

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



**Université des Frères Mentouri
Constantine 1**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie**



Mémoire présenté en vue d'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Biochimie Appliquée

**Etude de la production de l'endoglucanase
par fermentation solide chez candida sp.
Optimisation et purification**

Présenté par :

- ❖ **Bara Chaima**
- ❖ **Fergani Hiba**

Jury d'évaluation :

Présidente : Mme Bennamoun L MCB, UMC Constantine.

Encadreuse : Mme Dakhmouche S MCA, ENS Assia Djebbar, Constantine.

Examinatrice : Mme Leghlimii.H MCA, UMC Constantine.

Année Universitaire 2020-2021

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

Nous voudrions adresser toutes nos reconnaissances à la directrice de ce mémoire, Mme Dakhmouche Scheherazed. Nous la remercions de nous avoir encadrées, orientées, aidées et conseillées.

Nos remerciements vont également à tous les membres de jury, pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce modeste travail,

Nous tenons à remercier nos très chers parents pour nous avoir encouragés. Qui ont toujours été là pour nous dans les bons comme les mauvais moments. Pour leur soutien durant toutes ces années scolaires qui n'ont pas été faciles. Sans eux, nous n'en serons pas là.

Enfin, nous aimerons exprimer notre gratitude à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Chaïma et Hiba

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce travail :

À mes chers parents, Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

À ma chère sœur Amira, pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

À toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

À mes Amis À tous ceux qui me sont chers.

Chaima

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour à mes
parents*

*ceux Qui m'ont donnés l'espoir et le courage nécessaire pendant
mon*

long trajet d'étude

Ma chère mère la source de tendresse

La personne qui occupe la meilleure place dans mon cœur,

Mon cher père que dieu lui fasse miséricorde

*Un grand merci à mes chers frères et sœurs surtout Soumiea
que Dieu les préserve*

*Mes amies Najla et Sara Pour le soutien moral,
Qui ont toujours été à côté de moi je leur souhaite une vie heureuse*

A tous ceux qui m'aiment.

Hiba

Figure 1 : Louis Pasteur dans son laboratoire de l'école Normale Supérieure..	3
Figure 2 : Morphologie des cellules de levure et des mycelium	5
Figure 3 : Structure cellulaire des levures	6
Figure 4 : Schéma de dégradation enzymatique d'une fibre de cellulose	16
Figure 5 : Cellolyse (EG : endoglucanase, CBHI : cellobiohydrolase de type I, CBHII : cellobiohydrolase de type II, BG : β -glucosidase).	17
Figure 6 : Organisation de cellulosome	18
Figure 7 : Structure tridimensionnelle de la biomasse lignocellulosique	21
Figure 8 : Structure moléculaire de la cellulose représentant l'unité cellobiose comme unité de répétition montrant les groupes finaux réducteurs (à droite) et non réducteurs (à gauche)	22
Figure 9 : Cellulose à différentes échelles	23
Figure 10 : Observation macroscopique de la souche Y1 sur milieu YMA après 48 h d'incubation à 30°C	35
Figure 11 : Observation au microscope optique de la souche Y1 (G \times 40)	36
Figure 12 : Procédure de l'identification des levures à l'aide de la galerie ID 32C	37
Figure 13 : Fermentation solide	41
Figure 14 : fermentation liquide	43
Figure 15 : Courbe étalon de glucose	45
Figure 16 : Courbe étalon des protéines	52
Figure 17 : Chromatographie sur colonne séphadex g50	53
Figure 18 : Préparation du jus de pomme	54
Figure 19 : Mise en évidence de l'activité cellulotique de la souche Y1 sur milieu YPCA	55
Figure 20 : Lecture de la galerie API 32 C après 48 h	56
Figure 21 : Évaluation de différents substrats lignocellulosique pour la production de l'activité endoglucanase sous fermentation solide et liquide	58
Figure 22 : Évaluation de différents substrats lignocellulosique pour la production de l'activité de cellulase totale sous fermentation solide et liquide	59
Figure 23 : Effet du carboxymethyl cellulose sur la production de l'activité CMCCase	61
Figure 24 : Effet du carboxymethyle cellulose sur la production de l'APF	62
Figure 25 : Effet des sources d'azotes sur la production de l'activité CMCCase	63
Figure 26 : Effet des sources d'azotes sur la production de l'APF	64
Figure 27 : Effet des sels sur la production d'enzyme CMCCase	66

Figure 28 : Effet des sels sur la production de l'APF	67
Figure 29 : Charte Pareto des effets standardisés des paramètres opératoires sur l'activité endoglucanase	78
Figure 30 : Graphique de probabilité normal des résidus	79
Figure 31 : Graphique des effets directs pour l'endoglucanase	79
Figure 32 : Courbes de contour (A) et la surface de réponse (B)	82
Figure 33 : Valeurs optimales des variables et de la réponse déterminées par « RSM » pour une meilleure activité endoglucanase	83
Figure 34 : Diagramme des interaction pour l'activité endoglucanase	83
Figure 35 : Profil chromatographique de cellulase de condida sp sur séphadex G-50 (la colonne de gel 100cm*1cm) est équilibrée et éluée par le tampon phosphate	88
Figure 36 : Clarification du jus de pomme produit par la cellulase	90
Figure 37 : Clarification du jus de pomme produit par l'eau (E : échantillon, C : control) ...	90

Tableau 1 : Principaux microorganismes cellulolytiques et pseudocellulolytiques.	8
Tableau 2 : Composition biochimique de son de blé	26
Tableau 3 : Composition biochimique de la paille de blé	27
Tableau 4 : La composition de la bande ID 32 C	38
Tableau 5 : La composition d'API C Medium.	39
Tableau 6 : Matrice d'expériences de Plackett et Burman pour l'étude de 11 facteurs avec 12 expériences.....	47
Tableau 7 : Les facteurs testés et leurs concentrations correspondantes	47
Tableau 8 : Générateur des matrices pour N=8,12,16 et 20 essais Plackett et burman	48
Tableau 9 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré.	49
Tableau 10 : La matrice expérimentale du plan composite centré pour l'étude de six facteurs.	50
Tableau 11 : Activités enzymatiques selon le plan de Plackett et Burman.	68
Tableau 12 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de l'endoglucanase SB et PB.....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 13 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production l'activité papier filtre (APF) PB et SB.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 14 : Valeurs expérimentales (observées) de l'activité endoglucanase par le CCD ..	74
Tableau 15 : Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité endoglucanase.	75
Tableau 16 : Résultats de ANOVA du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité endoglucanase (CMC ase).	77
Tableau 17 : Purification d'enzyme cellulase produites par <i>Condida sp</i>	87
Tableau 18 : Effet de cellulase produite sur le volume et le rendement du jus de pomme. ...	89

Liste des abréviations

- ❖ **CMC** : Carboxyméthyl cellulose.
- ❖ **APF** : Activité papier filtre
- ❖ **CMCase** : Carboxyméthyl cellulose.
- ❖ **E.C.** : Enzyme commission.
- ❖ **E** : Enzyme
- ❖ **EG**: Endoglucanases
- ❖ **D.P.** : Degré de polymérisation
- ❖ **CBH** : Cellobiohydrolase.
- ❖ **BG**: β -glycosidase.
- ❖ **CBD** : Cellulose Binding Domain.
- ❖ **CBM** : Domaine de liaison au substrat.
- ❖ **CD** : Domaine catalytique
- ❖ **T** : *Trichoderma*
- ❖ **sp** : Espèce
- ❖ **FMS** : Fermentation sur milieu solide
- ❖ **FML** : fermentation sur milieu liquide
- ❖ **MS** : Matière sèche
- ❖ **rpm** : Rotation par minute
- ❖ **UI**: Unité internationale
- ❖ **aw** : activité de l'eau
- ❖ **C°** : degré celsius
- ❖ **min** : minute
- ❖ **h** : heure

- ❖ **cm** : centimètre
- ❖ **mg** : milligramme
- ❖ **ml** : millilitre
- ❖ **M** : Molarité
- ❖ **pH** : potentiel d'hydrogène
- ❖ **DNS** : Acide dinitrosalicylique
- ❖ **PBD** : Plackett-Burman Design
- ❖ **RSM** : Response Surface Methodology
- ❖ **CCD** : Central Composite Design
- ❖ **F** : Statistique test de Fisher
- ❖ **ANOVA** : Analyse of Variances

I. Introduction générale	1
Chapitre 1 : Etude des levures cellulolytiques	3
I. Introduction	3
II. Morphologie et Structure	4
III. Caractères biochimiques	6
IV. Habitat	7
V. Microorganismes cellulolytiques	7
V.1. Bactéries cellulolytiques	9
V.2. Champignons cellulolytiques	10
V.3. Levures cellulolytiques	11
Chapitre 2 : étude de la cellulase	13
I. Nomenclature de la cellulase	13
II. Caractéristiques de la cellulase	13
III. Enzymes cellulolytiques	14
III.1. Endoglucanases (EGs) (EC 3.2.1.4) ou 1,4-β-D-glucan 4 glucanohydrolases ..	14
III.2. Exoglucanases (EC 3.2.1.91) ou 1,4-β-D-glucane cellobiohydrolases ou cellobiohydrolases (CBHs)	15
IV. Mode d'action	15
V. Cellulolyse	16
VI. Cellulosome	17
VI.1. Liaison cellulosome-substrat	18
VI.2. Action synergique	19
Chapitre 3 : Production de la cellulase	20
I. Production industrielle de la cellulase	20

II. Facteurs influençant la production cellulotique	20
II.1. Source de carbone	20
II.I.1. Lignocellulose	21
a) Structure et la propriété de la cellulose.....	22
II.I.1.2. Hémicellulose	24
II.I.1.3. Lignine.....	24
II.I.2. Déchets lignocellulosique.....	24
I. Son de blé	24
II. Paille de blé.....	26
III. Grignon d'olive	27
IV. Papier.....	28
II.2. Source d'azote	28
II.3. Sels	28
II.4. pH.....	29
II.5. Températures	29
II.6. Humidité.....	29
III. Fermentation solide	30
III.1. Définition	30
III.2. Les avantages de fermentation solide	30
IV.1. Définition.....	31
IV.2. Avantages du fermentation liquide	31
IV.3. Désavantages du fermentation liquide	31
V. Comparaison entre fermentation solide et liquide.....	31
VI. Amélioration de la production enzymatique	32
VI.1. Méthode OFAT (one factor at a time).....	32
VI.2. Plan de Plackett-Burman	33
VI.3. Plan composite central (CCD)	33

I. Microorganisme	35
I.1. Origine de la souche levurienne	35
I.2. Réactivation de la souche.....	35
I.3. Mise en évidence de l'activité cellulolytique.....	36
I.4. Identification de la souche levurienne (Assimilation des composés carbonés : Galerie API ID32C)	36
I.5. Préparation de l'inoculum.....	39
I.6. Dénombrement des cellules	40
II. Etude de la production de la cellulase	40
II.1. Substrat utilisé pour la fermentation	40
II.2. Sélection du milieu de fermentation	40
II.2.1. Préparation des fermentations en milieu solide	40
II.2.2. Préparation des fermentations en milieu liquide	42
a) Préparation du milieu	42
b) Conduite de la fermentation.....	42
III. Méthodes analytiques	43
III.1. Dosage des activités cellulolytiques	43
III.1.1. Activités papier filtre	43
III.1.2. Activité endoglucanase	44
IV. Optimisation des paramètres influençant la production de cellulase	45
IV.1. Optimisation des conditions de culture pour la production de cellulase par un facteur à la fois (OFAT).....	45
IV.1.1. Effet des sources d'azotes :.....	46
IV.1.2. Effet de la source de carbone :.....	46
IV.1.3. Effet des sels :	46
IV.2. Optimisation des conditions de culture pour la production de cellulase par la méthode statistique.....	46

IV.2.1. Optimisation de la production des enzymes selon le plan statistique de Plackett et Burman.....	46
IV.2.2. Optimisation des composants sélectionnés	49
V. Purification de cellulase	51
V.1. Dosage des protéines	51
V.2. Chromatographie d'exclusion	52
VI. Applications enzymatiques	53
I. Mise en évidence de l'activité cellulotique.....	55
II. Identification de la souche levurienne	56
III. Etude de la production de la cellulase	56
III.1. Sélection des meilleures sources de carbone	56
III.1.1. Activité endoglucanase	57
III.1.2. Activité papier filtre (APF)	58
IV. Optimisation des conditions de cultures pour la production des cellulases	60
IV.1. Optimisation des conditions de culture pour la production de cellulase par la méthode OFAT	61
IV.1.1. Effet de la CMC sur la production de cellulase	61
IV.1.2. Effet des sources d'azotes organiques et inorganiques sur la production de cellulase.....	63
IV.1.3. Effet des sels minéraux sur la production de cellulase	66
IV.2. Optimisation des conditions de culture pour la production de cellulase par la méthode statistique :	67
IV.2.1. Optimisation de la production des enzymes selon le plan statistique de Plackett et Burman.....	67
IV.2.2. Optimisation par plan composite central (CCD) et la méthode de surface de Réponse (RSM)	73
Validation du modèle expérimental	86
V. Purification.....	86

VI. Application enzymatique	88
Conclusion générale	91
Annexes	105
Résumés	104

A cluster of green avocados on a branch, with the text "Introduction générale" overlaid in a black cursive font. The avocados are in various stages of ripeness, with some showing a slight yellowing. The background is a soft, out-of-focus green, suggesting a natural setting.

*Introduction
générale*

I. Introduction générale

La biomasse lignocellulosique est la ressource renouvelable la plus abondante produite par photosynthèse sur terre et a été considérée comme une matière première durable. C'est une matière première prometteuse pour les futurs carburants renouvelables. Elle est importante pour la production de métabolites à valeur ajoutée. Les matériaux lignocellulosiques contiennent principalement un mélange de polymères tels que la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Ils peuvent être convertis en produits d'importance commerciale tels que les carburants, les produits à haute valeur ajoutée, les enzymes et les protéines unicellulaires.

(Verma *et al* 2020).

La production de cellulases par les microorganismes s'est bien développée ces dernières années. Cependant, elle utilise des procédés de fermentation faisant intervenir des substrats relativement onéreux. Un grand nombre de milieux de culture à base de substrats autres que le son de blé ont été mis au point telle que l'utilisation de lactosérum comme exemple. Il est désormais admis que la fermentation à l'état solide (FMS) est le processus le plus économique pour la production d'enzymes cellulolytiques. (Acourène, 2001 ; Iwashita *et al.*, 2002).

Dans l'industrie, il ne s'agit pas seulement de sélectionner une souche hautement productrice, mais il est aussi nécessaire de définir les conditions de culture optimale. Le milieu doit contenir tous les éléments nécessaires à la croissance du microorganisme et à la production des métabolites à savoir les enzymes.

La production de cellulase par différents organismes en fermentation a reçu plus d'attention et s'est avérée trop coûteuse en raison du coût élevé de l'ingénierie des procédés. Par conséquent, sa production à partir de sources facilement disponibles contribuera à réduire les frais d'importation (Khan *et al* 2016).


L'hydrolyse cellulolytique est la plus utilisée dans l'industrie en raison de ses rendements élevés avec moins de produits secondaires indésirables. Elle est obtenue par une simultanéité d'actions de trois enzymes : endo- β -glucanase (EC 3.2.1.4), exo- β -glucanase (EC 3.2.1.91) et β -glucosidase (EC 3.2.1.21). Les champignons et les bactéries sont des producteurs potentiels de

cellulase enzymes. De nos jours, les cellulases de levure gagnent un intérêt, car elles sont actives dans une large gamme de pH et de température. En effet, les levures peuvent produire de la cellulase thermostable, non dénaturé à des températures supérieures ou égales à 70°C. Ils peuvent être utilisés dans les processus de saccharification de lignocellulose en sucres fermentescibles pour la fabrication de bioéthanol (Leghlimi, 2013).

La demande industrielle de nouvelle cellulase possédant de nouvelles propriétés est en continu c'est pour cela, il serait intéressant d'isoler des nouvelles souches produisant de nouvelles enzymes

Dans notre travail consiste à :

- la sélection de milieu adéquat pour la production cellulolytique par fermentation FMS et FML
- L'optimisation du milieu de production par l'utilisation des plans statistiques de Plackett et Burman, afin de sélectionner les facteurs influençant la production des enzymes cellulolytiques.
- La détermination des optima des facteurs sélectionnés par les plans composites centrés
- La purification de la cellulase de *Candida* sp.
- Essai d'application de l'enzyme sur un rendement accru de jus de pomme

The image features a dense cluster of blue, textured, almond-like objects. These objects have a bumpy, organic surface and are arranged in a vertical, slightly irregular pattern. The background is a soft, out-of-focus gradient of light blue and white, creating a clean and modern aesthetic. The text is centered over the middle of the cluster.

*Synthèse
bibliographique*

Chapitre 1 : Etude des levures cellulolytiques

I. Introduction

Les levures sont des champignons unicellulaires, et les premiers micro-organismes utilisées par l'homme depuis des Millénaire (Amairia *et al.*, 2020), en particulier dans le domaine alimentaire. Les utilisations traditionnelles, telles que le vin, le cidre, la bière, le saké et autres boissons alcoolisées (rhum, whisky, gin, vodka), des produits à base de soja (sauce de soja, miso), le pain et les produits laitiers (fromage, kefir) sont connues par la majorité des gens (Labrecque, 2003).

Les levures sont également les premiers micro-organismes à être observés au microscope par A. Van Leewenhoek en 1680 qui les a dessinées. Ce n'est qu'avec les travaux de Pasteur (1866-1876) (figure 1) que leur rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence. À la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de Buchner.



Figure 1 : Louis Pasteur dans son laboratoire de l'école Normale Supérieure. <https://www.medarus.org/Medecins/Medecins/Textes/pasteurl.html>

Les levures ont bien d'autres utilités dans le domaine biotechnologique. Puisque plusieurs pays du monde ne produisent pas suffisamment de protéines pour l'alimentation de leurs populations, beaucoup de travaux ont été faits afin d'utiliser les levures comme sources de protéines, Elle est riche en protéines et en vitamine B et possède des propriétés probiotiques. Les levures permettent aussi la production des métabolites (lipides, acides organiques, polysaccharides, enzymes, vitamines). Par exemple, les acides gras à longue chaîne produits par les levures sont une base pour la synthèse de parfums synthétiques. La production de gamma-décalactone par *Yarrowia lipolitica* permet d'obtenir un composé aromatique ayant une plaisante odeur de pêche (Labrecque, 2003).

Aujourd'hui, les levures constituent une des importantes sources d'enzymes produites commercialement en raison de leurs capacités polyvalentes et de la frugalité de leurs exigences permettant d'obtenir une biomasse importante à bas prix. En effet, l'invertase ou saccharase sécrétée par diverses levures est utilisée industriellement pour produire du glucose et du fructose à partir de mélasses de betterave ou de cannes à sucre (Berber, 2018).

Les propriétés des enzymes de levure diffèrent de celles produites par d'autres microorganismes. Les amylases froides et les cellulases ont un grand potentiel pour être appliquées dans processus qui peuvent nécessiter de basses températures comme les industries des aliments, des biocarburants et des détergents (Carrasco *et al.*, 2016).

Un autre exemple concerne la levure *Kluyveromyces marxianus* qui produit l'enzyme lactase utilisée pour réduire le lactose contenu dans les produits laitiers. Cette hydrolyse du lactose contenu dans la crème glacée prévient ainsi la cristallisation du sucre. Puisque les levures ont démontré leur efficacité dans la production et la biotransformation de nombreux aliments, leur utilisation dans des procédés de dépollution pourrait être très intéressante (Labrecque, 2003).

À l'heure actuelle, les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes (Berber, 2018).

II. Morphologie et Structure

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires eucaryotes. Leurs cellules sont généralement ovoïdes, mais il existe d'autres formes spécifiques : triangulaires, ogivales, en forme de citron ou même en forme de bouteille. Leur taille cellulaire varie de quelques microns jusqu' à 25 à 30 microns (figure 2). Certaines peuvent former des associations cellulaires ou se présenter sous forme filamenteuse à un certain stade de leur vie (figure 2). Les

colonies sont en général blanches (très rarement roses ou rouges) et régulières. Les levures se différencient nettement des bactéries par leur structure cellulaire eucaryote, le cytoplasme contient les organites habituels des végétaux supérieurs non photosynthétiques par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de golgi et de plus d'un chromosome (figure 3) (*saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes). Les cellules végétatives sont généralement ovoïdes ou sphériques (Ouattara, 2016; Amairia *et al.*, 2020)

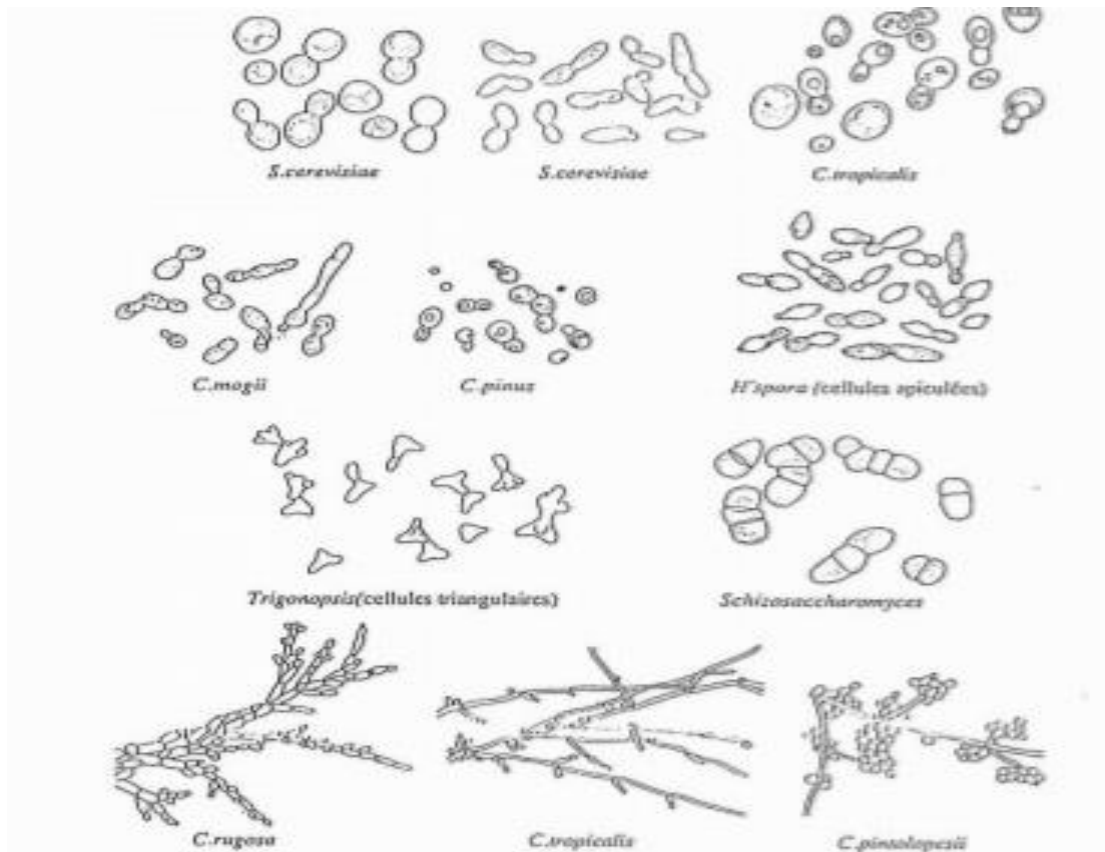


Figure 2 : Morphologie des cellules de levure et des mycelium

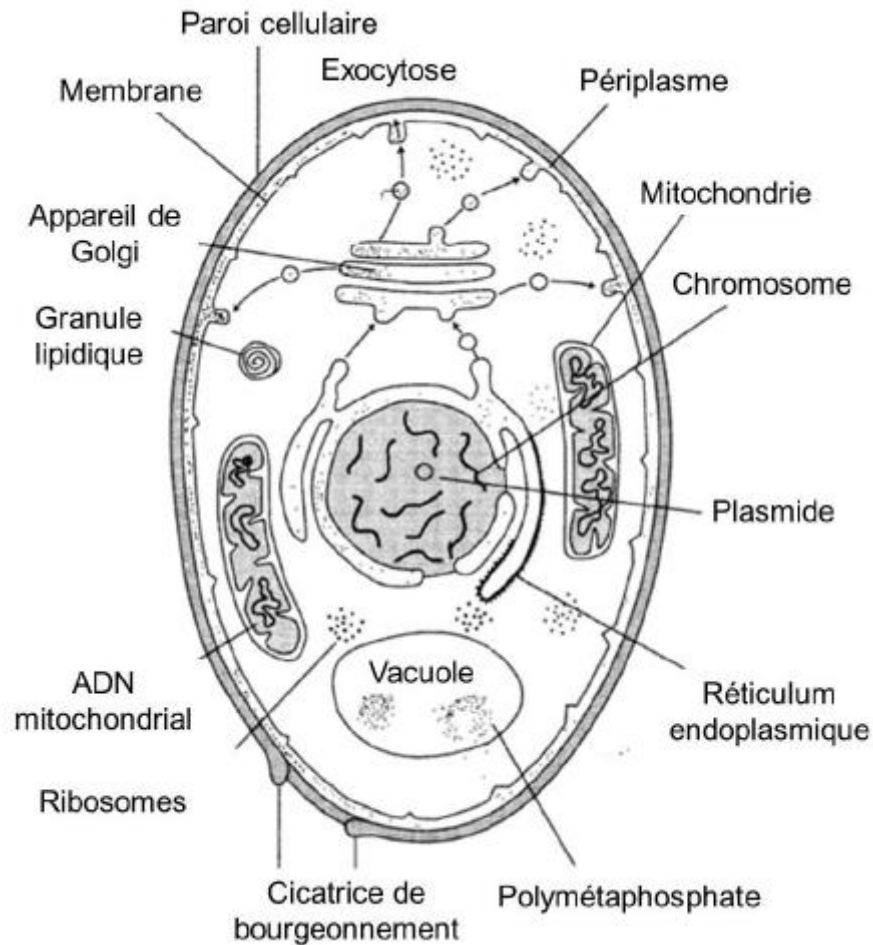


Figure 3 : structure cellulaire des levures (AL Daccache, 2017)

III. Caractères biochimiques

Les levures étant dépourvues de chlorophylle sont incapables de produire les composés organiques nécessaires à leur croissance à partir de substrats minéraux comme le font les végétaux supérieurs, les algues et quelques bactéries. Elles sont donc saprophytes et quelques fois parasites. Pour leur croissance, elles ont besoin d'oxygène, de sources organiques de carbone, d'azote minéral ou organique, de divers minéraux, d'une température et d'un pH adéquats. Certaines d'entre elles ont également besoin d'un ou plusieurs vitamines comme par exemple la thiamine (vitamine B1), biotine (vitamine B8), inositol (vitamine B7), acide pantothénique (vitamine B5) et d'autres facteurs de croissance. Toutes sont capables d'utiliser le D-glucose, le D-fructose et le D-mannose. Certaines levures produisent des lipides telles que *Lipomyces starkeyi* et d'autres ont une activité lipolytique. Elles utilisent de nombreux substrats carbonés soit uniquement par voie oxydative (*Cryptococcus*, *Rhodotorula*), soit pour la plupart, après une phase aérobie de démarrage de la croissance, par métabolisme fermentaire

(anaérobie) conduisant à la production d'éthanol et de CO₂. Les levures ne provoquent pas d'intoxications alimentaires et seules *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* sont pathogènes (Belmaziz & Djalal, 2017).

IV. Habitat

Les levures sont des microorganismes ubiquitaires qui peuvent coloniser plusieurs niches écologiques l'air, le sol, l'eau, le tube digestif de certains animaux et les galeries d'insectes.

Dans la nature, Elles se rencontrent sur les végétaux riches en sucre directement assimilables. En effet, les milieux fortement concentrés en sucre représentent un de leur environnement préféré, comme les sirops, le miel, les fleurs et de nombreux fruits (les pommes, les raisins) ainsi que d'autres niches écologiques. D'autres, se développent au niveau des eaux douces et profondes associées au plancton. Par ailleurs, une large variété de levures vit dans le sol, plus ou moins représentative de la flore levurienne associée aux plantes, champignons et animaux vivants à la surface. Néanmoins, pour d'autres espèces, le sol demeure leur seul habitat. Alexander et al, (1961) ont révélé la présence d'une grande variété de levures dans le sol à savoir *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Pullularia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizoblastoporon*, *Torula*, *Torulasspora*, *Torulopsies*, *Trichosporon* et *Zygosaccharomyces*.(Belmaziz & Djalal, 2017; Ouattara, 2016, et Kanti & Sudiana, 2002)

V. Microorganismes cellulolytiques

Les microbes cellulolytiques (Tableau 1) sont des agents de dégradation primaire des glucides et sont généralement incapables d'utiliser des protéines ou des lipides comme sources d'énergie pour la croissance. Les microbes cellulolytiques notamment les bactéries *Cellulomonas* et *Cyophaga* et la plupart des champignons peuvent utiliser une variété des glucides en plus de la cellulase. (Yehia *et al.*, 2011)

Tableau 1 : Principaux microorganismes cellulolytiques et pseudocellulolytiques.(Yaiche & Aidouni, 2018; Leghlimi, 2013)

Eucaryote	protozoire	<i>Polyplastron multivesiculatum</i>	
	Champignons	Moisissure	<p><i>Neocallimastix frontalis</i> <i>Sphaeromonas communis</i> <i>Piromonas commmunis</i> <i>Trichoderma viridae</i> <i>Trichoderma reesei</i>, <i>Trichoderma koningi</i> <i>Trichoderma longibrachiatum</i>, <i>Aspergillus aculeatus</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Sporotrichum pulverlentum</i> <i>Chaetomium cellulolyticum</i></p>
		Levures	<p><i>Candida molischiana</i> <i>Candida pulcherrima</i> <i>Candida stellate</i> <i>Candida wickerhamii</i> <i>Cryptococcus Flavus</i> <i>Kloeckera apiculate</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Rhodotorula</i>, <i>Saccharomyces fibuligeratinis</i>, <i>Trichosporon cutanum</i></p>

Procaryotes	Bactéries	<p><i>Cytophaga sp</i></p> <p><i>Sporocytophaga myxococcoides</i></p> <p><i>Pseudomonas fluorescens</i></p> <p><i>Cellvibrio gilvus</i></p> <p><i>Cellvibrio fulvus</i></p> <p><i>Cellvibrio vulgaris</i></p> <p><i>Cellvibrio mixtus</i></p> <p><i>Erwinia chrysanthemi</i></p> <p><i>Erwinia carotovoera</i></p> <p><i>Bactroides succinogenes</i></p> <p><i>Bacteroides cellulosolvens</i></p> <p><i>Butyvibrio fibrisolvens</i></p> <p><i>Acetivibrio cellulolyticus</i></p> <p><i>Acetivibrio cellulosolvens</i></p> <p><i>Bacillus circulans</i></p> <p><i>Bacillus coagulans</i></p> <p><i>Bacillus laterosporus</i></p> <p><i>Bacillus licheniformis</i></p> <p><i>Clostridium aldrichii</i></p> <p><i>Clostridium C7</i></p> <p><i>Clostridium celerecrescens</i></p> <p><i>Clostridium cellobioparum</i></p> <p><i>Clostridium cellulolyticum</i></p> <p><i>Clostridium cellulovorans</i></p> <p><i>Clostridium chartatabidum</i></p>
-------------	-----------	---

V.1. Bactéries cellulolytiques

Parmi les différents microbes, les souches bactériennes *Cellulomonas spp.*, *Thermomonospora spp.*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Clostridium thermocellum* et *Cellvibrio spp* sont largement utilisées pour la production de cellulase en raison de leur croissance rapide, de leur manipulation facile, de leur faible consommation d'énergie et de leur manipulation génétique facile. Parmi les différents genres bactériens, le genre *Bacillus* est le plus utilisé parce qu'il

produit des cellulases alcalines et thermostables ainsi que d'autres enzymes polysaccharidiques extracellulaire (Tabssum *et al.*, 2018).

Récemment, les bactéries thermophiles ont reçu une attention considérable en tant que source d'enzymes cellulolytiques. L'hydrolyse de la cellulose par les bactéries présente plusieurs caractéristiques telles que : stabilité, élevée activité spécifique accrue et transfert facile (Potprommanee *et al.*, 2017).

La plupart des bactéries cellulolytiques thermophiles peuvent en fait être qualifiées d'extrêmes thermophiles puisque leur température optimale de croissance est généralement supérieure ou égale à 65°C, Elle est, par exemple, de 65°C pour *Clostridium stercorarium* et de 80°C pour *Thermoto gamaritima* qui peut même se développer jusqu'à 90°C. Jusqu'à présent *Acido thermus cellulolyticus* et *Clostridium thermocellum* sont les deux seules bactéries cellulolytiques thermophiles faisant exception à cette règle puisque leur température optimale de croissance reste comprise entre 55°C et 60°C (Hadjaz, 2020).

Depuis de nombreuses années, plusieurs études sur l'isolement et la caractérisation des bactéries cellulosiques à partir de déchets de l'industrie ont indiqué que seul des peu bactéries peut produire une grande quantité de composés bioactifs, capable d'hydrolyser complètement la cellulose cristalline in vitro (Farjana & Roy, 2018). Par exemple *Bactéride succinogenes* est capable de dégrader les celluloses les plus cristallines. Elle adhère fortement aux fibres de cellulose. Et *Ruminococcus albus* et *Rumilnococcus flavefaciens* sont capables d'utiliser le xylane et le cellobiose mais ne fermentent pas les oses simples (Hadjaz, 2020).

Les cellulases commerciales sont principalement d'origine fongique en raison de sa capacité à produire des quantités de cellulases par rapport aux bactéries dans la nature (Kunasundari *et al.*, 2017).

V.2. Champignons cellulolytiques

Les champignons ont traditionnellement été utilisés comme usines de cellules pour la fabrication de cellulases, ces derniers sont d'un grand intérêt parce qu'ils excrètent leurs enzymes de façon extracellulaire (Ballmann *et al.*, 2019).

Les champignons anaérobies sont des microorganismes largement utilisés pour produire la cellulase. qui sont capables de produire un système complet de cellulase comme l'endo- β -glucanase, l'exo- β -glucanase et la β -glucosidase, par rapport aux bactéries (Azzouz, 2016).

La cellulase produite par *Trichoderma* est résistante aux inhibiteurs chimiques et stable dans les réacteurs à cuve agitée pH 4,8, 50°C pendant 48h ou plus (Tanveer, Bisma, *et al.*, 2015).

Alors que les champignons ont été génétiquement modifiés pour sécréter rendement économique adéquat des enzymes, *Trichoderma reesei* est le producteur le plus efficace d'endo- et d'exo- glucanases, mais n'excrète pas une quantité suffisante de β -glucosidase pour lesquelles les souches d'*Aspergillus* sont connues pour être de bons producteurs (Abdullah *et al.*, 2018).

Chez des champignons aérobies stricts, il a été mis en évidence (*Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* et *Piromonas communis*) un équipement enzymatique très complet leur permettant d'hydrolyser les polysaccharides des parois cellulaires végétales. D'autres espèces anaérobies telles que les *Chytridomycètes* sont connues pour leur capacité à dégrader la cellulose dans les appareils gastro-intestinaux des ruminants (Fergani & Lakhel, 2015) .

Les moisissures des genres *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* et *Phanerochaete* ont été rapportés comme étant les meilleurs producteurs de cellulases et les enzymes brutes produites par ces micro-organismes sont commercialisées (Azzouz, 2016)

V.3. Levures cellulolytiques

Le principal microorganisme producteur d'enzymes est la levure, l'utilisation de levure pour la production d'enzymes, en particulier les cellulases a plusieurs avantages. Ces enzymes sont produites à grande échelle, dans un temps de production relativement court et peut être produites de façon durable à un coût relativement faible, et sa capacité à manipuler la génétique produit potentiellement des enzymes avec les caractéristiques souhaitées (Arman *et al.*, 2020)

Les souches appartenant au genre *Trichosporum*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* ont été décrits pour produire des cellulases de manière constitutive, ainsi que des β -glucosidases lorsqu'ils sont cultivés dans les inducteurs de milieux définis, comme la cellobiose. Le criblage des milieux de fermentation est important pour qualifier les micro-organismes producteurs des métabolites. Jiménez *et al.* ; ont évalué la production de cellulases (CMCases, β -glucosidases et β -xylosidases) chez 51 espèces de levures de genres *Candida*, *Kluyveromyces*, *Filobasidium* et *Pichia*, isolé du bois en décomposition, cultivé sur CMC et les copeaux de bois. La production de cellulase et de β -glucosidases a également été étudiée à partir de plusieurs souches isolées à partir de raisins et de jus de raisins appartenant aux genres

Kloeckera, *Candida*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora* et *Kluyveromyces* (Giese *et al.*, 2017).

Par ailleurs, il a été rapporté que plusieurs souches de *S. Cerevisiae* sont capables de produire des cellulases hétérologues. Cependant, ces souches sont incapables de dégrader efficacement la cellulose cristalline (Liu *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2019).

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

Chapitre 2 : étude de la cellulase

Il y a 14 familles de cellulase listées sur le site de CAZy : (http://afmb.cnrsMrs.fr/CAZY/fam/acc_GH.html). Plusieurs de ces familles, contiennent principalement d'autres hydrolases de glycosyle, avec seulement quelques membres ayant l'activité de cellulase (Wilson, 2009) , selon le site les cellulases ont été classés dans de nombreuses familles en fonction des séquences d'acides aminés des site catalytiques ainsi leur structure cristalline (Zhang & Zhang, 2013).

Les cellulases sont définies comme une famille d'enzymes qui effectuent le processus de dégradation de la cellulose en glucose (Sharma *et al.*, 2017), Ces enzymes fendent toutes la même liaison chimique, la liaison glycosidique β -1,4 (Knowles *et al.*, 1987).

Ils sont répandus dans la nature et sont particulièrement fréquents dans le monde des bactéries et des champignons (Sharma *et al.*, 2017), mais aussi des animaux, y compris des insectes, des mollusques et des protozoaires (Khelil Omar, 2017) . La plupart des animaux, y compris les humains, ne synthétisent pas les cellulases et sont donc incapables d'utiliser toute l'énergie contenue dans le matériel végétal (Sharma *et al.*, 2017).

I. Nomenclature de la cellulase

Nom codifié : E.C.3.2.1.4

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

Nom recommandé : Cellulase.

Synonymes : Endoglucanase, Endo-1,4- β -Glucanase, Cellulase carboxyméthylque, β -1,4-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase, etc...(Schamburg D & Salzman, 1991).

II. Caractéristiques de la cellulase

- **Réaction spécifique**

Les cellulases sont des hydrolases qui catalysent le clivage de liaisons β -1,4-glycosidiques de la cellulose avec addition concomitante de l'eau au point de clivage. Même si un seul type de liaison chimique est présent dans la cellulose, des enzymes avec différents modes d'action sont nécessaires pour une dégradation complète du polymère récalcitrant et insoluble. Dans la nature, un organisme peut produire les enzymes nécessaires à la dégradation complète de la

cellulose, bien que l'action synergique de nombreux organismes ait également été suggérée (Khelil Omar, 2017).

- **Substrat naturel**

Les cellulases sont un groupe d'enzymes catalysant un système de réaction enzymatique dans lequel la cellulose est décomposée en glucose, cellobiose ou cello-oligosaccharides (Yehia et al., 2011), et la dégradation des xyloglucanes et le coton (Reffas, 2017)

- **Inhibiteurs**

L'inhibition de l'activité cellulolytique est engendrée par la présence de différents éléments tels que : Hg^+ (élément minéral qui peut être restauré en par la cystéine ou le NaCl), le glucose et le cellobiose (exception faite pour la cellulose de *Bacillus subtilis*), la glucoylamine, la gluconolactones, le N-bromosuccinimide, l'arsenate, le sodium dodecyl sulfate, le dithiothreitol et le dextrans etc...(Reffas, 2017)

- **Activité enzymatique**

L'unité internationale de l'activité cellulolytique correspond à la quantité d'enzyme produite intervenant dans la dégradation de carboxyméthylcellulose en carbohydrates réduits. Elle est exprimée en $1\mu\text{mol}$ de glucose/minute (Reffas, 2017).

III. Enzymes cellulolytiques

Le principal système de classification des cellulases en basant sur la similitude de séquence. Les cellulases sont classées dans glycoside de la famille hydrolases. Ce système regroupe les enzymes qui hydrolysent les liaisons glycosidiques dans les glucides (Co & Hug, 2020).

Essentiellement, Il existe trois types d'hydrolases glycosyliques responsables de la conversion de la cellulose en glucose :

III.1. Endoglucanases (EGs) (EC 3.2.1.4) ou 1,4- β -D-glucan 4 glucanohydrolases

Ces enzymes hydrolysent de manière aléatoire les parties amorphes de la cellulose, principalement les chaînes de surface des microfibrilles, générant des oligosaccharides de différentes tailles pouvant rester liés à la fibre de cellulose, ainsi que de nouvelles extrémités de chaînes. Ces enzymes n'agissent pas sur la cellulose cristalline (Prevot, 2013), et sont mises

en évidence sur la carboxyméthylcellulose (CMC), forme de la cellulose. On les appelle également CMCases (Fergani & Lakhel, 2015)

III.2. Exoglucanases (EC 3.2.1.91) ou 1,4- β -D-glucane cellobiohydrolases ou cellobiohydrolases (CBHs)

Elles agissent de manière processive et s'adsorbent sur la cellulose en hydrolysant à partir des extrémités réductrices (type I ou CBHI) ou à partir des extrémités non réductrices (type II ou CBHII) pour libérer du cellobiose. Ce sont les seules enzymes agissant sur la cellulose cristalline (Prevot, 2013). La cellobiohydrolase ne dégrade pas le coton rapidement, mais peut entraîner une saccharification considérable des celluloses micro cristallines (Sharada et al., 2014).

III.3. β -glucosidases (BGs) (EC3.2.1.21) ou cellobiases ou β -D-glucoside glucohydrolases

Cette enzyme hydrolytique est responsable de l'achèvement de l'hydrolyse étape par le clivage de cellobiose et d'éliminer les oligosaccharides des extrémités non réductrices et la formation de B-glucosides aryles (Prevot, 2013).

IV. Mode d'action

Les cellulases sont différenciées par leur mode d'action sur la cellulose (Figure 4).

Les endoglucanases hydrolysent les liaisons glucosidiques B-1,4 au niveau des régions amorphes. Elles libèrent des extrémités non réductrices qui deviennent la cible préférentielle des exocellulases libérant du cellobiose. Les exoglucanases peuvent aussi s'attaquer aux régions cristallines. Le cellobiose est hydrolysé en 2 molécules de glucose par les β -glucosidases. En se basant sur le mécanisme d'hydrolyse du substrat, Il est possible de distinguer les cellulases de type "endo" et de type "exo" par des mesures viscosimétriques. Les enzymes de type "endo" ont une activité élevée sur la CMC, qui est hydrolysée au hasard à l'intérieur de la molécule. Ce qui entraîne une diminution rapide du degré de polymérisation des molécules de cellulose, correspondant à une diminution de la viscosité de la solution. Les enzymes de type "exo" conduisent à une diminution plus lente de la viscosité puisqu'elles attaquent la CMC par l'extrémité non réductrice. Il faut donc attendre plus longtemps avant que cette hydrolyse séquentielle produise un effet sur la viscosité de la solution (Wittman, 1993).

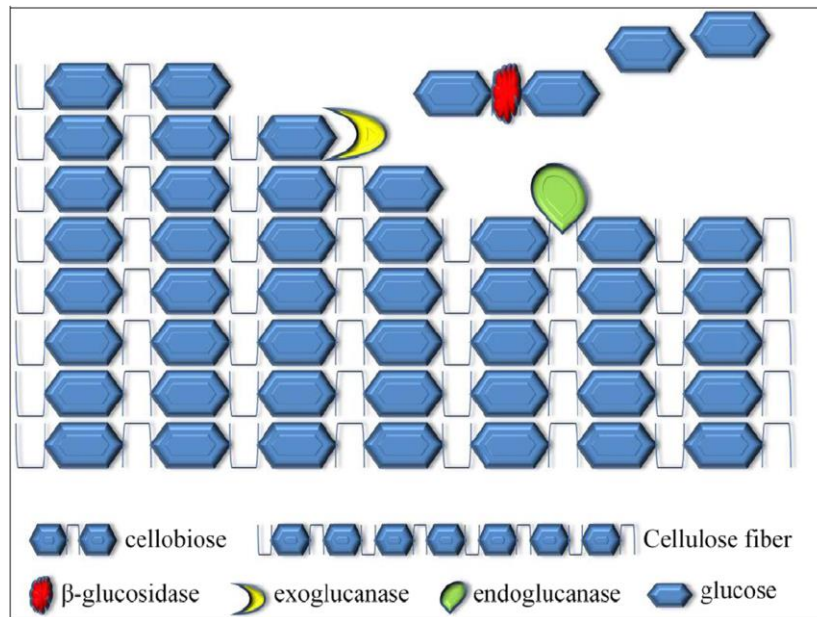


Figure 4 : Schéma de dégradation enzymatique d'une fibre de cellulose (Lakhundi *et al.*, 2015)

V. Cellulolyse

Le mécanisme de dégradation de la cellulose ou cellulolyse, tout comme celui d'un polysaccharide pariétal, est un phénomène de catalyse enzymatique hétérogène et suit les étapes suivantes (Figure 5) :

Etape 1 : transfert de l'enzyme du milieu aqueux vers le polysaccharide insoluble et adsorption des enzymes (cellulases) sur le substrat à l'interface liquide-solide via le module de liaison grâce à des interactions non covalentes (hydrogène, électrostatique ou hydrophobe) ;

Etape 2 : localisation d'une liaison susceptible d'être hydrolysée à la surface du substrat ;

Etape 3 : formation du complexe enzyme-substrat (par insertion de l'extrémité de chaîne dans le tunnel catalytique pour initier l'hydrolyse) ;

Etape 4 : hydrolyse de la liaison β-glycosidique et glissement simultanée vers l'avant de l'enzyme le long de la chaîne de cellulose ;

Etape 5 : désorption des cellulases du substrat ou répétition de l'étape 4 ou des étapes 2/3 si ce n'est que le domaine catalytique qui se détache de la chaîne ;

Etape 6 : transfert des produits de dégradation du polysaccharide vers le milieu aqueux et hydrolyse du cellobiose en glucose par la β-glucosidase (si cette enzyme est présente dans le cocktail enzymatique) (Prevot, 2013)

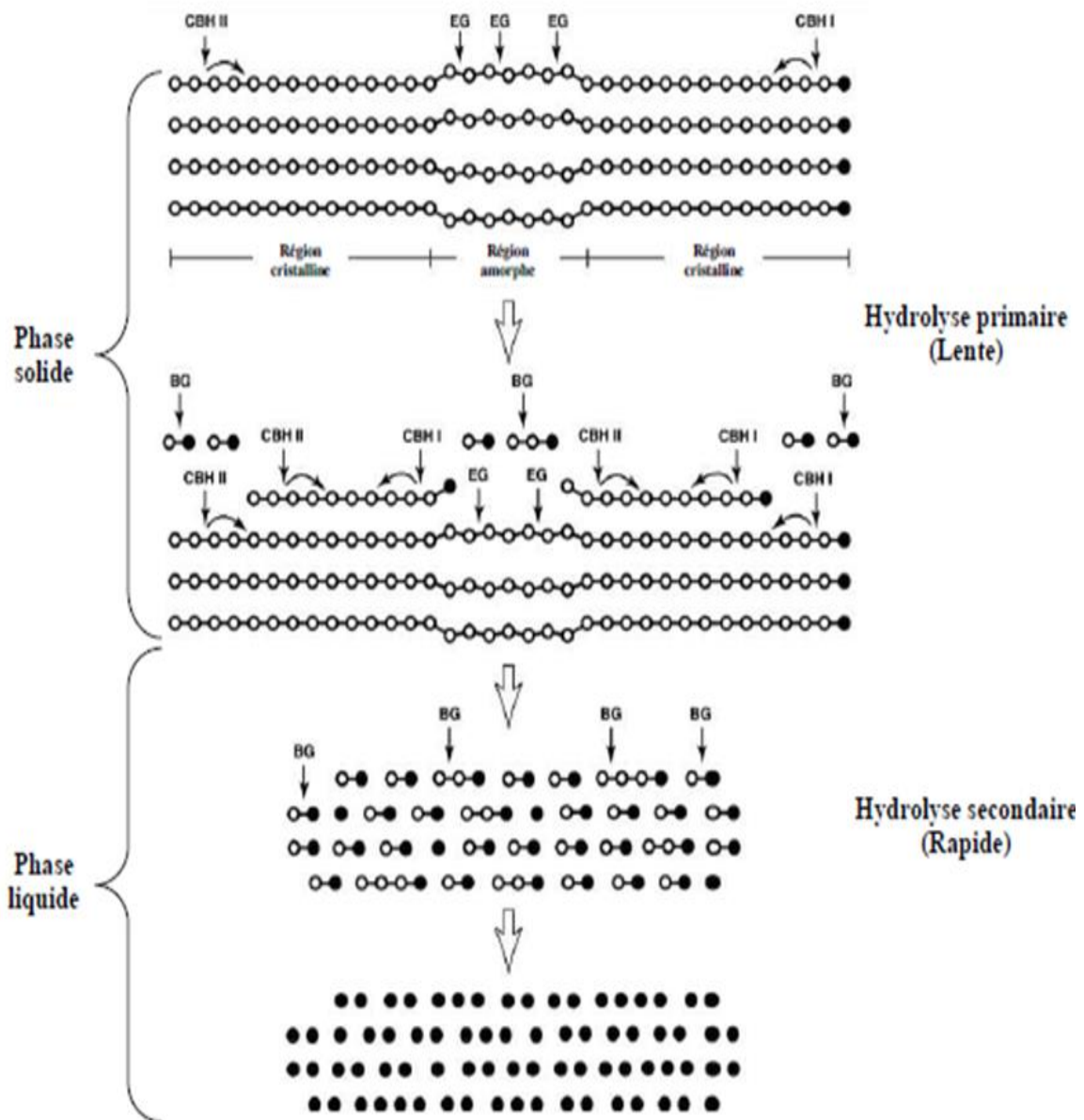


Figure 5 : Cellulolyse (Prevot, 2013) (EG : endoglucanase, CBHI : cellobiohydrolase de type I, CBHII : cellobiohydrolase de type II, BG : β -glucosidase).

Les cellulases peuvent fonctionner comme des enzymes uniques avec des domaines catalytiques individuels ou dans des complexes multi-enzymes, appelés cellulosomes (Co & Hug, 2020)

VI. Cellulosome

Le Cellulosome est un complexe multienzymatique que l'on retrouve lié à la surface de nombreux microorganismes dégradant la cellulose (figure 6), Ce complexe macromoléculaire

est en fait composé de plusieurs enzymes venant se fixer via des interactions protéiques sur une protéine « échafaudage » appelée « scaffoldin ». Ces interactions interviennent entre deux domaines spécifiques : le domaine dockerin et le domaine cohesin. Le premier faisant partie de l'enzyme alors que le second est un domaine de la protéine « échafaudage ». Il est important de noter qu'il existe une très grande diversité d'organisations des cellulosomes et ce même au sein d'une même souche (Romain, 2011)

VI.1. Liaison cellulosome-substrat

Les liaisons entre les cellulosomes et les substrats s'effectuent à l'aide de modules intégrés dans certaines protéines, les Carbohydrate-Binding modules ou CBMs. Ils existent de nombreux types de CBMs qui ont été classés en trois groupes différents :

Type A : interagit avec les zones cristallines des polysaccharides (principalement la cellulose)

Type B : se lie à une région interne de chaîne simple de glycane

Type C : reconnaît des saccharides de petites tailles ou les extrémités de polysaccharides complexes. (Romain, 2011)

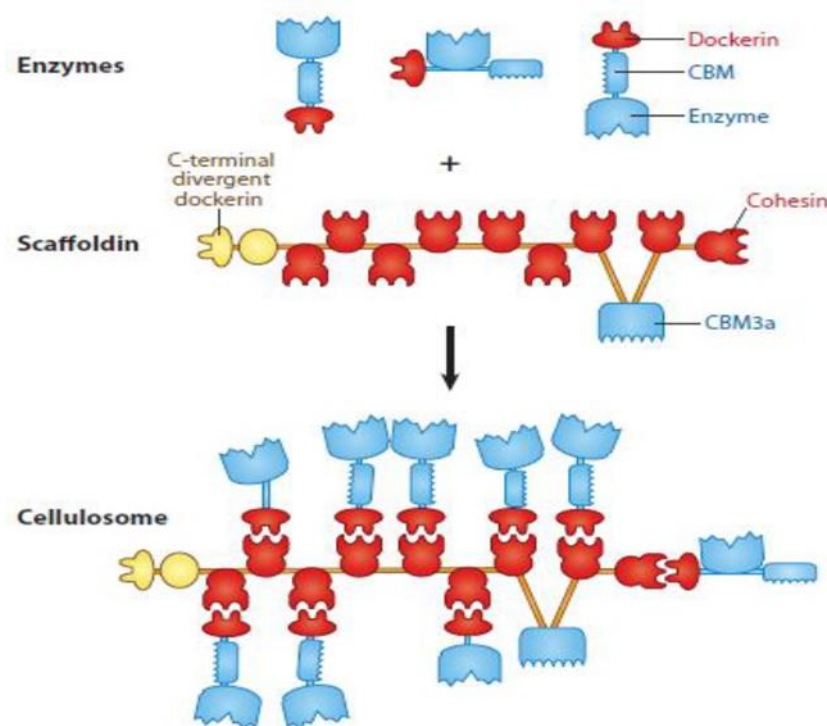


Figure 6 : Organisation de cellulosome (Romain, 2011)

VI.2. Action synergique

De très nombreuses enzymes « cellulosomiques » sont produites par les différentes souches. *Rumunicoccus flavefaciens* produit plus de 200 enzymes différentes. Cette très grande diversité d'enzymes est due à la complexité de l'organisation des cellules constituant les parois végétales.

L'efficacité de l'hydrolyse des différents substrats comme par exemple la cellulose, résulte donc de l'action coopérative de ces nombreuses enzymes d'activités différentes.

Cette coopération des enzymes est favorisée par la proximité spatiale imposée par l'organisation sous forme de cellulosome et résulte en une activité enzymatique totale supérieure à la somme des activités enzymatiques individuelles (synergie).

Quatre formes de synergie ont été signalées :

- Synergie entre endoglucanase et exoglucanase, appelée synergie endo-exo
- Synergie entre les exoglucanases, appelée synergie exo-exo
- Synergie entre l'exoglucanase et la β -glucosidase pour éliminer la cellobiose qui inhibe l'exoglucanase
- Synergie entre les domaines de liaison catalytique et glucidique

La formation de ce complexe multienzymatique induit également une très forte proximité entre le substrat et la cellule, minimisant ainsi les pertes, par diffusion, des produits d'hydrolyse (Romain, 2011; et Lakhundi *et al.*, 2015).

Chapitre 3 : production de la cellulase

I. Production industrielle de la cellulase

La conversion biotechnologique de la biomasse cellulosique est une approche potentiellement durable pour développer de nouveaux bioprocédés et produits. Les cellulases microbiennes sont devenues les biocatalyseurs focaux en raison de leur nature complexe et industrielles largement répandues, C'est un des enzymes les plus important dans plusieurs industries et été appliquer par plusieurs chercheurs L'utilisation de cellulase permet la production de glucose qui est leur fermentation permet d'obtenir des substances clés (Receveur *et al.*, 2002).

Aussi les cellulases étaient commercialement valables pour plus de 30ans, et présentent une cible pour les recherches académiques et industrielles (Singh.,1999)

Selon Sajith *et al.* (2016) cellulase utiliser dans l'industries du papier et de la pâte.et aussi entrer dans l'industrie des aliments pour animaux (Sharada *et al.*, 2014) et industrie textile (Cavako-Paulo. 1998), l'industrie du vin et de la brasserie (Ramesh Chander Kuhad *et al.*, 2011), Industries alimentaires (Scriban, 1993).

Dans la thérapie cutanée La résistance mécanique élevée à l'état humide, la perméabilité substantielle aux liquides et aux gaz et la faible irritation de la peau indiquaient que la membrane gélatineuse de la cellulose bactérienne était utilisable comme peau artificielle pour couvrir temporairement les plaies a des larges applications en chirurgie et implants dentaires et réalités dans le secteur de la santé humaine. Les cas de brûlures de deuxième et troisième degré. (Sherif MAS Keshk1, 2014)

II. Facteurs influençant la production cellulotique

Il y a plusieurs facteurs aider la production de cellulase et à offrir de meilleurs résultats.

II.1. Source de carbone

Le carbone est le paramètre le plus important et qui occupe le premier rang, influençant les voies métaboliques des micro-organismes et important pour la production d'enzymes.

II.I.1. Lignocellulose

La biomasse lignocellulosique représente une des ressources renouvelables les plus abondantes sur terre, et certainement une des moins coûteuses. Le matériel lignocellulosique contient un mélange de polymères qui composée de trois principales fractions (Figure 7).

La première est la cellulose de (35 à 50 %) qui est un polymère de glucose. La seconde, appelée fraction hémicellulosique de 20 à 30 %, est aussi un polysaccharide, essentiellement constitué de pentoses (dont le xylose et l'arabinose) et de glucose. La troisième est la lignine (15 à 25 %), polymère de structure complexe à base de groupements phényles (Abdi, 2009; Ogier *et al.*, 2008) ces composés représentent l'essentiel de la biomasse végétale (Bettaieb, 2016).

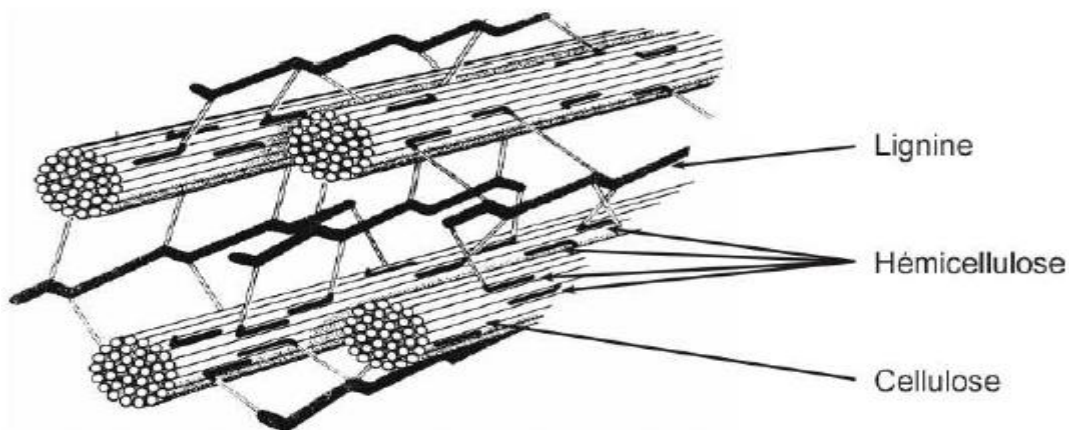


Figure 7 : la structure tridimensionnelle de la biomasse lignocellulosique (EL abdi, 2009)

II.I.1.1. Cellulose

La cellulose est le biopolymère le plus important de la planète et revêt une importance économique considérable dans le monde entier elle constituée la forme la plus omniprésente de carbone fixe et la source possible d'énergie organique renouvelable dans l'écosystème. C'est une substance fibreuse, dure et insoluble dans l'eau qui offre une résistance mécanique ainsi qu'une stabilité chimique aux plantes et aide ainsi à maintenir la structure de la paroi cellulaire de la plante, (Mohamed, 2011; et Thapa *et al.*, 2020).

La cellulose est le principal constituant des matières premières comme le coton (plus de 94%), les feuilles sèches contiennent environ 10-20% et le bois 50% (Dini *et al.*, 2019). Elle

représente entre 20 et 50% de la matière sèche des parois cellulaires végétales et confère à la plante une grande résistance à la flexion et à la traction (Prevot, 2013)

La cellulose et l'hémicellulose représentent la source la plus abondante et la plus potentielle de sucre fermentescible pour produire divers produits à valeur ajoutée et composés bio-actifs d'un grand intérêt pour la biotechnologie. En plus de sa présence presque exclusive dans les plantes, divers groupes d'espèces comme les bactéries, certains champignons, les protozoaires (par exemple *Naegleria gruberi*, *Dictyostelium discoideum* et *Acanthamoeba castellanii*) et un groupe d'animaux,

a) Structure et la propriété de la cellulose

La cellulose est une macromolécule à très longue chaîne stéréorégulière appartient à la famille des β -D-glucanes, formée exclusivement d'unités D-glucopyranoses liées entre elles par des liaisons osidiques de type β (1 \rightarrow 4). L'unité répétitive, composée de l'association de deux monomères de glucose (l'un droit, l'autre renversé), est appelée cellobiose (figure 8) (Crepy, 2010).

L'extrémité réductrice (R) du polymère correspond à l'unité glucose dont le carbone anomérique n'est pas lié à une autre unité glucosidique. Il existe donc un équilibre entre la forme hémiacétale et la forme aldéhyde réductrice minoritaire. L'unité glucose située à l'autre bout de la chaîne cellulosique est appelée extrémité non-réductrice (NR) car le carbone anomérique est engagé dans une liaison glucosidique β -1,4. (Benhadi, 2010)

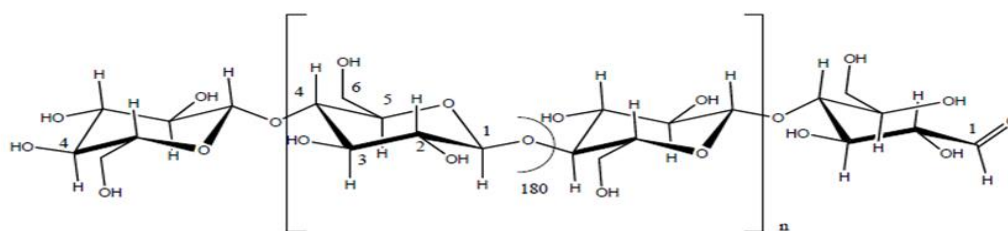


Figure 8 : structure moléculaire de la cellulose représentant l'unité cellobiose comme unité de répétition montrant les groupes finaux réducteurs (à droite) et non réducteurs (à gauche) (Granström, 2009)

Cette conformation explique la linéarité de la molécule qui se trouve stabilisée par un réseau de liaisons d'hydrogène intramoléculaires entre deux résidus glucoses successifs, les chaînes de cellulose adoptent des structures linéaires dites « en ruban », très stables, qui s'associent entre elles via des liaisons d'hydrogène intermoléculaires. Ces liaisons d'hydrogène intra- et

intermoléculaires peuvent se former entre fonctions alcools ou entre fonction alcool et atome d'oxygène du cycle pyranose, créant ainsi un réseau tridimensionnel rigide de macromolécules de cellulose.(Crepy, 2010)

La longueur de la molécule de cellulose est déterminée par le nombre des unités de glucanes présents dans le polymère. Cet homopolysaccharide linéaire possède un degré de polymérisation (DP) qui dépend des types de plantes , variant de 9 000 à 15 000, se traduisant ainsi par une longueur de chaîne d'environ 5 μm (EL abdi, 2009).

Les chaînes de cellulose sont organisées sous forme de microfibrilles (figure 9) qui constituent l'armature de la paroi et offrent une très grande résistance aux tensions. Les microfibrilles de cellulose occupent environ 15% du volume de la paroi. Dans les cellules différenciées ayant synthétisé une paroi secondaire, la proportion de cellulose atteint de 40 à 90 % de la masse pariétale. La cellulose est synthétisée au niveau de "rosettes" transmembranaires, constituées d'hexamère de cellulose synthétase. La disposition relative des microfibrilles est importante car elle permet de conférer une plus ou moins grande capacité de la paroi à se déformer, ainsi que la direction dans laquelle se fera cette déformation. dans la phase finale de la différenciation cellulaire (Pérez, 2015)

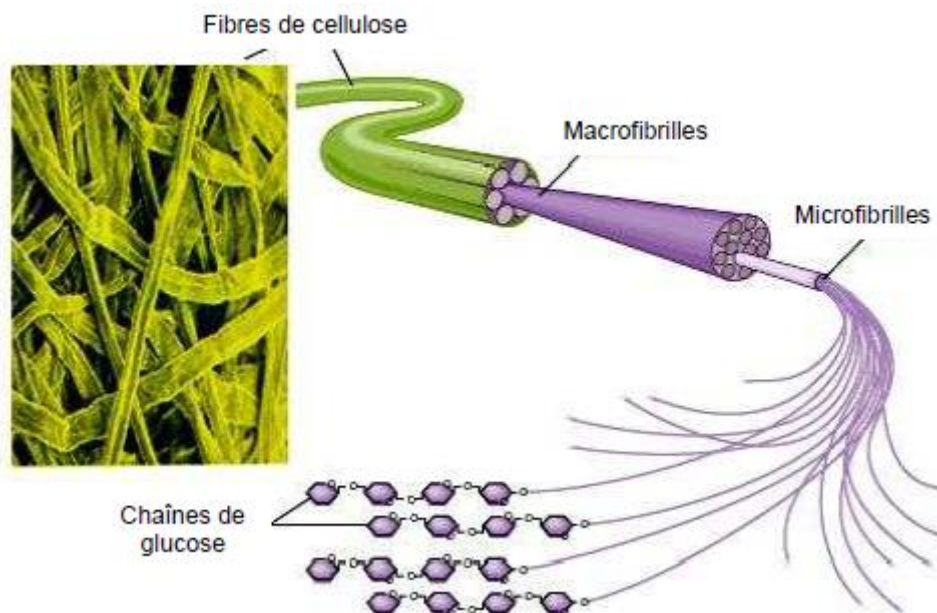


Figure 9 : La cellulose à différentes échelles (Crepy, 2010)

Certains auteurs estiment que la cellulose peut se présenter sous différents états et classent la structure de la cellulose en deux groupes :

La cellulose I : qui représentent la forme naturelle ou native, présente dans le coton et le bois.

La cellulose II : qui est une forme modifiée ou obtenue après traitement chimique (Reffas, 2017).

II.I.1.2. Hémicellulose

Les hémicelluloses sont des barrières physiques, qui entourent les fibres de celluloses et les protègent contre les attaques enzymatiques (EL abdi, 2009).

Les hémicelluloses sont des polysaccharides complexes, de faible poids moléculaire et solubles en milieu alcalin. Par extension, est appelé hémicellulose tout polysaccharide présent dans la paroi végétale n'étant ni de la cellulose, ni une substance pectique (Bettaieb, 2016).

II.I.1.3. Lignine

La lignine est le constituant principal de la paroi secondaire des cellules végétales. Ce composé est étroitement associé aux molécules d'hémicelluloses et de cellulose. La lignine confère aux plantes leurs rigidités, diminue la perméabilité à l'eau et protège la plante des phénomènes oxydatifs (EL abdi, 2009).

La lignine est une macromolécule formée par polymérisation oxydative de monomères de type phénylpropane (Bettaieb, 2016).

II.I.2. Déchets lignocellulosique

La lignocellulose naturelle est la matière organique renouvelable la plus abondante sur Terre. De la forêt à la mer, il existe une grande quantité et une grande variété de biomasse, et de nouvelles biomasses sont constamment générées par la photosynthèse. Chaque année la production mondiale de la biomasse lignocellulosique est estimée à 10-50 milliards de tonnes. La plus grande partie de la lignocellulose naturelle est décomposée et transformée par une variété de microorganismes dans l'environnement naturel, et finalement, elle est convertie en CO₂ et H₂O. Certes c'est une partie importante du cycle de carbone, mais c'est un énorme gaspillage du point de vue de l'utilisation des ressources naturelles (Khelil Omar, 2017).

I. Son de blé

Le son de blé est essentiellement obtenu en tant que coproduit lors des procédés de fabrication de farine de blé, c'est pourquoi il est aussi appelé issues de meunerie. Il s'agit d'une fraction fine faite principalement de fragments d'enveloppes et de particules de grains dont la plus

grande partie de l'albumen a été enlevée ; cette presque exclusive teneur en enveloppe impliquant une très forte concentration en fibres.(Romain, 2011)

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 (Arouak & Zenad, 2019).

Le son de blé est très riche en arabinoxylanes qui sont très hydrophiles et présentent une forte capacité de rétention d'eau. La nature des fibres qui composent le son a aussi un effet sur l'absorption d'eau. Les fibres solubles augmentent la vitesse d'absorption contrairement aux fibres insolubles. La capacité d'absorption d'eau dépend de la composition des fibres (tableau 2): des fibres composées de lignine et de cellulose absorbent plus d'eau que des fibres composées de polysaccharides insoluble et non cellulosique (Zaddem, 2014).

Le son de blé peut être utiliser dans plusieurs domaines :

- **Dans l'industrie alimentaire** : il est utilisé comme alternative des substrats synthétiques utilisés dans le processus de fermentation ; selon (Chapoutot *et al.*, 2019) le son de blé est largement utilisé dans L'amidonnerie, utilise l'amidon pour faire des épaississants alimentaires. Par l'intermédiaire de la chimie, l'amidon a de multiples usages. Par exemple dans l'industrie pharmaceutique, il est utilisé en tant que dragéfiant, liant ou encore principe actif tel que le sorbitol. Dans de moindres proportions, l'amidon transformé peut être employé dans la fabrication de papier, de carton mais aussi de détergents. L'amidon du blé tendre est également utilisé depuis plusieurs années comme matière première pour la fabrication de biocarburants (Debiton, 2010).
- **La production d'enzymes et de métabolites secondaires**, ces dernières années, beaucoup d'études ont été consacrées à la production de cellulase sous fermentation à base de son de blé, Verma *et al.*,(2012) a révélé que le son de blé est une bonne source de azote due à la présence de protéines; il s'agit également d'un bonne source d'hémicellulose, dans son ensemble c'est un bon inducteur du système enzymatique cellulolytique, et en 2020 étudié la production de cellulases par *T.reesei NCIM 1186* et *N. crassa NCIM 1021* sous fermentation solide à base de son de blé (Verma & Kumar, 2020).

Ainsi les travaux de Yu *et al.*, (1998) étudié l'effet de l'ajout de son de blé au milieu de croissance de la production d'enzymes cellulolytiques de *Trichoderma ressei rut c30*.

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 animale.(Fergani & Lakhel, 2015).

Tableau 2 : Composition biochimique de son de blé (Zhang *et al.*, 2012; Fergani & Lakhel, 2015)

Paramètre	Teneur
Cellulose %	17.00
Hémicellulose %	32.38
Protéine %	17.89
Lignine %	4.01
Cendre %	6.40
Taux de calcium mg/g	1.58
Taux de sodium mg/g	6.27
Taux de potassium mg/g	4.94
Matière azoté %	2.65

II. Paille de blé

La paille est un coproduit de la culture de maïs grain ou fourrage ou de colza, constituée de la tige, des feuilles et des spathes de la plante. La tige renferme au centre d'une partie moelle spongieuse et lacunaire en tourée d'une écorce (Biomaser & Spezzani, 2014).

La composition biochimique de la paille de blé est très variable (tableau 3). ceci est du part à la variabilité de la matière végétale qui est fonction de la nature du sol, du climat et du stade de maturité de la plante au moment de la récolte, et d'autre part , aux différentes méthodes d'analyse employées (Biomaser & Spezzani, 2014).

La paille peut avoir plusieurs types d'utilisations :

La paille, riche en cellulose, peut servir de matière première pour la fabrication de papier (Commission Européenne, 2001).

Litière pour animaux (chevaux, bovins et ovins), et former ainsi la base du fumier (Niraula & Lebeau, 2018).

Alimentation animale pour les ruminants, seuls animaux d'élevage capables de digérer la cellulose, grâce à l'activité microbienne de la panse. C'est un fourrage utile en cas de pénurie de foin dans les pays d'élevage, notamment pendant les périodes de sécheresse et donc de fenaisons médiocre. De valeur nutritive faible, elle doit être associée à une alimentation protéique et sucrée. Pour la rendre plus appétente auprès d'animaux difficiles, mais aussi pour améliorer sa valeur nutritive, on peut y ajouter divers produits sous forme liquides : urée, mélasse, etc (Devun et al., 2011).

Tableau 3 : Composition biochimique de la paille de blé

Paramètre	Teneur (%)
cellulose	29-35
Lignine	16-21
Hémicellulose	26-32
Cendres	4.5-9
Silice	3-7

III. Grignon d'olive

Ce sous-produit résulte de l'extraction de l'huile d'olive. Il renferme la plus grande partie de la matière sèche de l'olive, constituée essentiellement de l'épicarpe du fruit (pellicule), le mésocarpe (pulpe ou chair de l'olive) et l'endocarpe (coque et amandon de noyau)

De plus, il peut contenir une certaine proportion d'eau de végétation qui contient à son tour les composants hydrosolubles de l'olive (Bataiche, 2014).

Les grignons d'olives sont une biomasse qui présente des problèmes environnementaux dans les pays méditerranéens d'où l'importance de leur valorisation afin d'éliminer ces déchets.

Les grignons d'olive peuvent être valorisés et utilisés dans plusieurs domaines :

- **En alimentation** : par la séparation du noyau de la pulpe, la pulpe étant utilisée en alimentation et le noyau en biocombustible ;

L'utilisation des grignons d'olive, le plus important des sous-produits de l'industrie oléicole, dans la nutrition animale, est très limitée du fait de leur faible valeur nutritive.

Cependant, la valorisation de ce sous-produit prend une importance pratique particulière, étant donné que les grignons d'olive sont produits dans les régions où les fourrages sont limités (Aguilera et al., 1986).

- **En biotechnologie** : comme substrat pour la culture des champignons filamenteux producteurs d'enzymes ;

Selon Perraud-gaime et al., (2009) les grignons d'olive ont été utilisés comme substrat pour la culture de champignons filamenteux thermophiles par fermentation en milieu solide pour la production de lipases thermostables de *Rhizopus oligosporus*.

- **en compostage** : généralement pour la fertilisation des sols (Ammarkhodja & Djafour, 2019).

IV. Papier

Du latin papyrus c'est une matière fabriquée à partir de fibres cellulosiques végétales. Il se présente sous forme de feuilles minces et est considéré comme un matériau de base dans les domaines de l'écriture, du dessin, de l'impression, de l'emballage. Il est également utilisé dans la fabrication de composants divers, comme les filtres (Loucif, 2010).

II.2. Source d'azote

L'azote est l'un des principaux paramètres après source de carbone, influencer les voies métaboliques des microorganismes et pour la production d'enzymes, l'azote peut être assimilé de manière supplémentaire et intracellulaire par des itinéraires métaboliques pour produire des acides aminés qui sont utilisés dans la production de divers composés (Vieira *et al* 2020). Les organismes microbiens poussent sur des milieux riches en sources azotées organiques. Il a été montré que l'utilisation de peptone, et l'urée séparément a (1.8g/l) est meilleur pour optimiser la production de la cellulase (Martiniano,S.E., 2014).

La composition du milieu de culture a modifié la morphologie de *T. reesei* ainsi que sa production de cellulase. Les souches poussant sur des milieux complétés avec de la peptone du glucose et d'extrait de levure ont montré des mycéliums plus denses et plus ramifiés et donc une plus grande surface, ce qui a amélioré leur production d'enzymes en raison d'une interaction plus élevée avec le substrat enzymatique (Y-Maritza Zapata *et al.* 2018) L'extrait de levure est employé pour la production maximale de la cellulase par *Bacillus species* (K.Shanmugapriya *et al* 2012).

II.3. Sels

La croissance microbienne était limitée dans les milieux de culture dépourvus de sels, ce qui suggère que les sels sont nécessaires aussi à la production d'enzymes cellulolytiques. Ces résultats ont validé des études précédentes qui utilisaient de la boue de chaux d'usine de pâte à

papier comme substrat pour la croissance de *T. asperellum*. (Rumbos et Maniscalco., 2015). Les levures ont besoin des sels minéraux et des oligoéléments en de très faibles concentrations, indispensables pour leur développement (Dakhmouche-Djekrif, 2016).

Selon Edor ; (2018), les sels important pour élevé la production chez *Aspergillus niger*, Aussi les sel sont indispensables à la croissance des microorganismes et à la production de cellulase par *Bacillus cellulosilyticus* (Mryam.B et al2018).

II.4. pH

Le pH est un paramètre pour la production d'enzymes. La plupart des micro-organismes sont capables de se développer dans une plage de pH de 5 à 7 (Verma. et al., 2020) la meilleur production cellulosique a été obtenue chez *Bassillus brevis* VS-1 , *Bassillus subtilis* et la nouvelle levure thermo tolérante a 5.5 (Vinay et Kumar, 1998 Kim et Pack MY, 1988, Rai et al 2012) et chez *Cellulomonas sp* a pH = 7. (Yin et al., 2010).

II.5. Températures

La température est le paramètre critique et crucial qui doit être contrôlé et varié d'un organisme à l'autre. Des études indiquent que la température la plus favorable pour les micro-organismes producteurs de cellulase se situe entre 25° C et 35 °C (Verma et al., 2020) .la production de cellulase a été obtenue à 50°C par *Bcillus sp* (Kawai et al., 1988) a 55°C chez *Bacillus licheniformis* (Dhillon , 1985) et a 35°C chez *Bassillus brevis* VS-1 (Vinay K et Anil Kumar, 1998) .La température optimale pour la production de cellulase chez *T. reesei* NRRL 11460 cultivé sur bagasse de canne à sucre prétraitée (Singhania et al. 2006) et *T.reesei* RUT C30 cultivé sur son de blé (Singhania et al.2007) était de 28 et 30 C, respectivement. La production maximale de cellulase de nouvelle levure thermo tolérante a été réalisé à 50°C (Rai et al 2012). Une mauvaise dissipation de la chaleur peut entraîner des gradients de température au sein du milieu de culture durant la fermentation et peut provoquer des déviations métaboliques, l'assèchement du milieu, la dégradation des produits sécrétés, une diminution de la disponibilité des nutriments ou encore l'arrêt de la phase végétative au profit de la phase reproductive du champignon filamenteux (production de conidies) (Manpreet et al 2005).

II.6. Humidité

Le contenu en eau, ou plutôt la quantité d'eau disponible, est vraiment très important puisqu'une faible humidité limiterait l'hydrolyse du substrat, la solubilisation et la diffusion des nutriments et/ou l'accumulation de composés inhibiteurs dans les particules solides, tandis

qu'une forte humidité réduirait la porosité (espace interparticulaire), le volume des gaz et les échanges gazeux, tout en favorisant la contamination bactérienne, le maintien d'une teneur en eau optimale est par conséquent essentiel (Duchiron *et al* 2011) . Les levures ont besoin d'une certaine humidité relative pour se développer. En effet, la plupart des levures nécessitent une humidité relative (HR%) comprise entre 90 et 95 %. Certaines espèces, les « osmophiles », peuvent se développer à une HR inférieure à 65 % (Hencke, 2000). La teneur en humidité de 75% a un effet significatif sur l'augmentation de APF (Darabzadeh *et al.* 2018). Selon Darah *et al* ; (2011) le meilleur taux d'humidité pour *A.niger* est de 70%, et pour *T.reesei* l'optimum 60% (Abdullah *et al*, 2016).

III. Fermentation solide

III.1. Définition

La fermentation en milieu solide est la croissance de micro-organismes sur des substrats solides en absence totale ou presque d'eau libre (Pandey *et al.*, 2000). La matrice solide pourrait être soit la source de nutriments, soit simplement un support imprégné des nutriments appropriés qui permettent le développement des micro-organismes (Pndey, 2003) Le potentiel de la fermentation solide réside dans le fait d'amener le micro-organisme cultivé à proximité immédiate du substrat et d'atteindre la concentration de substrat la plus élevée pour la fermentation. Le milieu solide à l'habitat naturel des micro-organismes et est donc constitue un environnement préféré des micro-organismes pour se développer et produire des produits utiles à valeur ajoutée. (Kelecom *et al.*, 2002).

III.2. Les avantages de fermentation solide

Aujourd'hui l'environnement d'évolue rapidement, où nous pouvons faire l'expérience d'un progrès technologique constant soutenu par l'innovation jouant le rôle de catalyseur majeur dans cette course. La fermentation solide semble posséder plusieurs avantages biotechnologiques, tels qu'une productivité de fermentation plus élevée, une concentration finale plus élevée des produits, une stabilité plus élevée du produit, une répression catabolique plus faible, et enfin, demande moindre de stérilité en raison de la faible activité de l'eau utilisée (Hölker *et al.*, 2004). Les cultures des bactéries et des levures peuvent être bien manipulées et gérées pour le processus FMS (Sabu, 2016) Bien que les procédés de récupération et de purification des produits soient plus coûteux en utilisant des supports naturels, leur utilisation

suppose une réduction des coûts de production et généralement des activités beaucoup plus élevées sont obtenues (Couto,2005).

IV. Fermentation liquide

IV.1. Définition

Fermentation liquide utilise des substrats liquides à écoulement libre, tels que la mélasse et le bouillon. Cette technique de fermentation est la mieux adaptée aux micro-organismes tels que les bactéries, les moisissures et les levures qui nécessitent une teneur en humidité élevée. Un avantage supplémentaire de cette technique est que la purification des produits est plus facile (Subramaniyam R *et al*, 2012, Azzouz 2016 , Liu 2016).la fermentation immergée est généralement effectuée à la vue d'un liquide libre dans lequel des substrats solubles sont dispersés, et constitue la technologie la plus couramment utilisée pour l'énorme gamme de production d'enzymes (Namnuch et Thammasittirong. 2020).

IV.2. Avantages du fermentation liquide

La fermentation submergée a divers mérites comme les facilités de transfert de masse et de chaleur du système de stérilisation surveillant l'extraction et la récupération des protéines bioactives et l'automatisation et facilité le contrôle du pH (Ahmed *et al.*, 2017).

IV.3. Désavantages du fermentation liquide

Le principal inconvénient de la fermentation immergée est la longue durée d'incubation avec faible production d'enzymes (Bhati *et al.*, 2020) et leur stérilisation est nécessaire car le risque de contamination est élevé (Manpreet, *et al.*, 2005).

V. Comparaison entre fermentation solide et liquide

La fermentation solide a attiré une nouvelle attention de la part des chercheurs et des industries du monde entier depuis quelques années, principalement en raison des quelques avantages qu'elle offre par rapport à la fermentation liquide, en particulier dans les domaines de la gestion des déchets solides, de la conservation de l'énergie de la biomasse et de son application pour produire des métabolites à haute valeur ajoutée. Produits à faible volume tels que les métabolites secondaires biologiquement actifs, etc., en dehors de la production de denrées alimentaires, d'aliments pour animaux, de carburant et de produits chimiques traditionnels en vrac à l'inverse de fermentation liquide (Pandey et al., 2007).

Les cellulases sont produites en utilisant la méthode de fermentation submergée traditionnellement, dans laquelle la culture de micro-organismes se produit dans une solution aqueuse contenant des nutriments. Une alternative à cette méthode est la méthode de culture à l'état solide, qui implique la croissance de micro-organismes sur des matériaux solides en l'absence de liquides libres. Étant donné que la FMS implique relativement peu de liquide par rapport au fermentation liquide, le traitement en aval du fermentation liquide est théoriquement plus simple et moins coûteux. Au cours des dix dernières années, un regain d'intérêt pour la FMS s'est développé en raison de la reconnaissance que de nombreux micro-organismes, y compris les organismes génétiquement modifiés (OGM), peuvent produire leurs produits plus efficacement par fermentation solide. (Sangrila Sadhu et Tushar Kanti Maiti. 2013). Aussi plus facile avec bon rendement et moins chers (Sandhu et Malti 2013).

VI. Amélioration de la production enzymatique

Un plan d'expériences est une série d'essais sélectionnés qui offre une stratégie optimale permettant de prédire avec le maximum de précision une réponse à partir d'un nombre minimal d'essais. De manière générale, la méthode des plans d'expériences cherche à minimiser le temps et à déterminer et à établir les interaction entre les différent variables .Il existe différent plans d'expérience utilises pour la production de métabolites notamment les enzymes (Hamma et Saoudi, 2016).

VI.1. Méthode OFAT (one factor at a time)

C'est la méthode classique, changer un facteur en maintenant les autres a une valer fixe, remettre ce facteur à son réglage initial, puis changer un autre facteur. C'est une approche structurée permettant d'étudier les effets de la modification simultanée des facteurs en limitant le nombre d'essais. (Gallo,2017) Le facteur peut être : un paramètre physique ou nutritionnel importants pour la régulation de la croissance du micro-organisme et son rendement enzymatique. Cette méthode néglige les effets des interactions des facteurs étudiés sur la production enzymatique. Pour cette raison, on suggère l'application d'approche statistique pour concevoir des expériences en considérant les différents facteurs comme des variables et en réalisant aussi des études des effets des interactions entre plusieurs paramètres physiques et nutritionnels. (Bhardwaj et *al.*, 2019).

VI.2. Plan de Plackett-Burman

Plackett-Burman est un plan factoriel à deux niveaux utilisé pour filtrer un grand nombre de facteurs qui affectent de manière significative le processus. De nombreuses variables peuvent affecter la réponse souhaitable et il n'est pratiquement pas possible d'identifier leur contribution individuelle. Par conséquent, il existe un besoin de sélectionner les variables significatives ayant un effet profond sur l'optimisation de la cellulase. Il permet deux niveaux pour chacune des k variables de contrôle, similaire à la conception 2^k , nécessitant moins d'essais expérimentaux (BOX *et al* 1957). L'effet principal de chaque variable a été déterminé selon l'équation suivante : $Ex_i = (M_{i+} - M_{i-}) / N$ où, Ex_i est l'effet principal de la variable, M_{i+} et M_{i-} sont le pourcentage d'activité dans les essais, dans lesquels la variable indépendante (x_i) était présent à des concentrations élevées et faibles, respectivement, et N est la moitié du nombre d'essais. . (Mouhcine Fadil *et al* 2014). Utiliser dans plusieurs travaux dans la production d'amylopullulanase (Dakhmouche,2016) aussi la production de cellulase (Yaiche et Aidouni,2018).

VI.3. Plan composite central (CCD)

Le CCD est un plan de second ordre, adapté à l'expérimentation parallèle, qui permet à des informations raisonnables de sans impliquer un grand nombre de points de conception. C'est une conception appropriée pour l'ajustement d'une surface quadratique, qui fonctionne bien pour optimiser les paramètres de processus, fournissant des informations sur l'effet de chaque facteur et l'effet des interactions des facteurs étudiés. Après la sélection des paramètres significatifs à l'aide d'un modèle linéaire, l'objectif se déplace vers l'optimisation des produits et des processus de facteurs d'influence sélectionnés. L'étude de l'effet d'interaction entre deux variables et de l'efficacité avec un nombre minimum d'essais fait du CCD un modèle unique et le plus largement utilisé pour l'optimisation de divers processus. Les principales variables de processus dans leurs unités de mesure affectant la réponse sont utilisées pour une optimisation supplémentaire. Cependant, lors de la conception d'une expérience, le codage des variables est effectué lorsque X_1 et X_2 sont effectués, qui sont centrés à 0, et s'étendent à $+\alpha$ et $-\alpha$ à partir du centre de la région expérimentale. L'objectif est de commencer quelque part en utilisant nos meilleures connaissances antérieures ou actuelles et de rechercher le point optimal de réponse maximisée ou minimisée (Somayajula *et al* 2012) et (Aanchal *et al* 2016) .Utilisé dans nombreux ouvrages, notamment la production de protéase (Benkahoul *et al* 2017) et la

production d'amylopullulanase (Dakhmouche,2016). Les plans de composite centré généralement sont combiné avec les isoréponses et les surfaces des réponses.

A cluster of blue, textured, oval-shaped objects, possibly seeds or fruits, against a blurred background. The objects are arranged in a dense, vertical group, with some showing a small circular mark or indentation. The background is a soft, out-of-focus mix of light blue and white.

*Matériel et
méthodes*

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Génie Microbiologique et Application. Université des Frères Mentouri Constantine. Il porte sur étude de la production de cellulase avec un potentiel d'application industrielle dans plusieurs secteurs, sur des déchets lignocellulolytiques par fermentation liquide et fermentation solide chez la souche des levures nouvellement isolée par Dr Dakhmouche schehrazad. Afin de sélectionner le milieu le plus performantes, et dans un deuxième temps, l'amélioration de la production cellulolytique par la méthode OFAT et les plans statistiques (Plackett et Burman et le plan composite centré). Et par la suite la purification d'enzyme étudiée

I. Microorganisme

I.1. Origine de la souche levurienne

La souche utilisé dans ce travail a été isolée du yaourt et conservée et stockées dans le mycothèque du laboratoire Génie enzymatique et application.

I.2. Réactivation de la souche

La réactivation de la souche Y1 est effectuée par repiquage en surface de milieu YMA (annex1) en boîte de pétrie. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 48 h. La culture pure obtenue est conservée à 4°C pour courte durée et à -20°C pour longue durée, après observation macroscopiques (figure 10) et microscopique (figure 11).



Figure 10 : Observation macroscopique de la souche Y1 sur milieu YMA après 48 h d'incubation à 30°C

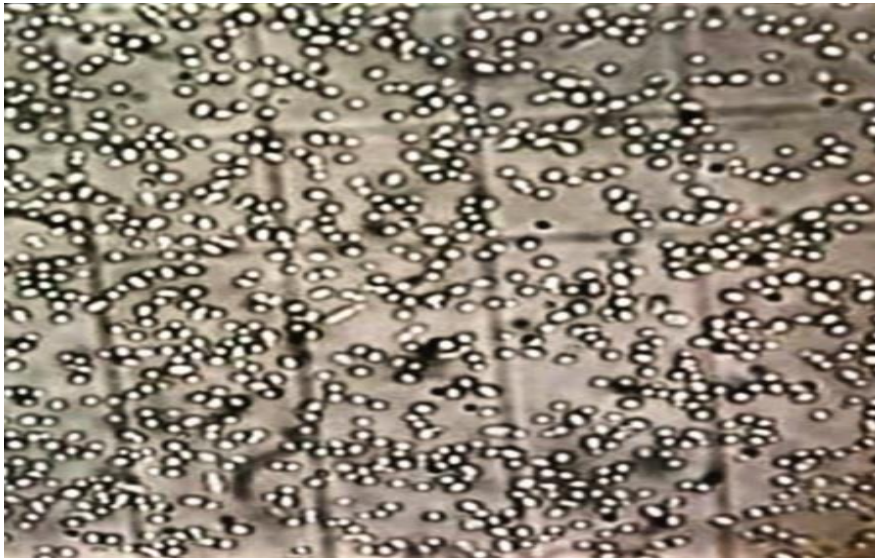


Figure 11 : Observation au microscope optique de la souche Y1 (G×40)

I.3. Mise en évidence de l'activité cellulolytique

La mise en évidence de l'activité cellulolytique de la souche testée. Est effectuée sur un milieu YPCA (annexe 1), après l'incubation à 30°C pendant 48 h, les boîtes sont colorées pendant 20 min avec une solution au Rouge Congo (0.1%) (annexe 1) qui se fixe sélectivement sur les polymères de cellulose. L'excédent de colorant non fixé est éliminé. Les boîtes sont lavées avec une solution de NaCl (5N) (annexe 1) pendant 30 min, puis rincées délicatement à l'eau distillée. Le Rouge Congo permet la mise en évidence de l'activité cellulolytique par l'apparition des zones claires (Oikawa *et al.*, 1998; Korish, 2003).

I.4. Identification de la souche levurienne (Assimilation des composés carbonés : Galerie API ID32C)

La galerie ID 32C est un système standardisé pour l'identification des levures, contenant 32 tests d'assimilation miniaturisés. Cette manipulation a été effectuée au sein du Laboratoire de Génie Microbiologique et Application.

Principe de la galerie API

La galerie 32C comporte 32 cupules contenant chacune un substrat carboné sous forme déshydraté (Tableau 4), remplies d'un milieu semi-solide (API C Medium) (Tableau 5)

(on peut remplacer le milieu par tube contenant 2 ml d'eau distillée sans additifs ou milieu YPG) préalablement inoculé.

Quelques colonies sont transférées dans de l'eau distillée stérile jusqu'à une opacité Mac Farland 2. 250 µl de cette suspension sont transférés dans une ampoule de milieu semi-solide API C fournie par le fabricant. Après homogénéisation, chaque cupule de la galerie est inoculée par 135µl de milieuensemencé. La galerie recouverte d'un couvercle est mise à incuber à 30°C pendant 48h (figure 12).

Des lectures visuelles sont réalisées après 24 h et 48 h d'incubation. La présence éventuelle d'un trouble est notée après comparaison au contrôle (O) (position 1.F sur la galerie). Une cupule plus trouble que le témoin indique une réaction positive et la fermentation du composé.

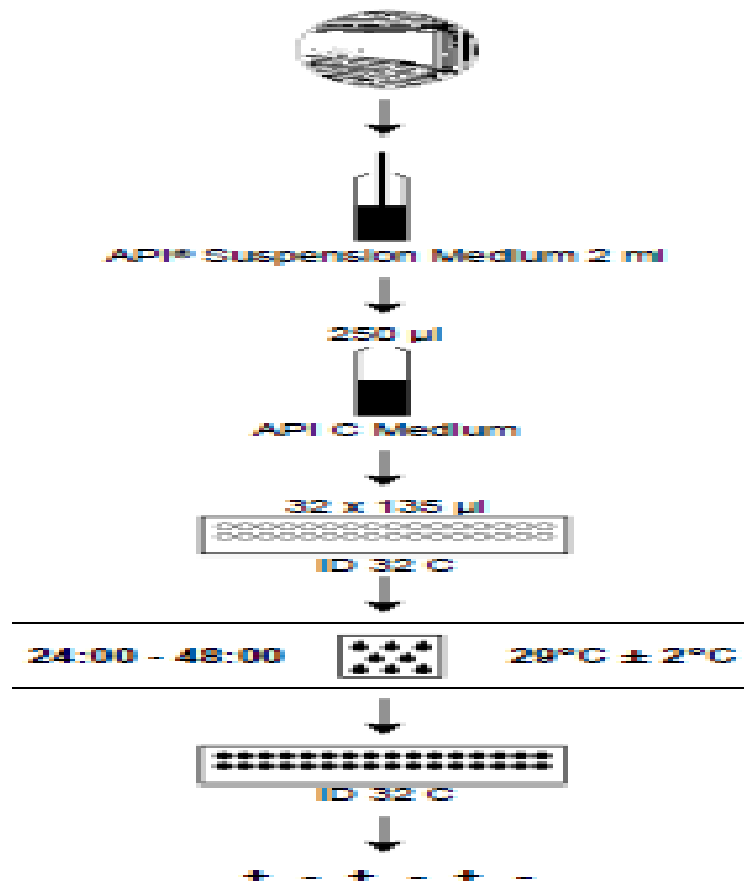


Figure 12 : Procédure de l'identification des levures à l'aide de la galerie ID 32C

Tableau 4 : La composition de la bande ID 32 C

CUPULES	TESTS	SUBSTRATES	QTY (mg/cup.)
1.0	GAL	D-GALactose	0.70
1.1	ACT	cycloheximide (ACTidione)	0.014
1.2	SAC	D-SACcharose (sucrose)	0.66
1.3	NAG	N-Acetyl-Glucosamine	0.64
1.4	LAT	LacTic acid	0.64
1.5	ARA	L-ARAbinose	0.70
1.6	CEL	D-CELlobiose	0.66
1.7	RAF	D-RAFfinose	2.34
1.8	MAL	D-MALtose	0.70
1.9	TRE	D-TREhalose	0.66
1.A	2KG	potassium 2- KetoGluconate	1.09
1.B	MDG	Methyl- α D- Glucopyranoside	1.92
1.C	MAN	D-MANnitol	0.68
1.D	LAC	D-LACtose (bovine origin)	0.70
1.E	INO	INOsitol	0.70
1.F	0	No substrate	-
0.0	SOR	D-SORbitol	2.72
0.1	XYL	D-XYLose	0.70
0.2	RIB	D-RIBose	0.70
0.3	GLY	GLYcerol	0.82
0.4	RHA	L-RHAMnose	0.68
0.5	PLE	PaLatinosE	0.66
0.6	ERY	ERYthritol	1.44
0.7	MEL	D-MELibiose	0.66
0.8	GRT	sodium GlucuRonaTe	0.76
0.9	MLZ	D-MeLeZitose	0.66
0.A	GNT	potassium GlucoNaTe	0.92

0.B	LVT	levulinic acid (LeVulinaTe)	0.48
0.C	GLU	D-GLUcose	0.78
0.D	SBE	L-SorBosE	0.70
0.E	GLN	GLucosamiNe	0.68
0.F	ESC	ESCulin ferric citrate	0.28 0.069

Tableau 5 : La composition d'API C Medium.

API C Medium 7 ml	Ammonium sulfate	5 g
	Monopotassium phosphate	0.31 g
	Dipotassium phosphat	0.45 g
	Disodium phosphate	0.92 g
	Sodium chloride	0.1 g
	Calcium chloride	0.05 g
	Magnesium sulfate	0.2 g
	L-Histidine	0.005 g
	L-Tryptophan	0.02 g
	L-Methionine	0.02 g
	Gelling agent	0.5 g
	Vitamin solution	1 ml
	Trace elements	10 ml
	Demineralized water to make	1000 ml
Final pH : 6.4-6.8 at 20-25°C		

I.5. Préparation de l'inoculum

La souche Y 1 est repiquée sur le milieu YPGA (annexe1) dans erlenmeyers de 250 ml puis incubé à 28°C pendant 48h.

Après la croissance de la levure, les cellules sont récupérées par addition de 20 ml d'eau distillée stérile. La suspension de cellules va servir à l'inoculation des milieux de cultures et de production des enzymes cellulolytiques.

I.6. Dénombrement des cellules

Le nombre de cellules est déterminé par la technique de dénombrement en utilisant la cellule de Thoma (Annexe1). Après une dilution de 1/10 de la solution mère de façon à obtenir une densité optique mesurable par spectrophotomètre. La densité optique de la suspension est déterminée à 600 nm ($Abs < 0.5$), le dénombrement s'effectue au microscope optique au grossissement (x 40).

II. Etude de la production de la cellulase

II.1. Substrat utilisé pour la fermentation

Afin de sélectionner les meilleurs substrats pour la production de cellulase quatre déchets lignocellulosiques sont utilisés dans les fermentations solides et liquides pour la production de la cellulase :

Son de blé et la paille de blé proviennent du marché Souika, Constantine. Algérie.

Les grignons d'olive, Il nous a été gracieusement fourni par une huilerie moderne à El Harrouch. Wilaya de Skikda.

Le papier essuie-tout est procuré du marché local.

Le papier est coupé en petits morceaux, la paille, le son de blé et le grignon d'olive sont séchés à l'air libre. Ils sont ensuite broyés en petites particules.

II.2. Sélection du milieu de fermentation

II.2.1. Préparation des fermentations en milieu solide

Toutes les expériences de la fermentation solide sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 ml, à raison de 5 grammes de substrat par erlen avec un volume de solution humidifiant (l'eau distillée), l'humidité ajustée à 60%. Ensuite ils sont homogénéisés à l'aide d'une baguette en verre puis les Erlenmeyers ont été bouchés avec un coton cardé et enveloppés avec papier aluminium. Les milieux sont stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

Après refroidissement les erlenmeyers sont inoculés avec une suspension de cellules à raison de 4×10^6 cellules/g.

Les erlenmeyers ensemencés sont ensuite incubés à 30°C dans une étuve pendant 48 h.

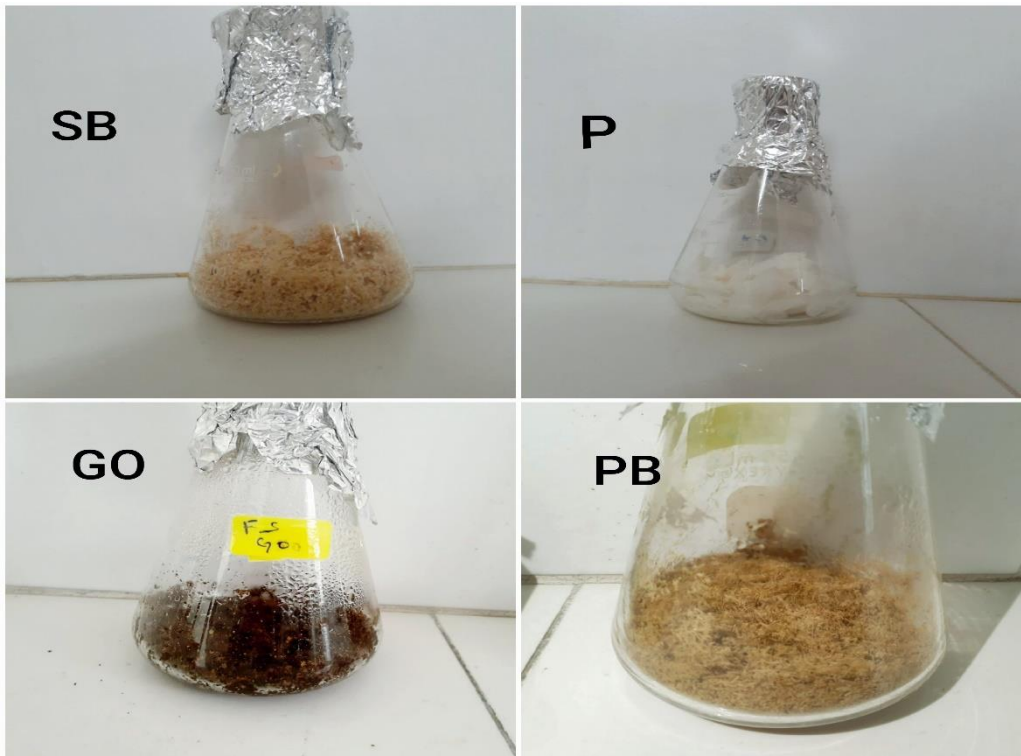


Figure 13 : Fermentation solide

SB : son de blé

GO : grignon d'olive

P : Papier

PB : paille de blé

a. Extraction

A la fin de la fermentation une quantité connue 2.5g de substrat fermenté est mélangée avec 25 ml de solution de Tween 80 (0.02%) et mixé pendant 3 minutes puis centrifugé à 10000g pour 10 minutes à 4°C. Le surnageant représente l'extrait enzymatique il est récupéré pour le dosage des activités enzymatique APF et endoglycanase.

b. Détermination de la matière sèche (MS)

Afin de suivre l'évolution de la matière sèche au cours de la fermentation une quantité connue de substrat fermenté est pesée dans des capsules sèches, Puis incubée dans une étuve à 105°C pendant 48h.

Le pourcentage de la matière sèche est calculé comme suit :

$$\text{MS (\%)} : [(\text{PF}-\text{PS}) / \text{PF}] \times 100$$

MS : Matière sèche

PF : Poids frais

PS : Poids sec

II.2.2. Préparation des fermentations en milieu liquide

a) Préparation du milieu

Toutes les expériences de la fermentation liquide sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml, 4 grammes de substrat (graingion d'olive, paille de blé, son de blé et papier) sont ajoutés séparément à 100 ml de l'eau distillé, après agitation sous une température légèrement élevée, la suspension est filtrée, le filtrat constitue le milieu de culture.

b) Conduite de la fermentation

On introduit 50 ml de milieu dans des erlenmeyers de 250 ml, les erlens sont bouchées avec du coton cardé et papier aluminium, puis stérilisé à 121°C pendant 20 min. Après refroidissement les erlenmeyers sont inoculés à raison de 4×10^6 cellules/g.L'ensemble est incubé dans un shaker thermostat à 30°C sous agitation transversale pendant 48 h. Au bout de 48h d'incubation, les cultures sont arrêtées, centrifugées pendant 10 min à 10000 tours par minute. Le surnageant est ensuite filtré et utilisé comme extrait

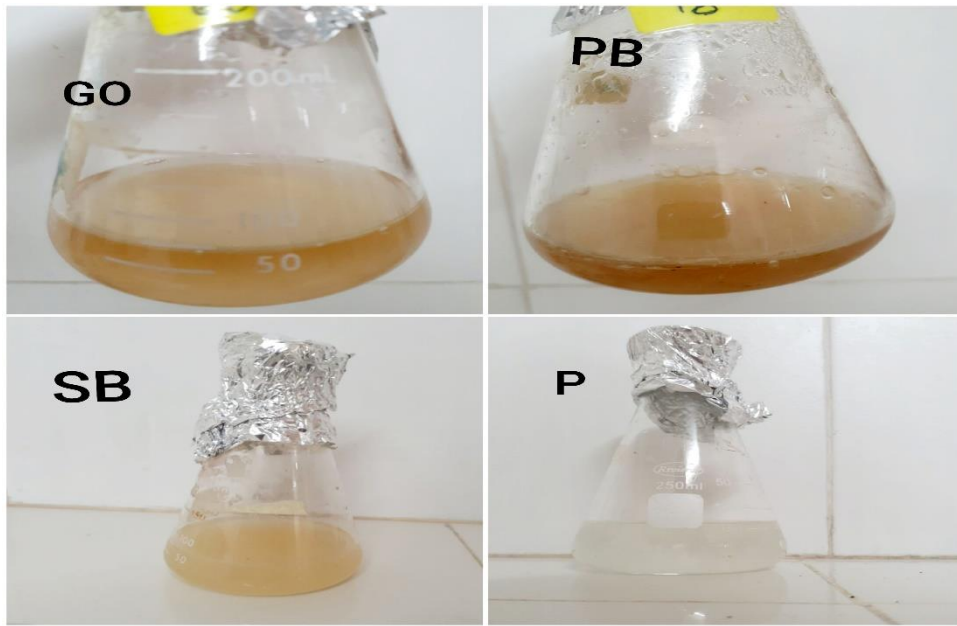


Figure 14 : fermentation liquide

SB : son de blé

GO : grignon d'olive

P : Papier

PB : paille de blé

III. Méthodes analytiques

III.1. Dosage des activités cellulolytiques

III.1.1. Activités papier filtre

Selon la méthode de Ghose

- Mettre dans un tube à essai 50 mg du papier filtre Whatman n°1 découpé en bandes.
- Ajouter 1ml de tampon au citrate (0.5M, pH = 5) (Annexe2).
- Ajouter 0.5ml de l'extrait enzymatique.
- Ensuite incuber les tubes à 50°C pendant 60min.
- Après de retiré les tubes du bain marie en ajoutant 1.5ml de réactif DNS (Annexe 2).
- Incubé a 100°C tous les tubes pendant 10min.

- Laissez stabilisé 20min dans un bain de glace.
- Prélevée de ce mélange réactionnel 0.5ml et ajouter 1ml de l'eau distillé et agiter.
- Lire l'absorbance à 540nm.

(YuX *et al.*, 2016)

III.1.2. Activité endoglucanase

Pour la détermination de l'activité cellulasique, le milieu réactionnel est composé de

- 500 µl d'une solution de CMC à 1 % (P/V) (Annexe 2) préparé dans du tampon citrate 0,5 M, pH = 5.
- 500 µl de mélange d'extrait enzymatique dilué dans un tampon citrate 0,5 M, pH = 5.
- Ce mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 30min.
- Les sucres réducteurs libérés ont été dosés selon la méthode de Miller (1959) en ajoutant 1ml de D.N.S au mélange réactionnel pour arrêter la réaction.
- Le milieu est porté au Bain-Marie bouillant pendant 10 min,
- Puis refroidi dans un bain de glace et en ajout 10ml eau distillé. L'intensité de la coloration a été déterminée à 540 nm contre le témoin contenant tous les réactifs, excepté l'enzyme.

(Sea T.B *et al* 2006).

L'unité de l'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole de glucose (lorsque le glucose est utilisé comme étalon sucre réducteur) par minute et par millilitre, à 50°C, pH 5. Le blanc est préparé de la même façon, sans l'addition de substrat. Chaque dosage est effectué en duplicate. Il y a une relation proportionnelle entr la couleur et la teneur en glucose libéré.

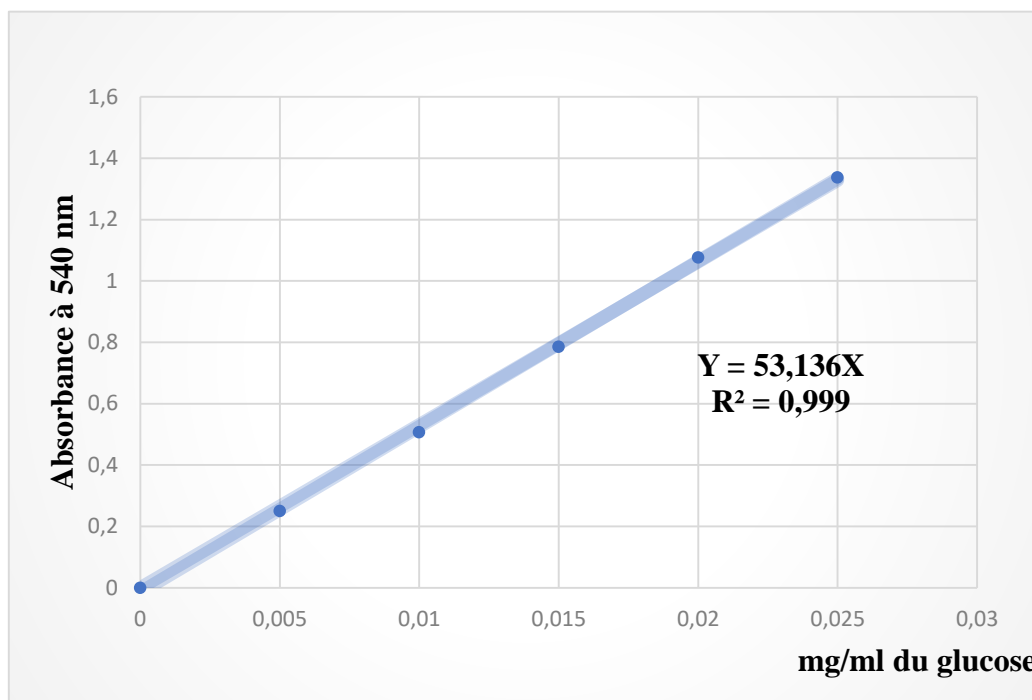


Figure 15 : Courbe étalon de glucose

IV. Optimisation des paramètres influençant la production de cellulase

Dans le but de déterminer les valeurs optimales des paramètres permettant une meilleure production de cellulase chez la souche étudiée. La méthode OFAT et deux plans statistique (Plaquett et Burman, Plan composite centré) est appliqué dans cette étude afin d'évaluer l'influence de chaque paramètre sur l'activité cellulosique étudiée d'une part et les effets d'interactions de ces derniers d'autre part.

IV.1. Optimisation des conditions de culture pour la production de cellulase par un facteur à la fois (OFAT)

- **Croissance sur milieu solide**

Le milieu exclusivement composé de 5g de déchets son de blé /paille de blé (en utilise un seul déchet dans chaque erlen) avec l'humidité 60 % et inoculés avec une suspension de spores à raison de 4×10^6 spore par gramme. Dans des erlens de 250 ml puis incubé dans l'étuve à 30° C pendant 48h ; Ce milieu de base (MB) est utilisé pour l'optimisation de la production de cellulase.

IV.1.1. Effet des sources d'azotes :

L'étude de l'effet de différentes sources azotées a été réalisée.

Les milieux de culture (MB) sont additionnés des sources d'azotes organiques urée, peptone extrait de levure, corn steep et des sources d'azote inorganique $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl et NaNO_3 avec pourcentage de 0.5%.

IV.1.2. Effet de la source de carbone :

L'étude de l'effet de carboxyméthyle cellulase à 0.5% est réalisé. Le CMC est la substrat classique du cellulase

IV.1.3. Effet des sels :

Les milieux de culture (MB) sont enrichis séparément avec différents sels à savoir (0,06%) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.02%) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05%) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

IV.2. Optimisation des conditions de culture pour la production de cellulase par la méthode statistique

IV.2.1. Optimisation de la production des enzymes selon le plan statistique de Plackett et Burman

Le plan d'expériences utilisé est établi selon les matrices de Plackett-Burman (Plackett et Burman, 1946), ce plan permet la sélection des facteurs ayant un effet significatif (positif ou négatif) sur la production des enzymes cellulolytiques (APF et endoglucanase) par la souche Y1. Ces matrices d'expériences permettent d'évaluer l'influence de k facteurs à deux niveaux sur la réponse étudiée avec un nombre d'expériences N tel que : $N = k-1$ (N est un multiple de 4 et peut être compris entre 4 et 100). Ce sont des matrices carrées (dites matrices d'Adamard) ne contenant que des éléments égaux à +1 ou -1, établies par permutation circulaire à partir d'un générateur de base (Tableau 8). Dans cette étude, la matrice employée est représentée dans le tableau 4.

12 expériences et 11 facteurs (7 réels et 4 erreurs) : les lignes représentent la différente expérience e les colonnes les facteurs testés. (C), (F), (I) et (K) représentent les facteurs erreurs qui permettent l'estimation de l'erreur expérimentale. Les facteurs de la dernière expérience

étant toujours pris au niveau -1. Les niveaux supérieurs (+) et les niveaux inférieurs (-) de l'ensemble des facteurs testés sont rapportées dans le tableau 7 et les essais sont reportés dans la matrice des essais en tableau 6. (Fadil *et al* 2014).

Tableau 6 : Matrice d'expériences de Plackett et Burman pour l'étude de 11 facteurs avec 12 expériences

expériences facteurs	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
4	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

(C), (F), (I) et (K) sont les facteurs erreurs.

(+) : niveau supérieur du facteur.

(-) : niveau inférieur du facteur.

Tableau 7 : Les facteurs testés et leurs concentrations correspondantes

facteur	Niveau(-)	Niveau(+)	unité
Température	30	50	°C
pH	4	8	-
Erreur	-	-	-
CMC	0	0.5	%
Humidité	20	80	%
Erreur	-	-	-
Taux d'ensemencement	10^5	10^7	cellule/ml
Temps d'incubation	48	72	heur
Erreur	-	-	-
Quantité de déchet	5	10	g
Erreur	-	-	-

Tableau 8 : Générateur des matrices pour N=8,12,16 et 20 essais Plackett et burman

N=8	+	+	+	-	+	-	-										
N=12	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-							
N=16	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-				
N=20	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-

Niveau supérieur+, Niveau inférieur -

• **Analyse statistique des matrices du plan de plackett-Burman**

Les coefficients des facteurs explicatifs sur la production des enzymes sont estimés par la méthode des moindres carrés. Le degré de signification accepté (niveau de confiance) est de $(1-\alpha) = 95 \%$. La signification de chaque variable sur la production des enzymes est déterminée via le test-t de Student, si le test t est significatif, l'effet est donc dû au changement du niveau du facteur et non pas au hasard ni à l'erreur expérimentale. C'est-à-dire le changement du facteur du niveau inférieur (-1) au niveau supérieur (+1) entraîne un effet positif ou négatif sur la réponse. Les calculs des coefficients de régression ainsi que le test de Student pour la régression linéaire multiple sont évalués par le logiciel « Minitab 19 » La réponse théorique Y, pour les facteurs étudiés, est :

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_4X_4 + \beta_5X_5 + \beta_6X_6 + \beta_7X_7 + \epsilon$$

Où β_0 : constante $\beta_1 \dots \beta_{11}$: coefficients de régression $X_1 \dots X_{11}$: facteurs explicatifs. L'effet de chaque facteur et de l'erreur sont calculés comme la différence entre la moyenne des valeurs de réponses observées au niveau supérieur (+) et la moyenne des valeurs de réponses observées au niveau inférieur (-).

$$EA = R (+) /r - R (-) /r$$

E : effet de chaque facteur ; **r** : le nombre d'apparition du facteur au niveau supérieur ou inférieur, **r = 4** * La variance est définie comme la moyenne des carrés des erreurs, qui est exprimée par :

VE : Variance des effets ; n : nombre des erreurs. * L'erreur standard E. S est définie comme la racine carrée de la variance, exprimé par : $E.S = \sqrt{VE}$ * La signification de chaque facteur est déterminée par le test-t de Student : $t = E / E.S$ (Benkerrou & Hamaili, 2012)

IV.2.2. Optimisation des composants sélectionnés

Afin d'optimiser l'activité endoglucanase les niveaux du trois variables indépendantes :pH (C1), l'humidité (C2) et quantité de substrat (C3) sélectionnées par le plan de Plackett et Burman, sont optimisés par le plan composite centré (CCD) (Tableau 9) en combinaison avec la méthodologie de surface de réponse (RSM).

Tableau 9 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré.

Facteurs	Niveaux des facteurs				
	-1.682	-1	0	1	1.682
C1	3.318	4	5	6	6.682
C2	71.59	75	80	85	88.41
C3	5.477	6.5	8	9.5	10.523

pH : $C1 = (pH-5) / 1$

Humidité : $C2 = (humidité-80) / 5$

Quantité de substrat : $C3 = (sels- 8) / 1,5$

C 1, C 2, C 3 sont les solutions des dérivés des équations obtenues après le traitement de la matrice du plan composite centré : ils nous permettent de déterminer les positions des extremums de ces fonctions.

$$X_i = \frac{(A_i - A_0)}{\Delta A}$$

A_i : valeur réelle de ce facteur

X_i = valeur codée du facteur

A₀ = la valeur au niveau 0 du facteur étudié

ΔA = le pas choisi par le manipulateur.

Ce plan de 20 expériences (Tableau 10) permet d'étudier chaque facteur à cinq niveaux. Il est composé de trois parties :

- 24 points de coordonnées (-1, +1) qui forment un plan factoriel complet 2 soit () combinaisons.
- 6 points en étoile avec deux niveaux +alpha et – alpha. La valeur du α est fonction du nombre de facteurs k ($\alpha = 1.682$).
- 6 répétitions du point central (niveau 0). Afin de calculer l'erreur expérimentale ce qui permet d'analyser ce plan (3 répétitions sont effectuées).

Un tel plan permet d'obtenir l'équation du deuxième degré et les dérivés par rapport à 0, permettant de déterminer les coordonnées codées des extremums qui seront ensuite transformées en valeurs réelles.

Tableau 10 : La matrice expérimentale du plan composite centré pour l'étude de six facteurs.

Numéro d'essai	Niveau de facteur		
	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1.682	0	0
10	1.682	0	0
11	0	-1.682	0
12	0	1.682	0
13	0	0	-1.682
14	0	0	1.682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

V. Purification de cellulase

L'enzyme brute a été précipitée pendant une nuit en utilisant du sulfate d'ammonium (40 % - 80 % de saturation) (Annexe 2)

- Après centrifugée à 10 500 tr/min pendant 10 minutes à 4°C pour recueillir les pastilles.
- Les culots ont été mis en suspension dans une quantité minimale de tampon phosphate 0.5 mM (pH 6.68)
- Dialysés pendant une nuit

(Goel N *et al* 2019)

V.1. Dosage des protéines

Selon la méthode de Lowry, qui consiste en un dosage colorimétrique particulièrement sensible se basant sur deux réactions colorimétriques.

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

- Dans un premier temps, 0,5 ml de culot /surnagent ont été ajoutés à des tube à essai.
- Ensuite, 2,5 ml de mélange réactionnel (Annexe 2) a été ajouté aux tubes.
- Les tubes ont été incubés 10min sur la paillasse.
- A la fin de l'incubation, en ajoutant 0.5 ml de folin dilué, tous les tubes ont été laissez stabilisé 30 min
- Lire l'absorbance à 650 nm.

(lowry *et al* 2016).

La quantité de protéines est déterminée par comparaison avec une gamme de sérum albumin bovine (BSA) à des concentrations de 0 à 500 µg/ml (figure 16).

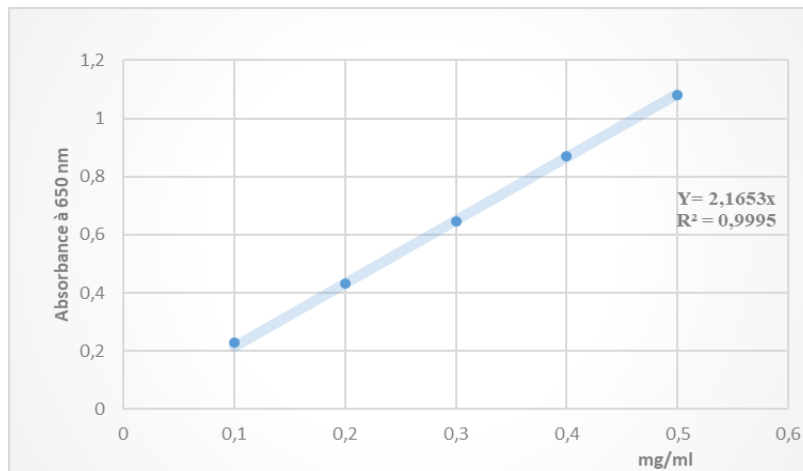


Figure 16 : courbe étalon des protéines

V.2. Chromatographie d'exclusion

Un échantillon de 1 ml est chargé sur un gel de séphadex G 50 dans une colonne de 1m x 1.6 cm (figure 17), équilibré avec un tampon citrate 0.5 M à pH 6.68. Le débit d'élution est réglé à 0.5 ml/mn. L'éluat est collecté par fraction de 2 ml. Sur chaque fraction collectée, la densité optique à 280 nm et l'activité endoglucanase est mesurée. Les fractions ayant des activités enzymatiques élevées sont rassemblées

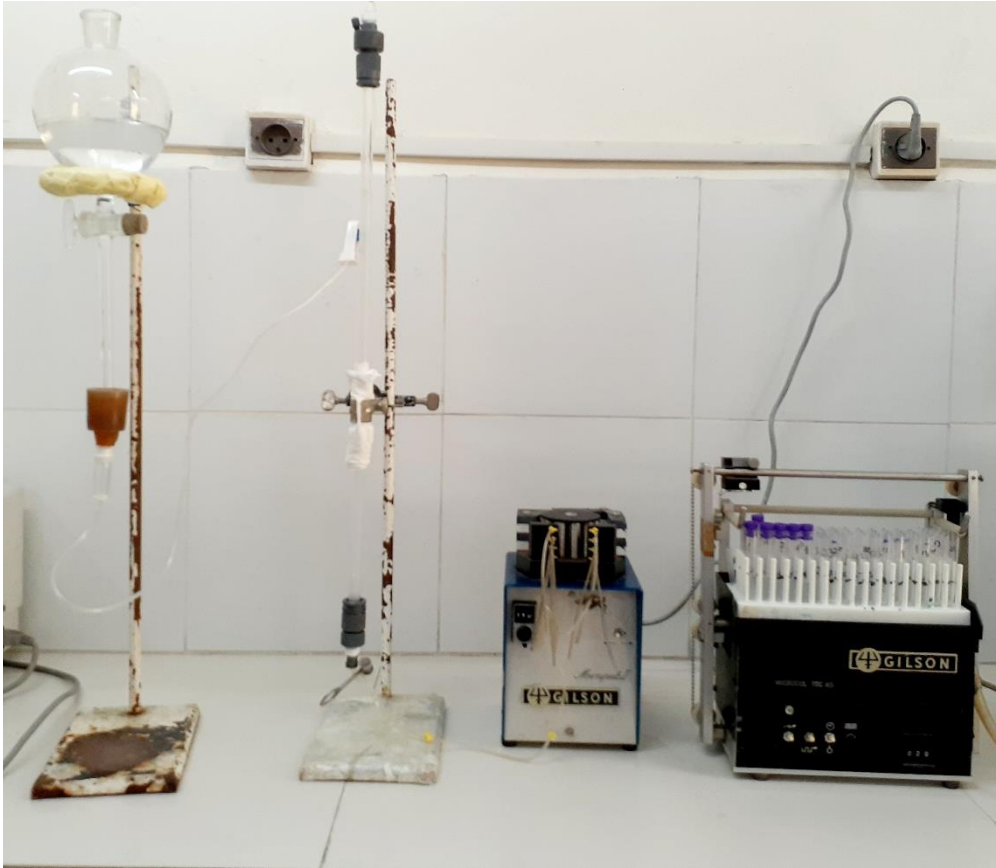


Figure 17 : chromatographie sur colonne séphadex g50

VI. Applications enzymatiques

Application de cellulase sur un rendement accru de jus de pomme des fruits de pomme rouges importés a été obtenue du marché local, à Constantine. Le rendement a été déterminé comme suit selon (Nehad *et al.*, 2019): les pommes ont été coupées en cubes d'environ 5mm de côté. On a ajouté environ 10 g de poids dans chaque béccher, ainsi que 24 ml d'eau dans le premier béccher, 24 ml d'enzyme cellulase ont été ajoutés au deuxième béccher (figure 18). Les bécchers ont été mis dans bain-marie à 40 °C pendant 2 h. Après avoir retiré les bécchers du bain-marie, on remue les morceaux de pommes dans chacun d'eux. Le volume de jus obtenu a été record après filtration. Le rendement en jus de pomme a augmenté

- **Effet de la cellulase sur la clarification du jus de pomme**

Elle a été réalisée selon la méthode de (Nehad *et al.*, 2019) comme suit : 2 éprouvettes ont été utilisées : une comme témoin et d'autres comme test.

Dans le premier tube : 1 ml d'eau a été ajouté à 5 ml de jus de pomme trouble.

Dans le second tube : 1 ml d'enzyme cellulase purifiée a été ajouté à 5 ml de jus de pomme trouble.

Le contenu du tube a été bien remué pour mélanger l'enzyme dans tout le jus et maintenu dans un bain marie à 50 °C, et une clarification du jus de pomme a été observée



Figure 18 : préparation du jus de pomme

A cluster of blue, textured, almond-like objects, possibly representing a biological or chemical structure, set against a blurred background. The objects are elongated and have a rough, pebbled surface. The text "Résultat et discussion" is overlaid in a black, italicized serif font.

*Résultat et
discussion*

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Génie Microbiologique et Application. Université des Frères Mentouri Constantine.

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats et la discussion de la production de cellulase levurienne à application variée dans des différents secteurs industriels. Pour la meilleure production nous avons sélectionné d'une part le type de fermentation et d'autre part la meilleur substrat lignocellulolytique. Dans un deuxième temps, nous exposons les résultats de l'amélioration de la production cellulolytique. Aussi, nous montrons les résultats de la purification d'enzyme étudiée.

I. Mise en évidence de l'activité cellulotique

la souche Y1 est incubée sur YPCA contenant CMC comme seule source de carbone. Après incubation à 28°C pendant 2 jours, la souche a montré sa capacité de dégrader la cellulose après addition du rouge Congo et lavage avec une solution de NaCl 5N, la souche montre un halo d'hydrolyse autour des colonies (figure 19). Ce test prouve que la souche Y1 est une levure cellulolytique.

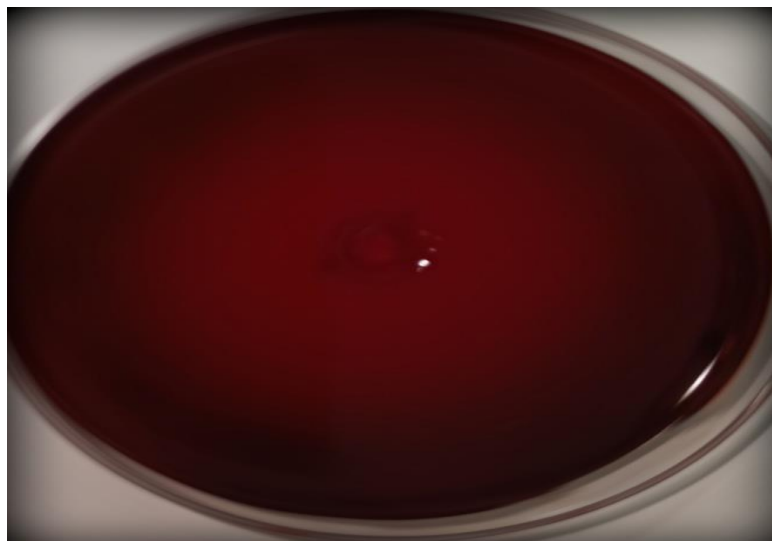


Figure 19 : Mise en évidence de l'activité cellulosique de la souche Y1 sur milieu YPCA

II. Identification de la souche levurienne

Après 48 h, on marque les résultats sur la fiche de résultat (figure 20).

D'après la figure 20 la levure Y1 a un code de **5775675726**, le catalogue de la galerie API 32C indique que ce code correspond à la levure *candida sp.*

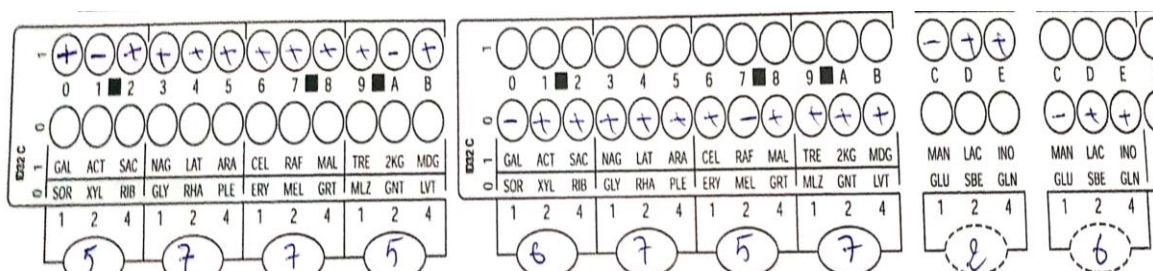


Figure 20 : lecture de la galerie API 32 C après 48 h

III. Etude de la production de la cellulase

III.1. Sélection des meilleures sources de carbone

La sélection des sources lignocellulosiques pour la production d'enzymes est l'une des étapes les plus importantes dans les processus de fermentation microbienne. Il est essentiel de rendre le procédé économiquement viable. Beaucoup de travaux rapportent la production de lignocellulases à partir de matières lignocellulosiques.

Plusieurs substrats lignocellulosiques, comme la paille de blé, la bagasse, les boues de papier résiduaire, les déchets de papier journal et le bois de tremble ont été utilisés comme principale composante des milieux de production d'enzymes. Cependant, les recherches sur le son de blé comme ressource de carbone pour la production de cellulase sont peu nombreuses (Shu *et al.*, 2011)

Dans ce travail, différents résidus agricoles sont utilisés comme substrat lignocellulosique à savoir : son de blé (SB), papier (P), grignons d'Olive (GO) et la paille de blé (Pb).

Pour la production de complexes enzymatiques, les substrats lignocellulosique ont été utilisés directement, sans prétraitement comme substrat ou la fermentation solide et comme milieu pour le fermentation liquide. La possibilité d'évité le prétraitement des substrats est important car elle entraîne des coûts supplémentaires dans les procédés industriels. Il est important de mentionner que la composition de la lignocellulose peut varier et donc affecter leur accessibilité

à la levure pour la production d'enzymes. Ceci, à son tour, pourrait affecter la production du complexe enzymatique. Malgré cela, la levure a toujours montré la capacité d'utiliser les autres substrats pour produire le complexe enzymatique requis. Par exemple canne de maïs (consistant en épi de maïs ou en enveloppe de maïs) (Davison *et al.*, 2019), et selon Différents échantillons de biomasse végétale, tels que Sarkanda (*Saccharum spontaneus*), Kallar grass (*Leptochloa fusca*), et Cotton Stalks (*Gossypium hirsutum*) ont été évalués pour déterminer leur potentiel en tant que substrats ou sources de carbone pour la production de cellulase enzymatique (Waseem *et al.*, 2014).

III.1.1. Activité endoglucanase

L'évaluation de différents substrats pour la production de l'endoglucanase par fermentation solide a montré que le son de blé était le substrat le plus efficace pour la production de cellulase, avec une activité enzymatique de 6.54 ± 0.2 UI/g, suivi de PB 4.69 ± 0.12 UI/g, GO et P avec une activité enzymatique 1.81 ± 0.22 UI/g et 0.88 ± 0.19 UI/g respectivement.

Dans le cas de la FML, la meilleur activité CMCCase est 5.19 ± 0.23 UI/g sur le SB, suivi par PB, GO et P avec une activité enzymatique 4.94 ± 0.28 UI/g, 4.64 ± 0.27 UI/g et 4.18 ± 0.25 UI/g respectivement.

Les résultats révèlent que la production de CMCCase est plus élevée en FMS qu'en FML dans le cas de la fermentation sur milieu à base de son de blé, Par ailleurs l'activité est plus élevée en FML sur paille de blé, grainon d'olive et papier qu'en FMS, comme indiqué dans la figure 21.

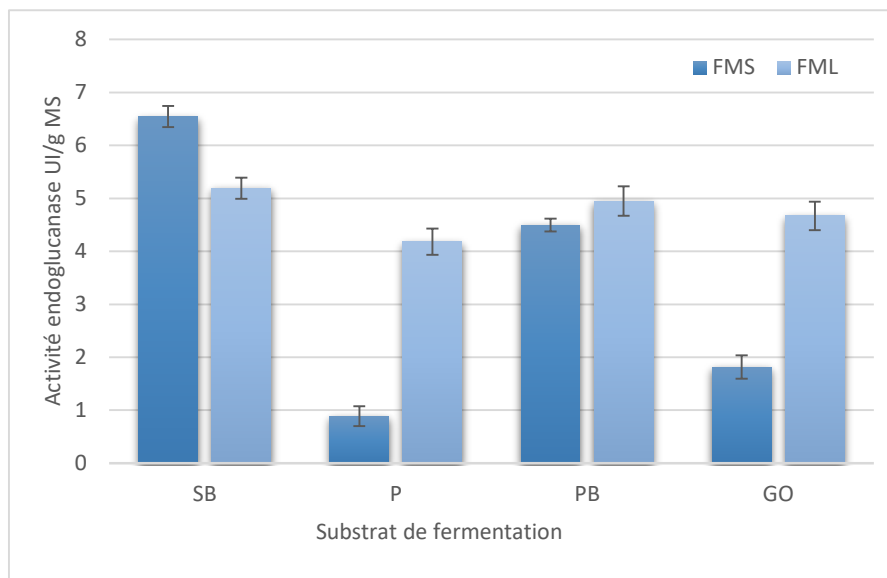


Figure 21 : Évaluation de différents substrats lignocellulosique pour la production de l'activité endoglucanase sous fermentation solide et liquide

III.1.2. Activité papier filtre (APF)

L'activités de cellulase totale (APF) produit par FMS la plus élevée a été enregistrée avec le paille de blé 17.01 ± 0.8 UI/g suivi par le SB 14.03 ± 0.82 UI/g, GO 8.14 ± 0.1 UI/g et papier 1.34 ± 0.25 UI/g

Concernant la FML, la meilleure production a été obtenu avec le son de blé 10.96 ± 0.8 UI/g, par la suit papier 8.92 ± 0.2 UI/g, PB 8.84 ± 0.4 UI/g, et grainions d'olive 5.99 ± 0.7 UI/g.

Les résultats (figure 22) obtenus indiquent clairement que l'APF est plus élevée en FMS qu'en FML concernant la fermentions sur PB, SB et papier, et en contraire l'activité est plus élevée en FML qu'en FMS dans le cas de substrat de grainions d'olive

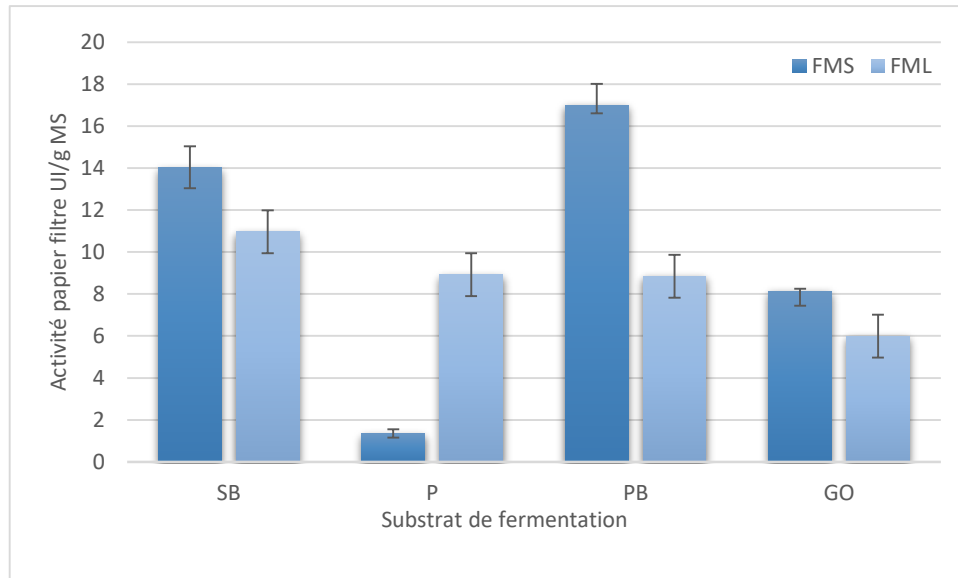


Figure 22 : Évaluation de différents substrats lignocellulosique pour la production de l'activité de cellulase totale sous fermentation solide et liquide

En conclusion, cette étude a comparé les capacités de production des enzymes CMCCase et APF des différentes biomasses lignocellulosique, Et prouvé que les FMS présentent une plus grande efficacité en lignocellulose Saccharification,

selon Kumar *et al.*, (2011) La production plus élevée d'enzymes dans la FMS peut être due au fait que la FMS se produit en l'absence ou presque d'eau libre, étant ainsi proche du milieu naturel auquel les micro-organismes sont adaptés.

La FMS est une méthode intéressante pour la production de produits à valeur ajoutée utilisant des résidus agricoles peu coûteux (Amadi *et al.*, 2020).

Abdullah *et al.* (2018) mentionné que la FMS peut être utilisé comme un autre moyen de produire une forte concentration de cellulase et de réduire le coût de production d'enzymes. De plus, les autres avantages de la FMS comprennent une productivité supérieure, une technique simple, un faible investissement en capital, un faible besoin en énergie et une teneur en eau moindre.

Le meilleur rendement de la cellulase dans des conditions de la FMS, pour l'activité CMCCase étaient de 6.54 UI/g \pm 0.2 par fermentation à base de son de blé,

ces résultats corroborent ceux de Tanveer *et al.*, (2015) qui ont trouvé que le son de blé s'est avéré être le meilleur substrat et bon marché pour la production de l'endoglucanase, utilisant différentes souches d'espèces de *Trichoderma sp.*

Les travaux de Vu *et al.*, (2011) ont montré que le son de blé a entraîné la production très élevée de la cellulase fongique par fermentation à l'état solide sur différents substrat à savoir le son de blé et il s'est révélé le son de blé est le meilleur avec une activité cellulosique de 19,2 U/g, alors que d'autres milieux solides, comme l'écorce, ne l'ont pas fait.

Selon Mahalakshmi & Jayalakshmi, (2016) le son de blé se caractérise par une meilleure circulation de l'air, une liaison lâche et un faible coût, il représente donc, une meilleure perspective économique dans les processus de fermentation.

D'après les résultats, l'activité APF est meilleure 17.01 ± 0.8 UI/g dans la production sur paille de blé.

Par ailleurs la production de cellulases APF et CMCase chez *Bjerkandera sp* a été meilleure en présence de son de blé que la paille de blé (Benkerrou & Hamaili, 2012).

Cette différence est peut-être due à la différence des éléments constitutifs de base des deux substrats car la composition varie selon l'espèce végétale considérée (Tableaux 2 et 3), l'âge de la plante et la nature des tissus végétaux. Lors de la formation de ces tissus, c'est à dire lors de la polymérisation, les réactions secondaires entraînent la liaison entre la lignine et les hémicelluloses, ces matrices associatives entourent les fibres de cellulose pour former une barrière physique qui protégerait la cellulose de l'attaque enzymatique (Benkerrou & Hamaili, 2012)

IV. Optimisation des conditions de cultures pour la production des cellulases

Dans le but d'améliorer la production enzymatique d'endoglucanase et l'activité papier (APF), nous avons étudié d'une part l'amélioration du milieu de production ainsi que certains facteurs influençant la production, la substrat de fermentation est le son de blé et la paille de blé car ils ont montré une meilleure production cellulosique et d'autre part nous avons tenté l'optimisation d'une part par la méthode un facteur à la fois (OFAT) (en anglais one factor at time) et d'autre part les plans d'expériences

IV.1. Optimisation des conditions de culture pour la production de cellulase par la méthode OFAT

La méthode OFAT a été utilisée pour étudier l'effet de CMC, de source d'azote organique, et inorganiques et de sels minéraux sur la production cellulolytique.

Toutes les expériences sont effectuées dans les mêmes conditions en variant chaque fois un seul facteur et tous les autres facteurs ont été maintenus constants, à savoir la période d'incubation (48 h), la température (30°C), le taux d'inoculum (4×10^6 cellules), la quantité de substrat (5 g) et l'humidité (60%).

IV.1.1. Effet de la CMC sur la production de cellulase

La source de carbone est un des facteurs importants qui affectent la production enzymatique, en particulier lorsqu'elle joue le rôle d'inducteur d'enzyme. Le carboxyméthyl cellulose est le substrat classique de la cellulase ainsi son indicateur (Oetari *et al.*, 2018).

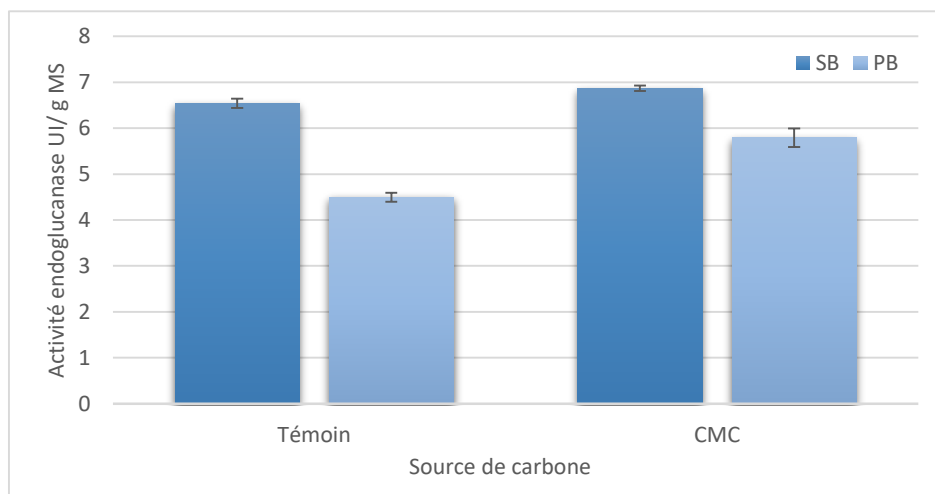


Figure 23 : Effet du carboxyméthyl cellulose sur la production de l'activité CMCCase

D'après les résultats de la figure 23 l'ajout 0.5% de carboxyméthyl cellulose a augmenté la production CMCCase de 5.53 % et de 28.95 % sur le son de blé et sur la paille de blé respectivement.

La figure 24 indique que l'APF est meilleur sur la paille de blé de 19.21 ± 0.28 UI/g, alors que sur le SB est 16.95 ± 0.5 UI/g.

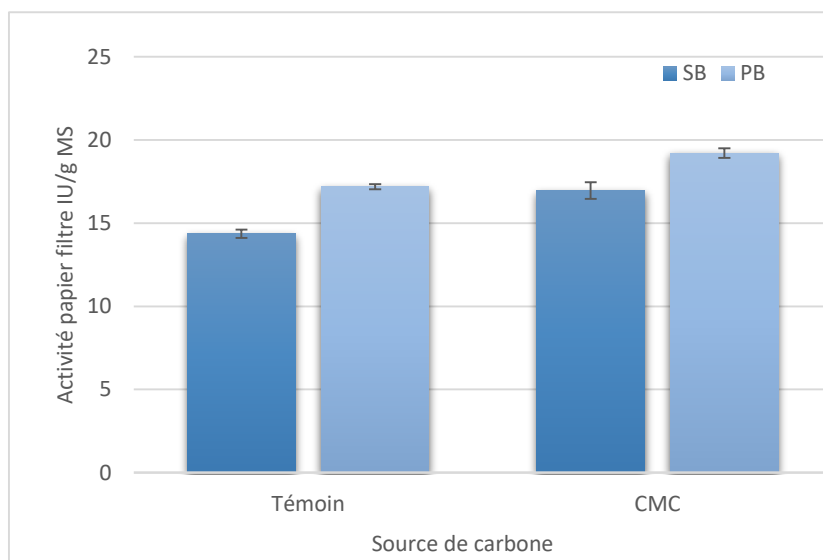


Figure 24: Effet du carboxyméthyle cellulose sur la production de l'APF

L'activité endoglucanase et l'activité de cellulase totale la plus élevée ont été enregistrées avec la paille de blé 5.79 ± 0.06 UI/g, 23.91 ± 0.28 UI/g respectivement, alors que dans le milieu à base de son de blé 6.86 ± 0.06 UI/g de CMC et 16.95 ± 0.5 UI/g d'APF.

Le CMC s'est révélé être un puissant inducteur des enzymes cellulases. D'où l'obtention des plus hauts rendements de cellulases sur CMC. Il a également été constaté que le CMC est le substrat préféré pour la production d'endoglucanase (Lucas *et al.*, 2001).

Selon Gautam *et al.*, (2011) le CMC est la seconde meilleure source de carbone (1,0 %) pour la production de cellulase par *A. niger*.

Alotaibi & Khan, (2016) rapportent dans leurs études de l'effet de différentes concentrations (1%, 2%, 3% et 4% (W/V)) du carboxyméthylcellulose sur l'activité enzymatique d'*Aspergillus fumigatus* que l'activité enzymatique la plus élevée est obtenue en présence de CMC à 3 % CMC.

Il a été trouvé aussi que chez la souche *Bacillus sp. Hcb-21* l'optimum de l'activité a été obtenu à 1.4% de CMC avec une activité spécifique maximale de $12,79 \pm 0,47$ U/mg, mais par la suite, une diminution de l'activité a été enregistrée avec l'augmentation de la concentration de CMC (Bhatia *et al.*, 2017)

IV.1.2. Effet des sources d'azotes organiques et inorganiques sur la production de cellulase

Comme la source de carbone, la source d'azote est un facteur très important dans le milieu pour la croissance microbienne et aussi pour la production d'enzymes. Il est connu que les proportions relatives des sources de carbone et d'azote doivent être bien ajustées pour avoir une bonne croissance et une production maximale d'enzymes (Haberra, 2014).

Différentes sources d'azotes organiques (uree, extrait de levure, peptone et corn steep liquor) et inorganiques (chlorure d'ammonium, sulfate d'ammonium et nitrate de sodium) ont été testées à une concentration de 0.5%, les résultats sont présentés dans les figures 25 et 26.

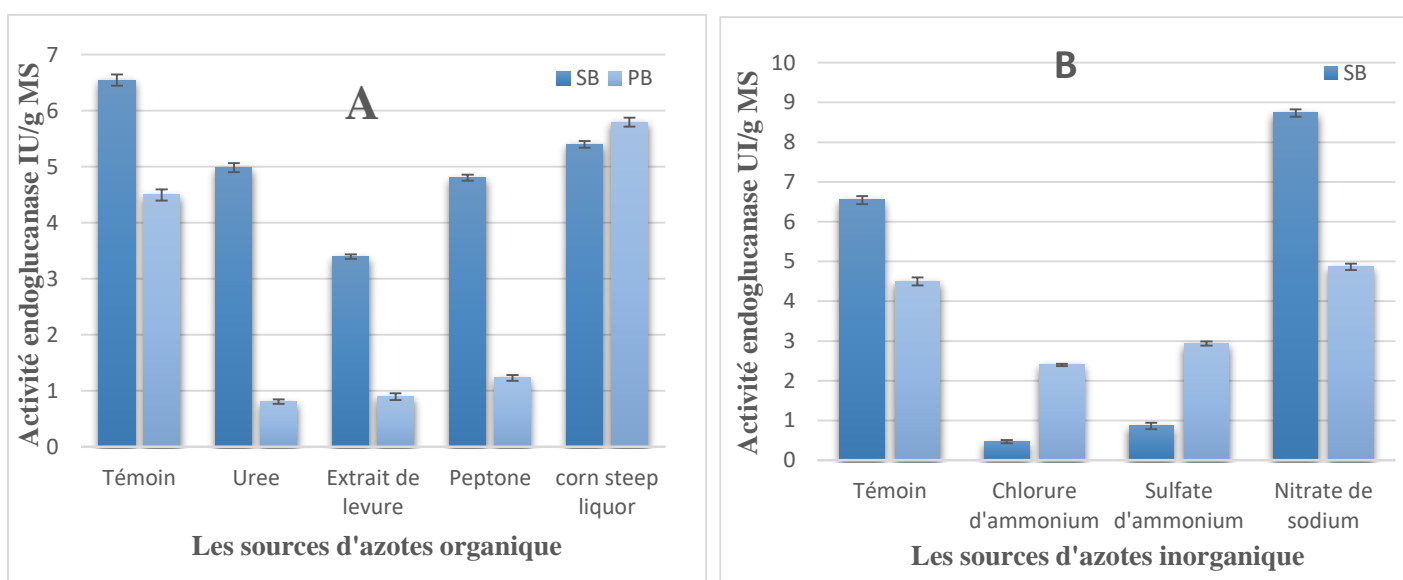


Figure 25 : Effet des sources d'azotes sur la production de l'activité CMCase

A : Effet des sources d'azote organique.

B : Effet des sources d'azote inorganique.

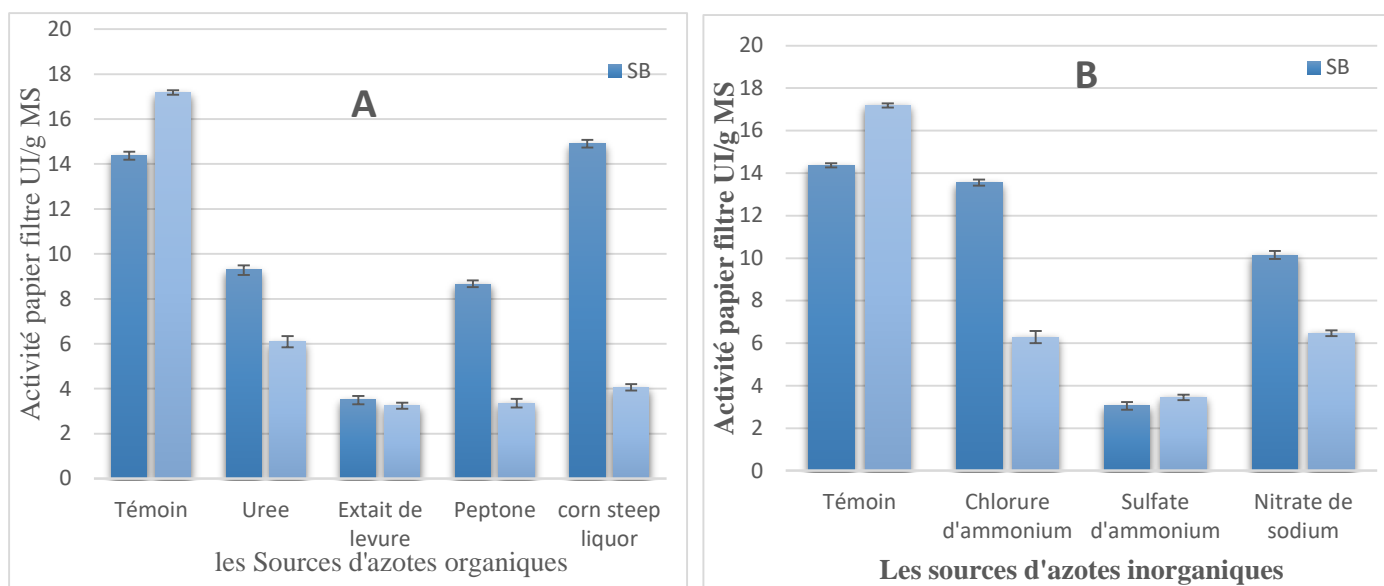


Figure 26 : Effet des sources d'azotes sur la production de l'APF

A : Effet des sources d'azote organique.

B : Effet des sources d'azote inorganique

Il ressort de ces résultats que :

Parmi les sources azotées étudiées, seulement le corne steep liquor et les nitrate de sodium augmentent la production d'endoglucanase dans le milieu à base de paille de blé avec des activités respectivement de 4.86 ± 0.15 UI/g, 5.79 ± 0.14 UI/g, Alors que l'activité CMC maximal est de 8.73 ± 0.09 UI/g dans le milieu à base de son de blé en présence de NaNO_3 .

Alors que l'APF augmenté en présence de corn steep dans le milieu à base de son de blé 14.89 UI/g.

Cependant les autres sources d'azote ne semblent pas améliorer la production des enzymes endoglucanase et APF.

L'activité CMC dans le milieu à base de son diminué avec urée, extrait de levure, peptone, corn steep liquor, chlorure d'ammonium et sulfate d'ammonium avec des activités 4.9 ± 0.08 UI/g, 3.39 ± 0.04 UI/g, 4.8 ± 0.2 UI/g, 5.39 ± 0.06 UI/g, 0.46 ± 0.04 UI/g et 0.86 ± 0.08 UI/g, respectivement, et dans le milieu à base de paille de blé en présence de urée, extrait de levure,

peptone, chlorure d'ammonium et sulfate d'ammonium avec des activités respectivement 0.80 ± 0.06 UI/g, 0.88 ± 0.04 UI/g, 1.22 ± 0.05 UI/g, 2.39 ± 0.027 UI/g et 2.93 ± 0.05 UI/g.

Par ailleurs, APF diminué avec urée 9.30 ± 0.25 UI/g, extrait de levure 3.50 ± 0.19 UI/g, peptone 8.64 ± 0.125 UI/g, chlorure d'ammonium 13.55 ± 0.15 UI/g, sulfate d'ammonium 3.05 ± 0.18 UI/g et nitrate de sodium 10.14 ± 0.19 UI/g dans le milieu à base de son de blé, et en présence de urée 6.08 ± 0.25 UI/g, extrait de levure 3.24 ± 0.14 UI/g, peptone 3.36 ± 0.125 UI/g, corn steep liquor 4.06 ± 0.17 UI/g, chlorure d'ammonium 6.29 ± 0.15 UI/g, sulfate d'ammonium 3.45 ± 0.13 UI/g et nitrate de sodium 6.46 ± 0.14 UI/g dans le milieu à base de paille de blé.

Selon Amirul *et al.*, (1996), l'azote peut être un facteur limitant. Il doit être fourni à des doses adéquates, sous forme inorganique et complexe pour avoir un effet stimulateur.

Le remplacement d'une source d'azote par une autre dans le milieu entraîne un changement dans la synthèse des protéines ainsi que la formation du produit (Ghori *et al.*, 2011). Ces composés stimulent non seulement la croissance et la reproduction fongiques, mais ont également une certaine influence sur la production des enzymes et d'autres métabolites (Kalsoom *et al.*, 2019)

Selon Sylvania & Erica, (2015), le corn steep liquor est une source d'acides aminés, de vitamines et d'ions métalliques et a donc été utilisée dans le milieu de culture au lieu d'extraits de levure de viande, qui sont des sources d'azote comparativement plus coûteuses.

Loureiro *et al.*, (2018), montrent que corn steep liquor a montré un effet négatif sur l'activité du papier filtre chez la souche *Gelatoporia subvermispora* cultivé en milieu à base de bagasse de canne à sucre, de boues d'épuration et de paille de riz).

Cependant les travaux de Rajoka, (2004), révèle que NaNO_3 , KNO_3 et NH_4NO_3 étaient les meilleures sources d'azotes pour la production de cellulase chez *Cellulomonas flavigena*.

Selon Kalsoom *et al.*, (2019) les composés inorganiques ont stimulé des rendements de cellulase plus élevés que les composés organiques. Cela peut être dû au mode d'action rapide des composés inorganiques

Il a été indiqué que l'urée est la meilleur sources d'azote pour la production de cellulase chez *Achromobacter xylosoxidans* (Mahalakshmi & Jayalakshmi, 2016), d'autre recherche révèlent que parmi les sources d'azote inorganique étudiées, le sulfate d'ammonium a donné la production maximale de cellulase chez *candida sp.* (Priyanka Rai, Soni Tiwari, 2012).alors que

chez la souche *Trichodema reesei* HY07 l'activité enzymatique (APF et CMCCase) a diminué en présence de 2.5% de sulfat d'ammonium.

IV.1.3. Effet des sels minéraux sur la production de cellulase

Les sels minéraux sont non seulement importants pour la croissance de micro-organismes, ils le sont également pour la production d'enzymes et leur activité (Dakhmouche, 2016).

Parmi les sels minéraux testés, la quantité maximale de production d'enzyme endoglucanase a été enregistrée en présence de $MgSO_4$ dans le milieu à base de son de blé 19.91 ± 0.3 UI/g, suivi par $ZnSO_4$ et $CaCl_2$ 11.10 ± 0.91 UI/g, 12.18 ± 0.89 UI/g respectivement

Et dans le milieu à base de paille de blé une augmentation d'activité a été obtenue en présence de $MgSO_4$ 5.00 ± 0.15 UI/g et $CaCl_2$ 4.76 ± 0.07 UI/g. Cependant, la quantité minimale de production de CMCCase a été induite par $ZnSO_4$ (figure 27)

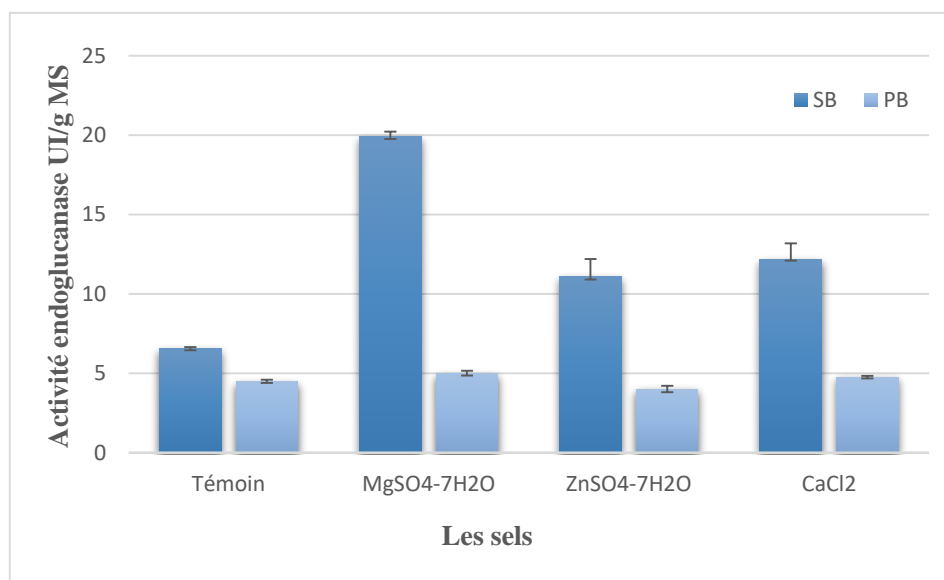


Figure 27 : Effet des sels sur la production d'enzyme CMCCase

Alors que la meilleure production d'APF a été obtenu avec la paille de blé en présence de $CaCl_2$ (18.15 UI/g) suivi par $MgSO_4$ (17.64 UI/g).

Et dans le milieu à base de SB la production a augmenté en présences de $MgSO_4$ (16.25 UI/g) et $ZnSO_4$ (15.65 UI/g).

Par ailleurs, l'activité diminue avec le CaCl_2 dans le milieu à base de son de blé, et avec ZnSO_4 dans le milieu à base de paille de blé (figure 28).

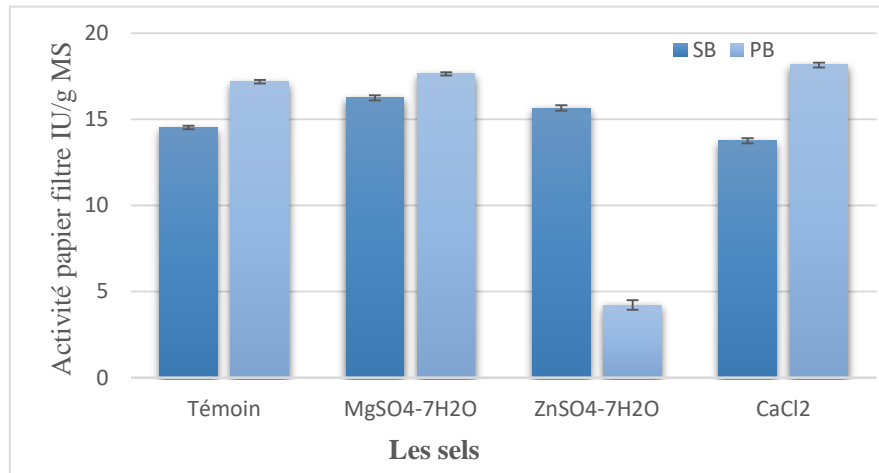


Figure 28 : Effet des sels sur la production de l'APF

Les résultats obtenus se rapprochent de ceux observés chez l'espèce *Aspergillus sp* dont l'optimum d'activité CMC_{ase} est de 43 UI/g est obtenue avec MgCl_2 (Van *et al.*, 2011).

Selon Sylvania & Erica, (2015), la présence de chlorure de sodium et la sulfate de magnésium dans le milieu jouent un rôle important dans la croissance cellulaire initiale

Alors que, les travaux de Shajahan *et al.*, (2017) révèlent que l'activité la plus élevée de cellulase 13,10 UI/mL est obtenue avec $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, et rapportent que l'ion métallique sous forme de sel tel que $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, protège certaines enzymes contre la dénaturation thermique et joue un rôle important pour stabiliser les formes indigènes à des températures élevées.

Les travaux de (Yaiche & Aidouni, 2018), ont montré que le calcium est nécessaire au maintien de la conformation de l'enzyme et à son activité, aussi le chlore et le zinc jouent le rôle de cofacteurs de l'enzyme.

IV.2. Optimisation des conditions de culture pour la production de cellulase par la méthode statistique :

IV.2.1. Optimisation de la production des enzymes selon le plan statistique de Plackett et Burman

L'effet des facteurs étudiés selon le plan de Plackett et Burman a permis d'évaluer l'activité globale papier filtre et l'activité endoglucanase de son de blé et paille de blé. L'ensemble des résultats est récapitulé dans le tableau 11.

Tableau 11 : Activités enzymatiques selon le plan de Plackett et Burman.

Expériences	Facteurs											Activité			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	APF /PB (U/g)	CMCase /SB (U/g)	APF /SB (U/g)	CMCase /PB(U/g)
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	7,5976	6,06562	12.5480	14,1260
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	3,9659	1,79177	1,8936	3,5675
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	0,8957	3,91796	1,7837	0,9502
4	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	3,9706	2,41289	1,4395	5,3513
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	5,7966	7,64546	6,3728	27,1800
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	15,0135	5,74345	7,8047	13,8080
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	2,0103	9,92300	9,3415	22,2374
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	0,1495	0,19090	0,8664	4,0595
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	6,5267	4,86444	7,1437	3,9916
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	5,9836	0,45446	7,4517	9,3281
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	4,9227	2,91082	1,9829	4,7164
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	7,9746	2,01173	3,5964	4,9400

L'activité papier filtre (APF) varie de 0.1495 U/g à 15,0135 U/g (Tableau 11). La plus faible activité à l'essai n° 8 où le milieu de 72h est dépourvu de CMC, avec PB en présence de température élevé, pH alcalin et une longue incubation. Par contre, l'activité la plus importante est enregistrée dans l'essai n°6 où le milieu de production contient du PB, une température modérée, et un pH acide.

L'activité endoglucanase varie de 0,19090 U/g ,18 U/g. Le plus faible rendement est obtenu dans l'essai 8 qui comporte le milieu SB avec un PH alcalin et dépourvue de CMC, l'activité la plus importante est obtenue par l'essai 5 où le milieu de culture est enrichi de CMC, le ph est acide et le milieu de production est basé de PB.

- **L'analyse des résultats**

En a mesurer l'effet de chaque facteur par le calcul du coefficient de corrélation et son niveau de signification sur chaque réponse par la mesure de la probabilité (P) : Le principe d'exploitation consiste à calculer les coefficients du modèle polynomial, plus sa valeur absolue est élevée, plus le terme correspondant a une influence importante sur la réponse étudiée. S'il est faible, il a peu ou pas d'effet. S'il est négatif, dans ce cas l'augmentation de la valeur du facteur exerce une diminution de la réponse. La signification statistique est déterminée grâce au test de la probabilité (P) :

* $P < 0,05$: le résultat est significatif, donc le facteur est retenu.

* $P > 0,05$: le résultat est non significatif, donc le facteur ne présente pas un effet important sur la réponse ce qui l'exclue de l'étude.

- **Effet des facteurs sur la production L'APF**

Pour le PB toute fois la variation de la quantité de substrat de 5 à 10g a un effet significatif positif sur la production. La variation du temps d'incubation de 48 à 72h et de la température de 30 à 50°C entraine un effet significatif négatif sur la production de l'enzyme Cela indique l'excès de leur valeur et donc le nécessite de diminuer pour l'augmentation de l'activité.

Pour le SB la quantité de déchet est le facteur significatif avec un effet positif

- **Effet des facteurs testés sur la production de l'endoglucanase**

Pour PB et le SB la quantité de déchet a un effet significatif positif, la variation du pH de 4 à 8 a un effet négatif et de l'humidité de 20 à 80% entraine un effet significatif positif sur la production de l'enzyme.

L'analyse statistique (Tableau 12) de SB montre que la production de l'activité endoglucanase est expliquée de façon significative par quantité de déchet ($p = 0.006$), pH ($p = 0.015$), et l'humidité ($p = 0.028$) et pour PB L'analyse statistique montre que la production de l'activité endoglucanase est expliquée de façon significative par quantité de déchet ($p = 0.003$), l'humidité ($p = 0.017$) et pH ($p = 0.030$).

L'analyse statistique (Tableau 13) la production de l'activité papier filtre de PB est expliquée de façon significative par temps d'incubation ($p = 0.010$), quantité de déchet ($p = 0.024$), et

température ($p=0.026$) et pour SB la production de l'activité endoglucanase est expliquée de façon significative par quantité de déchet ($p=0.006$).

Tableau 12 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de l'endoglucanase SB et PB.

Terme	coeff		Coef ErT		Valeur de T		Valeur de P	
	SB	PB	SB	PB	SB	PB	SB	PB
Constante	3.994	9.521	0.337	0.842	11.85	11.31	0	0
A (température)	0.651	-1.174	0.337	0.842	1.93	-1.40	1.126	0.235
B (pH)	-1.364	-2.784	0.337	0.842	-4.05	-3.31	0.015	0.030
C (CMC)	-0.410	-1.475	0.337	0.842	-1.22	-1.75	0.290	0.155
D (l'humidité)	1.131	3.342	0.337	0.842	3.35	3.97	0.028	0.017
E (taux d'ensemencement)	0.781	-1.204	0.337	0.842	2.32	-1.43	0.081	0.226
F (temps d'incubation)	0.096	1.996	0.337	0.842	0.29	2.37	0.789	0.077
G (quantité de substrat)	1.788	5.591	0.337	0.842	5.31	6.64	0.006	0.003

Tableau 13 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production l'activité papier filtre (APF) PB et SB.

Terme	coeff		Coef ErT		Valeur de T		Valeur de P	
	SB	PB	SB	PB	SB	PB	SB	PB
Déchet	5.185	5.401	0.610	0.497	8.50	10.87	0.001	0
Constante	5.185	5.401	0.610	0.497	8.50	10.87	0.001	0
A(température)	0.426	-1.717	0.610	0.497	0.70	-3.45	0.524	0.026
B(pH)	0.038	-0.702	0.610	0.497	0.06	-1.41	0.953	0.231
C(CMC)	0.316	0.997	0.610	0.497	0.52	2.01	0.631	0.115
D(l'humidité)	0.411	-0.690	0.610	0.497	0.67	-1.39	0.537	0.237
E(taux d'ensemencement)	-0.284	-0.003	0.610	0.497	-0.47	-0.01	0.665	0.995
F(temps d'incubation)	-0.643	-2.266	0.610	0.497	-1.05	-4.56	0.351	0.010
G (quantité de substrat)	3.258	1.754	0.610	0.497	5.34	3.53	0.006	0.024

Les facteurs CMC et taux d'ensemencement n'ont aucun effet significatif sur l'activité papier filtre ou l'activité endoglucanase.

- **Expression des résultats**

Les résultats des activités cellulolytiques peuvent être présentés par une équation polynomiale du premier degré ayant la forme suivante :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 C_1 + \beta_2 C_2 + \beta_3 C_3 + \beta_4 C_4 + \beta_5 C_5 + \beta_6 C_6 + \beta_7 C_7$$

Pour Activité papier filtre (APF) PB

$$Y = 5,401 - 1,717 C_1 - 0,702 C_2 + 0,997 C_4 - 0,690 C_5 - 0,003 C_7 - 2,266 C_8 + 1,754 C_{10}$$

L'équation réduite :

$$Y = 5,401 - 1,717 \text{ température} - 0,702 \text{ pH} + 0,997 \text{ CMC} - 0,690 \text{ humidité} - 0,003 \text{ taux d'ensemencement} - 2,266 \text{ temps d'incubation} + 1,754 \text{ quantité de substrat}$$

Pour Activité papier filtre (APF) SB

$$Y = 5,185 + 0,426 C_1 + 0,038 C_2 + 0,316 C_4 + 0,411 C_5 - 0,284 C_7 - 0,643 C_8 + 3,258 C_{10}$$

L'équation réduite :

$$Y = 5,185 + 0,426 \text{ température} + 0,038 \text{ pH} + 0,316 \text{ CMC} + 0,411 \text{ humidité} - 0,284 \text{ taux d'ensemencement} - 0,643 \text{ temps d'incubation} + 3,258 \text{ quantité de substrat}$$

Pour l'activité endoglucanase PB

$$Y = 9,521 - 1,174 C_1 - 2,784 C_2 - 1,475 C_4 + 3,342 C_5 - 1,204 C_7 + 1,996 C_8 + 5,591 C_{10}$$

L'équation réduite :

$$Y = 9,521 - 1,174 \text{ température} - 2,784 \text{ pH} - 1,475 \text{ CMC} + 3,342 \text{ humidité} - 1,204 \text{ taux d'ensemencement} + 1,996 \text{ temps d'incubation} + 5,591 \text{ quantité de substrat}$$

Pour l'activité endoglucanase SB

$$Y = 3,994 + 0,651 C1 - 1,364 C2 - 0,410 C4 + 1,131 C5 + 0,781 C7 + 0,096 C8 + 1,788 C10$$

L'équation réduite :

$$Y = 3,994 + 0,651 \text{ température} - 1,364 \text{ pH} - 0,410 \text{ CMC} + 1,131 \text{ humidité} + 0,781 \text{ taux d'ensemencement} + 0,096 \text{ temps d'incubation} + 1,788 \text{ quantité de substrat}$$

L'analyse statistique indique des coefficients de détermination de $R^2 = 93\%$ pour (APF) PB, $R^2 = 88.60\%$ pour (APF) SB, $R^2 = 95.43\%$ pour Activité endoglucanase PB et $R^2 = 94.32\%$ pour Activité endoglucanase SB. Cela signifie que 93%, 88%, 95%, 94% de la variation de la production de cellulase avec (APF) PB, (APF) SB, Activité endoglucanase PB, Activité endoglucanase SB peuvent être expliquées par les sept variables étudiées. Selon Vimal et al., 2015, le coefficient de détermination est une mesure globale pour la qualité du modèle. Les R^2 prédits pour les deux déchets avec les deux méthodes de dosage de l'enzyme cellulase concordent avec les R^2 ajustés indiquant un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites pour la production de cellulase (Bari *et al.* 2009).

- **Conclusion**

Cependant, dans l'activité enzymatique cellulolytique l'endoglucanase joue un rôle prépondérant dans l'initiation et le maintien du processus hydrolytique il clive de manière aléatoire le polymère cellulosique en sucres plus petits et en polysaccharides oligomères, à cause de sa cristallinité, son complexe avec la lignine et les autres composés qui lui sont associés, il donne aussi une activité plus élevée que les autres méthodes de dosages, la caractérisation et la quantification de l'activité endoglucanase est importante pour l'industrie et dans l'étude globale de la dégradation de cellulose. Le dosage d'endoglucanase peut indiquer si l'enzyme est présente, sa quantité et son activité. (Shafiqur Rahman *et al.* 2018), (Arunik *et al.*, 1988).

L'analyse statistique des résultats de ce plan et la modélisation selon une régression linéaire multiple ont permis de sélectionner ayant un effet significatif positif ou négatif sur l'activité endoglucanase (avec SB et PB) a savoir quantité de déchet , pH et l'humidité et sur l'APF avec PB tels que le temps d'incubation ; la quantité de déchet et la température et avec le son de blé, la quantité de substrat.

Les niveaux de trois variables indépendantes :pH , humidité et quantité de substrat, sélectionnées par le plan de Plackett et Burman, sont optimisés par le plan composite centré (CCD) en combinaison avec la méthodologie de surface de réponse (RSM).

IV.2.2. Optimisation par plan composite central (CCD) et la méthode de surface de Réponse (RSM)

La méthode de surface de réponse (RSM) est maintenant considéré comme une approche statistique standard pour concevoir des expériences, construire des modèles, évaluer les effets de nombreux facteurs et déterminé leur optimales pour les réponses souhaitables et réduire le nombre d'expériences. Dans les processus biologiques, en particulier dans la production d'enzymes, RSM a été adopté pour optimiser la croissance des micro-organismes et la production d'enzymes (Sudha *et al.*, 2020). Dans la présente étude, nous avons utilisé le plan statistique de Box et wilson le CCD (Central Composite Design), cette méthode implique l'ajustement d'une surface quadratique pour optimiser les paramètres importants. L'analyse statistique des données à l'aide de l'analyse de régression permet d'étudier l'interaction entre les différents facteurs et la variable réponse (Pachauri *et al.*, 2016), Le CCD est utilisé pour étudier l'interaction entre les facteurs sélectionnés précédemment, par le plan de Plackett et Burman à savoir le pH, humidité et la quantité de substrar, et aussi pour déterminer leur optime optimal. Les résultats des expériences de l'optimisation sont analysés en utilisant le logiciel Minitab 19, le plan expérimentale ainsi que l'activité endoglucanase sont montré dans le tableau 14.

D'après les activités endoglucanase obtenues (tableau 6) on remarque que la production de CMC₅ varie de 1.92 UI/g à 17.78 UI/g. La plus faible activité correspond à l'essai n° 11 où le milieu compose de 8g de son de blé et 5.72 ml tampon pH 5 par erlen de 250 ml.

Par contre, l'activité la plus importante est enregistrée dans l'essai n° 14 où le milieu de production est supplémenté en 10.52g de son de blé et 8.41 ml tampon pH 5.

Tableau 12 : Valeurs expérimentales (observées) de l'activité endoglucanase par le CCD

N° d'essai	Niveaux des facteurs			Activité endoglucanase (UI/g)
	X1	X2	X3	
1	-1	-1	-1	2.7030
2	+1	-1	-1	3.4052
3	-1	+1	-1	9.1400
4	+1	+1	-1	5.8198
5	-1	-1	+1	8.8876
6	+1	-1	+1	9.3310
7	-1	+1	+1	10.0540
8	+1	+1	+1	8.6687
9	-1.682	0	0	5.4315
10	+1.682	0	0	2.5408
11	0	-1.682	0	1.9279
12	0	+1.682	0	3.0500
13	0	0	-1.682	9.1000
14	0	0	+1.682	17.7860
15	0	0	0	3.1100
16	0	0	0	3.0900
17	0	0	0	2.9838
18	0	0	0	2.9800
19	0	0	0	3.0811
20	0	0	0	3.6570

Les valeurs P sont utilisées comme un outil pour vérifier la signification de chacun des coefficients qui, à leur tour, sont nécessaires pour comprendre le modèle des interactions mutuelles entre les meilleures variables. Les valeurs de p, inférieures à 0,05, indiquent que les coefficients sont significatifs. Plus l'amplitude de la valeur du test- t est grande et plus la valeur de p tend vers 0 indique la signification du coefficient correspondant. Et les variables ayant des coefficients négligeables ont été omis.

Le tableau 15 récapitule les coefficients significatifs du polynôme de second degré de l'activité endoglucanase déterminés par le test de Student (t) et (p) valeur.

Tableau 13 : Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité endoglucanase.

Terme	Coeff	Coef ErT	Valeur de T	Valeur de p	FIV
Constante	3,137	0,303	10,36	0,000	
C1	-1,037	0,338	-3,07	0,012	1,00
C2	1,385	0,338	4,10	0,002	1,00
C3	3,754	0,338	11,11	0,000	1,00
C1*C1	1,075	0,553	1,94	0,081	1,02
C2*C2	-0,422	0,553	-0,76	0,463	1,02
C3*C3	10,532	0,553	19,05	0,000	1,02
C1*C2	-2,069	0,742	-2,79	0,019	1,00
C1*C3	0,593	0,742	0,80	0,443	1,00
C2*C3	-2,952	0,742	-3,98	0,003	1,00

La relation entre la réponse activité endoglucanase et les variables expérimentales obtenues par l'application du RSM est représentée mathématiquement par l'équation de régression suivante

$$\text{Activité endoglucanase} = 3,137 - 0,617 C1 + 0,823 C2 + 2,232 C3 + 0,380 C1 \times C1 - 0,149 C2 \times C2 + 3,723 C3 \times C3 - 0,731 C1 \times C2 + 0,210 C1 \times C3 - 1,043 C2 \times C3$$

Où **C1**, **C2** et **C3** représentent les facteurs **pH**, **Humidité** et **la quantité de substrat** respectivement. Une corrélation est établie entre les données expérimentales et les valeurs prédites par le modèle. Plus les valeurs expérimentales seront proches de la droite de régression linéaire, plus le modèle sera pertinent.

L'analyse statistique indique la valeur du coefficient de détermination **R²** de ce modèle est égale à **0.98**. Cela signifie que **98 %** de la production de l'activité endoglucanase sont expliqués par ce modèle et aussi par les trois variables étudiées, et que **2 %** restent par conséquent inexpliqués. **R²** utilisée pour juger de la pertinence du modèle. **R²** Suggéré pour un bon ajustement d'un modèle, devrait être au moins 80%. Plus la valeur de R (coefficient de corrélation) est proche de 1, plus est la corrélation entre les valeurs expérimentales et meilleur (Sudha *et al.*, 2020). Le coefficient de détermination **R²** est une mesure globale pour la qualité du modèle. Le modèle du deuxième degré est un indicateur adéquat des résultats expérimentaux puisque la valeur de **R² prédit** de **0,8664 (86.64%)** indique un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites. La valeur du coefficient de détermination ajusté **R² Adj = 96.57%**

représente une correction de la valeur de R^2 qui permet de prendre en compte la taille de l'échantillon et le nombre de variables utilisées dans le modèle (Bennamoun, 2017). Le coefficient de détermination relativement élevé ajusté (R^2 Adj= **0,96**) dans la présente étude explique la bonne qualité descriptive du modèle.

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,742176	98,19%	96,57%	86,64%

L'ANOVA, à travers le modèle de régression quadratique, le modèle de surface de réponse du second ordre obtenu est hautement significatif ($p = 0.004$).

Cette analyse est confirmée par la valeur élevée du test de Fisher (60.43). cette valeur est supérieure à celle tabulée $t = 10.36$. La valeur **P** du modelé était de (**0.000**) ceci indique aussi que le modèle est significatif et que les variables inclus dans ce modèle ont un effet important sur la production d'endoglucanase.

Par ailleurs, la signification des coefficients du modèle est présenté par le test (test-t) à un niveau de signification à 5%. Selon le tableau 16, les résultats montrent que les termes linéaires de pH (C1), d'humidité (C2) et de la quantité de substrat (C3), le terme quadratique $C3^2$ et l'interaction $C1 \times C2$ et $C2 \times C3$ ont un impact important sur l'activité CMC_{case}. Les effets positifs de l'humidité (C2) et de quantité de substrat (C3) indiquent qu'ils ont un effet linéaire pour augmenter l'activité CMC_{case}, alors que le pH initial (C1) montre un coefficient négatif indiquant qu'il contribue à diminuer l'activité.

Les termes quadratique (C3) ont un impact important sur l'activité CMC_{case}. Cependant, l'interaction ($C1 \times C2 = -2.069$) et ($C2 \times C3 = -2.952$) contribue négativement à la réponse. (tableau 16)

Tableau 14 : Résultats de ANOVA du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité endoglucanase (CMC ase).

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Modèle	9	299,590	33,288	60,43	0,000
Linéaires	3	82,482	27,494	49,91	0,000
C1	1	5,193	5,193	9,43	0,012
C2	1	9,255	9,255	16,80	0,002
C3	1	68,034	68,034	123,51	0,000
Carré	3	203,767	67,922	123,31	0,000
C1*C1	1	2,082	2,082	3,78	0,081
C2*C2	1	0,321	0,321	0,58	0,463
C3*C3	1	199,794	199,794	362,72	0,000
Interaction à 2 facteurs	3	13,341	4,447	8,07	0,005
C1*C2	1	4,279	4,279	7,77	0,019
C1*C3	1	0,351	0,351	0,64	0,443
C2*C3	1	8,710	8,710	15,81	0,003
Erreur	10	5,508	0,551		
Inadéquation de l'ajustement	5	5,185	1,037	16,03	0,004
Erreur pure	5	0,324	0,065		
Total	19	305,098			

a. Graphiques de Pareto

Le diagramme de Pareto (Figure 29) permet de représenter graphiquement les résultats de l'analyse du plan pour la production d'endoglucanase et illustre l'ordre de signification des variables . Où il apparait clairement que les paramètre, humidité, la quantité de substrat et pH sont significatifs sur la production de cellulase, ainsi que leurs interactions mutuelles C1×C2 et C2×C3, et le terme quadratique C3² au leur effet dépose le seul indice de 2.23.

D'après la charte Pareto obtenue, on remarque que les effets de l'interactions C1×C3, et les termes quadratiques C1et C2 ne sont pas significatifs sur la production de CMCase.

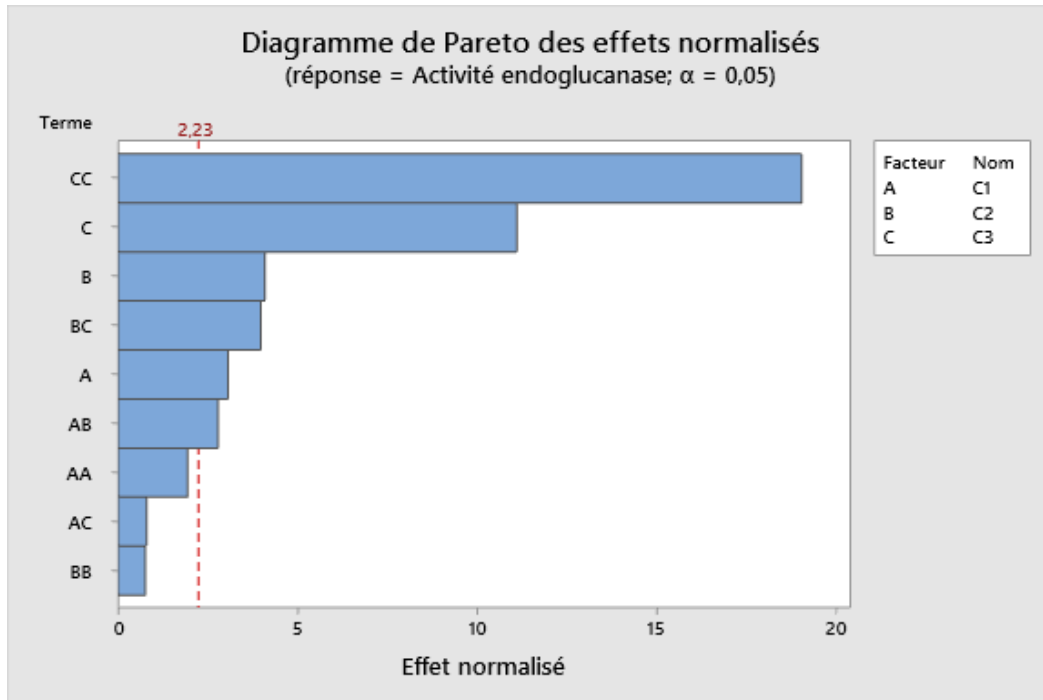


Figure 29 : Charte Pareto des effets standardisés des paramètres opératoires sur l'activité endoglucanase

b. Droite de Henry

La **droite de Henry** est une méthode graphique pour ajuster une distribution gaussienne à celle d'une série d'observations (d'une variable numérique continue).

Il est nécessaire de vérifier le modèle ajusté pour s'assurer qu'il fournit une approximation adéquate du système réel.

La figure 30 montre le diagramme de probabilité normal des résidus, qui est un outil de diagnostic important pour détecter et expliquer les écarts systématiques par rapport aux hypothèses. Les résidus ont été tracés par rapport aux valeurs normales attendues du modèle. Le tracé de probabilité normal des résidus montre les points proches d'une ligne diagonale, par conséquent, les erreurs sont normalement distribuées et sont indépendantes les unes des autres, et les variances d'erreurs sont homogènes. Cela indique que le modèle était bien adapté aux résultats expérimentaux. Comme les résidus du modèle ajusté sont normalement distribués.

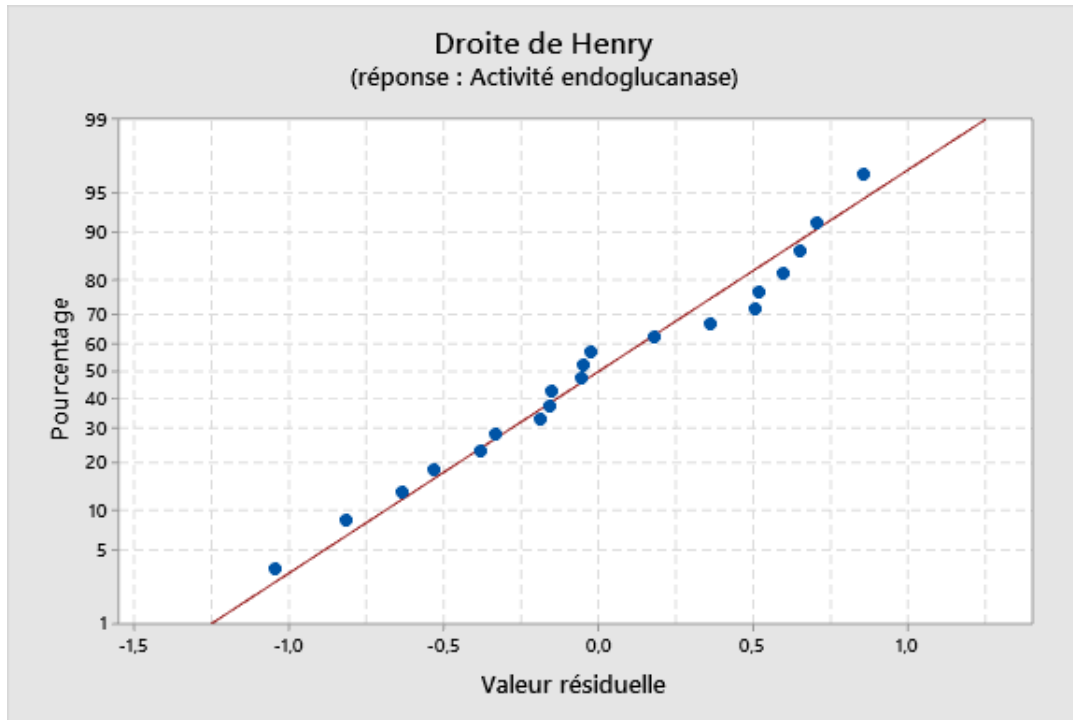


Figure 30 : le graphique de probabilité normal des résidus

c. Graphique des effets directs

La figure 31 montre que les effets linéaires des variables (pH, humidité et la quantité de substrat) sont forts et leurs effets quadratiques sont importants pour la production d'endoglucanase. La quantité de substrat a un effet quadratique plus important.

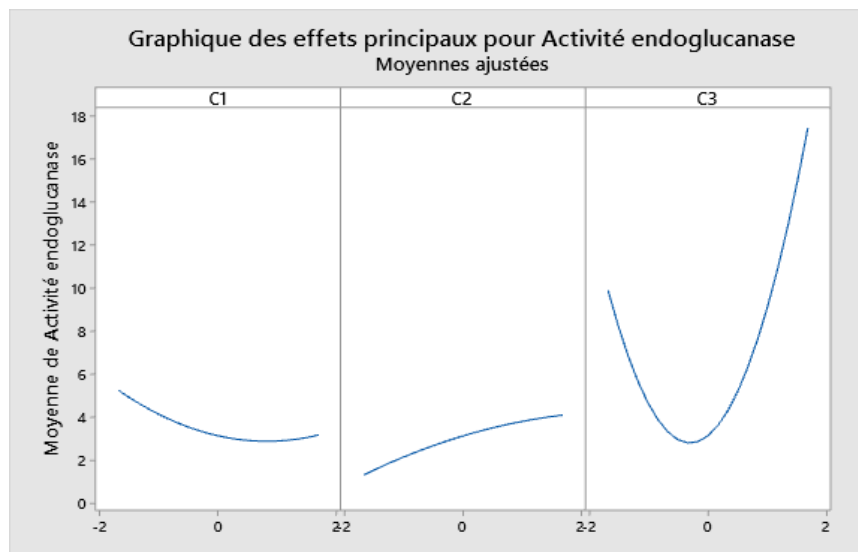


Figure 31 : Graphique des effets directs pour l'endoglucanase

Détermination des interactions entre les variables

Les courbes de surface de réponse tridimensionnelles et les courbes de contour correspondantes obtenues par le logiciel Minitab 19 montrant les interactions entre paire de facteurs permettant de déterminer la zone des meilleurs résultats entre deux variables, sont illustrés dans la figure 1.

Les courbes ont été tracées pour déterminer le niveau optimal de chaque variable (C1 : pH, C2 : humidité et C3 : quantité de substrat) et pour lesquels la réponse a été maximisée et l'effet de leurs interactions sur la réponse (activité endoglucanase)

Généralement, les surfaces de réponse sont basées sur le modèle, en maintenant deux variables indépendantes constantes à leur niveau central, en faisant varier les deux autres variables indépendantes dans le domaine. Par conséquent, 3 surfaces de réponse ont été obtenues en considérant toutes les combinaisons possibles. La forme des courbes de surface de contour correspondantes indique que les interactions réciproques entre les variables indépendantes sont significatives, par conséquent, les interactions entre deux facteurs pourraient apparaître comme un effet antagoniste ou comme un effet synergique.

Les formes des courbes de niveau, circulaires ou elliptiques, indiquent si les interactions mutuelles entre les variables sont significatives ou non. Un tracé de contour circulaire des surfaces de réponse indique que l'interaction entre les variables correspondantes peut être ignorée, tandis qu'une nature elliptique ou de selle du tracé de contour suggère que l'interaction entre les variables correspondantes est significative (Sudha *et al.*, 2020), par conséquent, les interactions entre deux facteurs pourraient apparaître comme un effet antagoniste ou comme un effet synergique.

- **Interactions entre C2 (humidité) et C1 (pH)**

Les interactions entre les deux variables : C2 (humidité) et C1 (pH) sont représentées par la surface de réponse (figure 1.B.1) et la courbes de contour (figure 1.A.1) qui définissant l'interaction entre les deux facteurs et montre les différentes zones traduisant l'activité cellulosique de la souche étudiée.

La zone en vert foncé de la figure 2.A1 représente l'intervalle entre les concentrations en C2 (humidité) et C1 (pH) où l'on retrouve la zone d'activité la plus importante (>8

UI/g), ce qui signifie une production élevée. Cet intervalle se situe à des niveaux bas pour pH et à des niveaux hauts pour l'humidité, L'augmentation supplémentaire de pH ou la diminution d'humidité a montré une diminution progressive du rendement. La forme de la courbe de surface de réponse montre une interaction modérée entre ces variables testées.

L'analyse statistique montre une forte interaction entre C2 et C1 ($p= 0,019$) avec un effet négatif.

- **Interactions entre C3 (Quantité de substrat) et C1 (pH)**

Les interactions entre les deux variables : C3 et C1 sont représentées par la surface de réponse (figure 1.B.2) et la courbes de contour (figure 1.A.2) qui définissant l'interaction entre les deux facteurs et montre les différentes zones traduisant l'activité cellulósique de la souche étudiée. La zone en vert foncé de la figure 1.A.2 représente l'intervalle des valeurs entre le pH et la quantité de SB où l'on retrouve la zone d'activité la plus importante (>17.5 UI/g) traduisant une production en cellulase élevée obtenue avec une concentration élevée en substrat et faible pH, l'augmentation supplémentaire de pH ou la diminution d'humidité a montré une diminution progressive du rendement.

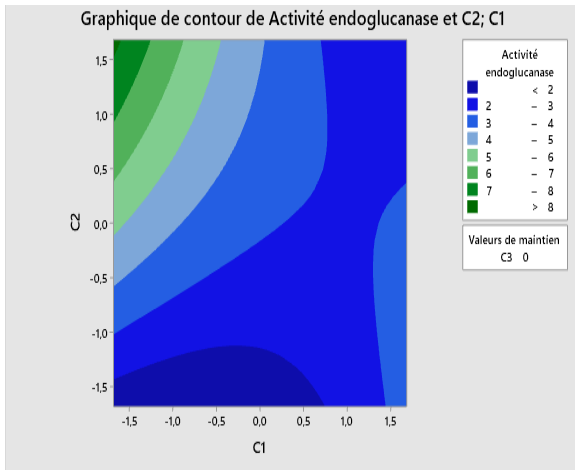
L'analyse statistique montre une faible interaction entre le pH et la quantité de substrat ($p= 0.443$)

- **Interactions entre C3 (quantité de substrat) et C2 (humidité)**

Les interactions entre les deux variables : C3 et C2 sont représentées par la surface de réponse (figure 1.B.3) et la courbes de contour (figure 1.A.3) qui définissant l'interaction entre les deux facteurs et montre les différentes zones traduisant l'activité cellulósique de la souche étudiée. La zone en vert foncé représente l'intervalle entre les concentrations en C3 et C2 où l'on retrouve l'activité la plus importante (>18 UI/g), ce qui signifie une production élevée obtenue avec une concentration élevée en substrat.

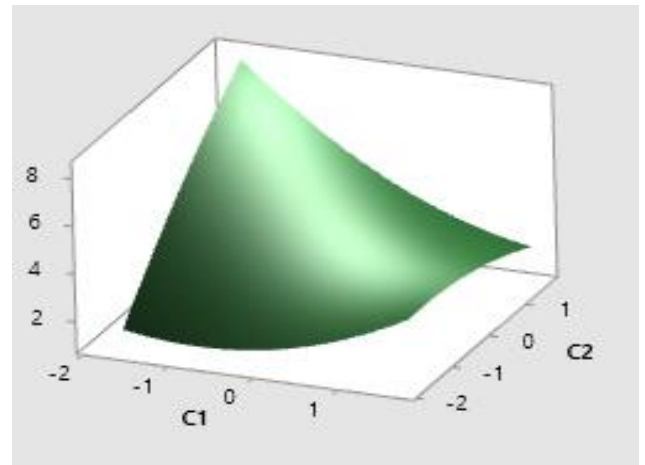
L'analyse statistique montre une forte interaction entre C3 et C2 ($p= 0,003$) avec un effet négatif.

A



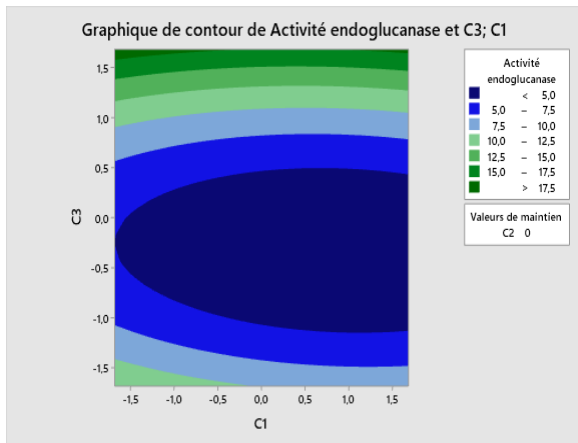
1

B

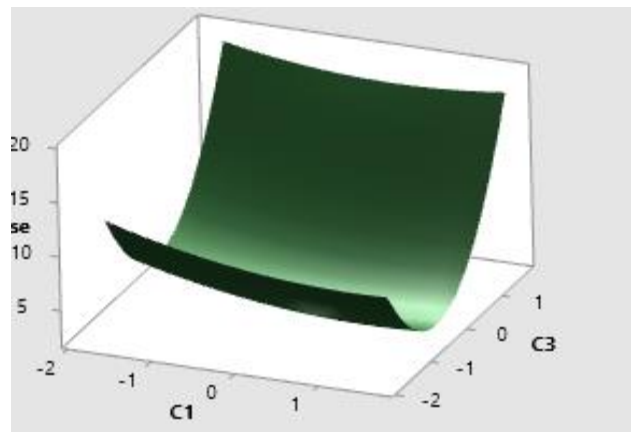


2

Activité endoglucanase C2 ; C1

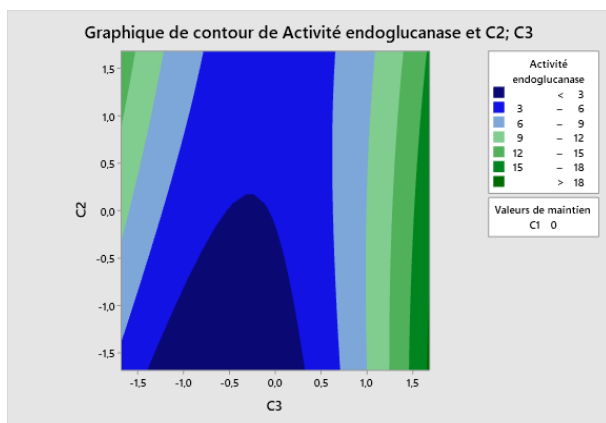


1

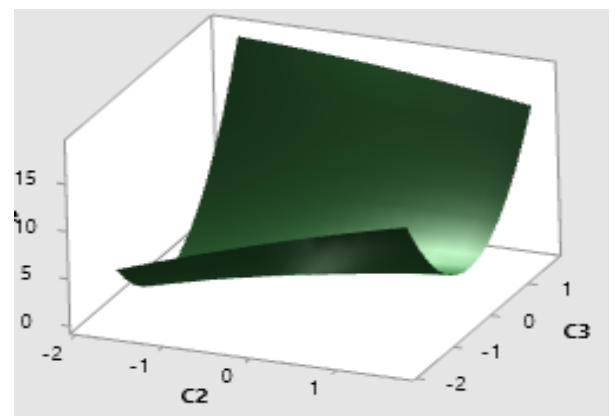


2

Activité endoglucanase C3 ; C1



3



3

Activité endoglucanase C2 ; C3

Figure 32 : la courbes de contour (A) et la surface de réponse (B)

• **Détermination des optima**

La méthodologie de surface de réponse « **RSM** », a permis de déterminer les valeurs optimales des trois variables retenues pour une meilleure activité endoglucanase.

L'optimisation de la production de cellulase évaluant l'influence de chaque paramètre sur l'activité étudiée d'une part et les effets des interactions par paire de facteurs d'autre part réalisée par la méthodologie de surface de réponse a permis d'obtenir la quantité de substrat (10.523 g son de blé) et humidité (71.59 %) optimales et une valeur optimale de 6.682 pour le pH. Et la valeur théorique calculée de l'activité CMCCase (21.2688 UI/g)

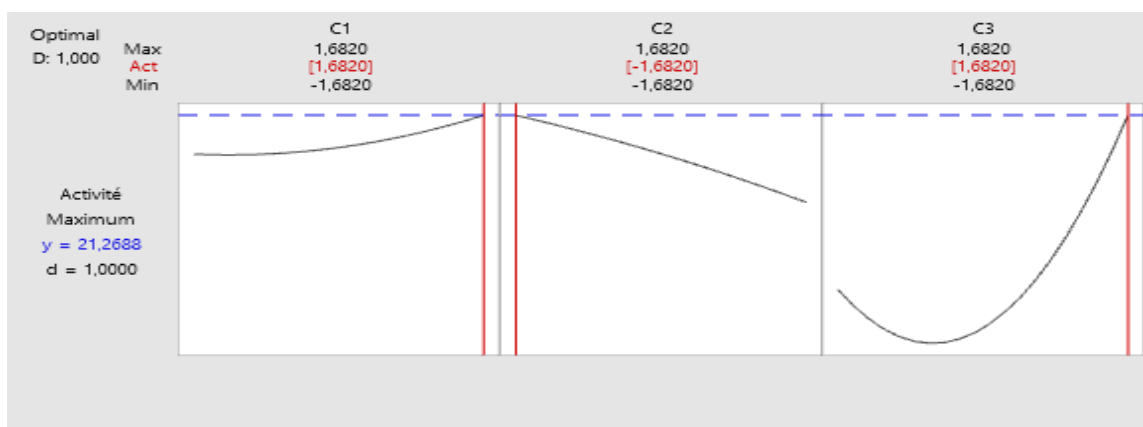


Figure 33 : Valeurs optimales des variables et de la réponse déterminées par « RSM » pour une meilleure activité endoglucanase

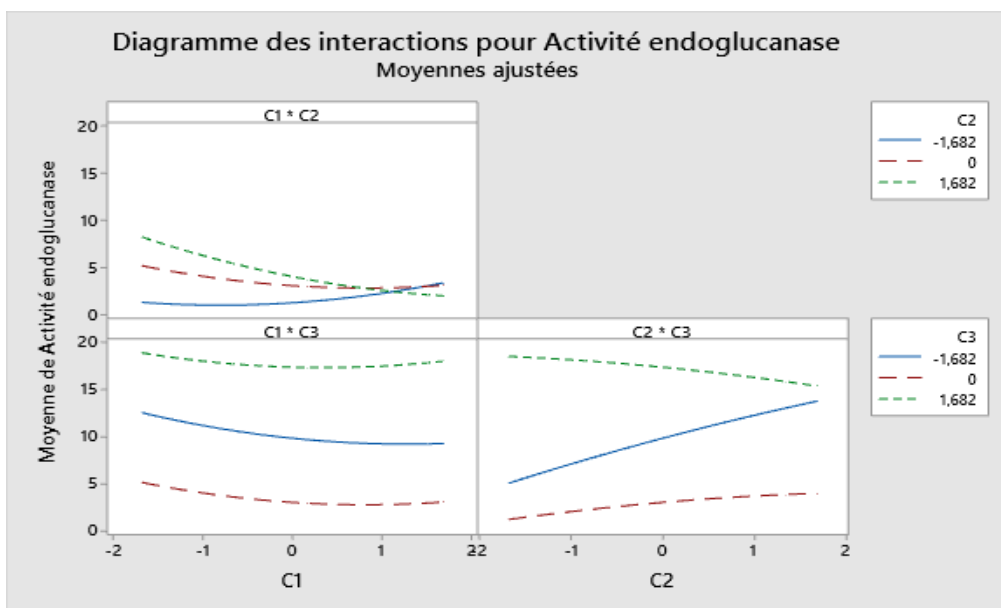


Figure 34 : diagramme des interaction pour l'activité endoglucanase

Les résultats obtenus montrent que les paramètres de culture sélectionnés en l'occurrence la quantité de son de blé, l'humidité et pH jouent un rôle important dans la production des d'endoglucanase par la souche *convida sp.*

Sharma *et al.* (2016) rapportent que la différence dans l'activité de la cellulase pourrait être due à diversité des souches et à la composition milieu de fermentation. Les cellulases peuvent être produites par des microorganismes cellulolytiques lorsque le milieu contient des substrats celluloseux qui agissent à la fois comme sources de carbone et inducteurs. En outre, l'hémicellulose dans son ensemble est également un bon inducteur du système enzymatique cellulolytique et le rapport C/N est crucial pour la croissance des microorganismes et la production de produits spécifiques sous SSF (Zhang *et al.*, 2012).

Notre travail montre que le son de blé convient mieux à la souche étudiée pour améliorer la production d'endoglucanase, Le son de blé il peut sous-produit plus riche en nutriments de l'industrie de la transformation du blé est riche en nutriment fournir aux microorganismes une nutrition abondante comme les protéines et l'hémicellulose. En outre, il reste lâche même dans des conditions humides pendant le mode de culture SSF offrant ainsi une grande surface et une aération efficace (Zhang *et al.*, 2012).

La quantité de substrat est aussi un facteur important pour la production d'enzyme CMC_{ase} ($p=0.000$). La quantité optimale de substrat lignocellulosique est de 10.52 g pour erlen de 250 ml.

En général, les enzymes ont une valeur de pH optimale à laquelle leur activité est la plus élevée et à des valeurs de pH plus ou moins élevées, leur activité diminue Le pH du milieu de fermentation pour la production de la cellulase par les champignons est considéré comme le facteur le plus important (El-Hadi *et al.*, 2014).

Notre étude a montré que la valeur de pH est significative ($p = 0.012$) pour l'activité d'enzymes CMC_{ase} de la souche étudiée. Le pH montre un coefficient négatif sur la production et la valeur prédite par le modèle statistique (CCD) ($pH = 6.68$). De plus, la réduction de la production enzymatique s'est traduite par un pH supérieur ou inférieur. L'instabilité des enzymes à des pH très faibles ou très élevés est due au fait qu'il s'agit de protéines qui sont généralement dénaturées à des pH extrêmes (Rai *et al.*, 2012).

Gautam *et al.*, (2011) a également signalé que des valeurs de pH basiques élevées et acides inhibent la production d'enzymes, et que le pH De 6.5 était idéal pour la production d'enzymes des cultures fongiques.

Selon Chen *et al.*, (2013) le pH pourrait non seulement améliorer efficacement la production de cellulase, mais aussi optimiser la composition de la cellulase et améliorer son efficacité d'hydrolyse. Le pH optimal pour la production d'endoglucanase chez *Trichoderma reesei* est de 4.5.

Alors que, chez *Aspergillus terreus* la production enzymatique est presque constante aux pH 5,0 et 6,0, mais diminue aux pH 4,0 et 4,5. Cela pourrait être dû à une activité protéolytique enzymatique (D'Souza & Volfová, 1982).

Chez *Streptomyces ruber* l'enzyme montre une activité élevée à un large éventail de pH (de 5,5 à 7) avec un pH optimal à 6,0 (El-Sersy *et al.*, 2010).

Quand l'humidité joue un rôle important dans la biosynthèse et la sécrétion de nombreux types d'enzymes, en particulier les cellulases. Le très haute teneur en humidité en milieu solide entraîne une diminution de la porosité du substrat et de la pénétration de l'oxygène parmi les particules du substrat, mais des niveaux d'humidité excessivement bas dans le milieu solide entraînent une croissance microbienne médiocre, un développement médiocre et une accessibilité médiocre aux nutriments (Van *et al.*, 2011).

Nos résultats montrent que l'humidité a un effet significative ($p = 0.002$) pour l'activité d'enzymatique. L'humidité montre un coefficient négatif sur la production et est sa valeur optimale est de 71.59 %.

Selon (Santos *et al.*, 2011) la teneur en eau est un facteur qui interfère avec l'excrétion des enzymes par les micro-organismes. Dans la fermentation à l'état solide l'humidité favorise la croissance des champignons par le transfert d'O₂, la diffusion de nutriments dans le substrat solide et le contrôle de la température. Comme la teneur en eau est limitée, son contrôle est essentiel pour optimiser la fermentation à l'état solide.

Nous résultats corroborent ceux de Pachauri *et al.*, (2016) qui à trouve que l'optim de l'humidité 70% pour la production de la cellulase chez *Trichoderma* sp cultivé sur le marc de

pomme. Alors que, chez la souche *Trichoderma reesei* RUT C30 cultivé sur le son de blé l'optimum de l'humidité est entre 37% - 38% (Pachauri *et al.*, 2016) .

Et dans l'étude de Abdullah & Greetham, (2016), 60% était la teneur minimale en humidité chez *Aspergillus niger* cultivé sur le son de blé,

La teneur en humidité optimale pour la croissance des microorganismes diffère par rapport au substrat, car la capacité de rétention d'eau des substrats est différente et a des effets importants sur l'activité de l'eau (A_w). Le son de blé a une plus grande capacité de rétention d'eau que les substrats lignocellulosiques. la teneur en humidité optimale peut également être influencée par les propriétés du substrat telles que la porosité et la granulométrie (Pachauri *et al.*, 2016, Abdullah & Greetham, 2016).

Validation du modèle expérimental

Afin de déterminer la précision du modèle et de confirmer les résultats d'optimisation, l'expérience a été réalisée dans les conditions optimales de la culture prédites par le modèle : une concentration du déchet de son de blé de 10.52g par erlen de 250 ml et un pH de 6.68 et l'humidité de 71.59%. Lors de ces conditions, la valeur optimale de production d'endoglucanase par *candida sp* a atteint 21.48 UI/g. Ce qui est en étroite accord avec la valeur prédite par le modèle statistique, qui évalue l'activité CMC_{Case} à 21.26 UI/g.

V. Purification

Précipitation avec du sulfate d'ammonium 80% de saturation a montré une activité cellulolytique élevée (1776 U/ml) par rapport à cellulase brute (1005 U/ml), et activité spécifique (77.35 U/mg de protéine), comme indiqué dans le tableau. L'enzyme après précipitation avec 80% le sulfate d'ammonium, le rendement était de 17.75%. La cellulase produite à partir de *T. reesei* a été purifiée par sulfate d'ammonium, est avec un rendement de 59,51 % . (Abdul-hadi *et al* 2016).

Tableau 15 : Purification d'enzyme cellulase produites par *Condida sp*

Etape	Activité totale (UI)	Protéines totaux (mg/ml)	Activité spécifique UI/mg	Taux de purification	Rendement (%)
Extrait brut	10005	652.77	15.32	1	100
Précipitation par (NH ₄) ₂ SO ₄ (40 – 80 %)	1776	22.96	77.35	4.35	17.75
Dialyse	1725.5	21.11	81.73	5.33	17.24
Séphadex G-50	1212.50	7.843	154.6	10.09	12.12

En a appliqué sur une colonne à un débit de 0.5 ml/min et élué en utilisant le tampon phosphate citrate. La fraction était collectée et analysée pour l'activité de la cellulase et teneur en protéines. Fractions contenant de l'enzyme cellulase ont été regroupées et concentrées en utilisant précipitation au sulfate d'ammonium.

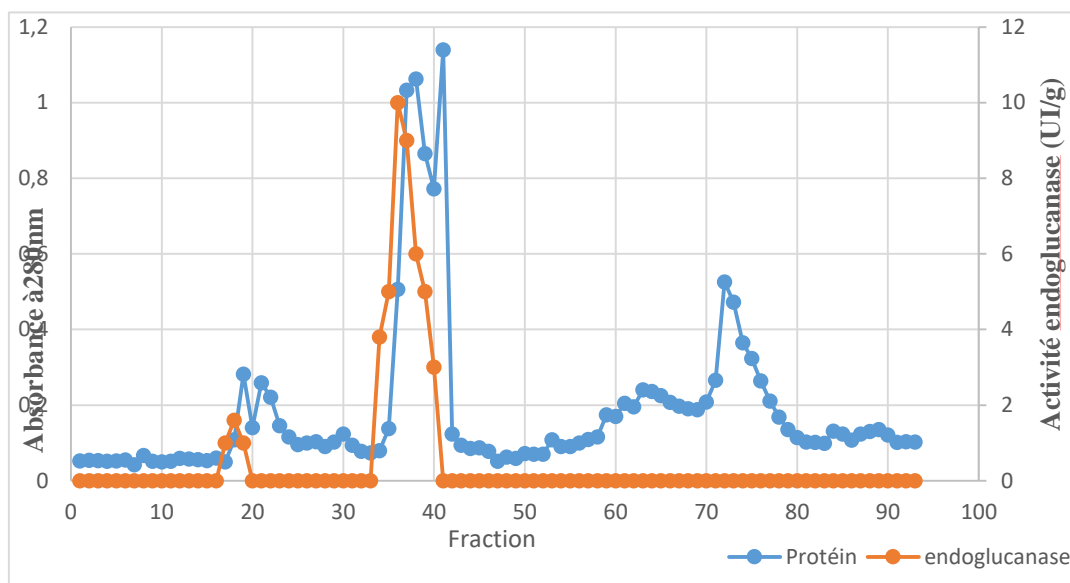


Figure 35 : Profil chromatographique de cellulase de condida sp sur séphadex G-50 (la colonne de gel 100cm*1cm) est équilibrée et éluée par le tampon phosphate

D'après le profil chromatographique en a trois pics de protéines la deuxième contient l'activité endoglucanase la plus importante. L'enzyme purifier a taux de purification 10.09 et un rendement 12.12%

VI. Applications enzymatiques

Cellulase est l'une des enzymes les plus utilisées pour clarifier le jus de pomme. La paroi cellulaire du fruit est composée de pectine. Pour produire du jus de pomme clair, il est absolument nécessaire d'en retirer la pectine et l'amidon. L'utilisation de l'enzyme cellulase dans des conditions particulières aide à clarifier le jus de pomme.

Le rendement du jus de pomme affecté par le traitement à la cellulase. Les données présentées au tableau 17 montrent l'effet de l'ajout de cellulase produite sur le rendement du jus de pomme par rapport à l'eau.

Cellulase peut hydrolyser la cellulose dans la paroi cellulaire, libérant ainsi plus de jus.

D'après les résultats du tableau 4, on peut observer que la cellulase a augmenté la quantité de jus de pomme produite. Il y a une augmentation significative du jus de pomme lorsque

l'enzyme cellulase a été ajoutée, il a amélioré le rendement jusqu'à 9 ml/10 g et une augmentation d'environ 37.5 % a été détectée à la suite de traitement par cellulase purifié.

Tableau 16 : l'effet de cellulase produite sur le volume et le rendement du jus de pomme.

Traitements	Volume du jus (ml) après incubation	Augmentation du rendement %
Eau	26	8.3
Cellulase	33	37.5

- **Clarification du jus de pomme à l'aide de l'enzyme cellulase :**

Un volume de cinq ml de jus est incubé soit avec 1 ml l'extrait brut ou avec l'eau pendant 1h à 50°C. Les échantillons traités et non traités sont ensuite photographiés (Figure 35 et 36). Une nette différence est observée entre le tube traité par cellulase et le contrôle. La cellulase purifiée donne un jus limpide.

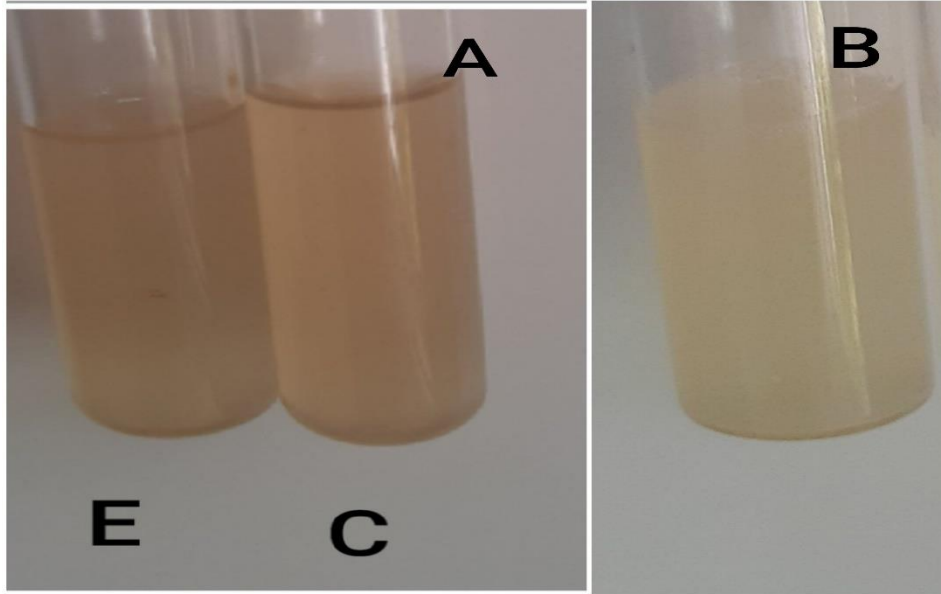


Figure 36 : Clarification du jus de pomme par la cellulase (**E** : Echantillon, **C** : Control)

A : Après le traitement enzymatique

B : Avant le traitement enzymatique

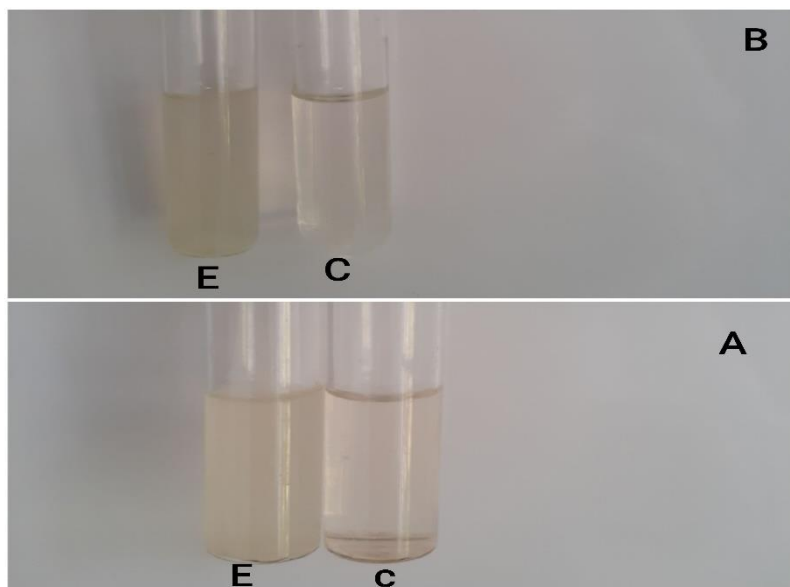


Figure 37 : Clarification du jus de pomme par l'eau (**E** : Echantillon, **C** : Control)

A : Après le traitement enzymatique

B : Avant le traitement enzymatique

The image features a cluster of approximately 15-20 green, almond-shaped objects with a textured, slightly bumpy surface. They are arranged in a vertical, somewhat irregular pattern, with some pointing upwards and others downwards. The background is a soft, out-of-focus green, suggesting a natural setting like a tree or a field of similar plants. The lighting is even, highlighting the texture of the objects.

*Conclusion
générale*

Conclusion générale

Le laboratoire dans lequel est fait ce travail, a fait plusieurs études sur la production d'enzymes diversifiées à partir de souches fongiques. Ainsi, il dispose d'une mycothèque enrichie en moisissures et levures vivant dans plusieurs niches écologiques arides en Algérie. Aussi, la souche levuriennes utilisée pour cette étude sont gracieusement offertes par le Docteur Djekrif-Dakhmouche. S. qui les a isolées du yaourt.

Cette étude et les résultats obtenus s'intègrent dans cette problématique ou un 1^{er} partie expérimentale a été consacrée à :

Premièrement la mise en évidence de l'activité cellulolytique de la souche Y1 sur milieu YPCA, qui monté sa capacité de dégrader la cellulose.

L'identification de la souche utilisée par l'assimilation des composés carbonés montre que la levure à un code de **5775675726**, et le catalogue des galerie API ID 32C indique ce code correspond à la levure *candida sp.*

Les principales raisons de l'augmentation continue des ventes mondiales d'enzymes microbiennes sont dues à l'augmentation de la demande et de la consommation. Parmi les enzymes industrielles majeures qui trouvent des applications dans les domaines de clarification des jus de fruit, les détergents et des industries textiles... etc., les cellulases. Ceux-ci sont produits par une variété de microorganismes, qui clivent les liaisons glycosidiques dans les glucides. Les cellulases provenant de différentes sources microbiennes révèlent une grande diversité biochimique et sont susceptibles de manipulation génétique, ils conviennent donc à des applications spécifiques.

L'objectif principal de cette étude est la sélection meilleur milieu de production enzymatique, quatre déchets lignocellulosiques sont utilisés comme substrat de la fermentation solide et la fermentation liquide à savoir : son de blé, paille de blé, grignon d'olive et papier.

L'étape précédente, nous a permis de sélectionner 02 substrats lignocellulosiques

Le son de blé qui révèlent de meilleurs activités endoglucanases 7.64 ± 0.2 UI/g et paille de blé qui révèlent de meilleurs activité papier filtre 17.01 ± 0.4 UI/g par fermentation en milieu solide.

Le son de blé et la paille de blé représente des sources lignocellulosiques alternative pour la production enzymatique, ainsi que pour des applications biotechnologiques. Nos résultats suggèrent que l'utilisation économique des résidus agro- industriels pour une production rentable de cellulase est possible. Des recherches en perspective montrant que c'est une option pratique et économique, notamment des applications à grande échelle sont susceptibles d'être disponibles.

Afin d'évaluer l'influence de CMC, les sources d'azotes organique (urée, peptone extrait de levure, corn steep liquor), sources d'azotes inorganique ((NH₄)₂SO₄, NH₄CL et NaNO₃) et les sels (MgSO₄.7H₂O, ZnSO₄.7H₂O, CaCl₂.2 H₂O) une optimisation par la méthode OFAT est appliqué. D'après les résultats l'activité endoglucanase et APF augmenté en présence de CMC, la production CMCCase atteint les valeurs suivantes : 6.86 ± 0.06 UI/g et 5.79 ± 0.08 UI/g, et l'APF atteint : 16.95 ± 0.5 UI/g et 19.21 ± 0.28 UI/g dans le milieu à base de son de blé et le milieu à base de paille de blé respectivement.

Et permis les sources d'azotées étudiées, seulement le corne steep liquor 5.79 ± 0.08 UI/g et les nitrate de sodium 4.86 ± 0.08 UI/g augmentent la production d'endoglucanase dans le milieu à base de paille de blé, alors que l'activité augmenté dans le milieu à base de son de blé en présence de NaNO₃ 8.73 ± 0.09 UI/g, et dans les sels l'augmentation de l'activité CMCCase a été enregistrée en présence de MgSO₄ 19.91 ± 0.3 UI/g, ZnSO₄ 11.10 ± 0.1 UI/g et CaCl₂ 12.18 ± 0.1 UI/g, et l'APF augmenté en présence de MgSO₄ 16.25 ± 0.15 UI/g et ZnSO₄ 15.65 ± 0.16 UI/g dans le milieu à base de son de blé, et en présence de MgSO₄ 5.00 ± 0.3 UI/g, 17.64 ± 0.1 UI/g et CaCl₂ 4.76 ± 0.07 UI/g, 18.15 ± 0.14 UI/g pour l'activité CMCCase et APF respectivement, dans le milieu à base de paille se blé.

Dans le but de déterminer les paramètres influençant la production de cellulase par la souche *condidan sp* à savoir : taux d'inoculation, temps d'incubation, pH, CMC, température d'incubation, l'humidité et la quantité de substrat, une matrice d'expériences donnée par le plan de Plackett et Burman est appliquée. La modélisation des résultats par le logiciel Minitab 19 a permis d'identifier les facteurs favorisant la production des enzymes, l'activité endoglucanase influencé par le pH , quantité de substrat et l'humidité sur les deux milieu, alors que l'APF influencé par la quantité de substrat en présence de son de blé et par la quantité de substrat, la température et temps d'incubation

L'optimisation de la production d'endoglucanase par fermentation en milieu solide sur son de blé a été suivie par un plan de Box-Wilson basé sur les composites centrés (CCD) combiné à la méthodologie de la surface de réponse (RSM) à 3 variables incluant 10.52 de son de blé par erlenmeyer de 250ml, d'un humidité de 71.59% et un pH 6.68. Les conditions optimales établies ont permis d'atteindre un niveau de production d'endoglucanase de 21,48 UI/g, ce qui a été confirmé avec la valeur prédite par le modèle quadratique 21.26 UI/g, confirmant ainsi la validité du modèle. Pour une utilisation éventuelle de l'enzyme, L'endoglucanase a été par la suite purifiée précipitation par saturation au sulfate d'ammonium et chromatographie chargée sur gel de filtration séphadex G50, et montré que la taux de purification est de 10.09 et le rendement de 12.12%.

Du point de vue application, l'endoglucanase purifié est capable d'améliorer la clarification du jus de pomme. Cette étude nous a démontré que l'endoglucanase possède des propriétés uniques, rendant cette enzyme précieuse à l'échelle industrielle.

Perspectives

La réponse à une question ouvre toujours la voie à de nouvelles perspectives de recherche. Ce travail peut être amélioré et étendu de différentes manières. Il serait souhaitable de :

Etude de la production de cellulase en fermenteur semi- pilote.

Le choix d'un autre plan statistique pour optimiser la production de l'endoglucanase et APF.

Elargir l'application du modèle Box et Wilson afin d'optimiser d'autres paramètres. physico chimiques influençant sur la production de cellulase.

Etude caractéristique physicochimique des cellulases.

Purification totale et l'utilisation d'autre chromatographie (échangeuse d'ions, HPLC...)



Référence

- Abdullah, Hamid, Marcelinus, C., & Hadiyanto, H. (2018). Optimization of cellulase production by *aspergillus Niger* ITBCC L74 with bagasse as substrate using response surface methodology. *HAYATI Journal of Biosciences*, 25(3), 115–125. <https://doi.org/10.4308/hjb.25.3.115>
- Abdullah, J., & Greetham, D. (2016). Optimizing Cellulase Production from Municipal Solid Waste (MSW) using Solid State Fermentation (SSF). *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 06(03). <https://doi.org/10.4172/2090-4541.1000206>
- Aguilera, J. F., Molina, E., Colmenero, E., Gil, F., Aguilera, J. F., Molina, E., Colmenero, E., Gil, F., & Valori-, D. R. (1986). *Valorisation nutritive d ' un grignon d ' olive traité à la soude*.
- AL Daccache, M. (2017). Étude du potentiel fermentaire de la pomme libanaise et impact des procédés émergents sur la fermentation du jus en vue de l'élaboration du cidre. Thèse de doctotat. L'université Saini-Joseph de Beyrouth.
- Alotaibi, A., & Khan, J. (2016). Kinetic study and basal media modification of cellulase enzyme production by mutated strain of *Aspergilluls fumigates (Af1)*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 7(1), B193–B200.
- Amadi, O. C., Egong, E. J., Nwagu, T. N., Okpala, G., Onwosi, C. O., Chukwu, G. C., Okolo, B. N., Agu, R. C., & Moneke, A. N. (2020). Process optimization for simultaneous production of cellulase, xylanase and ligninase by *Saccharomyces cerevisiae SCPW 17* under solid state fermentation using Box-Behnken experimental design. *Heliyon*, 6(7), e04566. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04566>
- Amairia, D., Bebkacher, M., & Chlehi, N. (2020). Contribution au comportement des levures « *Saccharomyces cereviasiae* » vis-à-vis des résidus du dioxyde de titane Présenté. Mémoire de master. Université 8 Mai 1945 Guelma.
- Amirul, A. A., Khoo, S. L., Nazalan, M. N., Razip, M. S., & Azizan, M. N. (1996). Purification and Properties of Two Forms of Glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica*, 41(2), 165–174. <https://doi.org/10.1007/BF02814694>
- Ammarkhodja, L., & DJAFOUR, I. (2019). *Mise en évidence des activités cellulolytiques issues de deux souches fongiques : Aspergillus Niger et Penicillium sp cultivées sur des sous produits agricoles*. Mémoire de master. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

- Arman, Z., Sondana, G. A., Fikriyyah, N. N., Afifah, Z. N., Balqis, M., Hasanah, R., Risandi, A., Sofiana, I., Nisa, H., Ridawati, Muktiningsih, M., & Sukmawati, D. (2020). Screening of amylolytic and cellulolytic yeast from *Dendrobium spathilingue* in Bali Botanical Garden, Indonesia. AIP Conference Proceedings, 2242(June). <https://doi.org/10.1063/5.0007802>
- Arouak, L., & Zenad, A. (2019). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de cellulase sur son de blé. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine 1.
- Azzouz, Z. (2016). Production de cellulases et de xylanases fongiques par fermentation solide et liquide à base de paille et de son de blé. Mémoire de magister. Université A. MIRA-BEJAIA.
- Ballmann, P., Lightfoot, J., Müller, M., Dröge, S., & Prade, R. (2019). Redesigning the *Aspergillus nidulans* xylanase regulatory pathway to enhance cellulase production with xylose as the carbon and inducer source. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1243-5>
- Bataiche, I. (2014). Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques. Thèse de doctorat. Université Constantine 1.
- Belmaziz, M., & Djalal, F. (2017). Analyses microbiologiques, biochimiques et biotechnologiques des levures issues du cépage Cinsault cultivé dans la commune Ben Abdelmalek Ramdane (Wilaya de Mostaganem). Mémoire de master. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
- Benhadi, S. (2010). Greffage de cyclodextrines modifiées par traitement Corona sur matériaux cellulosiques. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré Nancy 1.
- Benkerrou, F., & Hamaili, K. (2012). Etude de la croissance et la production des cellulases par *Bjerkandera sp.* sur le son et la paille de blé. Mémoire d'ingénieur d'état. Université Abderrahmane MIRA de Bejaia.
- Bennamoun, L. (2017). Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens (El-M'gheir) productrices de polygalacturonase: Purification et caractérisation enzymatique. Thèse de doctorat.

- Berber, N. (2018). Caractérisation biomoléculaire et biotechnologique des souches de « *Saccharomyces cerevisiae* » issues des cépages Algériens Soutenue. Thèse de doctorat. UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS - MOSTAGANEM.
- Bettaieb, F. (2016). Valorisation des déchets cellulosiques tunisiens. Thèse de doctorat. Université Grenoble Alpes.
- Bhatia, R., Kumar, R., Rathour, R., Kumar, V., Sharma, V., Rana, N., Thakur, S., & Bhatt, A. (2017). Enhancement of Cellulose Degradation Potential of *Bacillus sp. Hcb-21* through Mutagenesis. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 09(06), 61–70. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000374>
- Biomaser, L., & Spezzani, V. (2014). Valorisation énergétique des cultures intermédiaires et coproduits agricoles. 36.
- Carrasco, M., Villarreal, P., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2016). Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0640-8>
- CHAPOUTOT, P., ROUILLÉ, B., SAUVANT, D., & RENAUD, B. (2019). Les coproduits de l'industrie agro-alimentaire : des ressources alimentaires de qualité à ne pas négliger. *INRA Productions Animales*, 31(3), 201–220. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2018.31.3.2353>
- Chen, L., Yang, Z., He Can Zhang, R., Zhang, D., Chen, S., & Ma, L. (2013). Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.003>
- Co, R., & Hug, L. A. (2020). A Need for Improved Cellulase Identification from Metagenomic Sequence Data. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(1), 1–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.01928-20>
- Commission Européenne. (2001). Industrie papetière. 578.
- Crepy, L. (2010). CONCEPTION ET MISE EN FORME DE NOUVEAUX MATERIAUX A PARTIR DE MACROMOLECULES NATURELLES. Thèse de doctorat. UNIVERSITE D'ARTOIS Laboratoire.

- D'Souza, J., & Volfová, O. (1982). The effect of pH on the production of cellulases in *Aspergillus terreus*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 16(2–3), 123–125. <https://doi.org/10.1007/BF00500739>
- Dakhmouche, S. (2016). Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine.
- Davison, S. A., Keller, N. T., van Zyl, W. H., & den Haan, R. (2019). Improved cellulase expression in diploid yeast strains enhanced consolidated bioprocessing of pretreated corn residues. *Enzyme and Microbial Technology*, 131(June), 109382. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109382>
- Debiton, C. (2010). Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L .) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy. thèse de doctora. In *Université Blaise Pascal*.
- Devun, J., Brunschwig, P., Farri, J.-P., Pottier, E., & Sagot, L. (2011). *Bien utiliser la paille de céréales dans l'alimentation des bovins et ovins*.
- El-Hadi, A. A., El-Nour, S. A., Hammad, A., Kamel, Z., & Anwar, M. (2014). Optimization of cultural and nutritional conditions for carboxymethylcellulase production by *Aspergillus hortai* . *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(1), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2013.11.003>
- El-Sersy, N. A., Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G. M., Ibrahim, H. A. H., & El-Toukhy, N. M. K. (2010). Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. *African Journal of Biotechnology*, 9(38), 6355–6364. <https://doi.org/10.4314/ajb.v9i38>
- EL abdi, I. (2009). *Traitement de la biomasse lignocellulosique par le rayonnement Gamma et son effet sur la dégradation de la lignine*. Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie.
- Farjana, I., & Roy, N. (2018). Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. *BMC Research Notes*, 11(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3558-4>

- Fergani, K., & Lakhel, R. (2015). *Activités cellulolytiques de Trichoderma longibrachiatum cultivée sur son de blé. Mémoire de master*. Université Constantine 1.
- Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Khan, J., Awasthi, M. K., & Sarsaiya, S. (2011). Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. *Biotechnology Research International*, 2011, 1–8. <https://doi.org/10.4061/2011/810425>
- Ghori, M. I., Ahmed, S., Malana, M. A., & Jamil, A. (2011). Corn stover-enhanced cellulase production by *Aspergillus Niger* NRRL 567. *African Journal of Biotechnology*, 10(31), 5878–5886. <https://doi.org/10.5897/ajb10.2342>
- Giese, E. C., Dussán, K. J., Pierozzi, M., Chandel, A. K., Pagnocca, F. C., & Da Silva, S. S. (2017). Cellulase production by *trichosporon laibachii*. *Orbital*, 9(4), 271–278. <https://doi.org/10.17807/orbital.v9i4.1024>
- Granström, M. (2009). *Cellulose Derivatives: Synthesis, Properties and Applications* (Issue May).
- Haberra, S. (2014). *Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet Devant. thèse de doctorat*. université Badji mokhtar Annaba.
- Hadjaz, A. (2020). *Isolement de souches productrices souches productrices de cellulases et optimisation de la cellulases et optimisation de la production enzymatique. Mémoire de master*. Université Mohamed Khider de Biskra.
- Hamma, S., & Saoudi, S. (2016). *Optimisation de la production des des xylanases chez Jonesia denitrificans BN13 xylanases chez par la méthode par la méthode des plans d'expériences. Mémoire de master*. Université A. MIRA - Bejaia.
- Kalsoom, R., Ahmed, S., Nadeem, M., Chohan, S., & Abid, M. (2019). Biosynthesis and extraction of cellulase produced by *Trichoderma* on agro-wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(2), 921–928. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1717-8>
- Kanti, A., & Sudiana, M. (2002). Cellulolytic yeast isolated from soil Gunung Halimun National Park. *B'erita Biologi*, 6(April), 85–90.

- Khelil Omar. (2017). *Production de cellulase et d'enzymes associées par des souches de Bacillus sp. : Le rôle des prétraitements et l'effet des polyphénols, des flavonoïdes et des biosurfactants. Thèse de doctorat.* Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed-Boudiaf.
- Kim, J. Y., Jung, H. Y., Park, J. S., Cho, S. J., Lee, H. B., Sung, G. H., Subramani, G., & Kim, M. K. (2019). Isolation and characterization of cellulolytic yeast belonging to *Moesziomyces* sp. from the gut of Grasshopper. *Korean Journal of Microbiology*, 55(3), 234–241. <https://doi.org/10.7845/kjm.2019.9056>
- Knowles, J., Lehtovaara, P., & Teeri, T. (1987). Cellulase families and their genes. *Trends in Biotechnology*, 5(9), 255–261. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(87\)90102-8](https://doi.org/10.1016/0167-7799(87)90102-8)
- Korish, M. (2003). Production, purification, properties and application of the cellulases from a wild type strain of a yeast isolate. In *Life sciences*.
- Kumar, S., Sharma, H. K., & Sarkar, B. C. (2011). Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). *Food Science and Biotechnology*, 20(5), 1289–1298. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0178-3>
- Kunasundari, B., Naresh, S., & Che Zakaria, N. Z. (2017). Isolation and characterization of cellulase producing bacteria from tropical mangrove soil. *ACM International Conference Proceeding Series, Part F1319*, 34–37. <https://doi.org/10.1145/3143344.3143357>
- Labrecque, M. H. (2003). Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le Xylène. In *Mémoire du grade de maître ès sciences*. Université Laval.
- Lakhundi, S., Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2015). Cellulose degradation: A therapeutic strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0642-7>
- Leghlimi, H. (2013). *Cellulases de souches fongiques issues du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de doctorat.* Université des Frères Mentouri constantine 1.
- Liu, Z., Ho, S. H., Sasaki, K., Den Haan, R., Inokuma, K., Ogino, C., Van Zyl, W. H., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2016). Engineering of a novel cellulose-adherent cellulolytic

- Saccharomyces cerevisiae for cellulosic biofuel production. *Scientific Reports*, 6(January), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep24550>
- Loucif, I. (2010). *Etude de la valorisation des déchets en papiers et cartons au sein de Tonic Industrie (Approche économique, sociale et écologique)*. Mémoire de master. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- Loureiro, C. B., Gasparotto, J. M., Rabuscke, C. M., Baldoni, D. B., Carús Guedes, J. V., Mazutti, M. A., & Seminoti Jacques, R. J. (2018). Production of cellulolytic enzymes by *Gelatinoporia subvermispora* using different substrates. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 35(2), 459–465. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180352s20160575>
- Lucas, R., Robles, A., García, M. T., De Cienfuegos, G. A., & Gálvez, A. (2001). Production, purification, and properties of an endoglucanase produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 79–85. <https://doi.org/10.1021/jf000916p>
- Mahalakshmi, N., & Jayalakshmi, S. (2016). Amylase, Cellulase and Xylanase production from a novel bacterial isolate *Achromobacter xylosoxidans* isolated from marine environment. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 3(1), 230–233.
- Nehad, E. A., Yoness, M. . F., & Reem, A. A. (2019). Optimization and purification of cellulase produced by *Penicillium decumbens* and its application. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 18(4), 391. https://doi.org/10.4103/epj.epj_31_19
- Niraula, R., & Lebeau, B. (2018). *Matériaux de litière de remplacement pour le bétail*.
- Oetari, A., Fitri, R., Rachmania, M. K., & Sjamsuridzal, W. (2018). Use of microcrystalline cellulose and carboxymethyl cellulose for the detection of cellulolytic fungi from old Chinese manuscripts. *AIP Conference Proceedings*, 2023(November). <https://doi.org/10.1063/1.5064160>
- Ogier, J.-C., Ballerini, D., Leygue, J.-P., Rigal, L., & Pourquié, J. (2008). Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Oil & Gas Science and Technology*, 63(1), 9–19. <https://doi.org/10.2516/ogst>
- Oikawa, T., Tsukagawa, Y., & Soda, K. (1998). Endo- β -glucanase secreted by a psychrotrophic yeast: Purification and characterization. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62(9), 1751–1756. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1751>

- Ouattara, Y. K. (2016). *Role des levures et moisissures impliquées dans la fermentation du manioc. Mémoire de master.* université Nangui Abougoua.
- Pachauri, P., Sullia, S. B., & Deshmukh, S. (2016). Statistical optimization for enhanced production of cellulase from sugarcane bagasse using response surface methodology. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 75(3), 181–187.
- Pérez, S. (2015). Structure et Morphologie de la Cellulose. *ResercherGate*, 1(January 2000), 1–24.
- Perraud-gaime, S. R. I., Lakhtar, H., Aouidi, F., Labrousse, Y., Belkacem, N., Macarie, H., & Artaud, J. (2009). Valorisation biotechnologique des sous produits de l 'olivier par Fermentation en Milieu Solide. *Olivebioteq*, 293–300.
- Potprommanee, L., Wang, X. Q., Han, Y. J., Nyobe, D., Peng, Y. P., Huang, Q., Liu, J. Y., Liao, Y. L., & Chang, K. L. (2017). Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. *PLoS ONE*, 12(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175004>
- Prevot, V. (2013). *Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de doctorat.* <http://www.theses.fr/2013REIMS009>
- Priyanka Rai, Soni Tiwari, and R. G. (2012). Optimization of Process Parameters for Cellulase. *BioResources*, 7(4), 5401–5414.
- Rai, P., Tiwari, S., & Gaur, R. (2012). Optimization of process parameters for cellulase production by novel thermotolerant yeast. *BioResources*, 7(4), 5401–5414. <https://doi.org/10.15376/biores.7.4.5401-5414>
- Rajoka, M. I. (2004). Influence of various fermentation variables on exo-glucanase production in *Cellulomonas flavigena*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(3), 256–263. <https://doi.org/10.2225/vol7-issue3-fulltext-2>
- Reffas, F. zohra imene. (2017). *Isolement et caractérisation de bactéries productrices de cellulase. Thèse de doctorat.* Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes.
- Romain, K. (2011). *Production d'un starter cellulolytique anaerobique pour sa valorisation en*

alimentation animale. Mémoire de master. université de Liège.

- Santos, T. C. dos, Cavalcanti, I. S., Bonomo, R. C. F., Santana, N. B., & Franco, M. (2011). Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. *Ciência Rural*, 41(12), 2210–2216. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782011005000145>
- Schamburg D, & Salzmänn. (1991). *Enzyme handbook* (Issue 3).
- Shajahan, S., Moorthy, I. G., Sivakumar, N., & Selvakumar, G. (2017). Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. *Journal of King Saud University - Science*, 29(3), 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.08.001>
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateswar, S., & Anandrao, M. (2014). Applications of Cellulases – Review. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 4(2), 424–437.
- Sharma, H. P., Patel, H., & Sugandha. (2017). Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1215–1227. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977434>
- Sharma, S., Sharma, V., & Kuila, A. (2016). Cellulase production using natural medium and its application on enzymatic hydrolysis of thermo chemically pretreated biomass. *3 Biotech*, 6(2), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0465-z>
- Shu, G., Hu, M., Wang, S., & Chen, H. (2011). Effect of some factors on production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. *Procedia Environmental Sciences*, 8(November), 357–361. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.056>
- Silvania, L., & Erica, C. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(2), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.008>
- Sudha, A., Suganya, S. ., Priya, R., Nirmala, M., Janani, R., & Shankar, T. (2020). Central composite design (CCD) for cellulase production using *Aspergillus niger* isolated from kattalagarkovil, Tamilnadu. *International Journal of Recent Scientific Research*, 11(02), 37471–37472. <https://doi.org/10.24327/IJRSR>

- Tabssum, F., Irfan, M., Shakir, H. A., & Qazi, J. I. (2018). RSM based optimization of nutritional conditions for cellulase mediated Saccharification by *Bacillus cereus*. *Journal of Biological Engineering*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13036-018-0097-4>
- Tanveer, B., Bisma, M., Reiaz, R., & Manoj, K. (2015). Influence of Various Parameters on Cellulase and Xylanase Production by Different Strains of *Trichoderma* Species. *Austin J Anal Pharm Chem*, 2(1), 1–5. <http://austinpublishinggroup.com/analytical-pharmaceutical-chemistry/fulltext/ajapc-v2-id1034.php>
- Tanveer, B., Malik, B., Reiaz ul, R., & Kumar, M. (2015). Influence of Various Parameters on Cellulase and Xylanase Production by Different Strains of *Trichoderma* Species. *Austin J Anal Pharm Chem*, 2(1), 1–5. <http://austinpublishinggroup.com/analytical-pharmaceutical-chemistry/fulltext/ajapc-v2-id1034.php>
- Thapa, S., Mishra, J., Arora, N., Mishra, P., Li, H., O'Hair, J., Bhatti, S., & Zhou, S. (2020). Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 19(3), 621–648. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09536-y>
- Touijer, H., Benchemsi, N., Ettayebi, M., Janati Idrissi, A., Chaouni, B., & Bekkari, H. (2019). Thermostable Cellulases from the Yeast *Trichosporon* sp. *Enzyme Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2790414>
- Van, H. vu, Pham, T. A., & Kim, K. (2011). Improvement of fungal cellulase production by Mutation and optimization of solid state fermentation. *Mycobiology*, 39(1), 20–25. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2011.39.1.020>
- Verma, N., & Kumar, V. (2020). Impact of process parameters and plant polysaccharide hydrolysates in cellulase production by *Trichoderma reesei* and *Neurospora crassa* under wheat bran based solid state fermentation. *Biotechnology Reports*, 25, e00416. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00416>
- Verma, N., Kumar, V., & Bansal, M. C. (2012). *Utilization of Egg Shell Waste in Cellulase Production by Neurospora crassa under Wheat Bran-Based Solid State Fermentation*. 21(2), 491–497.
- Waseem, I., Gulsher, M., & Choudhry, S. (2014). *research article cellulase production from newly isolated bacterial strains from local habitat*. 5(August), 1454–1459.

- Wilson, D. B. (2009). Aerobic Microbial Cellulase Systems. *Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*, 374–392. <https://doi.org/10.1002/9781444305418.ch11>
- Wittman, S. (1993). *CLONAGE ET SÉQUENÇAGE DU GÈNE DE LA CELLULASE B DE Streptomyces lividans 66 ET CARACTÉRISATION DE L'ENZYME*. Thèse de doctorat. UNIVERSIT~ DU QU~BEC MÉMOIRE.
- Yaiche, S., & Aidouni, B. (2018). *Optimisation de la production de cellulase par Trichoderma longibrachiatum cultivée sur son de blé*. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine1.
- Yehia, A., Mahmoud, G., & Tarek, M. (2011). CELLULASES USES OR APPLICATIONS. *Nova Science Publisher*, 22.
- Yu, X. Bin, Yun, H. S., & Koo, Y. M. (1998). Production of cellulase by *Trichoderma reesei* Rut C30 in wheat bran- containing media. In *Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 8, Issue 3, pp. 208–213).
- Zaddem, M. (2014). *Application de la méthode des surfaces de réponse pour l'optimisation du blanchiment du son de blé par du peroxyde d'hydrogène et son incorporation dans une farine de pain*. université Laval.
- Zhang, H., Sang, Q., & Zhang, W. (2012). Statistical optimization of cellulases production by *Aspergillus niger* HQ-1 in solid-state fermentation and partial enzymatic characterization of cellulases on hydrolyzing chitosan. *Annals of Microbiology*, 62(2), 629–645. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0300-z>
- Zhang, X., & Zhang, Y. P. (2013). Production , and application. *Bioprocessing Technologies in Biorefi Nery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, 131–146.



Annexes

Annexe

Annexe 1 : Composition des milieux de culture utilisés.

YMA

- ❖ Extrait de levure : 3g
- ❖ Extrait de malt : 3g
- ❖ Peptone : 5g
- ❖ Glucose : 10g
- ❖ Agar : 20g
- ❖ Eau distillée : 1000 ml

YPCA

- ❖ Extrait de levure : 5g
- ❖ Peptone : 0.5g
- ❖ CMC : 10g
- ❖ Agar : 20g
- ❖ Eau distillée : 1000 ml

YPGA

- ❖ Extrait de levure : 5g
- ❖ Peptone : 10g
- ❖ Glucose : 20g
- ❖ Agar : 20g
- ❖ Eau distillée : 1000 ml

Rouge Congo pour le milieu YPCA

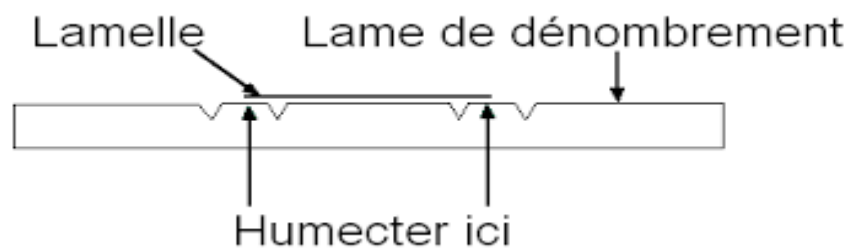
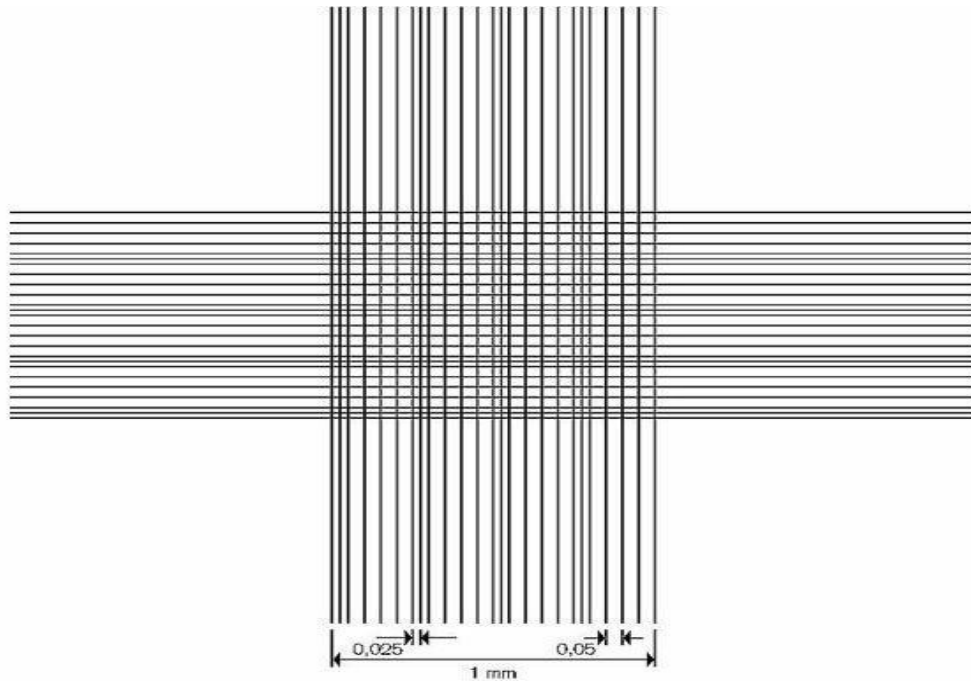
1% de poudre de Rouge Congo dans 100ml d'eau distillée.

Le dénombrement cellulaire par comptage sur la cellule de Thomas

Aire = $0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} = 0,0025 \text{ mm}^2$

Volume = $0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 = 2,5 \times 10^{-7} \text{ ml}$

Concentration cellulaire = $\frac{\text{nombre des cellules} \times \text{comptées facteurs de dilution} \times \text{le facteur de conversion}}{\text{Nombres des carrés} \times \text{le volume de carré}}$



Annexe 2 : Solutions et tampons préparés

Solution tampon citrate 0.5M, pH = 5

- ❖ Acide citrique (0.5M) : 10.5g
- ❖ Phosphate de sodium (0.5 M) : 58g
- ❖ Eau distillé 2000 ml

Protocole :

1000 ml acide citrique (0.5M) : 10.5g acide citrique dans 1000 ml d'eau distillée.

1000 ml phosphate de sodium (0.5M) : 58g phosphate de sodium dans 1000ml d'eau distillée.

Titration à l'aide d'un pH mètre (préalablement étalonné) jusqu'à pH 5.

La solution tampon est conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

Réactif de DNS

- ❖ Acide 3,5 dinitrosalicylique : 1g
- ❖ NaOH (2N) : 20 ml
- ❖ Tartrate double Na, K : 30g

Protocole :

Dissoudre 1g de DNS (acide 3,5 dinitrosalicylique) dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée. Ajouter 30 g de tartrate double Na, K. Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

Filtrer. Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière (Miller, 1959).

Solution de carboxyméthylcellulose (CMC) à 1%

- ❖ CMC : 1g
- ❖ Tampon citrate 0.5M pH 5 : 100 ml
- ❖ Protocole :

1g de CMC est dissout dans 100 ml de tampon citrate 0.5M pH 5, compte-tenu de la grande viscosité et afin avoir une solution homogène, il faut agiter et chauffer jusqu'à dissolution complète.

Dosage des protéines (méthode de Lowry 1951)

-Principe

Les protéines sont quantifiées en utilisant la méthode du Folin Ciocalteu (Lowry et al 1951). L'addition successive à une solution protéique diluée d'un sel de cuivre en milieu alcalin et du réactif des phénols de Folin Ciocalteu donne une coloration bleue foncée. Celle-ci résulte de la réaction du cuivre sur les liaisons peptidiques.

-Réactifs

- **Solution A** : Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2% dans NaOH (0.1N)
- **Solution B** : Tartrate double de sodium et potassium à 2% .
- **Solution C** : Sulfate de cuivre (CuSO_4) à 1% .

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

- Solution C : 0,5 ml
- Solution B : 0,5 ml
- Solution A : 50 ml

Réactif de Folin : Le Folin Ciocalteu commercial à dilué 3 fois dans l'eau distillée au moment de l'emploi.

-Mode opératoire

- Ajouter à 0,5 ml de l'extrait enzymatique dilué 2,5ml de la solution M.
- Agiter et laisser reposer 10 min à température ambiante
- Ajouter 0,25 ml de réactif de Folin
- Agiter et laisser la coloration se développer 30 min à l'obscurité.
- Lire l'absorbance contre le blanc à 650 nm.

Précipitation au sulfate d'ammonium

Le tableau ci-dessous donne les quantités de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C. (Le tableau indique aussi combien de sel ajouter à une solution qui en contient déjà)

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



Résumé

Abstract

The objective of our work is to study the optimisation of the endoglucanase production of *Candida sp.* By solid fermentation. Different lignocellulosic substrates are used as a carbon source, namely (wheat bran, wheat straw, olive pomace and paper), in solid and liquid fermentation medium. For this, the first part of this research work made it possible to select the best substrate for endoglucanase activity and FPA, namely wheat bran (7.64 ± 0.2 IU / g) and wheat straw (17.01 ± 0.4 IU / g) in solid fermentation respectively. In order to improve the CMCase and FPA enzyme production, we used, on the one hand, the one-factor-at-a-time method (OFAT), and on the other hand, the experimental designs of Plackett and Burman. And those of Box-Wilson. The influence of the effect of CMC, sources of organic nitrogen (urea, peptone, yeast extract, corn steep liquor), sources of inorganic nitrogen ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl and NaNO_3) and salts ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) was evaluated. The results showed that the endoglucanase activity was 6.86 ± 0.06 IU / g and 5.79 ± 0.08 IU / g, while APF reached 16.95 ± 0.5 IU / g and 19.21 ± 0.28 IU / g in the bran medium. Wheat bran and wheat straw respectively in the presence of CMC. Among the nitrogen sources studied, only corn steep liquor 5.79 ± 0.08 IU / g and sodium nitrate 4.86 ± 0.08 IU / g increase the production of endoglucanase in the medium based on wheat straw, while the activity has increased in the medium based on wheat bran in the presence of NaNO_3 (8.73 ± 0.09 IU / g). The increase in CMCCase activity was recorded in the presence of MgSO_4 (19.91 ± 0.3 IU / g), ZnSO_4 (11.10 ± 0.1 IU / g) and CaCl_2 (12.18 ± 0.1 IU / g), and that of APF was observed in the presence of MgSO_4 (16.25 ± 0.15 IU / g) and ZnSO_4 (15.65 ± 0.16 IU / g) in the medium based on wheat bran, and in the presence of MgSO_4 (5.00 ± 0.3 IU / g, 17.64 ± 0.1 IU / g) and CaCl_2 (4.76 ± 0.07 IU / g, 18.15 ± 0.14 IU / g) for CMCCase and APF activity, respectively in the medium based on wheat straw. The 7-way Plackett-Burman factorial design was used to study the influence of inoculation rate, incubation time, pH, CMC, incubation temperature, humidity and quantity of substrate on enzyme production. The results revealed that the endoglucanase activity is influenced by the pH, the amount of substrate and the humidity on both media, while the amount of substrate in the presence of wheat bran and by the amount of substrate, temperature and incubation times influenced APF. The centered composite design determined the optimal values of the factors selected by Plackett and Burman for the production of endoglucanase in FMS namely : wheat bran at 10.52g, humidity 71.59% and a pH of 6.68. Under optimal conditions, the enzyme production is 21.48 IU / g, which is in good agreement with the value predicted by the quadratic model (21.26 IU / g). The purification of endoglucanase is carried out by precipitation with ammonium sulfate (40 - 80%), dialysis and chromatography on a column of sephadex G 50. The final yield of the enzyme is 12.12% and the rate purification rate is 10.09. The purified endoglucanase from *Candida sp.* Has shown its ability to improve the clarification of apple juice. This study showed us that endoglucanase has unique properties, making this enzyme valuable on an industrial scale.

Keywords : Endoglucanase, APF, *Candida sp.* Optimisation and purification.

الملخص

الهدف من عملنا هو دراسة تحسين إنتاج endoglucanase من طرف *Candida sp*. عن طريق التخثير الصلب. تُستخدم ركائز مختلفة من اللجنوسليلوز كمصدر للكربون، وهي (نخالة القمح، قش القمح، ثفل الزيتون والورق)، في وسط التخثير الصلب والسائل. لهذا، جعلنا الجزء الأول من هذا البحث أفضل ركييزة لنشاط endoglucanase و APF، وهي نخالة القمح (0.2 ± 7.64) وحدة دولية / غ) وقش القمح (0.4 ± 17.01) وحدة دولية / غ) في التخثير الصلب على التوالي. من أجل تحسين إنتاج إنزيم CMCase و APF، استخدمنا طريقتين بالطريقة الأولى استملنا عامل واحد في كل مرة (OFAT)، ومن ناحية أخرى، التصميمات التجريبية لبلاكيت وبورمان. من بوكس وويلسون. تم تقييم تأثير CMC، مصادر النيتروجين العضوي (اليوريا، البيبتون، مستخلص الخميرة، خمور الذرة الحاد)، مصادر النيتروجين غير العضوي ($(NH_4)_2SO_4$ ، NH_4Cl ، $NaNO_3$) والأملاح ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)، أظهرت النتائج أن نشاط endoglucanase كان 0.06 ± 6.86 وحدة دولية / غ و 5.79 ± 0.08 وحدة دولية / غ، بينما بلغ APF 16.95 ± 0.5 وحدة دولية / غ و 0.28 ± 19.21 وحدة دولية / غ في وسط نخالة القمح وقش القمح على التوالي. في حضور CMC. من بين مصادر النيتروجين التي تمت دراستها، فقط سائل نقع الذرة 0.08 ± 5.79 وحدة دولية / غ و نترات الصوديوم 0.08 ± 4.86 وحدة دولية / غ يزيدان من إنتاج endoglucanase في الوسط على أساس قش القمح، بينما زاد النشاط في الوسط المعتمد على نخالة القمح في وجود $NaNO_3$ (0.09 ± 8.73) وحدة دولية / غ). تم تسجيل الزيادة في نشاط CMCCase في وجود $MgSO_4$ (0.3 ± 19.91) وحدة دولية / غ)، $ZnSO_4$ (0.1 ± 11.10) وحدة دولية / غ) و $CaCl_2$ (12.18 ± 0.1) وحدة دولية / غ)، ولوحظ أن APF من $MgSO_4$ (0.15 ± 16.25) وحدة دولية / غ) و $ZnSO_4$ (0.16 ± 15.65) وحدة دولية / غ) في الوسط المحتوي على نخالة القمح، وفي وجود $MgSO_4$ (0.3 ± 5.00) وحدة دولية / غ، $CaCl_2$ (0.07 ± 4.76) وحدة دولية / غ)، $CaCl_2$ (0.14 ± 18.15) وحدة دولية / غ) و APF، على التوالي في الوسط المعتمد على قش القمح. تم استخدام تصميم مضروب بلاكيت-بورمان ذي السبعة اتجاهات لدراسة تأثير معدل التلقيح ووقت الحضانة ودرجة الحموضة و CMC ودرجة حرارة الحضانة والرطوبة وكمية الركييزة وكمية الركييزة على إنتاج الإنزيم. أوضحت النتائج أن نشاط endoglucanase يتأثر بدرجة الحموضة وكمية الركييزة والرطوبة في كلا الوسطين، بينما تأثرت كمية الركييزة في وجود نخالة القمح وكمية الركييزة ودرجة الحرارة وأوقات الحضانة. حدد التصميم المركب القيم المثلى للعوامل التي اختارها بلاكيت وبورمان لإنتاج endoglucanase في FMS وهي: نخالة القمح عند 10.52 غ والرطوبة 71.59% ودرجة حموضة 6.68. في ظل الظروف المثلى، يبلغ إنتاج الإنزيم 21.48 وحدة دولية / غ، وهو ما يتوافق جيداً مع القيمة المتوقعة بواسطة النموذج التربيعي (21.26 وحدة دولية / غ). يتم تنقية endoglucanase عن طريق الترسيب بـكبريتات الأمونيوم (40-80%)، غسل الكلى واللوني على عمود من saphadex G 50. العائد النهائي للإنزيم هو 12.12% ومعدل التنقية 10.09. endoglucanase المنقى من *Candida sp*. أظهر قدرته على تحسين توضيح عصير التفاح. أظهرت لنا هذه الدراسة أن endoglucanase له خصائص فريدة، مما يجعل هذا الإنزيم ذا قيمة على نطاق صناعي.

الكلمات المفتاحية: *Candida sp*، APF، endoglucanase. التحسين والتنقية.

Présenté par :

Soutenu le 22 Septembre 2021

- **Bara Chaima**
- **Fergani Hiba**

Résumé

L'objectif de notre travail est l'étude de l'optimisation de la production d'endoglucanase de *Candida sp.* par fermentation solide. Différents substrats lignocellulosiques sont utilisés comme source de carbone à savoir (son de blé, paille de blé, grignon d'olive et papier), en milieu de fermentation solide et liquide. Pour cela, la première partie de ces travaux de recherche a permis de sélectionner le meilleur substrat pour l'activité endoglucanase et l'APF à savoir le son de blé (7.64 ± 0.2 UI/g) et la paille de blé (17.01 ± 0.4 UI/g) en fermentation solide respectivement. Dans le but d'améliorer la production enzymatique CMCase et APF, nous avons utilisé, d'une part, la méthode d'un facteur à la fois (OFAT), et d'autre part, les plans d'expériences de Plackett et Burman et ceux de Box et Wilson. L'influence de l'effet de CMC, des sources d'azotes organique (urée, peptone, extrait de levure, corn steep liquor), des sources d'azotes inorganique ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl et NaNO_3) et des sels ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a été évaluée. Les résultats ont montré que l'activité endoglucanase est de 6.86 ± 0.06 UI/g et 5.79 ± 0.08 UI/g, alors que APF a atteint 16.95 ± 0.5 UI/g et 19.21 ± 0.28 UI/g dans le milieu à base de son de blé et de paille de blé respectivement en présence de CMC. Parmi les sources azotées étudiées, seulement le corn steep liquor 5.79 ± 0.08 UI/g et les nitrate de sodium 4.86 ± 0.08 UI/g augmentent la production d'endoglucanase dans le milieu à base de paille de blé, alors que l'activité a augmenté dans le milieu à base de son de blé en présence de NaNO_3 (8.73 ± 0.09 UI/g). L'augmentation de l'activité CMCCase a été enregistrée en présence de MgSO_4 (19.91 ± 0.3 UI/g), ZnSO_4 (11.10 ± 0.1 UI/g) et CaCl_2 (12.18 ± 0.1 UI/g), et celle de l'APF a été observé, en présence de MgSO_4 (16.25 ± 0.15 UI/g) et ZnSO_4 (15.65 ± 0.16 UI/g) dans le milieu à base de son de blé, et en présence de MgSO_4 (5.00 ± 0.3 UI/g, 17.64 ± 0.1 UI/g) et CaCl_2 (4.76 ± 0.07 UI/g, 18.15 ± 0.14 UI/g) pour l'activité CMCCase et APF, respectivement dans le milieu à base de paille de blé. Le plan factoriel de Plackett-Burman à 7 facteurs a été utilisé pour étudier l'influence du taux d'inoculation, du temps d'incubation, du pH, de CMC, de température d'incubation, de l'humidité et de la quantité de substrat sur la production enzymatique. Les résultats ont révélé que l'activité endoglucanase est influencé par le pH, la quantité de substrat et l'humidité sur les deux milieux, alors que la quantité de substrat en présence de son de blé et par la quantité de substrat, la température et temps d'incubation ont influé l'APF. Le plan composite centré a permis de déterminer les valeurs optimales des facteurs sélectionné par Plackett et Burman pour la production d'endoglucanase en FMS à savoir : son de blé à 10.52g, l'humidité de 71.59% et un pH de 6.68. Dans les conditions optimales, la production enzymatique est de 21,48 UI/g, ce qui est en bon accord avec la valeur prédite par le modèle quadratique (21,26 UI/g). La purification d'endoglucanase est effectuée par la précipitation par le sulfate d'ammonium (40 – 80%), la dialyse et la chromatographie sur colonne de séphadex G 50. Le rendement final de l'enzyme est de 12.12% et le taux de purification est de 10.09. L'endoglucanase purifiée de *Candida sp.* a montré sa capacité d'améliorer la clarification du jus de pomme. Cette étude nous a démontré que l'endoglucanase possède des propriétés uniques, rendant cette enzyme précieuse à l'échelle industrielle.

Mots clés : Endoglucanase, APF, *Candida sp.* Optimisation et purification.

Année universitaire

2020-2021