du mycélium dans le substrat et d'être bon marché. Aujourd'hui, le son de blé est utilisé en fermentation en milieu solide pour la production d'enzymes, de métabolites secondaires et autres produits d'intérêt biotechnologiques.

Le son de blé a une bonne capacité de rétention de l'eau pouvant aller jusqu'à 80% (Abdullah, 1985). Ainsi, il est possible de travailler avec une humidité importante permettant une bonne croissance des champignons.

Le son de blé est un substrat potentiellement intéressant pour la production de biocarburant. Des études actuelles portent sur la saccharification et la fermentation simultanée de son de blé qui permet de convertir les complexes polysaccharidiques en réserve de sucre facilement transformable en éthanol

Le son de blé a également un rôle dans le domaine médical. Les antioxydants contenus dans ce coproduit peuvent réduire les risques de maladies telles que : le cancer du côlon, la maladie de Parkinson, les maladies cardio-vasculaires. Les fibres du son de blé sont connues pour diminuer le taux de cholestérol (Javed *et al.*, 2012).

### 2.3. Utilisation du son de blé

Dans l'industrie alimentaire, le son de blé est utilisé comme alternative des substrats synthétiques utilisés dans le processus de fermentation (Pandey, 1991) ainsi que dans la production d'enzymes et de métabolites secondaires. Il est aussi utilisé dans la production de plusieurs types de moisissures, dont la *Trichoderma* (Javed *et al.*, 2012) et la production biologique par fermentation (Hawkes *et al.*, 2007).

Cependant, l'application principale du son de blé concerne l'alimentation animale: en raison de ses propriétés nutritionnelles, il permet d'améliorer la qualité nutritionnelle des produits alimentaires de source animale.



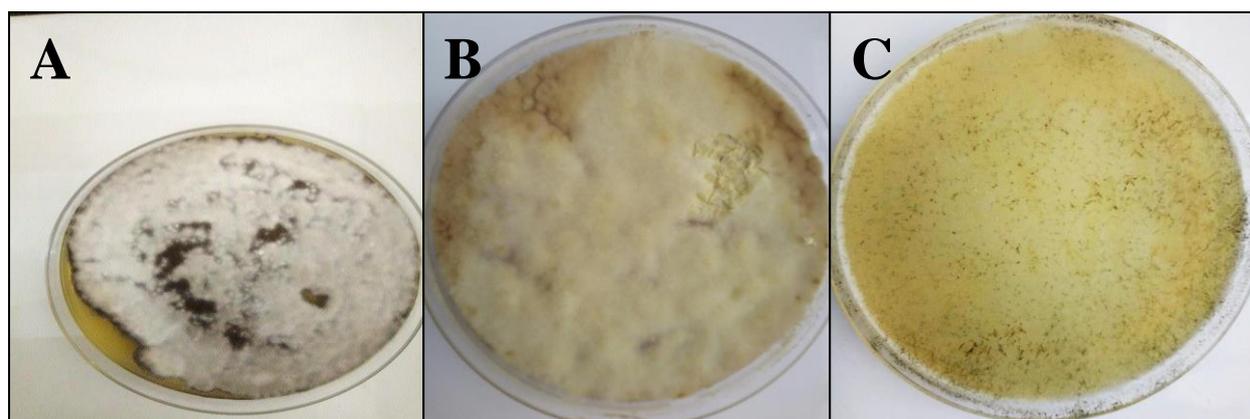
*Matériel et  
méthodes*

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie. Université des frères Mentouri. Constantine. Il consiste la mise en évidence des activités hydrolases des moisissures *Penicillium*, *Aspergillus terreus* et *Trichoderma longibrachiatum* (GHL). Et de la production et l'extraction des enzymes suivants : cellulase et amylase, par une fermentation sur milieu solide de la souche *Penicillium sp.*

### 1. Origines et réactivation des souches fongiques

Dans ce travail, nous avons utilisés trois souches de moisissures : *Penicillium. sp*, *Trichoderma longibrachiatum* et *Aspergillus terreus*, Les souches ont été isolées au niveau du laboratoire de génie enzymatique. Université des frères Mentouri. Constantine. Algérie, à partir d'échantillon de sol collectée proche de la source thermique (Hammam Debagh. Guelma), localisée dans le nord-est de l'Algérie. La souche *Trichoderma longibrachiatum* a été identifiée au niveau du laboratoire DSMZ en Allemagne (Leghlimi, 2013). La souche *Aspergillus terreus* a été identifiée par (Bahloul et Imami., 2016). Tandis que la souche *Penicillium.sp* est identifiée dans le cadre de cette étude.

La réactivation de ces moisissures est effectuée par ensemencement sur milieu Sabouraud « Sab » (annexe1). L'ensemencement de ce milieu gélosé, coulés en boîte de Pétri, se fait par dépôt de suspension de spores au centre de la gélose et étalement à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Les géloses inoculées sont ensuite incubées à 30°C (figure 5).



**Figure 5 :** *Penicillium sp* (A), *Aspergillus terreus* (B) et *Trichoderma longibrachiatum* (C) après 7 jours d'incubation à 30°C.

## **2. Mise en évidence des activités hydrolases sur milieux gélosés**

### **2.1. Activité amylolytique**

La recherche de l'activité amylolytique est réalisée avec les trois souches testées. La détection est effectuée sur milieu PDA (annexe 3), additionné d'amidon soluble à 1%. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours. Après incubation, une solution de lugol dilué est vaporisée sur la surface de la boîte pendant 30 secondes, suivie d'un rinçage avec de l'eau distillée (Annexe 5). L'eau iodée contenant l'iode qui se complexe avec l'amidon et donne un précipité bleu sombre. Les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases. Le diamètre des zones d'hydrolyse, est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante (Tatsinkouet *al.*, 2005 et Benaouida., 2008).

### **2.2. Activité cellulolytique**

La mise en évidence de l'activité cellulolytique des souches testées, est effectuée sur un milieu CMC agar (annexe 2) à pH 5, additionné de 2 % de carboxyméthylcellulose (CMC, substrat inducteur). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 5 à 7 jours. Après croissance, les boîtes sont colorées avec une solution au rouge Congo (0.1 %) qui se fixe sélectivement sur les polymères de cellulose (annexe 5). Après 30 min de réaction, les boîtes sont lavées avec une solution de NaCl (1M) pendant 1 heure. Le « rouge Congo », permet la mise en évidence de l'activité cellulolytique par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de cellulase (Oikawa, 1998; Korish, 2003). Après le test, les diamètres des zones d'hydrolyse pour chaque souche sont mesurés, ce qui permet de sélectionner la meilleure souche cellulolytique.

### **2.3. Activité pectinolytique**

Chaque moisissure est ensemencée par une touche centrale sur le milieu Pectine Agar (annexe 4). Après incubation à 30°C pendant 7 jours, les boîtes sont inondées par une solution aqueuse d'acétate de cuivre à 7.5 % (annexe 5) pendant 10 minutes. L'acétate de cuivre donne une couleur bleu claire sur la gélose qui contient la pectine non dégradée (Snaikiet *al.*, 2006). L'activité pectinolytique se manifeste par l'apparition d'un halo blanc autour des colonies productrices. La meilleure souche pectinolytique est retenue en se basant sur la mesure du diamètre des zones d'hydrolyse.

### **3. Etude de la production des enzymes cellulase et $\alpha$ -amylase par la souche *Penicillium. sp* par fermentation en milieu solide**

#### **3.1. Matière première**

Le son de blé est la matière première principalement utilisée, comme substrat de fermentation, dans cette étude. Il nous a été gracieusement fourni par le groupe des Moulin sidi Rachad (Unité 314 Chihani Bachir Elkhroub). Son humidité serait initialement de 13.7%. Sa composition chimique est présentée dans l'annexe 9.

#### **3.2. Microorganisme**

La souche *Penicillium. sp* est retenue dans cette partie de notre travail, par ce qu'elle a donné le meilleur résultat avec les enzymes recherchées par rapport aux autres souches.

##### **3.2.1. Identification de la souche *penicillium. sp***

L'identification d'une souche de moisissure est essentiellement morphologique et basée sur une observation macroscopique et une étude microscopique (Botton *et al.*, 1990).

###### **- Etude des caractères culturaux :**

Les caractères macroscopiques et culturaux sont déterminés après ensemencement de la souche sur le milieu gélosé Sabouraud coulé en boîtes de Pétri, par repiquage au centre d'un petit fragment mycélien. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 7 jours. Les caractéristiques de la culture (couleur du mycélium aérien et sa variation au cours du temps, la couleur du revers de la culture, la production de pigments diffusibles, présence ou absence d'exsudat (gouttelettes) sur le mycélium, texture de la surface etc...) sont notées (Guiraud, 1998).

###### **- Etude des caractères microscopiques :**

L'identification morphologique est réalisée par une étude microscopique. Cette dernière est effectuée par un prélèvement soigneux d'un petit fragment de la flore microbienne (quelques spores et un fragment mycélien à la marge du thalle) à l'aide d'une anse en platine stérile. Ce fragment est ensuite transféré sur une lame, en lui ajoutant comme diluant du lactophénol-bleu coton(annexe 8). L'observation microscopique est réalisée au grossissement  $\times 40$ . Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation,...)

et des spores (forme, couleur, texture des parois,...) (Harrigan et McCance, 1976 ; Oteng-Gyang, 1984 ; Guiraud, 1998).

### 3.2.2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum correspond à la suspension de spores de la moisissure sélectionnée, servant à l'ensemencement du milieu de fermentation, est issu de cultures sporulées cultivées sur gélose Sabouraud pendant 7 jours. 10 ml d'eau distillée stérile sont déposés en surface afin d'obtenir, après mélange par un râteau, une suspension de spores.

### 3.2.3. Dénombrement des spores

Le nombre des spores est déterminé par le dénombrement au microscope optique (objectif  $\times 40$ ) à l'aide d'une cellule de comptage (cellule de Thoma)(Guiraud, 1998), pour calculer le taux d'inoculum.

### 3.2.4. Conservation des souches

Les souches sont maintenues sur milieu Sabouraud (Incubation à 30°C jusqu'à une bonne sporulation). Les spores sont récupérées par addition de 10ml d'eau distillée avec le glycérol à 20% (agent cryoprotecteur). Ces suspensions de spores sont ensuite stockées au congélateur, afin de garder leur viabilité et de limiter les possibilités de variation, jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990).

## 3.3. Préparation des fermentations en milieu solide

Les fermentations en milieu solide sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml à col large. Dans chaque erlenmeyer, 5 g de son de blé dont le taux d'humidité initiale est de 13.5 %, sont introduits et pré-humidifiés avec une solution aqueuse (agent humidifiant à 70 %) (annexe 6). Les milieux sont homogénéisés à l'aide d'une baguette en verre puis les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé, recouverts avec du papier aluminium et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, les erlens-meyers sont inoculés par une suspension de spores à raison de  $2.10^7$  spores par grammes de substrat (figure 6). Les erlens-meyers ensemencés sont ensuite incubés à 30°C dans une étuve, pendant 10 jours. Des prélèvements sont effectués tous les jours, à partir du 2ème jour d'incubation. Toutes les expériences sont réalisées en triplicate.

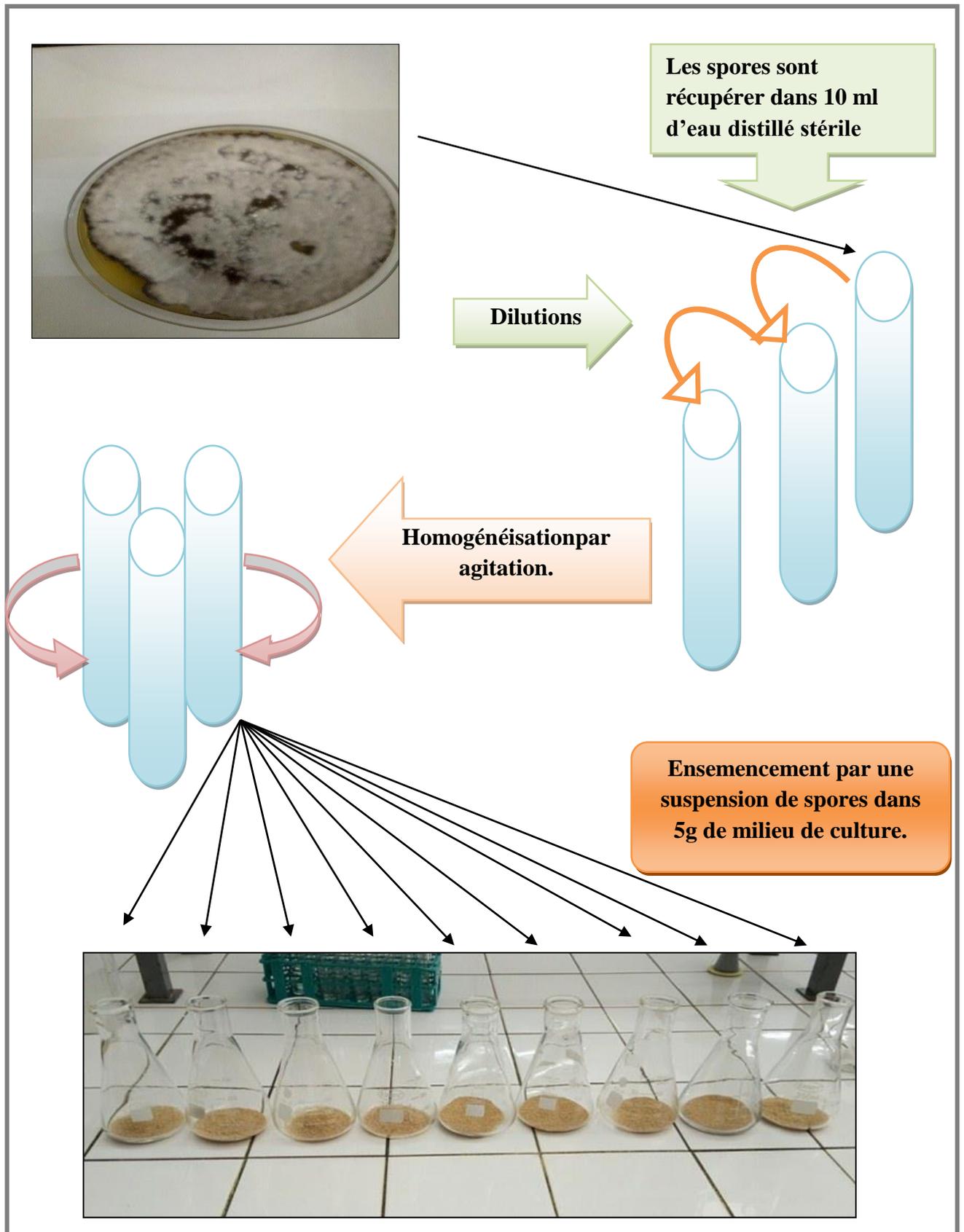


Figure 6 : Préparation de l'inoculum et fermentation sur un milieu solide.

A la fin de la fermentation, une quantité connue (1 g) de substrat fermenté est mélangée soit avec 40 ml de solution tampon citrate 0.1M, pH 4.8 pour la mesure de l'activité cellulase (annexe7), soit avec 40 ml de solution tampon phosphate citrate 0.1 M, pH 5 pour la mesure de l'activité  $\alpha$ -amylase. Après broyage à l'aide d'un mixeur pendant 1 à 2 minutes, le mélange est centrifugé à 20627g pendant 10minutes. Le surnageant obtenue (représente l'extrait enzymatique) est utilisée pour le dosage des activités enzymatiques (papier filtre, endoglucanase,  $\alpha$ -amylase). Les expérimentations sont réalisées en triplicate. Le surnageant est conservé à 4 °C jusqu'à utilisation.

## 4. Méthodes analytiques

### 4.1. Dosage des activités cellulolytiques

➤ **Activité papier filtre(APF)** : est utilisée pour déterminer l'activité totale dans un complexe cellulasique selon la méthode de Ghose (Ghose, 1987) dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés (lors de l'hydrolyse d'un substrat cellulosique). Le mélange réactionnel est constitué d'une solution d'enzyme (0.5 ml), d'1 ml de tampon citrate (0.1M, pH 4.8) et de 50 mg de papier filtre Wattman N° 1(des morceaux de 1 x 6 cm), incubés à 50°C pendant 60 minutes.

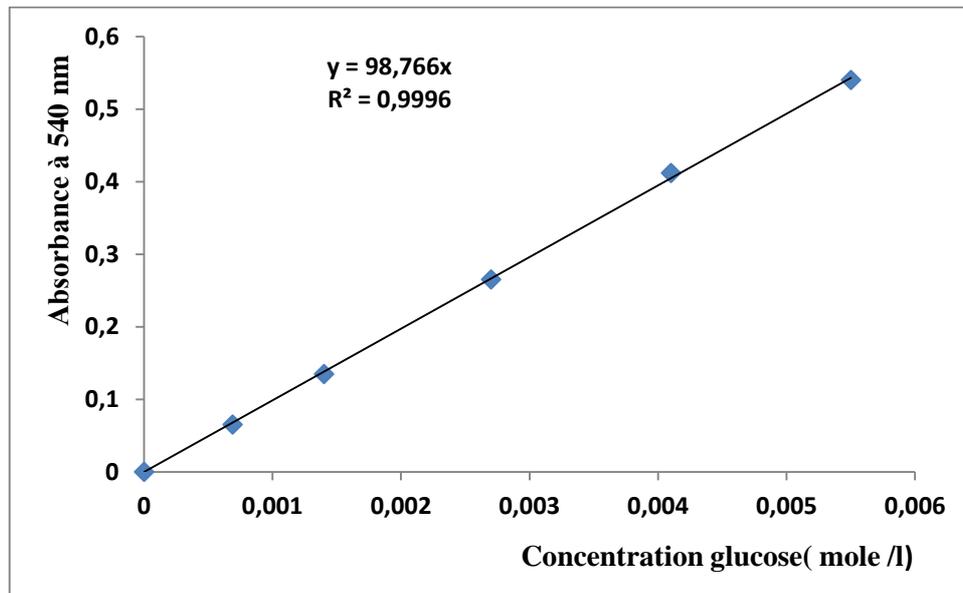
➤ **Activité endoglucanase:** (CMCase, endo 1.4- $\beta$ -D-glucanase ; EC 3. 2. 1. 4) est mesurée dans un volume totale de 1 ml d'un mélange réactionnel contenant 0.5 ml d'extrait enzymatique dilué dans du tampon citrate 0.1 M, pH 4.8 et 0.5 ml d'une solution de CMC (carboxymethylcellulose) à 1 % (W/V) préparé dans le tampon citrate 0.1M, pH 4.8. Ce mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 30 minutes.

La quantité des sucres réducteurs libérés de l'hydrolyse du papier filtre et du carboxymethyl-cellulose est mesurés selon la méthode de Miller (Miller, 1959) par une réaction colorimétrique due à la présence du réactif : acide dinitrosalicylique (DNS) (Annexe 7).

\* L'absorbance de la coloration développée est lue à 540 nm, l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant le glucose comme standard avec une concentration de la solution mère de 0.0167Moles/litre (figure 7). L'activité enzymatique est calculée en Unité par gramme de matière sèche (U/g).

Une unité de l'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent glucose (lorsque le glucose est utilisé comme étalon sucre réducteur)

par minute et par millilitre, à 50°C, pH 4,8. Le blanc est préparé de la même façon, sans l'addition de substrat. Chaque dosage est effectué en triplicate.



**Figure7:** Courbe étalon du glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase.

#### **4.2. Dosage de l'activité $\alpha$ -amylasique**

L'activité  $\alpha$ -amylasique est mesurée selon la méthode de Bernfeld, (1955), dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur lors de l'hydrolyse de l'amidon. Cette activité est mesurée dans un mélange réactionnel contenant 0.5 ml d'extrait enzymatique dilué dans du tampon phosphate citrate 0.1 M, pH 5 et 0.5 ml d'une solution de l'amidon soluble à 1 % (W/V) préparé dans le tampon phosphate citrate 0.1M, pH 5. Ce mélange réactionnel est incubé à 40°C pendant 30 minutes. La concentration des sucres réducteurs correspondant (maltose libéré sous l'action de l' $\alpha$ -amylase), est déterminée à partir d'une courbe étalon (figure8).

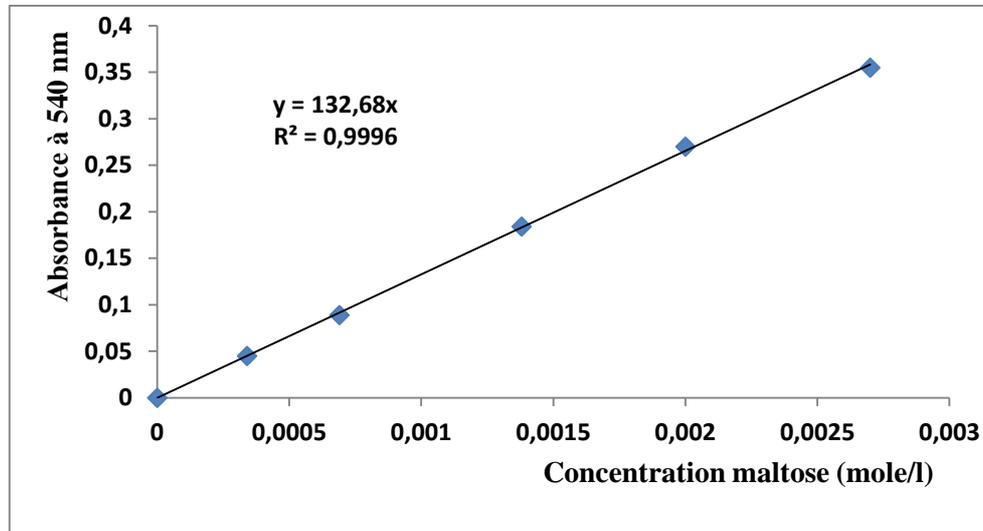


Figure8 : Courbe étalon du maltose pour le dosage de l'activité  $\alpha$ -amylase.

Le dosage du sucre réducteur est déterminé par une réaction colorimétrique, due à la présence de l'acide 3,5- dinitrosalicylique. L'activité enzymatique est calculée en Unité par gramme de matière sèche (U/g). Une unité de l'activité enzymatique correspondant à une micromole de maltose libéré par minute, à 40°C et à pH 5 et par millilitre. Le blanc est préparé de la même façon, sans l'addition de substrat. Chaque dosage est effectué en triplicate.

### 4.3. Mesure de l'humidité

L'humidité est un paramètre qui renseigne sur le développement du champignon au cours de la culture. En effet, au cours de sa croissance, le champignon produit six molécules d'eau pour une molécule de glucose consommée. De plus, la mesure du taux d'humidité permet de déterminer la matière sèche, nécessaire pour le calcul de la production de l'enzyme. L'humidité est déterminée par la méthode de la mesure du poids sec. 1g de substrat fermenté de chaque prélèvement est séché par incubation dans une étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Audigie *et al.*, 1984).

L'humidité correspond au pourcentage que représente la masse d'eau obtenue par calcul après dessiccation par rapport à la masse initiale.

D'une part, la matière totale et la matière sèche sont déterminées afin de calculer la production des enzymes. La matière sèche permet également d'avoir des indications concernant la consommation du substrat. D'autre part, l'humidité est un paramètre permettant l'amélioration de la croissance du champignon et/ou de la production de la molécule recherchée.

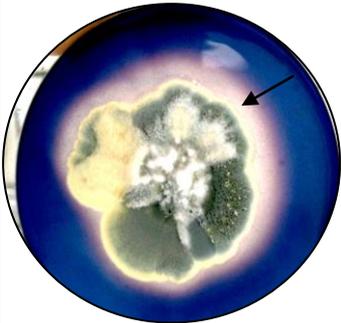
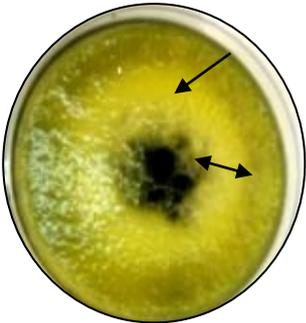
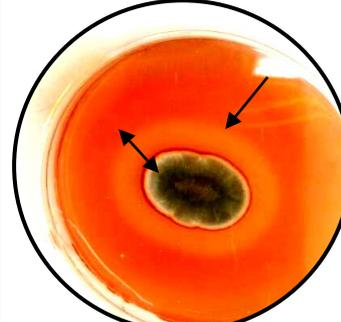
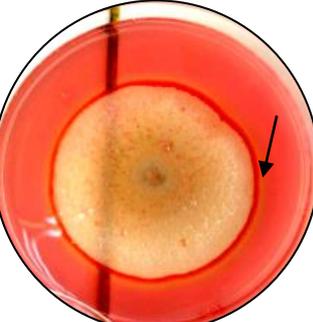
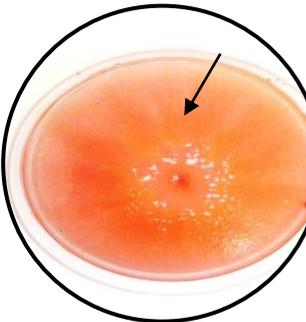
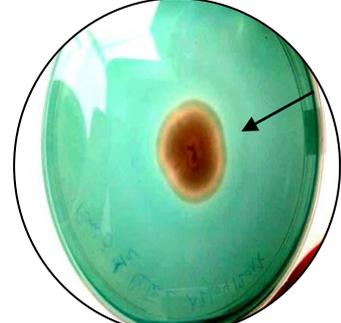
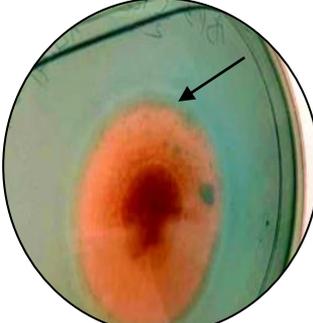
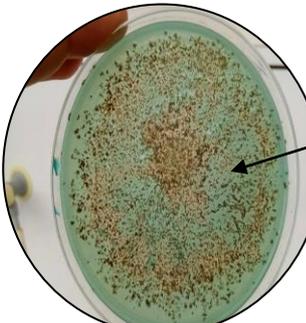


*Résultats et  
discussion*

## 1. Activités hydrolases sur milieux gélosés

Le choix des milieux de culture est déterminant dans la mise en évidence des activités enzymatiques recherchées et surtout dans le choix de la substance employée comme substrat inducteur pour la production des enzymes. Pour cela, on a utilisé les milieux gélosés : PDA à amidon 1%, CMC-agar et pectine agar comme milieux sélectifs pour la détection des activités : amylases, cellulases et pectinases, respectivement, chez les trois souches testées. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 6. Cependant les zones d'hydrolyse apparues prouvant la production des enzymes hydrolases recherchées.

**Tableau 6:** Zones d'hydrolyses de souches testées après 5 jours incubation à 30°C.

Milieux	Activités enzymatiques	Photos des boîtes après révélation		
		<i>Penicillium. sp</i>	<i>Aspergillus terrues</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
PDA à amidon 1%	Amylase			
CMC-agar	Cellulase			
Pectine – agar	Pectinase			

## Résultats et discussion

Les résultats obtenus après l'ensemencement des milieux gélosés, donnent des zones d'hydrolyse de diamètres différents suivant la capacité de chaque souche à dégrader le substrat disponible (tableau 7).

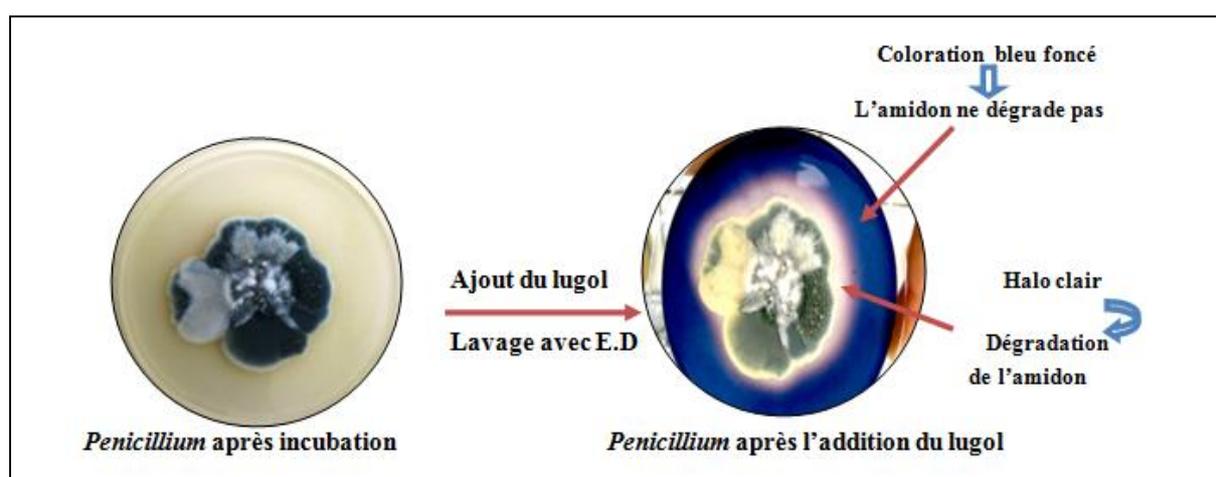
**Tableau 7 :** Diamètres (mm) de zones d'hydrolyses de souches testées.

Activité enzymatique	Diamètre (mm) des zones d'hydrolyse		
	<i>Penicillium.sp</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Amylase	10	5	9
Cellulase	10	3	-
Pectinase	7.6	3.8	2

- : non déterminé.

### 1.1. Activité amylase

Parmi les 3 souches, nous devons sélectionner la souche la plus performante, pour la production de l' $\alpha$ -amylase. Cette activité est détectée par le lugol (figure 9).



**Figure 9:** Principe de révélation de l'activité amylase par le lugol.

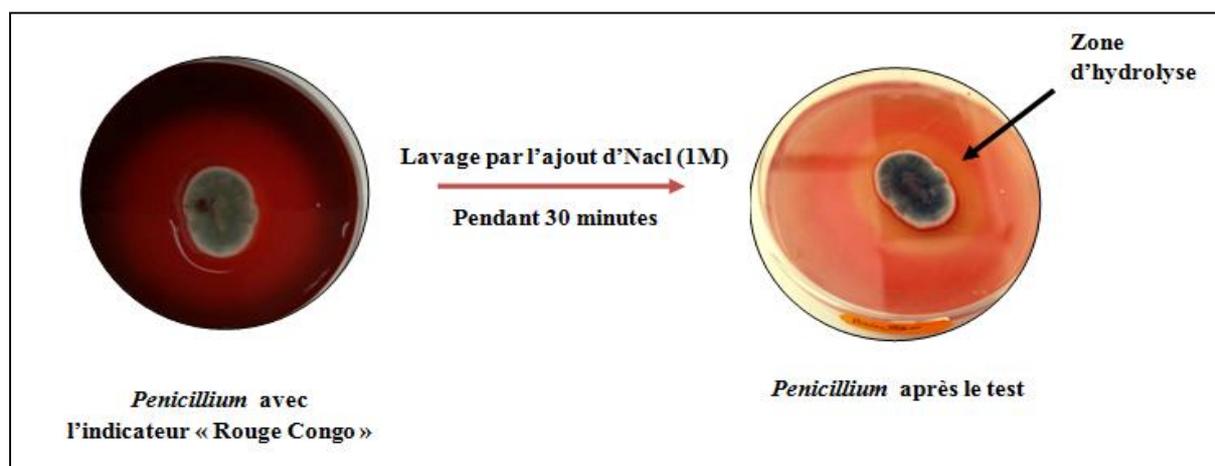
En effet, en présence de l'iode, l'amidon se combine avec lui et donne un complexe de coloration bleu foncé plus ou moins intense selon sa concentration. Preuve de la dégradation de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase, les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d' $\alpha$ -amylases (figure 9).

Le diamètre des zones d'hydrolyse (tableau 7), est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante.

Parmi les 3 souches testées, la souche *Penicillium. sp* se distingue par une activité amylolytique élevée avec une zone d'hydrolyse de diamètre mesuré à 10 mm. Par ailleurs, plusieurs espèces du genre *Penicillium* telles que *P. fellutanumet*, *P. notatum* sont productrices d' $\alpha$ -amylase, comme a été montré par les études de Kathiresan et Mannivanan (2006) ; Ertan et Balkan (2007).

### 1.2. Activité cellulase

Cette activité est détectée par l'indicateur « Rouge Congo » (0.1%) suivi d'une décoloration avec du NaCl (figure 10).



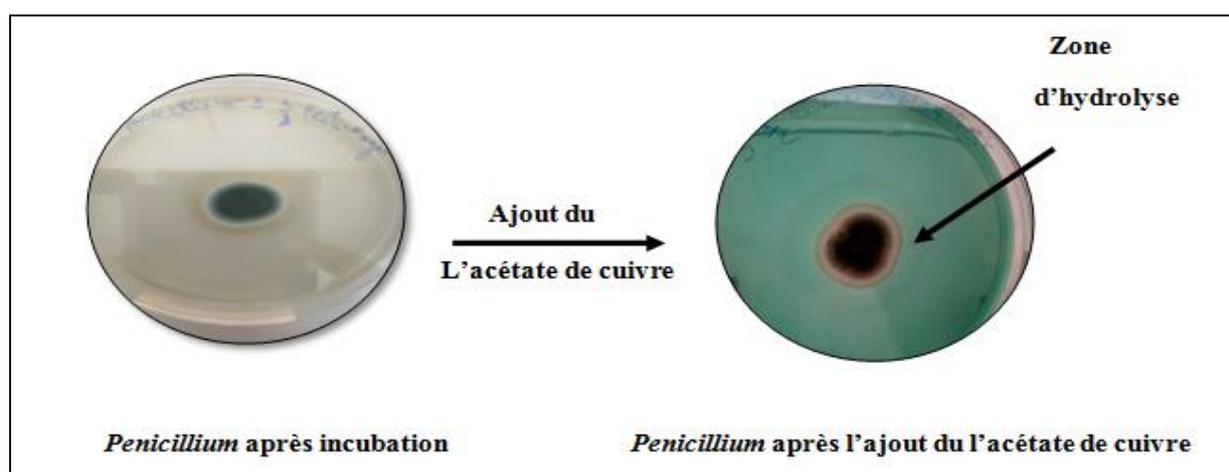
**Figure 10:** Révélation par le « Rouge Congo » de l'activité cellulase.

Après le test, l'observation d'une zone claire apparente autour des colonies des souches *Penicillium. sp* et *Aspergillus terreus*, indique l'hydrolyse du substrat testé (CMC), ainsi on a constaté l'absence d'une zone d'hydrolyse apparente autour de la colonie de *Trichoderma longibrachiatum*. En effet, cette souche a développée des plages d'hydrolyse dispersées sur la gélose (tableau 6). Le diamètre de ces zones (tableau 7) est lié à la quantité des enzymes extracellulaires libérées par les souches testées.

La souche *Penicillium. sp* présente l'activité cellulolytique la plus élevée avec un diamètre mesuré à 10 mm, par contre, la souche *Aspergillus terreus* a donné une zone d'hydrolyse de diamètre faible mesuré à 3 mm. Tandis que, avec la souche *Trichoderma longibrachiatum* on n'a pas pu mesurer un diamètre exact, du fait de sa croissance rapide et l'envahissement complet de la boîte au bout de trois jours. En effet, le genre *Trichoderma* est connu parmi les souches fongiques les plus cellulolytiques (Petersson et al., 1981 ; Kubicek., 1998) par leur capacité à produire le complexe cellulase composé d'au moins 2 exoglucanases (Shoemaker et al., 1983 ; Chen et al., 1987), 5 endoglucanases (Pentilla et al., 1987) et 2  $\beta$ -glucosidases (Barnett et al., 1991 ; Takashima et al., 1999 ; Nogawa et al., 2001). Aussi, les souches fongiques cellulolytiques, les plus étudiées sont : *Aspergillus* (Kitamoto et al., 1996 ; Lokington Kelly, 1997 ; Riouet et al., 1998 ; Fujita et al., 2002), *Penicillium* et différentes espèces de *Trichoderma* (Petersson et al., 1981 ; Neiss et Montene court, 1984, Kubicek et Penttilä, 1998 ; Takashima et al., 1999 ; Nogawa et al., 2001).

### 1.3. Activité pectinase

La révélation de la sécrétion des pectinases qui dégradent la pectine est faite par l'ajout d'une solution d'acétate de cuivre (7.5%) (figure 11). L'acétate de cuivre précipite la pectine non dégradée, un halo translucide (clair) sur fond bleu clair apparaît autour des colonies productrices de pectinases (tableau 6).



**Figure 11** : Principe de révélation de l'activité pectinolytique par l'acétate de cuivre.

Nous observons des zones d'hydrolyse de différents diamètres (tableau 7) chez les trois souches, la souche *Penicillium. sp* présente une activité importante avec un diamètre mesuré à 7.6 mm suivi par *Aspergillus terreus* qui a donné un diamètre égal à 3.8 mm. Alors que, la souche *Trichoderma longibrachiatum* a présenté une activité pectinolytique réduite, dont le diamètre est mesuré à 2 mm.

Divers champignons sont connus par la production d'un mélange depolygalacturonase et d'estérases dont les plus connus sont: *Penicillium funiculosum* qui sécrète une endopolygalacturonase et une pectine méthyl-estérase (Wiseman A., 1978) et *Aspergillus niger* qui produit une exopolygalacturonase et une pectine méthylestérase (Stratilova E., 1993).

La souche *Penicillium. sp* a montré clairement sa capacité à hydrolyser (dégrader) les polysaccharides utilisés à savoir, l'amidon, le CMC et la pectine. Ces résultats permettent la sélection de la souche *Penicillium. sp* comme étant la plus performante par rapport aux deux autres. La souche est retenue pour la poursuite du travail.

## 2. Identification de la souche *Penicillium. sp*

La souche fongique la plus performante dans la production des activités hydrolases recherchées est soumise à une identification macroscopique (caractères culturaux) et microscopique (caractères morphologiques).

- **Identification macroscopique**

Ce type d'étude est primordial pour l'identification des moisissures (aspect de la colonie, couleur, revers et la vitesse de croissance,...). Dans ce cas, *Penicillium. sp* est incubé à 30°C pendant une semaine sur milieu Sabouraud. L'étude macroscopique repose sur l'observation à l'œil nu de l'aspect mycélien de la colonie, la couleur de la souche et du revers...ect. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le (tableau 8).

**Tableau 8 :** Caractères macroscopiques de la souche *Penicillium. sp* sur milieu Sabouraud.

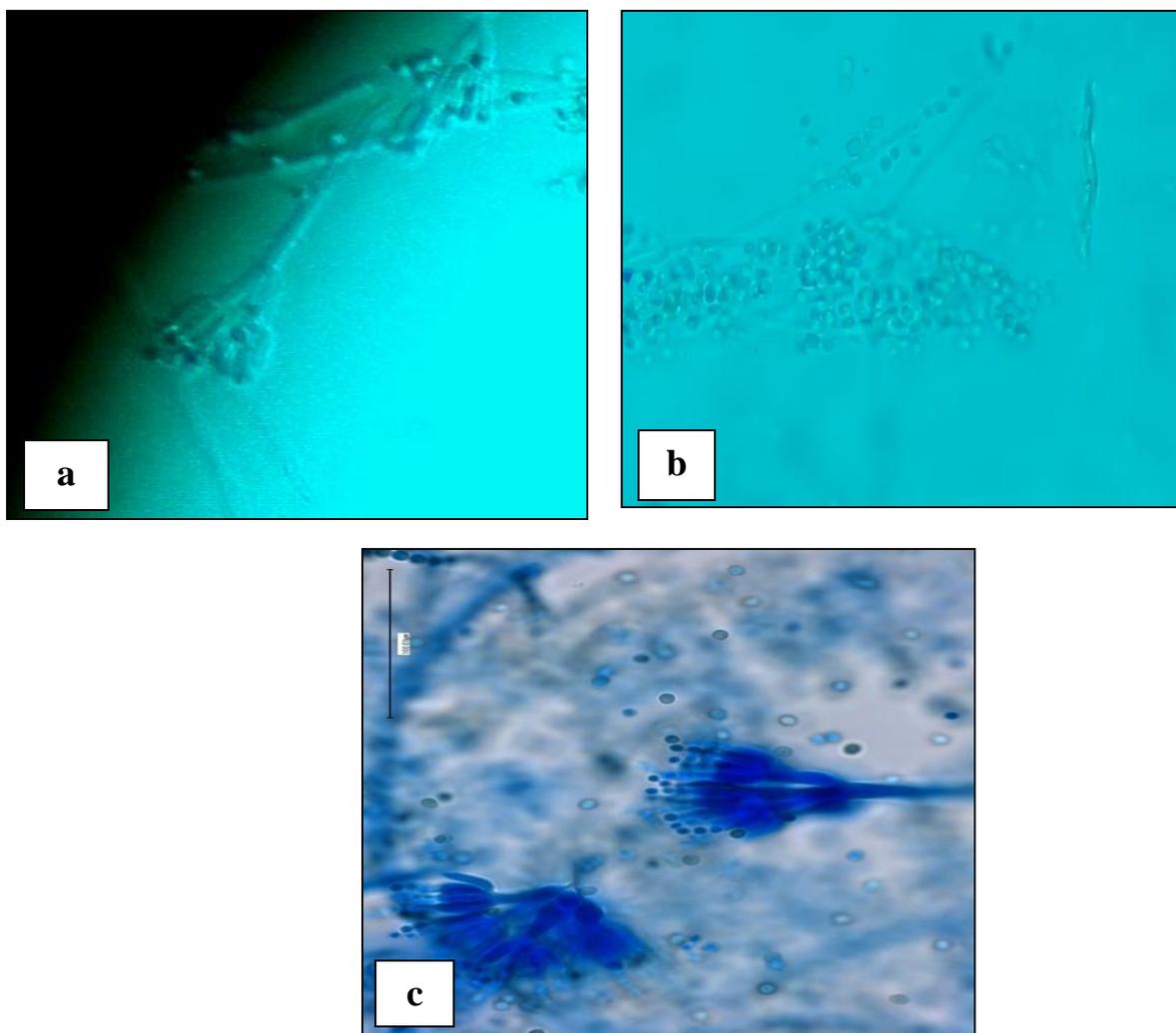
Milieu	La souche	Caractères macroscopiques
Sabouraud		<p><b>Couleur du mycélium et du contour :</b> Vert-bleu devenant gris ou brin, surélevé au centre, à contour blanc irrégulier. Exsudat jaune et pigment jaune diffusible.</p> <p><b>Forme du mycélium :</b> Circulaire à développement lent</p> <p><b>Texture :</b> Velouté et poudreuse</p> <p><b>Couleur du revers :</b> Incolore</p>

### • Identification microscopique

L'identification microscopique repose sur des critères morphologiques et sur l'ontogénie des spores, c'est-à-dire la conidiogénèse (aspect, couleur et structure des conidiophores), l'examen microscopique de la souche *Penicillium. sp* est réalisée au G×40 (figure 12).

La technique de coloration au bleu de lactophénol a permis d'observer des conidiophores isolés, des pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité des conidiophores qui apparaissent tous colorés en bleu. Les résultats obtenus sont similaires à ceux décrits dans la bibliographie (Jackson, 1962 ; Weiser et *al.*, 1971 ; Bennett, 1985 ; Dai et *al.*, 2004) à savoir :

- Pénicilles : asymétriques et complexe
- Conidiophores : lisses
- Métules : biverticillé
- Phialides : lancéolées
- Conidies : sub-globuleuses, lisses, disposées en longues colonnes irrégulières.



**Figure 12:** Observation microscopique de *penicillium chrysogenum* a et b : notre résultat au microscope optique au Gx40, c : photo de référence.

[https://www.google.dz/search?q=penicillium+chrysogenum+microscope&sa\(06/06/2017\)](https://www.google.dz/search?q=penicillium+chrysogenum+microscope&sa(06/06/2017))

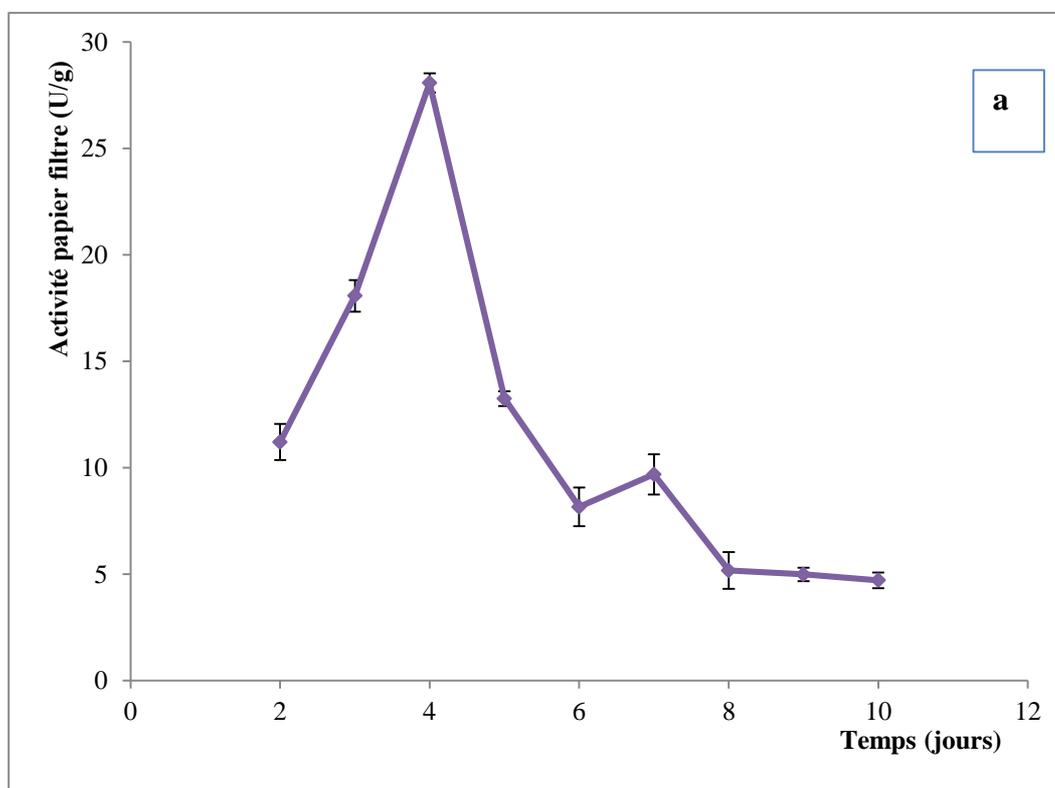
À partir de ces observations, nous pouvons conclure que la souche examinée semble appartenir à l'espèce *Penicillium chrysogenum*. En effet, les caractères présentés par cette souche se rapprochent énormément à ceux cités par Botton *et al.*, (1990) ; Guiraud, (1998) ; Chabasse *et al.*, (2002) pour l'identification de cette espèce.

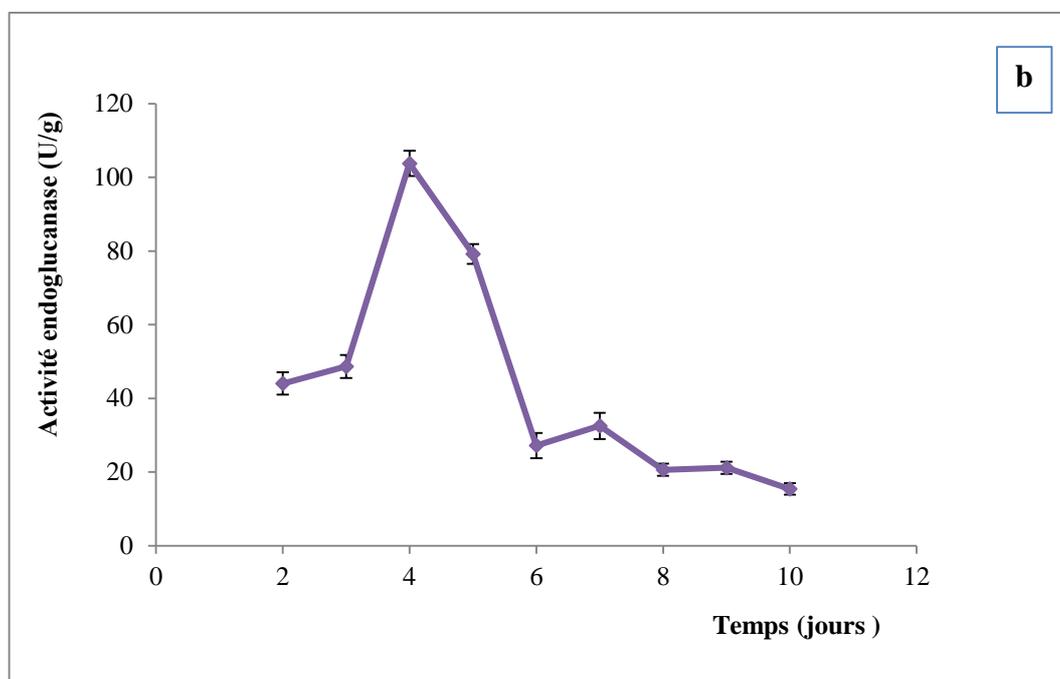
### 3. Production des enzymes cellulase et $\alpha$ -amylase par *Penicillium chrysogenum* cultivé sur substrat solide

#### 3.1. Suivi cinétique de la production de la cellulase par *Penicillium chrysogenum*

La cinétique de production de la cellulase par la souche *Penicillium chrysogenum* cultivée dans un milieu à base de son de blé. Elle est étudiée au cours de la fermentation par la mesure des activités enzymatiques APF et endoglucanase.

La production des enzymes est présentée par la (figure 13). Pour l'activité papier filtre (figure 13 a), on observe une augmentation progressive de sa production, où la moisissure a produit 11.21 U/g après deux jours de culture et atteint sa valeur maximale de **28.08 U/g** au bout de 4 jours d'incubation, puis elle diminue jusqu'à le 10<sup>ème</sup> jour à environ 5 U/g.





**Figure 13** : Activités cellulolytiques produites par *Penicillium chrysogenum* sur son de blé à 30°C (a: activité APF, b: activité endoglucanase).

Le profil cinétique de l'activité endoglucanase (figure 13b), ressemble celui obtenu avec l'activité globale APF. Le début de production est enregistré à partir du 2<sup>ème</sup> jour d'incubation, après elle augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale estimée à **103.78 U/g** au quatrième jour d'incubation. Au-delà, une diminution progressive est enregistrée jusqu'au dernier jour d'incubation, dont l'activité est mesurée à 15.41 U/g.

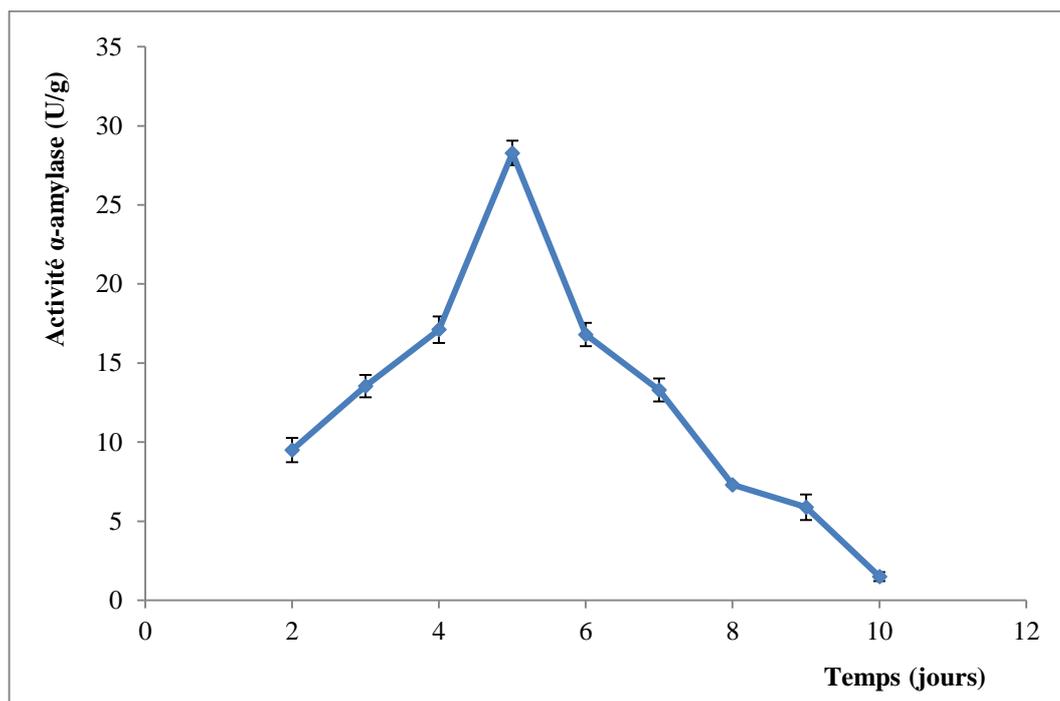
Notre résultat dépasse largement celui obtenu par *Penicillium chrysogenum* cultivée sur milieu contenant de la cellulose, qui a donnée après 60 heures de culture 0.67 U/mg protéine<sup>-1</sup> d'activité endoglucanase (Nwodo Chinedu et Okochi).

Par contre, un maximum d'activité papier filtre (140U/g) est produit par *Trichoderma reesei* NRRL 11460 après 96 heures de culture sur son de blé traité (Singnania *et al.*, 2006).

Sun *et al.* (2008) rapportent également l'augmentation de la croissance de *Penicillium decumbens* cultivée dans un milieu supplémenté par le son de blé.

### 3.2. Suivi cinétique de la production de l' $\alpha$ -amylase par *Penicillium chrysogenum*:

Le suivi cinétique de l' $\alpha$ -amylase produite par *Penicillium chrysogenum* cultivée sur son de blé est présenté par la figure 14.



**Figure 14 :** Activités amylolytiques produites par *Penicillium chrysogenum* sur son de blé à 30°C.

Cette activité augmente progressivement dès le début de la culture. Le pic de la production est obtenu après 5 jours d'incubation avec une valeur mesurée à **28.28 U/g**. Au-delà, on assiste à une diminution progressive, jusqu'à l'obtention d'une valeur très réduite de 1.5 U/g au dixième jour de culture.

Par ailleurs, Balkan et Ertan, (2005) ont étudiés les champignons et critiqué leur capacité à produire l'alpha-amylase, *Penicillium chrysogenum* a montré une activité enzymatique élevée. Plusieurs études faites par (Socol *et al.*, 1994 ; Lucio de-Sousa *et al.*, 1996 ; Akbache et Bariout., 2007) et (Ayugu et Amadi., 2010) montrent que certaines espèces du genre *Rhizopus* sont productrices d'amylases (glucoamylase et  $\alpha$ -amylase). Plusieurs espèces du genre *Penicillium* telles que *P. fellutanum* et *P. chrysogenum* sont productrices d' $\alpha$ -amylase, comme a été montré par les études de Kathiresan et Mannivanan (2006) ; Ertan et Balkan (2007).

En effet, l'activité amylolytique mesurée dans notre étude est à des valeurs largement inférieures à d'autre résultat qui montre que la production de l'alpha-amylase par *Penicillium*.

*chrysogenum*, cultivé dans des milieux solides contenant du maltose (1%) atteint son maximum de 350.2 U/g en 6-8 jours à 30°C, Cette valeur de l'activité enzymatique concorde avec celle trouvée avec *P. chrysogenum* (Hotopet *al.*, 1993), et d'autre souche de *Penicillium* : *P. olsoni* (Afifi *et al.*, 2008) .

Cependant, notre résultat se rapprochent de celui trouvé par Tiwari *et al.*, (2007) ; Taskin *et Erdal*, (2010) ; Nouadri, (2011) qui ont trouvé que l'activité  $\alpha$ - amylasique de diverses espèces appartenant au genre *Penicillium*, apparaît dès 24 heures d'incubation et augmente progressivement pour atteindre son maximum de production à des durée de 72 heures à 57 °C, 144 heures à 30 °C et 168 heures à 22 °C, pour les souches *Penicillium regulosum*, *Penicillium expansum* et *Penicillium cammenberti*, respectivement.

Beaucoup de champignons secrètent plus de protéines en cultures solides qu'en cultures liquides (Oda *et al.*, 2006). A la différence des autres microorganismes, les moisissures se développent dans la nature sur des substrats solides (Battaglino *et al.*, 1991). Les conditions naturelles de croissance des cellules ainsi que la disponibilité des nutriments sont donc plus favorables dans la culture solide (Sandhya *et al.*, 2005b). La croissance des moisissures en hyphes et leur bonne tolérance de  $a_w$  faibles les rendent efficaces et compétitives dans la microflore naturelle pour la bioconversion des substrats solides (Rahardjo *et al.*, 2006). Les enzymes hydrolytiques excrétées ont donc une action très efficace dans un milieu peu dilué et permettant la pénétration dans la plupart des particules de substrats solides. Cette pénétration augmente l'accessibilité des éléments nutritifs disponibles dans les particules (Raimbault, 1998). En effet, la culture solide est bien adaptée aux processus de développement des moisissures sur des substrats végétaux naturels. En outre, le substrat fermenté après *SSF* pourrait être utilisé comme source directe d'enzymes dans plusieurs applications technologiques : en tannerie, comme additif alimentaire, pour l'hydrolyse ligno-cellulosique et pour le traitement des fibres naturelles.

Par conséquent, nos résultats peuvent être améliorés par l'utilisation d'autres sous-produits agricoles et l'optimisation des conditions de production des enzymes.

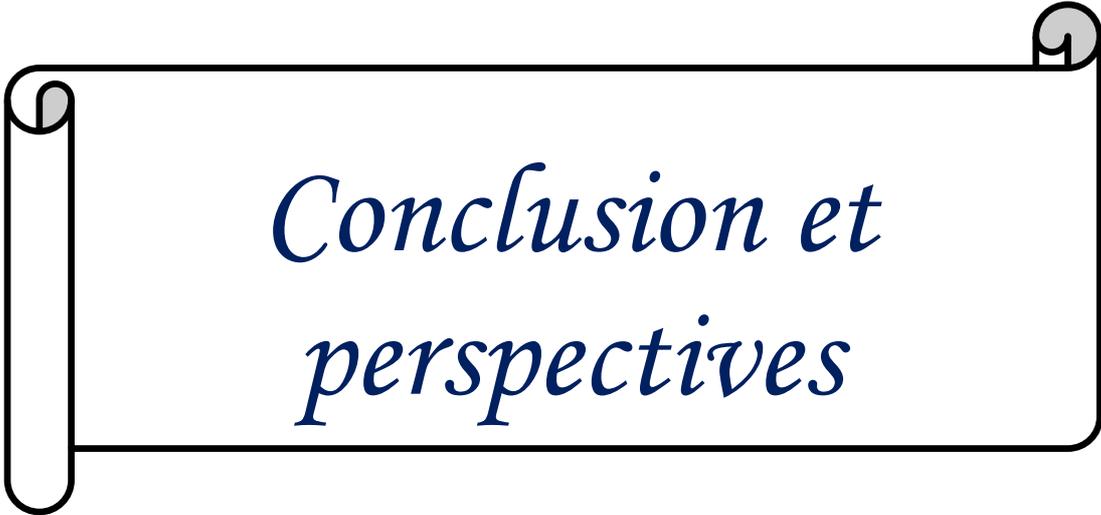
### 3.3. Humidité à la fin de la fermentation

L'humidité mesuré pour chaque prélèvement de culture de la moisissure *Penicillium chrysogenum*, sur son de blé sont consignées dans le tableau 09.

**Tableau 09 :** Humidité mesurée après chaque prélèvement.

<b>Prélèvement (jours)</b>	<b>Humidité (%)</b>
2	43
3	52
4	65
5	61
6	44
7	53
8	37
9	43
10	43

La diminution de l'humidité à chaque prélèvement par rapport à l'humidité initiale avant inoculation (83.7%), explique le besoin en eau pour la croissance de la moisissure, d'une part, et la production des enzymes recherchées en fermentation solide, d'autre part. La baisse de l'humidité observée dans le milieu confirme que les enzymes libérées permettent de retenir l'eau contenue dans le milieu.



*Conclusion et  
perspectives*

L'objectif de notre travail consiste à mettre en évidence, sur milieux gélosés, la production des activités hydrolases, à savoir amylase, cellulase et pectinase chez des souches fongiques provenant de sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales), la sélection de la souche performante pour la production de ces enzymes. Ainsi que, la production de la cellulase et d'alpha-amylase par fermentation sur milieu solide.

D'après les résultats obtenus sur milieux gélosés, la souche *Penicillium. sp* s'est avérée performante dans la production des trois enzymes recherchées par rapport aux autres souches

Le but principal de notre étude est la production des enzymes amylase et cellulase par fermentation sur substrat solide de la souche *Penicillium. sp*. Pour cela, l'étude des caractères culturels et morphologiques de cette souche ont permis son classement probable à l'espèce *Penicillium chrysogenum*. Nous avons utilisé le son de blé comme substrat naturel pour la croissance de la moisissure et la production de l'amylase et la cellulase, ce qui permet sa valorisation et la préparation des milieux à moindre coût telle que l'exige la production d'enzymes industrielles.

Le suivi cinétique de production de l'amylase et de la cellulase montre qu'au bout de 5 jours de fermentation, la moisissure *Penicillium chrysogenum* atteint sa production maximale d'amylase **28,28 U/g** après 5 jours de culture. Alors que, l'activité cellulasique au bout de 4 jours de culture, la production atteint un maximum de **28,08 U/g** pour l'activité APF et **103,78 U/g** pour l'activité endoglucanase.

Cette étude de la mise en évidence et la production des enzymes hydrolases de souches fongiques a donné des résultats très encourageants qui devront être complétés par les perspectives suivantes :

- Identification de la souche *Penicillium chrysogenum* par des techniques de biologie moléculaire.
- Optimisation des paramètres de production des enzymes: pH du milieu, et nature de l'agent humidifiant.
- Purification recommandée des enzymes pour une éventuelle utilisation en industrie alimentaire ou pharmaceutique.



*Résumés*

### **Résumé :**

Ce travail s'intéresse à la mise en évidence des activités hydrolases chez les souches fongiques : *Penicillium. sp*, *Aspergillus terreus* et *Trichoderma longibrachiatum*. Pour cela la première partie de ces travaux de recherche a porté sur la sélection de la meilleure souche performante dans la production des enzymes amylase, cellulase et pectinase. Après la culture des trois souches fongiques sur les milieux gélosés sélectifs, la souche *penicillium chrysogenum* est retenue pour la production des enzymes cellulase et alpha-amylase par fermentation en milieu solide.

La production des enzymes par le champignon filamenteux microscopique *Penicillium chrysogenum* cultivé sur son de blé à 70% d'humidité par fermentation solide, a donné une production maximale des activités APF et endoglucanase au bout de 4 jours de culture de **28.08 U/g** et **103.78 U/g**, respectivement. Par ailleurs, l'activité alpha-amylase donne un maximum de **28.28 U/g** au bout du 5<sup>ème</sup> jour de culture.

**Mots clés :** Amylase, cellulase, pectinase, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus terreus*, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation en milieu solide, son de blé.

**Abstract**

This work focuses on the detection of hydrolyses activities in fungal strains: *Penicillium. sp*, *Aspergillus terreus* and *Trichoderma longibrachiatum*. To this end, the first part of this research focused on the selection of the best performing strain in the production of amylase, cellulase and pectinase enzymes. After culturing the three fungal strains on the selective agar media, the *Penicillium chrysogenum* strain is retained for the production of cellulase and alpha-amylase enzymes by solid-state fermentation.

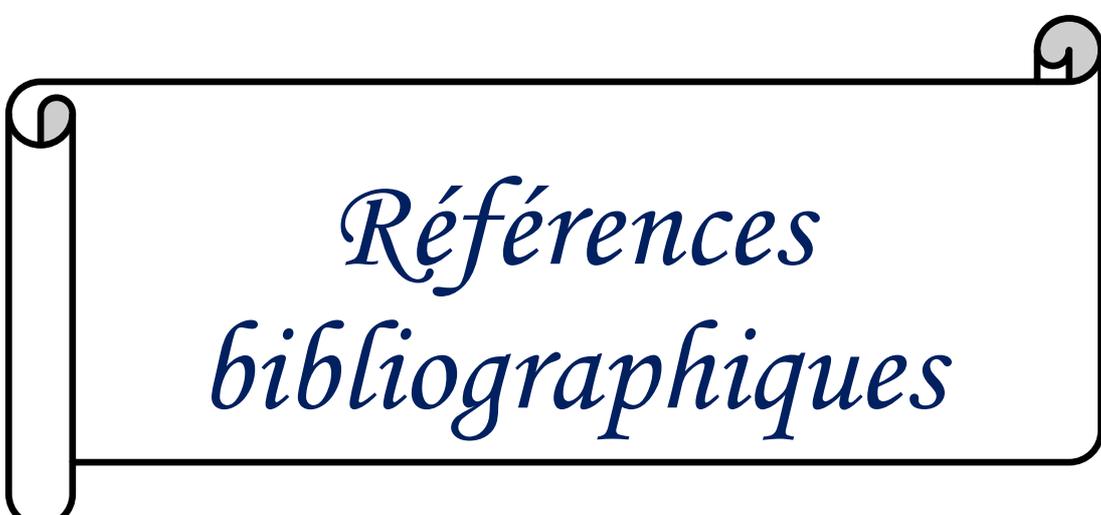
The production of enzymes by the microscopic filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* grown on wheat bran at 70% moisture by solid fermentation gave a maximum production of APF and endoglucanase activity of 28.08 U / g and 103.78 U / g after 3 and 4 days of culture, respectively. Furthermore, the alpha-amylase activity gives a maximum of 28.28 U / g at the end of the 5th day of culture.

**Key words:** Amylase, cellulase, pectinase, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus terreus*, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation in solid medium, bran of wheat.

### المخلص:

يركز هذا العمل على الكشف عن النشاط هيدرولاز في السلالات الفطرية *Aspergillus terreus*، *Penicillium.sp* و *Trichoderma longibrachiatum*. لهذا ركز في الجزء الأول من هذا البحث على اختيار أفضل سلالة في إنتاج الإنزيمات الأميلاز، سيلولاز و بكتيناز. بعد زراعة السلالات الفطرية الثلاثة على وسائط زرع انتقائية، يتم استخدام سلالة *Penicillium chrysogenum* لإنتاج الإنزيمات السيلولاز وألفا الأميلاز عن طريق التخمير في وسط صلب. إنتاج الإنزيمات بواسطة الفطريات الخيطية المجهرية *Penicillium chrysogenum* النامية على نخالة القمح إلى 70٪ الرطوبة عن طريق التخمير الصلب، وقدم العائد الحد الأقصى من APF والنشاط endoglucanase من **U 28.08** / ز **U 103.78** et / ز بعد 3 و4 أيام من الزرع، على التوالي. وعلاوة على ذلك، فإن النشاط ألفا أميلاز يعطي الحد الأقصى **U28.28** / ز بعد اليوم 5 من الزرع.

كلمات البحث: الأميلاز، سيلولاز، بكتيناز، *Trichoderma*، *Aspergillus terreus*، *Pencillium chrysogenum*، *longibrachiatum*، التخمير الحالة الصلبة، ونخالة القمح.



*Références  
bibliographiques*

- Abdullah A. (1985).** "Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw." *biotechnology and bioengineering* 27(1), P: 20-27.
- Aguillar G. & Huitron C. (1990).** Constitutive exopectinase produced by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 on different carbon sources. *Biotechnology Letters* 12, P: 655-660.
- Akbatche N. et Bariout S. (2007).** Utilisation de planification expérimentale pour l'optimisation d'un milieu de culture à base de farine de dattes déclassées pour la production d' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae*. Mémoire d'ingénieur, INATAA, université Mentouri, Constantine, P: 42.
- Alkorta I., Garbisu C., Llama M.J., Serra J.L. (1998).** Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Proc. Biochem.* 33 (1), P: 21-28.
- Audigie C.L., Fagerella J., Zonszain F. (1984).** Manipulation d'analyse biochimique. P: 270. Edition Tec et Doc, Lavoisier. Paris.
- Bahloul M., Imami A. (2016).** Activités cellulolytiques de souches fongiques cultivées sur son de blé. Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri. Constantine.
- Ballerini D. (2002).** La transformation de la biomasse lignocellulosique par voie biochimique et enzymatique. Institut Français du pétrole.
- Barnett C.C., Berka R.M., Fowler T. (1991).** Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved
- Battaglino R.A., Huergo M., Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B., (1991).** Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35; P: 292–296.
- Bèguin P., Aubert J P. (1994).** The biological degradation of cellulose, *fems, microbiol. Rev.* 13, P: 25-58.
- Bellon-Maurel V., Orliac O. & Christen P. (2003).** Sensors and measurements in solid-state fermentation: a review. *Process Biochem.*, 38, P: 881-896.
- Benkada M. (2006).** Evaluation du risque fongique en zone conchylicoles, substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Thèse de doctorat, chimie biologique, Université de Nantes : faculté des sciences pharmaceutiques.
- Berry D . R and Paterson A. (1990).** Enzymes in food industry *In: Sucking C.J. (éd.), Enzyme chemistry impact and application.* Editions Chapman and Hall London, 2nd edition. P: 306-351.
- Bornscheuer T. (2002).** Microbial carboxylesterases. classification, properties, and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, P: 73-81.

- Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P.,(1990).** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy ph., Larpent J P., Reymond P., Nevalainen k M H., Palva E J. (1990).** Production of extracellular enzymes in mutant Isolated from *Trichoderma viridea* unable to hydrolyse cellulose. *Appl envirmicrobiol*, 33, P: 11-16.
- Brivog k. (1992) .** Specificity of proteolysis. Spriger. Paris. P: 232.
- Buelon A ., Colonna P et Leloup V. (1990).** Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. *Industries Alimentaires et Agricoles*. 6, P: 515-532.
- Burhan A., Nisa U., Gokhan C., Omer C., Ashabil A and Osman G. (2003).** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* Sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem*. 38, P: 1397-1403.
- Cao J., Zheng L., Chen S. (1992).** Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of rammie. *Enz. Microbiol. Technol*. 14, P: 1013-1016.
- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. (2002).** Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans la sécurité alimentaire du consommateur, Lavoisier, Tec & Doc characterization. *Biotechnol. Biochem*. 62, P: 1751-1756.
- Chen C.M., Gritzali M., Stafford D.W. (1987).** Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Biotechnology*. 5, P: 274-278.
- Chi Z., Ma C., Wang P., Li H.F. (2007).** Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresour. Technol.*, 98; P: 534–538
- Dealarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec & Doc ; éditions médicales internationales. P: 776
- Djouldé Darman R. (2005).** Screening des microorganismes à potentialités fermentaires pour le manioc. Ed. AFNOR, Saint-Denis-la-plaine, France, P: 300.
- Ertan F. et Balkan B. (2007).** Production of  $\alpha$ -Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. *Food Technol. Biotechnol.* 45 (4), P: 439-442.
- Ertan F.et Balkan B. (2007).** Production of  $\alpha$ -Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. *Food Technol.Biotechnol.* 45 (4), P: 439-442.

- Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T. & Vniegra-Gonzalez G. (2006).** Production of hydrolytic polymerizing pectinases. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2), P: 221-227.
- Ferrero M.A., Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D., Sineriz F. (1996).** Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, P: 327–32.
- Filténborg O., Frisvad J.C., Thrane U. (1996).** Moulds in food spoilage, *Int. J. Food Microbiol.*, 33(1), P: 85-102.
- Fogarty (W.M.), Kelly (C.T.). (1980).** Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. *Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion*. London: Academic Press, Vol. 5, P: 115-170.
- Fujita Y., Takashashi S., Ueda M., Tanaka A., Okada H., Morikawa Y., Kawaguchi T., Arai M., Fukuda H., Kondo A. (2002).** Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (10). P: 5136-5141.
- Gainvors, A. & Belarbi, A. (1995).** Detection methods for polygalacturonase producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, P: 1311-1319.
- Gao, J., H. Weng, D. Zhou, M. Yuan, F. Guan and Yu Xi. (2008).** production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid state cultivation of corn stover., *Bioresour. technol.*, 99, P: 7623-7629.
- García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L.A. (2009).** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.*, 112; P: 604–608.
- Ghose, T.K. (1987).** Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* [en ligne], , vol. 59, n°2, P: 257-268. Disponible à l'adresse:
- Guiraud J P., & Rosec J P. (2004).** *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*,
- Guiraud J. P., (1998).** *Microbiologie alimentaire*. Donod. Paris. P: 7-330.
- Gusakov, A. ; Sinitsyn, A. ; Berlin, A. ; Markov, A. et Ankudimova, N. (2007).** Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose *Biotechnol. Bioeng* 97, P: 1028–1038.
- Harrigan W.F. & Mcance M.E. (1976).** *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic press. London. P: 21-277.
- Hausnner K., Hilgendor P., Hofbauer C., Demeester J. & Lauwers A. (1996).** New international F.I.P. method for the determination of the activity of *Aspergillus oryzae* proteases. *Pharmazie*. 51(12), P: 946-50.

**Hemery, Youna, Rouau, Xavier, Dragan, Ciprian, Bilici, Mihai, Belega, Radu, Dascalecu, Lucian. (2009).** Electrostatic properties of wheat bran and its constitutive layers: Influence of particle size, composition, and moisture content. *Journal of Food Engineering* [en ligne], juillet, vol. 93, n°1, P: 114-124.

**Hozzein Wael N., Li Wen-Jun, Ali Mohammed I.A., Ola Hammouda Mousa, Ahmed S., Xu Li-Hua, Jiang Cheng-Lin. (2004).** *Nocardiosis alkaliphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycetes isolated from desert soil in Egypt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, P: 247–252.

**Jacques Florimont. (2013).** Etude de la spécificité des enzymes digestives. Dernière modification le Mardi 31 Décembre à 12:10.

**Javed M. (2012).** "wheat bran as a brown gold: nutritious value and its biotechnological applications." *african journal of microbiology research* 6(4), P: 724-733.

**Jayani R.S., Saxena S. & Gupta R. (2005).** Microbial pectinolytic enzymes: areview .Protopectinase: production, properties, and applications. *Adv Appl Microbiol* 39, P:213–294.

**Kabel, Mirjam A., Van Der Maarel, Marc J.E.C., Klip, Gert, Voragen, Alphons G.J., Schols, Henk A. (2006).** Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials. *Biotechnology and Bioengineering* [en ligne], janvier, vol. 93, n°1, P : 56-63. Disponible à l'adresse :

**Kader A.J., Omar O., and Feng L.S. (1999).** Isolation of cellulolytic fungi from the bario Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. *Review of Biodiversity and Environmental Conservation*.

**Karmakar M. et Ray R.R. (2011).** Tendances actuelles de la recherche et de l'application des cellulases microbiennes. *Research Journal of Microbiology*, 6, P: 41-53.

**Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S. & Tewari R., (2001).** Applications of pectinase sin the commercial sector: areview. *Bioresour. Technol.*, 77,p: 215-227.

**Kathiresan K.et Manivannan S. (2006).**  $\alpha$ -amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (10), P: 829-832.

**Keating L., Kelly C., Forgatry W. (1998).** Mechanism of action and the substrate dependant pH maximum shift of the- amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Research*. P: 311-318.

**Kitamoto N., Go M., Shibayama T., Kito Y., Ohmiya K., Tsukagoshi N. (1996).** Molecular cloning, purification and characterisaton of two endo-1,4- $\beta$ -glucanases from *Aspergillus oryzae* KBN 616. *Appl . Microbiol. Biotechnol* .46, P: 538-544.

- Kkemm D., philip B., Heinze T., Heinze U., et Wagenknecht W. (1998).** Evaluation of hydrolysis conditions of cellulosic materials by *penicillium* cellulase. *Bioresour. Technol.* 52, P: 109-117.
- Korish M. (2003).** Production, purification, properties and application of the cellulose From a wild type strain of a yeast isolate. Faculty of biology, Johannes gutenberg-University, mainz, germany.
- Kubicek C.P., and Penttilä M. E. (1998).** Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*.. In G. E. Harman and C. P. Kubicek (2ed), P: 49-72. Taylor & Francis Ltd., London, United Kingdom.
- Leghlimi H. (2013).** Cellulases de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de Doctorat en Sciences.
- Li, Y.H., M.Ding, J.Wang, G .J.Xu and F.zhao. (2006).** A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose degrading bacterium, *bacillus* sp .AC-1. *Appl microbiol .Biotechnol.*, 70, P:430-436 .lignine .P: 199 -214.Edition Gauthier –Villard, Paris.
- Liese A., Seelbach S., Wandrey C. et Wileyu V C H. (2000).** Industrial biotransformations.
- Lokington R.A., Kelly J.M. (1997).** Direct conversion of cellulose to ethanolby engineered filamentous fungi. *Environmental . Biotechnology.*7 (6). P: 363-368.
- MAES, C., DELCOUR, J.A. (2001).** Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction of Wheat Bran Non-starch Polysaccharides. *Journal of Cereal Science* [en ligne], vol. 34, n°1, P: 29-35. Disponible à l'adresse :
- Mathot P. (1996).** *Modélisation d'un réacteur simplifié pour la fermentation solide de produits et sous-produits agricoles. Valorisation de l'aliment fermenté par le porc.* Thèse de doctorat : Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique).
- Mehta V.J., Thumar J.T., Singh S.P. (2006).** Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresour. Technol.*, 97, P: 1650–1654.
- Miller G L. (1959).**Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.*Analyt Chem.* 31, P: 426-428.
- Morin O. (1994).** *Aspergillus et aspergilloses: biologie*, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses8-600-A-10
- Nakatani H. (1996).** Rontecarlo stimulation of multiple attack mechanism of  $\alpha$ - amylase. *Biopolymers.*39 (5), P: 665-669.

- Neiss S., Montenecourt B.C.,(1984).** Characterisation of the secreted cellulases of *Trichoderma reesei* wild type and mutants during controlled fermentations. *Appl Microbiol Biotech*, 20, P: 46-53.
- Nigam (P.), Singh D. (1995).** Enzymes and microbial systems involved in starch processing. - *Enzyme Microb. Technol.* 17(9), P: 770-778.
- Nogawa, M., Goto M., Okada H., and MorikawaY. (2001).** L-Sorbosein duces cellulosegene trancription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* . *Curr. Genet.* 38. P:329-334.
- Oda K., Kakizono D., Yamada O.,Iefuji H., Akita O., Iwashita K. (2006).** Proteo micanalysis extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(5), P : 3448–3
- Odier F., Rouau X. (1985).** Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine p.199-214.in: Mouranche A., C. (ed), Hydrolases et dépolymérase. Enzyme d'intérêt industriel. Edition Gauthier-Villard, Paris.
- Oikawa T. (1998).** Endo- $\alpha$ -glucanase secreted by a Psychrotrophic yeast: purification and
- Pandey A., (1991).** Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid state fermentation. *Bioresour. Technol.* 37, P: 169-172.
- Pazur J. H and Marchetti N.T. (1992).** Action patterns of amylyolytic enzymes as determined by the [1-14 C] malto-oligosaccharides mappingmethod. *Carbohydr. Res.* 227, P: 215-225.*Process Biochem.*, 40, P: 2931-2944.
- Pentilla M.E., Andre E.L., Saloheimo M.,Lehtovaara P.,Knowles J.K. (1987).** Expression of two *Trichoderma reesei* endo-glucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*.3, P: 175-785.
- Petterson G., Farger S.L., Bhikhabhai R., Leandroer K.,(1981).** In the Ekman-Days. International Symposium on wood and pulping Chemistry, SCPI, Stockholm, 111, P: 39.
- Pitt J.I. (1988).** Laboratory guide to common *Penicillium* species, Academia Press editor, London
- Rahardjo Y.S.P., Tramper J. & Rinzema A., (2006).** Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol. Adv.*, 24(2),P: 161-179.
- Raimbault M. (1998).** General and microbiological aspects of solidsubstrate fermentation, *Elec. J. Biotech.*, 1(3), P: 1–15.

- Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M.S. & Deshpande V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biology Rev.* **62** (3), P: 597-635.
- Raper K., Fennell D.J. (1965).** The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore. rates of saccharification of cellulosic substrates. *Biotechnol ogy*.9, P: 562-567.
- Receveur V., Czjzek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002).** Dimension, shape, and conformational flexibility of a two-domain fungal cellulase in solution probed by small angle X-ray scattering. *The journal of Biological Chemistry.* 277(43), P: 40887-40892.
- Riou C., Salmon J.M., Vallier M.J., Gunata Z., Barre P. (1998).** Purification, characterisation, and substrate specificity of a novel high glucose tolerant  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotrechnol* .64, P: 3607-3614.
- Roquebert M.F. (1998).** Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification”, in “Moisissures des aliments peu hydratés”, Ed. Tec & Doc, P: 39-95
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 40, P: 2689–2694.
- Schamburg D. & Salzmann M.G.B.F. (1991).** Cellulase. *In: Enzyme Hand book*, Vol, IV66(3) : 506-5.9414: action on cello-oligosaccharides, *Carbohyd.Res.*275,P: 207-213.
- Schwimmer S and Balls A.K. (1949).** Isolation and properties of crystalline  $\alpha$ -amylase from germinated barley. *J. Biol. Chem.* 179, P: 1063-1074.
- Scriban R. (1993).** *Trichoderma reesei* exhibit true reversion and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Biotechnologie*. P : 32-690, 4<sup>ème</sup> édition.
- Scriban R. (1999).** *Biotechnologie*. 5<sup>ème</sup> édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (éd.).P : 401-409.
- Shoemaker S., Schweickart V., Ladner M., Gelfand D., Kwok S., Myamlo K., Innis M. (1983).** Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *biotechnology*.1, P: 691-695.
- Singh.A. (1999).** Engineering enzyme properties, *Indian Journal of Microbiology*, vol. 39, no. 2, P: 65–77.
- Stratilova E., Markovic O., Skrovinova D., Rexova-Benkova L., Jornvall H. (1993).** Pectinase *Aspergillus. sp.* polygalacturonase: multiplicity, divergence and structural patterns linking fungal, bacterial and plant polygalacturonases – *Journal of protein chemistry.* 12 , P : 15-22.

**Suregt, Anne, Barron, Cécile. (2005).** Histologie du grain de blé. Industries des Céréales [en ligne], n°145, P : 3-7.

**Takashima, S., Nakamura A., Hidaka M., Masaki H., and Uozumi T. (1999).** Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. J. Biochem. 125. P:728-736.

**Tamura and Takeichi K. Y., Otozai, K., Yamasaki, M., Yamazaki, G. H., Ohmura, K. A., Nakayama Y. (1983).** Alpha-amylase genes (amy R2 and amy E+) from an alpha-amylase-hyperproducing *Bacillus subtilis* strain: nucleotide sequences and. molecular cloning J. Bacteriol., 156 (1), P: 327.

**Tatiana da Costa RP, and Flevo F. (2005).** Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Food Chem. 89, P: 85-92.

**Tatsinkou F.B., Taveai F and Ndjouenkeui R. (2005).** Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. African Journal of biotechnology., 4(1), P: 14-18

**Tobe S., Takami T., Ikeda S., Horikoshi K. (1976).** Production of some enzymatic properties of alkaline protease of *Candida lipolytica*. Agric. Biol. Chem., 40, P: 1087–1092.

**Wiseman A. (1978).** Introduction to topics in enzyme and fermentation biotechnology 3- Ed. Wisman. Ellis Horwood Ltd. P: 60-66.

### **Site web:**

<http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.2001.0377>

<http://dx.doi.org/10.1002/bit.20685>

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.01.003>

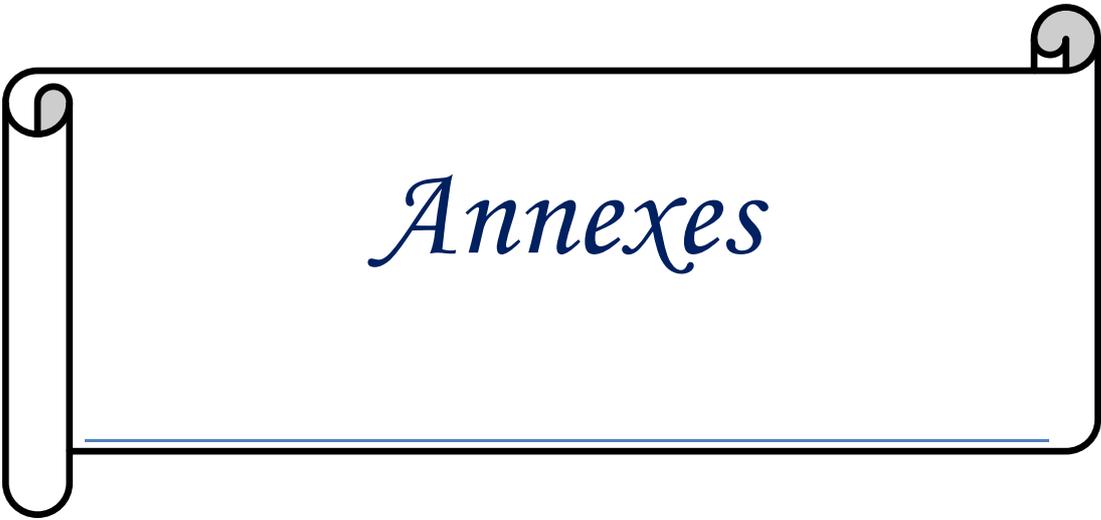
<http://www.industriesdescereales.com/Images/Produits/548E2BE8-6F6B-447B-8E94-4C8E59097B35.PDF>

<http://www.iupac.org/publications/pac/59/2/0257/>

[https://en.wikibooks.org/wiki/Medical\\_Physiology/Gastrointestinal\\_Physiology/Digestion\\_%26\\_Absorption](https://en.wikibooks.org/wiki/Medical_Physiology/Gastrointestinal_Physiology/Digestion_%26_Absorption) (29/05/2017)

<https://www.google.dz/search?q=penicillium+chrysogenum+microscope&sa> (06/06/2017)

<https://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/1/index.html>.



*Annexes*

### **Annexe 1 : Milieu Sabouraud**

- Glucose .....20g
- Peptone .....10g
- Agar .....15g
- Eau distillé .....1000ml
- pH =5.6
- stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

### **Annexe 2 : Milieu (CMC-agar)**

- CMC .....20g
- Extrait de levure .....5g
- Agar .....15g
- Eau distillé.....1000ml
- pH=5
- stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

### **Annexe 3 : Milieu PDA à amidon 1%**

- Extrait de pomme de terre.....1000ml
- Amidon .....10g
- Glucose.....20g
- Agar.....20g
- pH= 5
- stérilisation à 110°C pendant 30 minutes
  - Préparation de l'extrait pomme de terre

200g de pomme de terre non pelées vieilles sont lavés et coupés en petites dés ensuite mis dans un litre d'eau distillée et portés à ébullition pendant 1heure , ils sont enfin écrasés ,filtrés ,compléter à 1L d'eau distillée

- Préparation de milieu de culture

L'agar et le glucose et l'amidon dissous à chaud dans l'extrait, compléter à 1Ld'eau distillée

#### **Annexe 4 : Milieu Pectine-agar**

- Pectine.....5g
- Extrait de levure.....5g
- Agar .....20g
- Eau distillé .....1000ml
- pH =5
- stérilisation à 110°C pendant 30 minutes

#### **Annexe 5: Les indicateurs colorés**

##### ❖ Rouge Congo à 0.1%

- Rouge Congo .....0.1g
- Eau distillé .....100ml

-dissoudre 0.1g de Rouge Congo dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 100ml

##### ❖ Acétate de cuivre à 7.5%

- Acétate de cuivre .....7.5g
- Eau distillée .....100ml

-dissoudre 7.5 g de l'acétate de cuivre dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 100ml

##### ❖ Eau iodée (Lugol)

- Iode .....1g
- Iodure de potassium ..... 2g
- Eau distillé .....100ml

-dissoudre 2g d'iodure de potassium dans un peu d'eau distillée puis ajouter 1g d'iode, ensuite compléter à 100ml d'eau distillée (ajouter éventuellement un peu d'iode pour permettre la dissolution totale de l'iode)

### Annexe 6 : Agent humidifiant

- Glucose.....1g
- Sulfate d'ammonium.....0.046g
- Tartrate double Na, K.....0.046g
- Eau distillé.....100ml

-Dissoudre 1 g de glucose, 0.046g de sulfate d'ammonium et 0.046 g de tartrate double Na, K Dans 100 ml d'eau distillée et bien mélanger jusqu'à l'homogénéisation complète.

### Annexe 7 : Dosage de l'activité cellulolytique et amylolytique

#### ❖ solution tampon citrate 0.1M, pH =4.8

- Acide citrique (0.1M).....23g
- Citrate de sodium (0.1 M).....58g
- Eau distillé

#### Protocole :

- 1000ml acide citrique (0.1M) : 23g A. citrique dans 1000 ml d'eau distillée.
- 2000mlcitrate de sodium (0.1M) : 58g citrate de sodium dans 2000ml d'eau distillée.
- Titration jusqu'à pH 4.8. La solution tampon est conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

#### ❖ Solution tampon phosphate citrate 0.1 M, pH= 5

**Etape 01** : préparation d'une solution basique constituer de :

- sodium phosphate dibasic.....17.8g
- Eau distillé.....1000ml

**Etape 02** :

Dans un 500 ml d'acide citrique et sous agitation, ajouter la solution basique jusqu'à l'obtention d'un pH = 5

#### ❖ Réactif de DNS

-Dissoudre 1g de DNS dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée.

-Ajouter 30g tartrate double Na, K. Compléter à 100ml avec l'eau distillée, agité.

-Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière. Il se conserve environ un mois (Miller, 1959).

### ❖ Solution de CMC (1%) :

- CMC.....1 g
- Tampon citrate (0.1M, pH= 4.8).....100ml

### ❖ Solution d'amidon (1%) :

- Amidon.....1 g
- Tampon phosphate citrate (0.1M, pH=5).....100 ml

### Annexe 8 : Lactophénol-bleu coton

- Phénol en cristaux .....20 g
- Acide lactique..... 20 g
- Glycérine.....40 g
- Eau distillée.....20 g
- Bleu de méthylène.....0.5 g

### Annexe 9 : Composition chimique du son de blé.

Paramètre	Pourcentage %
Taux d'humidité initial	13.7
Cellulose	16.2
Protéine	29
Matière grasse	7.7
Matière minérale	10.5



**Thème** : Activités hydrolases des souches fongiques.  
Production par fermentation de cellulase et d' $\alpha$ -amylase par *Penicillium. sp*  
cultivé sur substrat solide

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des  
Mycètes : Fermentation et production de substances fongiques.

**Résumé:**

Ce travail s'intéresse à la mise en évidence des activités hydrolases chez les souches fongiques : *Penicillium. sp*, *Aspergillus terreus* et *Trichoderma longibrachiatum*. Pour cela la première partie de ces travaux de recherche a porté sur la sélection de la meilleure souche performante dans la production des enzymes amylase, cellulase et pectinase. Après la culture des trois souches fongiques sur les milieux gélosés sélectifs, la souche *penicillium chrysogenum* est retenue pour la production des enzymes cellulase et alpha-amylase par fermentation en milieu solide.

La production des enzymes par le champignon filamenteux microscopique *Penicillium chrysogenum* cultivé sur son de blé à 70% d'humidité par fermentation solide, a donné une production maximale des activités APF et endoglucanase au bout de 4 jours de culture de **28.08 U/g** et **103.78 U/g**, respectivement. Par ailleurs, l'activité alpha-amylase donne un maximum de **28.28 U/g** au bout du 5<sup>ème</sup> jour de culture.

**Mots clés:** amylase, cellulase, pectinase, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus terreus*, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation en milieu solide, son de blé.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de microbiologie. Université des Frères Mentouri  
Constantine1. Algérie.

**Jury d'évaluation :**

**Présidente :** Mme. MIHOUBI Ilhem. (Prof- UFM Constantine).  
**Rapporteur :** Mme. LEGHLIMI Hind. (MCB- UFM Constantine).  
**Examinatrice :** Melle. ABDELAZIZ Wided. (MAA- UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 12/06/2017