

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

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



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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Enzymes d'intérêt industriel produites par *Penicillium*
*chrysogenum***

Présenté par :

ARIBA Rekia

Le 20/06/2022

ABDELLI Sondous

Jury d'évaluation :

Encadreur : BOUCHERIT Zeyneb (MAA - UFM, Constantine 1).

Examineur 1 : LEGHLIMI Hind (MCA - UFM, Constantine 1).

Examineur 2 : LABBANI Fatima-Zohra Kenza (MCA - ENS, Constantine).

Année universitaire
2021 – 2022

Remerciements

On remercie Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé et de nous avoir guidé, aidé et donné le courage pour accomplir ce travail.

Nos remerciements s'adressent généralement à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

En premier lieu, on remercie notre encadreur Madame BOUCHERIT Zeyneb.

Pour nous avoir proposé ce thème, pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils pertinents et son aide lors de la rédaction de ce manuscrit.

On adresse nos sincères remerciements aux membres du jury, Dr. LEGHLIMI

Hind et Dr. LABBANI Fatima-Zohra Kenza qui ont accepté d'évaluer ce travail.

En fin, on exprime toute nos sympathies et on remercie très chaleureusement l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :

A celle qui m'arrosé d'espoirs et de courage ,à la source de l'amour

"Maman Fatima zohra"

Mon support dans la vie, qui m'a appris et m'a toujours dirigé vers la gloire

"Papa Smain"

*À mes adorables Bouchra et Mouhamed qui savaient toujours comment
procurer la joie et le bonheur à ma vie.*

À tonon Redouane, qui n'a jamais cessé de me soutir et de m'épauler.

À mes grands-parents et mes tantes ,mes chers amis et mon binôme « Souna ».

Merci d 'être toujours là près de moi

Rekia

Dédicaces

Grâce à Allah et avec sa faveur, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie À celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse et le courage A celle qui attend chaleureusement ce jour À :

Les deux personnes, les plus chères à mon cœur ;Au meilleur papa du monde « Mouloud » , mon héros, l'homme qui s'est sacrifié pour me voir réussir dans ma vie, et pour me rendre heureuse, que Dieu le garde ,À mon paradis sur terre, ma femme unique, ma vie et la source de mon bonheur « ma mère Farida», qui ma guidé vers le bon chemin, et qui a fait le possible pour me voir réalisé mes rêves.

À mes adorables sœurs :Malak et Rihab El djanna que Dieu les garde et les protège.

À mon petit prince, mon cher frère : Iyadou.

À Mon cher fiancé Salim qui m'a toujours soutenu et encouragé pendant tous les moments difficiles vécus.

À l'oncle le plus précieux et le plus gentil du monde Hakim

À Mon binôme Kouka et toute sa famille

À mes tantes, mon grand père ,mes amis, mes proches et toute ma famille.

À tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin.

Sondous

Table des matières

الملخص

Abstract

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre I. Revue Bibliographique

I. Les moisissures

1	Définition	7
2	Morphologie.....	7
3	Classification.....	8
3.1	Ascomycota.....	8
3.2	Zygomycota	9
3.3	Chytridiomycota.....	10
3.4	Basidiomycota.....	10
3.5	Deuteromycota.....	11
4	La croissance	11
4.1	Cycle de vie	11
4.2	Conditions de croissance	12
4.2.1	Les nutriments.....	12
1.1.1	les conditions physico-chimiques	12

5	Ecologie.....	13
5.1	Parasitisme	13
5.2	Symbiose.....	13
5.3	Saprophytisme.....	13
6	Importance Industrielle.....	13
6.1	Industrie laitière	13
6.2	Industrie pharmaceutique	13
6.3	Industrie des détergents	14
6.4	Industrie des boissons	14
6.5	Domaine médical	14
6.6	Lutte biologique	14
 II. Les enzymes		
1	Généralités sur les enzymes.....	16
1.1	Définition et Nomenclature	16
1.2	Importance des enzymes.....	17
1.3	Sources d'enzymes.....	18
2	Enzymes fongiques	18
3	Domaines d'application des enzymes fongiques.....	19
3.1	Applications agroalimentaires	19
3.1.1	Panification	19
3.1.2	Boissons	19
3.2	Applications médicales et pharmaceutiques	19
3.3	Applications industrielles	20

3.3.1	Les détergents	20
3.3.2	Les papiers	20
3.3.3	Désencollage de textile	20
4	Genres producteurs des enzymes fongique.....	21
5	<i>Penicillium chrysogenum</i>	22
5.1	Généralités	22
5.2	Classification de <i>P. chrysogenum</i>	23
5.3	Exemples des Enzymes produites par <i>Penicillium chrysogenum</i>	23
Chapitre II. Partie epérimentale		
1	α-Amylase	28
1.1	Production.....	28
1.2	Récupération des extraits enzymatiques.....	28
1.3	Dosage de l'activité amylasique.....	29
1.4	Quantification des protéines	29
1.5	Traitements des tissus par les amylases.....	29
2	Xylanase.....	30
2.1	Production.....	30
2.2	Récupération des extraits enzymatiques.....	30
2.3	Dosage enzymatique.....	30
2.4	Quantification des protéines	31
2.5	Traitement de la poudre du maïs par les xylanases	31
3	Laccase.....	32
3.1	Production.....	32

3.2	Récupération des extraits enzymatiques	32
3.3	Dosage de l'activité laccase.....	32
3.4	Traitement du jus par les laccases	32
3.5	Analyses physico-chimiques du jus	32
3.5.1	Polyphénols.....	32
3.5.2	Clarté et couleur	33

Chapitre III: Résultats et discussion

1	α-Amylases.....	35
1.1	Production.....	35
1.2	Application des amylases dans le désencollage des tissus	35
2	Xylanases	36
2.1	Production.....	36
2.2	Application du xylanase dans la saccharification du poudre d'épi de maïs	37
3	Laccase.....	38
3.1	Production.....	38
3.2	Application des laccases dans la clarification de jus.....	39

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Résumé

Ce travail théorique s'intéresse à la mise en évidence des enzymes produites par la souche *Penicillium chrysogenum* et leurs applications dans l'industrie. Pour cela la première partie de ce travail de recherche porte sur la production de trois enzymes: amylases, xylanases et laccases sur différents milieux (milieu à base de biomasse et milieu synthétique) par cette moisissure. Les activités enzymatiques obtenues après récupération des extraits et dosage sont $8.5\mu\text{/mg}$, de 1.081 à $0.940\mu\text{/ml}$ et $7.9\mu\text{/ml}$ pour les amylases, les xylanases et les laccases respectivement. Ces trois enzymes ont des applications intéressantes dans le domaine industriel; les amylases sont appliquées dans le désencollage des tissus. Après un traitement à 80°C pendant 45 minutes suivi d'un lavage à froid à 30°C pendant 10 minutes, on a obtenu un indice de 9. Les xylanases sont utilisées dans la saccharification de la poudre d'épi de maïs, en les appliquant pendant 24h à 50°C avec une légère agitation. Ce processus a donné un rendement en xylose de 449.15 mg/g et en sucre réducteur et 195.93 mg/g . Enfin un traitement des jus par les laccases (à température ambiante pendant 5 heures) montre une réduction des polyphénols à 45 % et une augmentation de la clarification avec une DO de 1.91 et 4.7 mesurée à 650 nm et 420 nm respectivement

Mots-clés : *Penicillium chrysogenum* ; Amylases ; Xylanases ; Laccases ; Tissus ; Jus ; Maïs.

الملخص

يركز هذا العمل النظري على تحديد الإنزيمات التي تنتجها سلالة *Penicillium chrysogenum* وتطبيقاتها في الصناعة يركز الجزء الأول من هذا العمل البحثي على إنتاج ثلاثة إنزيمات: الأميلاز، والزيلاناز، واللاكاز في وسائط مختلفة (وسط يعتمد على الكتلة الحيوية ووسط صناعي) بواسطة هذه السلالة الفطرية. الأنشطة الإنزيمية التي تم الحصول عليها بعد استعادة المستخلصات وقياس الجرعة الإنزيمية للأميلاز، الزيلاناز واللاكاز على التوالي 8.5 ميكرو لتر /مليجرام، من 1.081 إلى 0.940 ميكرو لتر / مل و 7.9 ميكرو لتر / مل . هذه الإنزيمات الثلاثة لها تطبيقات مثيرة للاهتمام في المجال الصناعي ؛ يتم تطبيق الأميلاز في إزالة تجاعيد الأقمشة حيث أنه بعد المعالجة عند 80 درجة مئوية لمدة 45 دقيقة متبوعة بالغسيل البارد عند 30 درجة مئوية لمدة 10 دقائق تم الحصول على مؤشر 9. تستخدم الزيلاناز في تكسير مسحوق كوز الذرة وذلك بوضعها لمدة 24 ساعة عند 50 درجة مئوية مع التحريك الخفيف. أعطت هذه العملية ناتج زيلوز قدره 449.15 ملجرام / جرام و سكر مرجع 195.93 ملي جرام / جرام. أخيرًا ، تُظهر معالجة العصائر باستخدام اللأكاز (عند درجة حرارة عالية لمدة 5 ساعات) ارجاعا بنسبة 45 ٪ في مادة البوليفينول وزيادة في التنقية مع كثافة ضوئية بمقدار 1.91 و 4.7 التي تم قياسها عند 650 نانومتر و 420 نانومتر على التوالي.

الكلمات المفتاحية : *Penicillium chrysogenum* ؛ الأميلاز. الزيلاناز. اللاكاز. الأقمشة. عصير ؛ حبوب ذرة.

Abstract

This theoretical work focuses on the identification of enzymes produced by the strain *Penicillium chrysogenum* and their applications in industry. For this purpose, the first part of this research work focuses on the production of three enzymes: amylases, xylanases and laccases on different media (biomass-based medium and synthetic medium) by this mold. The enzymatic activities obtained after recovery of extracts and assay are 8.5 μ /mg, from 1.081 to 0.940 μ /ml and 7.9 μ /ml for amylases, xylanases and laccases respectively, these three enzymes have interesting applications in the industrial field; amylases are applied in the desizing of fabrics. After treatment at 80°C for 45 minutes followed by a cold wash at 30°C for 10 minutes, an index of 9 was obtained. The xylanases are used in the saccharification of corn cob powder, by applying them for 24 h at 50°C with a slight agitation. This process gave a yield in xylose of 449.15 mg/g and in reducing sugar and 195.93 mg/g. Finally, a treatment of the juices with laccases (at room temperature for 5 hours) showed a reduction of polyphenols to 45% and an increase in clarification with an OD of 1.91 and 4.7 measured at 650 nm and 420 nm respectively.

Key-words: *Penicillium chrysogenum*; Amylases; Xylanases; Laccases; Tissues; Juice; Corn.

Liste des abréviations

Exp : Exemple

etc. : et cetera

°C : Degré Celsius

ABTS : acide 2,2-azino bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique)

CCP : poudre d'épave de maïs

cm :centimètre

CMC : Carboxy méthyl cellulose

DNS :Methode d'Acide Dinitro-salicilylic

g : Gramme

g/l :Gramme par litre

GAE : Equivalents d'acide gallique

h : heure

IR :Infra Rouge

M :molème

mg : milligramme

mg/l :milligramme par litre

min : minute

ml : millilitre

nm : nanomètre

P/P :poids du composant /poids de mélange

P/V : poids du composant / volume de mélange

P:poids

rpm : rond par minute

SSF : Solid State Fermentation

SYE :Solid Starch Yeast Extracted Agar

T° : Température

μ :micro

U/ml :Unité par millilitre de milieu

UI : unité internationale

UV :ultrat Violet

μ/g : micro par gramme

μ/ml : mirco par millilitre

μg : micro-gramme

Liste des figures

- Figure 1 : Types de thalle chez les moisissures
- Figure 2 : Quelques exemples des ascomycètes
- Figure 3 : Quelques exemples des zygomycètes
- Figure 4 : Quelques exemples des chytridiomycètes
- Figure 5 : Quelques exemples des basidiomycètes
- Figure 6 : Quelques exemples des deutéromycètes
- Figure 7 : Cycle de vie des moisissures
- Figure 8 : Différentes Source des enzymes

- Figure 9 : Schéma représentative et observation microscopique de *Penicillium chrysogenum*
- Figure 10 : Tissus désencollés par l'amylase à des concentrations d'enzyme de 1% sur le poids du tissu (p.p.a.)

Liste des tableaux

- Tableau 1 : Genres producteurs d'enzymes fongiques
- Tableau 2 : Enzymes produites par *Penicillium chrysogenum*

Introduction

Introduction

Les champignons filamenteux produisent une variété de métabolites secondaires à un grand bénéfice (enzymes, antibiotiques, toxines...etc) qui sont largement utilisées dans les processus biotechnologiques (Industries agroalimentaires, pharmaceutiques, détergents, boissons, domaine médical et la lutte biologique). Ces vastes applications sont dues à la possibilité des moisissures à produire une quantité de métabolites importante à faible coût, en utilisant un substrat bon marché (Singh *et al.*, 2019).

Les enzymes fongiques sont des biocatalyseurs stables et efficaces ; leurs production est rapide et élevée en consommant moins d'énergie. Ces enzymes sont majoritairement utilisées dans l'industrie agroalimentaires pour la panification (Majsov,2016) et la fabrication des boissons (Simon et Barry,2005); dans le domaine médicale et pharmaceutique pour le traitement des brûlures et les problèmes de digestion (Belmessikh,2010) et dans autres applications tels que la production des détergents (Ejaz *et al.*,2021), le désencollage de textile et l'industrie papetières (Kalia,S *et al.*, 2021).

Parmi les moisissures les plus connues par la production des enzymes à intérêt industriel c'est le genre *Penicillium* notamment l'ascomycète filamenteux *Penicillium chrysogenum* qui a été profondément étudié pour sa capacité à produire une large gamme de produits naturels tels que les enzymes. La majorité de ces enzymes (Les protéases, les xylanases, les invertases, les amylases...etc) ont des applications biotechnologiques très intéressantes (Mukesh *et al.*,2018).

Dans ce contexte, la présente étude est effectuée dans l'objectif de chercher des enzymes à intérêt industriel produites par *Penicillium chrysogenum*. Nous avons abordé dans une première partie une synthèse bibliographique comportant d'une part, une étude de moisissures touchant la morphologie, la classification, le cycle de vie, les conditions de croissance et l'écologie et d'autre part une étude des enzymes fongiques s'intéressant à leurs définition, importance et domaine d'application.

Dans la partie matériel et méthodes, nous avons synthétisé des travaux précédents qui s'intéressent à la production, par *Penicillium chrysogenum*, de trois enzymes : α -amylases par Jyotsna *et al.*,(2020), xylanases par Ullah *et al.*,(2019) et laccases par Senthivelan *et al.*,(2019).Ensuite, les majeures applications dans le domaine industriel sont prises des travaux respectifs de Kalia *et al.*,(2021), Zhang *et al.*,(2015) et Gassara-Chatti *et al.*, (2013)

pour le désencollage des tissus par les amylases, la saccharification de poudre d'épi de maïs par les xylanases et la clarification de jus par les laccases respectivement.

Dans la partie résultats et discussion, nous avons exposé et discuté les activités enzymatiques des α - amylases, des xylanases et des laccases produites par la moisissure *P.chrysogenum* ainsi que l'évaluation du désencollage de tissus par les amylases, puis le taux de saccharification de la poudre de maïs par les xylanases et enfin une clarification de jus par les laccases. Et pour clôturer, on a comparé les résultats avec des travaux similaires.

En fin, ce travail est achevé par une conclusion résumant l'ensemble des résultats obtenus qui confirment que *P.chrysogenum* a de bonne production enzymatique et que les enzymes amyliques, xylanolytiques et laccasiques ont un grand potentiel industriel . Sans oublier que nous pouvons obtenir des taux plus élevé des enzymes étudiées avec quelques changements liés au milieux de culture et certains conditions physico-chimiques qui améliorent la production et l'application à l'échelle industrielle.

Chapitre I : Revue bibliographique

I. Les moisissures

1 Définition

Les moisissures sont des champignons hétérotrophes microscopiques, eucaryotes pluricellulaires à croissance filamenteuse (hyphomycètes). Leur texture se diffère : duveteuse, laineuse, cotonneuse, veloutée, poudreuse, granuleuse . (Chabasse *et al.*, 2002)

Les moisissures produisent des structures de reproduction appelées spores ; celles-ci sont invisibles à l'œil nu. Elles peuvent également élaborer des substances chimiques susceptibles de demeurer à l'intérieur des spores, d'être libérées dans les matériaux qu'elles colonisent (ex. : enzymes, mycotoxines) ou encore d'être libérées dans l'air ambiant (ex. : composés organiques volatils). (D'Halewyn ,MA *et al.*, 2003)

2 Morphologie

Les moisissures sont des thallophytes, leur appareil végétatif est constituée de cellules allongées appelées hyphes ou thalles. Ces hyphes regroupent les organites classiques d'une cellule : noyau, mitochondrie, cytoplasme et vésicules. L'ensemble des hyphes constitue un réseau appelé « mycélium ». D'après Chabasse *et al.*, (2002), le thalle mycélien peut être cloisonné ou non cloisonné (figure 1) et on distingue :

- a) Le thalle siphonné ou coenocytique : il est constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifiées de diamètre large et irrégulier (5 à 15 μm en moyenne) et non cloisonné. Ces filaments caractérisent les champignons inférieurs (zygomycètes , chytridiomycètes).
- b) Le thalle septé ou cloisonné : il correspond aux champignons dits supérieurs (ascomycètes et basidiomycètes) et de deutéromycètes filamenteux. Ces filaments ont un diamètre étroit 2 à 5 micromètres et réguliers leurs bords sont parallèles ils sont divisés par des cloisons ou *septa* en articles uni ou pluricellulaires.

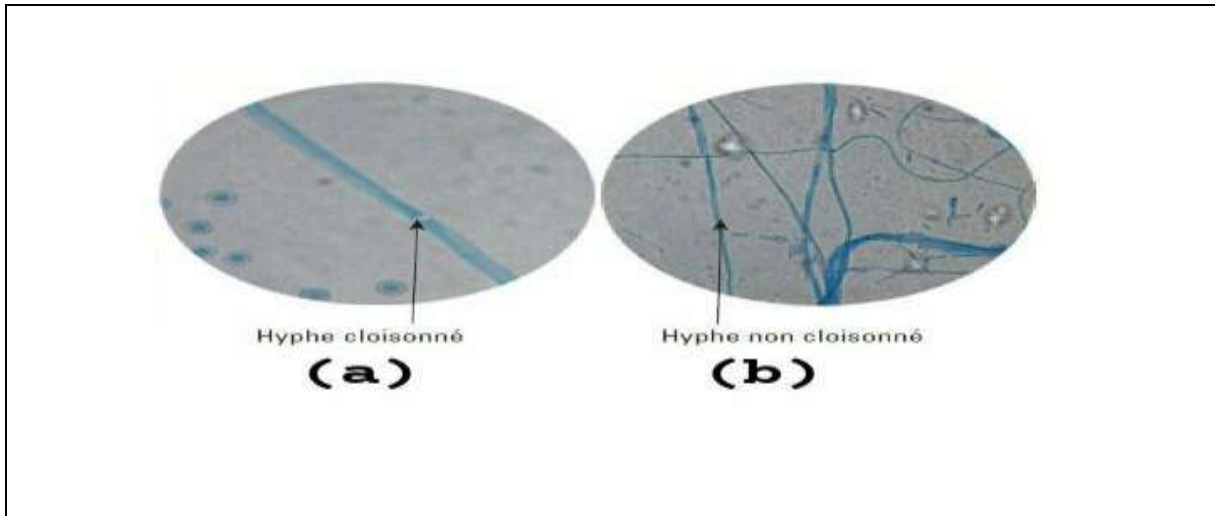


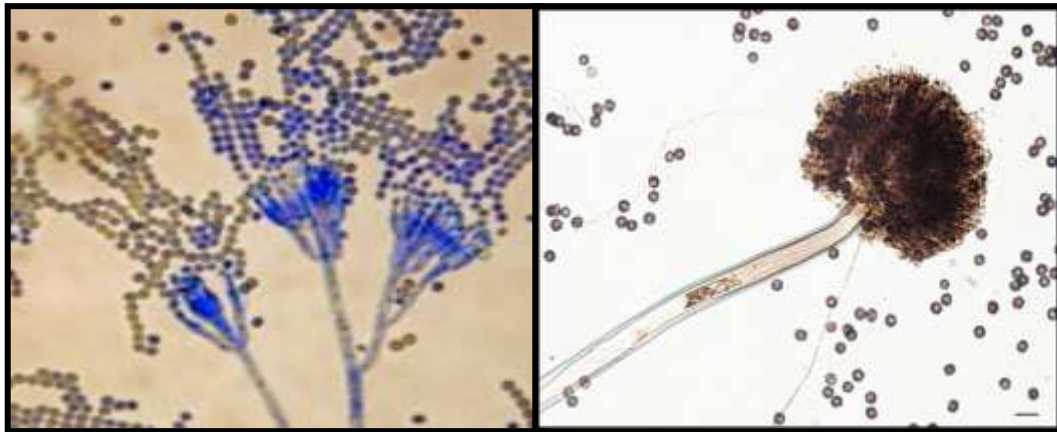
Figure 1 : Types de thalle chez les moisissures. Thalle cloisonné (a) et Thalle non cloisonné (b). (net 1)

3 Classification

La classification des moisissures est basée essentiellement sur la morphologie (structure de mycélium) et le mode de reproduction (sexuée ou asexuée). L'ensemble des moisissures était réparti en quatre ordres selon les modalités de reproduction sexuée : les mastigomycotina (chytridiomycotina), les zygomycotina, les basidiomycotina et ascomycotina. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la subdivision est appelée deuteromycotina ou *Fungi imperfecti* (Redouane-Salah .S , 2016).

3.1 Ascomycota

Le nom est dérivé des mots grecs "askos" (une bouteille, un sac ou une vessie en cuir) et "mykes" (un champignon) donc ascomycètes sont des champignons à sac. La caractéristique du groupe est que les spores produites sexuellement, les ascospores , sont contenus dans un sac « l'asque » (figure 2). Dans la plupart des ascomycètes l'asque contient huit ascospores.(Webster et Weber,2007).



(a)

(b)

Figure 2 : Quelques Exemples Des Ascomycètes. *Penicillium sp.*(a); *Aspergillus sp.*(b)

(Mukhtar *et al.*, 2006 ; Net 2)

3.2 Zygomycota

Un groupe qui comporte 1000 espèces, ce sont des moisissures microscopique très discrets à spores non flagellés, dans lesquels le thalle est coenocytique ou siphonné , avec de nombreux noyaux dans un même siphon (figure 3) (Bouchoukh .I ,2016).

La reproduction asexuée est par des spores appelées aplanospores parce qu'ils ne sont pas mobiles et les sporangiospores parce qu'ils sont généralement contenus dans sporanges (Webster et Weber ,2007) et la reproduction sexuée est une cystogamie qui aboutit à la formation de zygospores.



(a)

(b)

Figure 3 : Quelques Exemples Des Zygomycètes *Rhizopus sp.* (a) ; *Mucor sp.*(b) (Badiee *et al.*, 2012)

3.3 Chytridiomycota

C'est le type de champignons le plus primitif au mycélium peu ou pas cloisonné, ils sont caractérisés par la présence de spores munies de flagelles et la présence de chitine dans leur paroi et leur nutrition qui se fait par absorption (figure 4) (Chabasse *et al.*,2002).

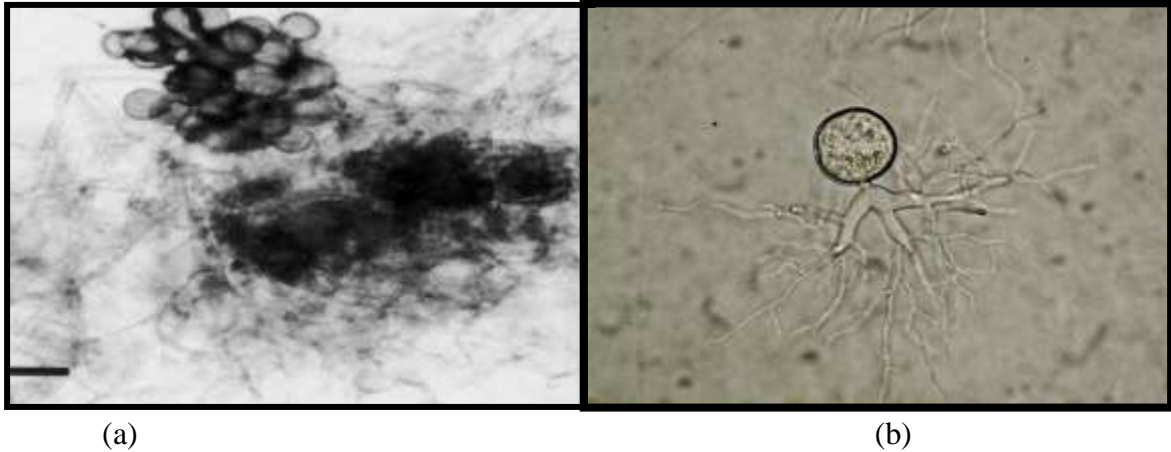


Figure 4 : Quelques exemples des chytridiomycètes *Piromyces sp.*(a) ; *Spizellomyces sp.* (b) (Natalija *et al.*, 2007 ; Net 3)

3.4 Basidiomycota

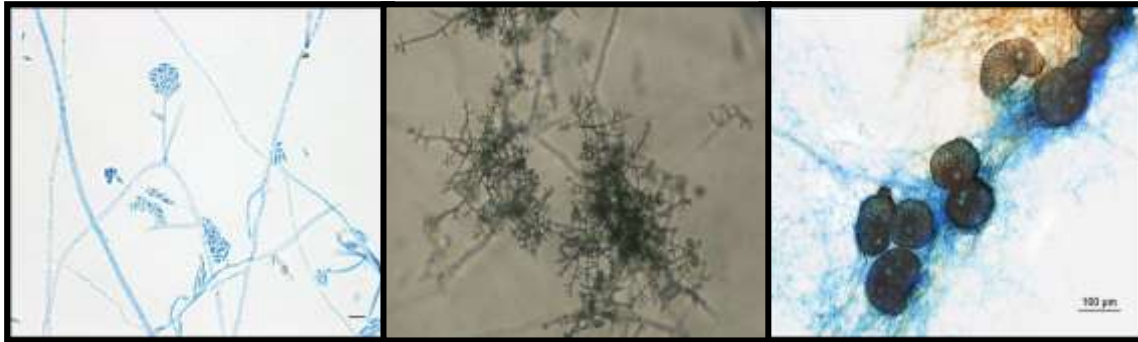
Ils sont caractérisés par la production de spores sexuées, appelées basidiospores, formées par bourgeonnement à l'apex de cellules allongées, les basides. Les basidiomycètes ont un thalle cloisonné avec présence de « boucles » au niveau des cloisons (figure 5) (Chabasse *et al.*,2002) .



Figure 5 : Quelques exemples des Basidiomycètes *Puccinia sp.*(a) ; *Gymnosporangium sp.*(b) (Jumpin ,2014 ; Net 4)

3.5 Deuteromycota

les deutéromycètes, aussi appelés « *fungi imperfecti* », sont des champignons filamenteux à thalle septé (Chabasse *et al.*,2002), leur identification est basée sur le mode de formation des spores (appelées :conidies) (figure 6) (Bex et al., 2006).



(a)

(b)

(c)

Figure 6 : Quelques Exemples Des Deuteromycètes *Phoma sp.*(a) ; *Fusarium spp.*(b) ; *Trichoderma sp.* (c) (Net 5;Net 6 ; Mitre y el campo ,2016)

4 La croissance

4.1 Cycle de vie

Le développement d'une colonie de moisissure débute toujours par la germination du spore qui donne naissance à un filament non différencié « hyphes » . L'élongation des hyphes aboutit à la formation d'un ensemble c'est le « mycélium ». Cet ensemble se ramifie à la suite pour donner le thalle des champignons (figure 7).

Dans les conditions favorables, le mycélium donnera naissance à des structures plus spécialisées, qui produiront des spores asexuées (conidies) ou plus rarement, des spores sexuées.

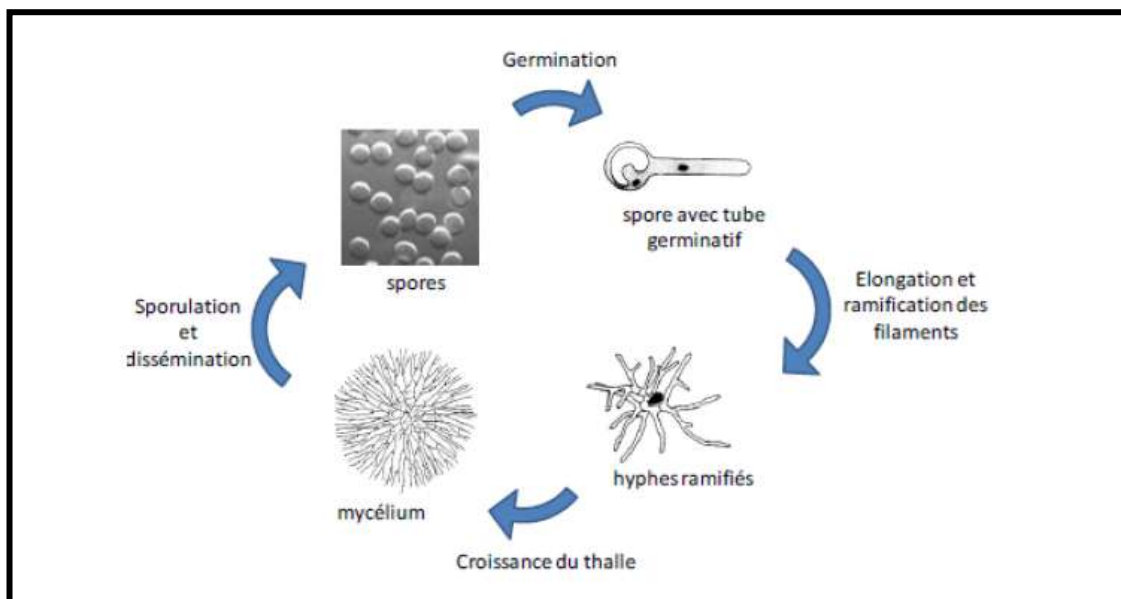


Figure7 : cycle de vie des moisissures (Net 7)

4.2 Conditions de croissance

4.2.1 Les nutriments

Les mycètes utilisent des substances organiques comme sources de carbone et d'énergie (Redouane-salah.S,2016). La plupart d'elles assimilent l'ammoniaque sous forme de sels (NH_4) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines) ; alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucun champignons filamenteux ne peut fixer l'azote atmosphérique (Bouderaoune .S ,2013).

La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire à la croissance et à la reproduction de plusieurs espèces fongiques, ce sont essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore dont les concentrations varient plus au moins d'une espèce à l' autre (Uchicoba *et al.*, 2001). Laib (2011) a montré que les moisissure ont des besoins de vitamines préformées, comme la thiamine et de la biotine, ainsi que des stérols, de la riboflavine, de l'acide nicotinique et folique .

4.2.2. Conditions physico-chimiques

Selon Redouane-Salah (2016), les moisissures sont des mésophiles qui tolèrent, une température de 5 à 40°C se développant mieux en milieu légèrement acide (croissance optimale à des pH entre 4 et 6) (Leyral .G et Vierling.E, 2001). La plupart sont aérobies ; certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix*.

(Bouderaoune .S ,2013). Les moisissures ont en général un faible besoin en eau par rapport aux autres microorganismes (Davet, 1996).

5 Écologie

Les moisissures sont des microorganismes ubiquistes qui peuvent coloniser presque tout les écosystèmes. Selon Delphine (2012) , leurs mode de vie est soit parasitisme ou symbiose ou bien saprophytisme.

5.1 Parasitisme

Certaines moisissures mènent une vie parasite vis-à-vis des substances organiques lorsqu'elle se développent sur du vivant. C'est le cas des espèces responsables de maladies sur les végétaux tel que l'oïdium blanc par *Erysiphe spp.*(Pearson *et al.*,1998) et les dermatophytoses chez l'homme tel que le genre *Trichophyton* .

5.2 Symbiose

Définie comme une association à bénéfice réciproque avec les autres organismes par exemple : *Mucor rammannianus* (Pierre.C *et al.*,2022).

5.3 Saprophytisme

Les espèces saprophytes se développent sur la matière organique inerte tel que *Penicillium chrysosporum* .

6 Importance Industrielle

Les moisissures jouent un rôle primordial dans les différents domaines grâce à leurs pouvoir enzymatique; dans l'industrie, elles sont indispensables à la décomposition de la matière, et à la préparation de nombreux produits issus de la fermentation.

6.1 **Industrie laitière** :la production de certains fromages et produits laitiers par exemple , dépend sur l'utilisation des moisissures telles que « *Penicillium camemberti* » et « *Penicillium roqueforti* ».

6.2 **Industrie pharmaceutique** : elles servent à la production de nombreuses molécules bioactive comme les vitamine (riboflavine produite par *Aspergillus oryzae*) les enzymes

(lipases; protéases; amylases...etc) et les antibiotiques (ex : la pénicilline par le genre *Penicillium*).

- 6.3 **Industrie des détergents** : c'est le plus grand utilisateur des enzymes industrielles employant des protéases, amylases et cellulase produites par les moisissures tel que *Penicillium sp.* pour la production des lessives <biologiques> (simon *et al.*,2005).
- 6.4 **Industrie des boissons** : la transformation des fruits donne de jus troubles ou de jus concentrés qui nécessite dans la plupart des cas un traitement enzymatique tel que les laccases de *Pycnoporus sanguineus* (Vikineswary *et al.*,2005).
- 6.5 **Domaine médical** : les dérivés synthétiques du l'ergot de seigle *Claviceps purpurea* sont utilisés comme médicament pour diverses maladies : ergotamine et dihydroergotamine traitent la migraine alors que la bromocriptine et lisuride traitent la maladie de Parkinson.
- 6.6 **Lutte biologique** : Certaines moisissures sont appliquées comme biofongicide. On prend l'exemple de l'utilisation du genre *Trichoderma* contre la moisissure grise dans la fraise « *Botrytis cinerea* »(Lambert ,2002).

II . Les enzymes

1 Généralités sur les enzymes

1.1 Définition et Nomenclature

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de poids moléculaire plus élevé associées éventuellement à des cofacteurs de petite taille. Ce sont des catalyseurs qui interviennent dans tous les processus de biosynthèse, de dégradation, de régulation et de reproduction (Benkahoul.M, 2018) et permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires.

Les enzymes sont caractérisés par des noms simples, des noms systématiques et des numéros de codes. Ces numéros de code, préfixés par EC, contiennent quatre éléments séparés par points, avec la signification suivante:

- Le premier chiffre indique laquelle des six divisions principales (classes) à laquelle appartient l'enzyme (Webb et Edwin, 1992), ou bien le type de réaction en jeu. (Benkahoul, 2018)
- La deuxième chiffre indique le type de groupement chimique ou de liaison concernée (la sous-classe).(Benkahoul, 2018)
- Le troisième chiffre détermine la nature précise des groupements chimiques en jeu ou les mécanismes réactionnels (la sous-sous-sous-classe).(Benkahoul, 2018)
- Le quatrième chiffre est le numéro de série de l'enzyme dans sous-classe.

Selon (Webb et Edwin, 1992); les principales divisions et sous-classes sont les suivantes :

- **Classe 1 Oxidoréductases** : à cette classe appartiennent toutes les enzymes catalysant des réactions d'oxydation. Le substrat qui est oxydé est considéré comme donneur d'hydrogène. Le nom systématique est basé sur donneur:accepteur oxidoréductase.
- **Classe 2 Transférases** : les transférases sont des enzymes transférant un groupe, par exemple, un groupe méthyle ou un groupe glycosyl d'un composé (généralement considéré comme donneur) à un autre composé (généralement considéré comme accepteur).
- **Classe 3 Hydrolases** : Ces enzymes catalysent le clivage hydrolytique de C—O, C—N, C—C et d'autres liaisons, y compris les liaisons anhydride phosphorique. Bien que le nom

systematique inclut toujours l'hydrolase, le nom recommandé est dans de nombreux cas formé par le nom de la substrat avec le suffixe-ase. En principe, tous les enzymes hydrolytiques peuvent être classés comme des transférases, puisque l'hydrolyse elle-même peut être considérée comme un transfert d'un groupe spécifique à l'eau comme accepteur.

- **Classe 4 Lyases :** les lyases sont des enzymes qui fendent C—C, C—O, C—N et d'autres liaisons par élimination, en laissant des doubles liaisons ou des anneaux, ou inversement en ajoutant groupes de doubles liaisons. Le nom systématique est formé en fonction du substrat de motif groupe-lyase. Le trait d'union est une partie importante du nom, pour éviter toute confusion.
- **Classe 5 Isomérasés :** ces enzymes catalysent des changements géométriques ou structurels au sein d'une molécule.
- **Classe 6 Ligases :** les ligases sont des enzymes catalysant l'union de deux molécules couplées à l'hydrolyse d'une liaison pyrophosphate dans l'ATP ou un triphosphate similaire. Les noms systématiques sont formés sur le système X:Y ligase (ADP-formant).

1.2 Importance des enzymes

Les enzymes sont des molécules très importantes pour l'écosystème en générale et pour les êtres vivants en particulier. Aucune opération cellulaire ne peut se faire sans eux; ils sont utilisées dans de nombreuses industries, notamment la boulangerie (amylase par *Penicillium expansum*), la fabrication du fromage (lipase par *Penicillium camemberti*) (El-Gendi *et al.*, 2022), elle sont aussi très utile pour la santé humaine (enzymes digestives telles que l'amylase et protéase par *Penicillium sp.* (Glover-Bondeau, 2020), et pour la préparation des aliments des animaux (cellulases de *Penicillium simplissium*) (Mukesh *et al.*,2018). Pour les plantes elles sont utilisées dans le traitement des fruits et légumes (exemple d' amylase produites par *Aspergillus sp*) (Simon *et al.*,2005).

Récemment les moisissures ont été utilisés pour la production de plus de 50 % des enzymes nécessaires ce qui donne une grande chance de produire en quantité importante à faible coût .(El-Gendi *et al.*,2022).

1.3 Sources d'enzymes

Les enzymes sont obtenus de plusieurs sources animales, végétales et microbiennes (Net 8) (figure 8)

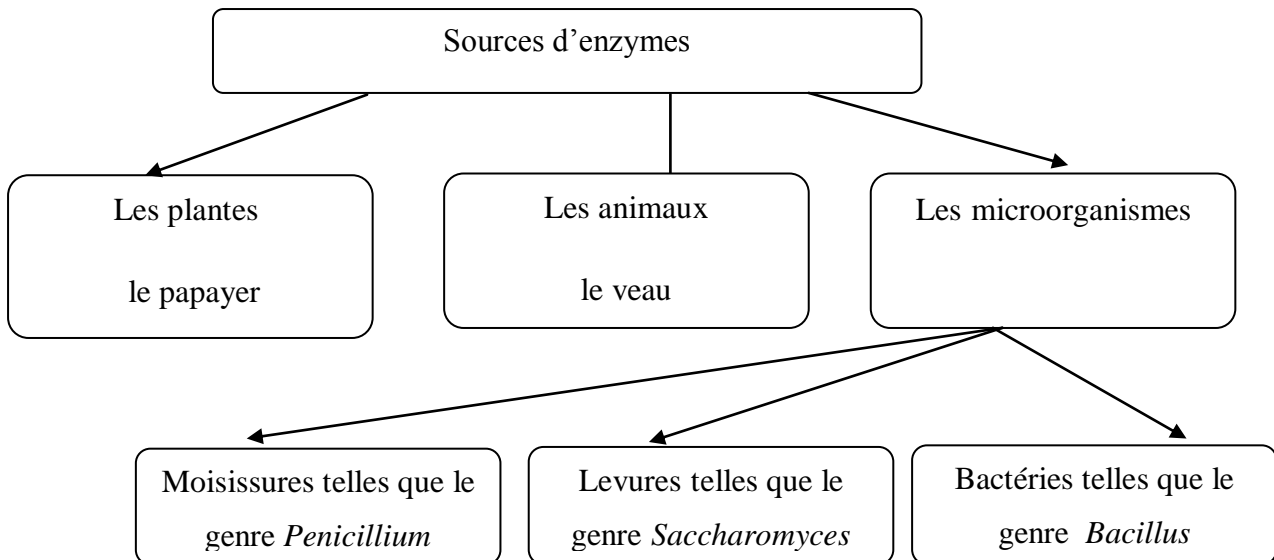


Figure 8: Différentes sources d'enzymes (Net 8)

2 Enzymes fongiques

les enzymes fongiques sont largement utilisés dans les différentes industries à cause de certains avantages tels que la productivité élevée à faible coût, car leur production peut se faire en consommant un substrat bon marché qui sert de source de carbone (Singh *et al.*, 2019) et leurs exigences de purification et de séparation sont plus faciles ce qui aboutit à une réduction de la consommation d'énergie et du temps de travail (Jyostna *et al.*, 2019).

Selon El-Gendi *et al.*, (2022) ; la production d'enzymes fongiques est plus rapide, rentable, évolutive, se prête aux manipulations génétiques et donne des enzymes qui ont une catalyse efficace avec la stabilité souhaitée dans des conditions difficiles.

Quelques espèces d'*Aspergillus*, *Trichoderma*, les genres *Rhizopus* et *Penicillium* qui répondent aux exigences à l'échelle commerciale pour la production d'enzymes représentent concurrent prometteur dans cette production en termes de productivité supérieure et de coût d'investissement inférieur (El-Gendi *et al.*, 2022).

3 Domaines d'application des enzymes fongiques

De nos jours, les enzymes fongiques interviennent dans de nombreux domaines de fabrication agro-alimentaire, industrie médicale et pharmaceutique et dans les détergents et papiers.

3.1 Applications agroalimentaires

Aujourd'hui la plupart des applications pour les enzymes industrielles se trouvent dans l'industrie alimentaire. Parmi ces applications on peut citer les suivantes (Simon et Barry, 2005) :

3.1.1 Panification

Le procédé de panification (pain, pâtes, biscuits,...etc) nécessite une véritable présence enzymatique pour assurer une bonne qualité du pain et leur multiples formes.

À la fin du XIXe siècle, des enzymes exogènes sous forme de malt étaient ajoutées à la farine et à la pâte pour contrôler et faciliter le processus de fabrication du pain dans les boulangeries commerciales naissantes. Exp: α -Amylase produite par *Aspergillus sp* (Majsov.KD,2016) .

Ces enzymes sont ajoutées en quantités très faibles (entre 10 et 100 g/tonne de farine). (Boudoukha, 2017)

3.1.2 Boissons

La première utilisation des enzymes industrielles dans l'industrie des boissons remonte aux années 1930, pour la clarification du jus de pomme trouble (Simon et Barry,2005).

La transformation des fruits en jus clairs, en jus troubles ou en jus concentrés nécessite dans la plupart des cas un traitement enzymatique comme celui des laccases produites par *Penicillium chrysogenum* (Senthivelan *et al.*, 2019).

3.2 Applications médicales et pharmaceutiques

D'un point de vue analytique et thérapeutique, les enzymes sont de plus en plus utilisées dans le domaine médical (isabelle, 1986).

Entant que molécules qui visent à faciliter et accélérer des réactions chimiques, les enzymes pancréatiques sont utilisées depuis le XIXe siècle pour le traitement des troubles digestifs (Boudoukha, 2017). La grande diversité et la spécificité des protéases sont les avantages qui permettent d'utiliser ces enzymes pour le développement de médicaments thérapeutiques

efficaces. Par exemple, la protéase de *A.oryzae* est utilisée pour faciliter la digestion; la Collagénase de *Clostridium spp.* en combinaison avec la subtilisine traitent les brûlures, les plaies et les ulcères cutanés. Avec des antibiotiques et la brinase (une protéase acide) hydrolyse la fibrine et Fibrinogène chez les patients hémodialysés (Belmessikh ,2010).

3.3 Applications industrielles

3.3.1 Les détergents

L'industrie des détergents est actuellement la plus grande utilisatrice d'enzymes industrielles, en employant des protéases, des lipases, amylases et cellulases, surtout pour la production des lessives <biologiques >. Ces enzymes décomposent rapidement ou libèrent les souillures qui ne sont éliminées qu'à des températures beaucoup plus élevées ou par l'action de plus grandes quantités de détergents chimiques sur une période plus longue (Simon et Barry,2005).Exp: la cellulase de *Trichoderma sp* (Ejaz *et al.*, 2021).

3.3.2 Les papiers

Les enzymes produites par les moisissures (les laccases de *Penicillium sp.*) ont la capacité de dégrader la lignine du bois, et donc de blanchir la pâte à papier. Cette capacité leurs permet de remplacer les produits chlorés et polluants actuellement utilisés. Dans l'étape de blanchiment, l'utilisation de xylanase de *Aspergillus sp.* comme un alternatif permet non seulement d'augmenter le degré de blanc de la pâte mais aussi d'éviter le chlore, de réduire les déchets toxiques et de diminuer les coûts de l'opération. L'étape de désencrage nécessite la réutilisation des fibres issus de la fabrication de papier et de carton; ces fibres sont traités par les lipases (de *Penicillium sp.*) et les estérases qui dégradent les encres à base d'huiles végétales; puis par les pectinases (de *Aspergillus sp.*), les hemicellulases, les cellulases (de *Trichoderma sp.*) et les enzymes lignitiques qui modifient la surface de la fibre de cellulose et libèrent son teinture de la fibre (Boudoukha, 2017).

3.3.3 Désencollage de textile

Les traitements enzymatiques sont très utilisés à l'industrie de textile pour de nombreuses raisons: ils sont non toxiques, efficaces en petites quantités, respectueux de l'environnement et économes en ressources (eau, énergie). Les enzymes interviennent à toutes les étapes de la fabrication textile, exemple l'utilisation des amylases comme alternative écologique au

désencollage chimique pour le désencollage des tissus en coton. La principale application des amylases dans l'ennoblissement textile est le désencollage, qui implique l'élimination de l'amidon en hydrolysant les molécules d'amidon en petits fragments qui peuvent être facilement lavés ou dissous dans de l'eau chaude (Boudoukha, 2017).

4 Genres producteurs d'enzymes fongiques

La plupart des enzymes fongiques qui ont un intérêt industriel sont produites par des moisissures du genre: *Trichoderma*, *Aspergillus* et *Penicillium* et sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Quelques Genres producteurs d'enzymes fongiques.

Genre	Enzymes produites	Références
<i>Trichoderma sp.</i>	Alpha galactosidase Betta mannanase Cellulase Laccase Pectine methyl esterases Xylanase	(Kunamneni <i>et al.</i> , 2014)
<i>Aspergillus sp.</i>	Beta glucanase Cellulase Lipase Pectinase Pectinesterase Protease α -Amylase Amylase Glucose oxydase Xylanas	(Majsov, 2016) (Singh,2016)

<i>Penicillium sp.</i>	Beta glucosidase	(Singh, 2018)	
	Cellulase		
	Hemicellulase		
	Pectinase		
	Xylanase		
	α -Amylase		
	Laccase		(Meena <i>et al.</i> , 2018)
	Protéases		
	Lipases		
	Invertase		

5 *Penicillium chrysogenum*

5.1 Généralités

Les *Penicillium*, groupe de moisissures appartiennent à la classe des hyphomycètes (thalle entièrement mycélien), sont considérés comme deutéromycètes ou *fungi imperfecti*.

Ce genre comprend entre 100 et 250 espèces leur nom *Penicillium* vient du latin « penicillus » pour signifier pinceau, en raison de la structure des têtes conidiennes.

Ces moisissures se multiplient généralement de manière végétative (conidiogénèse) en produisant sur des parties aériennes (conidiophores) des spores non sexuées (conidies) (Correia, 2011). Généralement; les espèces du genre *Penicillium* se différencient par la couleur des colonies, les sécrétion des pigments, l'organisation des conidiogènes, la taille et la forme des conidies et la vitesse de croissance en conditions standardisées (figure 9).

Penicillium chrysogenum également connu sous le nom de *Penicillium notatum*. se caractérisent par un stipe lisse , une ramification terverticillé des pinceaux, des conidies subglobuleuses à ellipsoïdes lisses leurs taille et de 2.5-4 *2.2-3.5 μ m. Son caractère particulier est la présence des exsudats jaunes (BEX *et al.*, 2006).

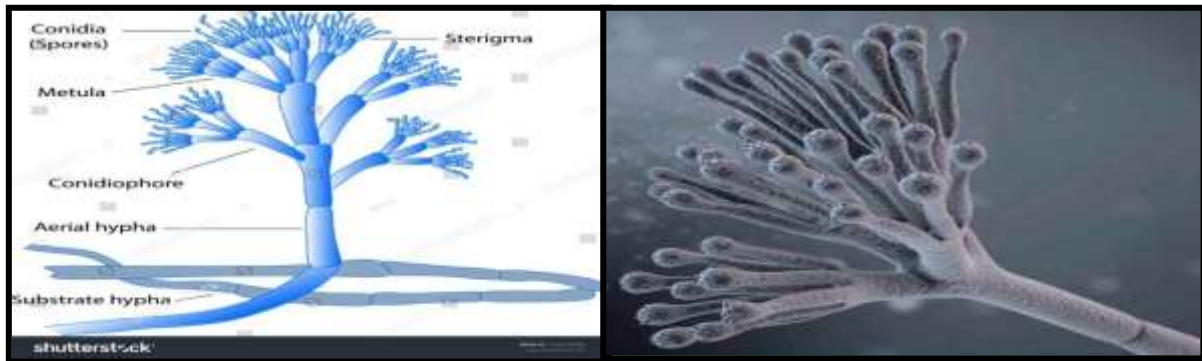


Figure 9 :Aspect microscopique de *Penicillium chrysogenum* (Laronzo *et al.*,2020;Net 9)

5.2 Classification de *P. chrysogenum*

La classification la plus récente de cette espèce a été déterminée par le centre national d'information sur la biotechnologie (NCBI) en 2020 comme suite :

Règne : Fungi

Embranchement : Ascomycota

Classe : Eurotiomycetes

Ordre : Eurotiales

Famille : Aspergillaceae

Genre : *Penicillium*

Espèce : *Penicillium chrysogenum*

5.3 Exemples des Enzymes produites par *Penicillium chrysogenum*

Grace à son importante et diverse production d'enzymes ; *Penicillium chrysogenum* est une espèce fongiques largement utilisée notamment dans le domaine industriel.

Le tableau 2 représente quelques enzymes produites par cette espèce et leurs applications :

Tableau 2 : Enzymes produites par *Penicillium chrysogenum*

Enzyme	Applications
Protéases	<ul style="list-style-type: none"> - Elimine la brume dans le vin et la bière, - Améliore le volume et la texture du pain, de la viande attendrissemen (mukesh <i>et al.</i>, 2018) - Industrie alimentaire et application médical et pharmaceutique : détergents et cuire (Hamid, 2006).

<p>Xylanase (endoxylanase et exoxylanase)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Additifs alimentaires pour volailles - Dans de la farine de blé pour améliorer la manipulation de la pâte et la qualité de la cuisson. - Extraction de café, huiles végétales et l'amidon. - L'amélioration des propriétés nutritionnelles de ensilage agricole et alimentation céréalière. (mukesh <i>et al.</i>, 2018) -Améliorer l'assimilation des nutriments des volailles. -Elimination de lignine blanchiment biologique (papeterie) (simon et barry, 2005).
<p>Glucose-oxydase</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Elimination du glucose de blanc d'œuf avant séchage dans l'industrie de la boulangerie. - Réducteur non enzymatique brunissement des vins et mayonnaises. - conservateurs et antioxydants dans les industries alimentaires (Mukesh <i>et al.</i>,2018) -Agent antimicrobienne. - Industrie des Textiles. - Application médicale et pharmaceutique. - Industries de production d'aliments pour oiseaux. -Utilisation dans les soins dentaires et Utilisation pour améliorer la production de biocarburants.(Seyyed <i>et al.</i>,2021)
<p>β-D-Galactosidases (Lactase)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Aliments pour animaux - Source de sucre pour plusieurs produits de fermentation (Mukesh <i>et al.</i>,2018).
<p>α-D-Galactosidase (Melibiase)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Hydrolyse des sucres du lait et transformation des produits du soja. (Mukesh <i>et al.</i>,2018)
<p>α-Amylase β-Amylase Exo-1,4-α-glucosidase</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Préparation de glucose et sirops de maltose, maltodextrines (Mukesh <i>et al.</i>,2018). - Dégradation de l'amidon, convention de l'amidon en glucose. - Elimination des troubles d'amidon en jus. - Désencollage des textiles.

II. Les enzymes

	- Utiliser en contrôle de procédé en boulangerie. (Simon et Barry, 2005).
Lipase	-Utile pour rehausser les saveurs dans le lait et autres produits laitiers des produits (Mukesh <i>et al.</i> , 2018) et détergents (Simon et Barry, 2005).
Invertase	- Préparation de miel artificiel et confiture et de bonbons, confiserie alimentaire. (Mukesh <i>et al.</i> , 2018)
Cellulase	- L'agriculture -La brasserie - La blanchisserie - Industrie des textile, les pâtes et papiers - Jus de fruits -Extraction d'huile d'olive -Industrie du vin et détergents (Abdelaziz <i>et al.</i> , 2021) -Aliments pour animaux et bioprocédés d'alimentation et la conversion de biomasse (Mukesh <i>et al.</i> ,2018).

Chapitre II: Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Les enzymes fongiques sont largement utilisées dans diverses industries à cause de leurs activités spécifiques qui permettent de faciliter et accélérer les réactions; en raison de cette valeur nous avons étudié, dans cette partie, la production et l'application de certaines enzymes: α -amylases, xylanases et laccases par la moisissure *Penicillium chrysogenum*. Cette dernière reconnue en tant qu'une bonne productrice d'enzymes.

- Premièrement, on a synthétisé les travaux de Jyostna *et al.*, (2020) qui consistent à produire l' α - amylase par *P. chrysogenum*.
- Ensuite, on a suivi les travaux de Kalia *et al.*, (2020) qui s'intéressent aux traitements des tissus par l' α - amylase dans le processus de désencollage comme application.
- Deuxièmement, on a suivi le protocole d'Ullah *et al.*, (2019) pour la production des xylanases par *P. chrysogenum*.
- Puis on a choisis d'étudier, pour cette enzyme, le traitement de la poudre de maïs expérimenté par Zhang *et al.*, (2015).
- Troisièmement, on a suivi le protocole de production des laccases décrit par Senthivelan *et al.*, (2019).
- Finalement, en se basant sur les travaux de Gassara *et al.*, (2013), on a traité une application de laccase dans la clarification du jus.

1 α -Amylase

1.1 Production

Penicillium chrysogenum est cultivé sur 50 ml du milieu SYE liquide composé de 0,5 g amidon soluble, 2 g extrait de levure, 1 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄ 7H₂O dans un 1000 ml d'eau distillée; la culture est incubée pendant 7 jours à pH 7 et température de 30°C avec le glucose comme source de carbone et le sulfate d'ammonium comme source d'azote (Jyotsna *et al.*, 2020).

1.2 Récupération des extraits enzymatiques

Les cultures après fermentation sont filtrées puis centrifugées et les surnageants clairs obtenus sont utilisés pour mesurer l'activité de l'amylase.

1.3 Dosage de l'activité amylasique

L'activité de l'amylase est estimée en mesurant les sucres réducteurs libérés lors de l'hydrolyse de 1% (p/v) d'amidon dans un tampon phosphate 0,1M (pH 6,5) en utilisant la méthode à l'acide dinitrosalicylique pendant 20 min à 25°C. Puis, l'absorbance est suivie à une longueur d'onde de 700 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une unité d'activité amylasique est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1µmol de sucres réducteurs sous forme de glucose par minute dans les conditions du test. L'activité enzymatique est exprimée en activité spécifique, exprimée en U/mg de protéine (Jyotsna *et al.*, 2020).

1.4 Quantification des protéines

Les concentrations de protéines sont déterminées par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) qui permet le dosage des protéines en utilisant de l'albumine de sérum bovin (SAB) comme standard. le protocole suivi par Settouti *et al.*, (2017), sert à préparer une gamme d'étalonnage de 6 tubes SAB s'étalant régulièrement de 0 à 0,5 g/l à partir d'une solution de SAB à 0.5 g/l. Puis l'ajout de 5 ml de solution réactive (Annexe 1) dans tous les tubes, agiter et attendre 10 min à température ambiante. En suite, 0,5 ml de réactif de Folin est ajouté dans tous les tubes avec une agitation immédiate de chacun et laisser la coloration se développer pendant 30 min à l'obscurité. Enfin, lire l'absorbance contre le blanc de gamme à 630 nm.

1.5 Traitements des tissus par les amylases

Dans le processus de désencollage, le tissu de coton gris d'une grande industrie textile a été traité avec de l' α -amylase dans une machine de teinture à infrarouge (IR). Les tissus gris (8*8 cm) ont été plongés dans la solution d'enzyme avec un agent mouillant 1g/l et du CaCl₂ 5 g/l. Le ratio solide/liquide a été maintenu à 1:30 et la concentration d' α -amylase était de 1% sur le poids des tissus.

Le processus de désencollage a été réalisé à 80°C pendant 45 minutes. Après cela, les tissus ont été soumis à un lavage à chaud à 95°C pendant 10 min suivi d'un lavage à froid à 30°C pendant 10 minutes. Les tissus ont été séchés dans un four à air chaud. Le degré de résidus d'amidon sur le tissu a été évalué par l'échelle TEGEWA où 1 indique une absence d'élimination de l'amidon et 9 indique une élimination complète.

La solution d'iode a été préparée en dissolvant 10g d'iodure de potassium dans 100 ml d'eau, avec 0,65 g d'iode et agitée jusqu'à dissolution complète. La solution a été complétée jusqu'à 800 ml avec de l'eau distillée, puis avec de l'éthanol pour atteindre 1 litre.

Les échantillons de tissu désencollés ont été placés dans la solution d'iode pendant 1 min, puis rincés avec de l'eau froide, tamponnés avec du papier filtre et comparés immédiatement avec l'échelle violette. Les résultats de l' α -amylase produite ont été comparés à ceux de l' α -amylase utilisée dans l'industrie textile et de l' α -amylase purifiée (RM638 Hi-Media). (Kalia *et al.*, 2021)

2 Xylanases

2.1 Production

La production d'enzymes a été réalisée dans des fioles coniques contenant 50 ml de milieu liquide contenant 0,7% KH_2PO_4 , 0,2% K_2HPO_4 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,16% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ complété par 1% (p/v) de résidus agricoles (paille de canne à sucre ou bagasse de canne à sucre, écorce d'orange) comme sources de carbone. La culture est incubée à 28°C avec une agitation constante de 120 rpm pendant 10 jours (Ullah *et al.*, 2019).

2.2 Récupération des extraits enzymatiques

Des aliquotes ont été collectées chaque 24 heures d'incubation. Ces derniers sont filtrés et centrifugés à 10 000 g pendant 10 min à 4°C pour obtenir le surnageant puis l'utiliser pour estimer l'activité enzymatique et la concentration de protéines (Ullah *et al.*, 2019).

2.3 Dosage enzymatique

L'activité xylanase est évaluée en utilisant 2% (p/v) de carboxyméthylcellulose (CMC) et 1% (p/v) de xylane d'avoine et d'épeautre comme substrats. Les dosages enzymatiques sont standardisés en utilisant des échantillons de 0,05 ml mélangés à 0,1 ml de substrat (tampon d'acétate de sodium 0,05M pH 5,0). L'hydrolyse est réalisée à 40°C pendant 30 minutes et la réaction est arrêtée en ajoutant 0,3 ml de réactif acide dinitrosalicylique. Les sucres réducteurs ont été mesurés à 540 nm dans un spectrophotomètre. Une unité d'activité xylanase est exprimée comme la quantité d'enzyme libérant une micromole de sucres réducteurs par

minute de réaction, en utilisant le xylose comme étalons, une micromole par millilitre d'enzyme (μ /ml) Ullah *et al.*, 2019).

2.4 Quantification des protéines

Les concentrations de protéines ont été déterminées par dosage de Bradford (Bradford *et al.*, 1976). Le protocole suivi par Guachi *et al.*, (2021) consiste à utiliser le bleu brillant de Coomassie G-250 (CBBG-250) comme réactif et l'albumine de sérum de bovin 1mg/ml comme standard. Une gamme d'étalonnage de 6 tubes est préparée à partir d'une solution mère de SBA (1mg/ml). 4ml de réactif Bleu Brillant de Coomassie (BBC) (Annexe 2) qui utilise le CBBG-250 comme réactif sont additionnés à 100 μ l de l'extrait. La lecture est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc.

2.5 Traitement de la poudre du maïs par les xylanases

La poudre d'épis de maïs (CCP) a été prétraitée à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (1% p/p) et d'une solution aqueuse d'ammoniac à 15% en poids respectivement.

La bouillie de CCP (10% p/v) dans une solution d'hydroxyde de sodium est autoclavée à 121°C pendant 1heure. La suspension de CCP (10% p/v) préparée avec une solution aqueuse d'ammoniaque est placée dans une bouteille de laboratoire à bouchon à vis (bouteilles en pyrex) et incubée dans un bain-marie à 60°C pendant 12heures sans agitation. Après le prétraitement, la CCP est lavée et filtrée avec de l'eau double distillée jusqu'à neutralité puis séchée dans un four à 80°C pendant 24 heures.

La saccharification enzymatique a été réalisée dans des flacons de 250ml et chaque mélange réactionnel était composé de 50ml de tampon d'acétate de sodium (50mM, pH 4,8), 1.0g de CCP (non traité et prétraité) et la solution de xylanase brute 2500U/g de CCP sec.

La réaction a été réalisée au bain-marie à 50°C pendant 24h avec une légère agitation. Chaque système de réaction a été enrichi avec de l'azide de sodium à 1% pour éviter toute contamination. Le contrôle de chaque mélange réactionnel a été effectué en remplaçant les enzymes brutes actives par des enzymes inactivées par la chaleur (100°C, 10 min). Le sucre réducteur de chaque mélange réactionnel a également été estimé par la méthode (DNS). Le xylose a été estimé par la méthode du phloroglucinol (Zhang *et al.*, 2015).

3 Laccase

3.1 Production

La production des laccases est effectuée par *Penicillium chrysogenum* sur un agitateur rotatif à 120 rpm, à 32°C, pH 5.5, pendant 5 jours d'incubation dans 50ml du milieu de culture avec les composants suivants (g/l): glucose 20g ; peptone 5g ; tartrate d'ammonium 10g ; extrait de levure 1g ; KCl 0,5g ; KH₂PO₄ 1g ; MgSo₄.7H₂O 0,5 g ; CuSo₄.5H₂O 0,25g (Senthivelan *et al.*, 2019).

3.2 Récupération des extraits enzymatiques

Après l'incubation, Les cultures sont filtrées et centrifugées à 10000 rpm pendant 10 min et les surnageants claires obtenus sont utilisés pour doser l'activité enzymatique.

3.3 Dosage de l'activité laccase

L'activité laccase est mesurée par spectrophotométrie en utilisant le guaiacol comme substrat. Le mélange réactionnel est composé de 3ml de 100 mM de guaiacol dissous dans de l'acétone à 10% dans un tampon d'acétate de sodium et 1ml de filtrat de culture. Le mélange a été incubé pendant 15 min et l'absorbance a été enregistrée à 470 nm. Une unité d'activité de laccase a été définie comme la quantité d'enzyme catalysant le substrat (guaiacol) pour la production de 1 ml de laccase par min et par ml du milieu (Senthivelan *et al.*, 2019).

3.4 Traitement du jus par les laccases

Pour chaque expérience, environ 4ml de jus mélangé de baie et de grenade sont soumis au traitement enzymatique par les laccases pendant 5 heures à température ambiante (Gassara-Chatti *et al.*, 2013).

3.5 Analyses physico-chimiques du jus

3.5.1 Polyphénols

La teneur en polyphénols totaux dans le jus avant et après le traitement enzymatique est déterminée par la méthode de Swain et Hillis, (1959) où une aliquote appropriée de la solution à analyser, contenant au maximum 0,5ml de méthanol ou d'éthanol, est diluée avec de l'eau jusqu'à environ 7ml dans une éprouvette graduée de 10ml. Le contenu est bien mélangé, 0.50ml de réactif de Folin-Denis est ajouté et les tubes sont à nouveau agités. Exactement 3min plus tard, 1ml de solution saturée de carbonate de sodium est ajoutée et le mélange est

complété à 10ml avec agitation. Après 1heure, l'absorbance est déterminée à 725 nm en utilisant comme blanc uniquement de l'eau et des réactifs et comme standard l'acide gallique. Si la solution est trouble ou s'il se forme un précipité, il faut la filtrer ou la centrifuger avant de procéder aux mesures (Swain *et al.*, 1959).

3.5.2 Clarté et couleur

La clarté du jus avant et après le traitement avec l'enzyme est étudiée en mesurant l'absorbance à 650 nm et la couleur est détectée par la mesure de l'absorbance à 420 nm. (Gassara-Chatti *et al.*, 2013).

Chapitre III: Résultats et discussions

Notre travail théorique a été conduit dans le but d'étudier des enzymes d'intérêt industriel produites par *Penicillium chrysogenum*. La structure de ce chapitre se base sur l'étude de la production d' α -amylases, de xylanases et de laccases par la souche choisie et quelques exemples de leurs applications industriels. Les résultats obtenus sont récapitulés ces dessous.

1 α -Amylases

1.1 Production

Les résultats présentés par Jyotsna *et al.*, (2020) ont révélé que *P.chrysogenum* a une production d' α -amylase de 8.5U/mg après 7 jours d'incubation à 30°C sur un milieu optimisé. Meziani *et al.*, (2017) ont constaté une activité de 28.28U/l après 5 jours de fermentation de *P. chrysogenum* sur un substrat solide (son de blé) à pH 5 et température 40°C. Le son de blé, additionné de la farine d'huile de tournesol (SOM) et le tourteau de betterave à sucre (SBOC) comme substrat et le galactose (1% p/p) comme source de carbone, est aussi utilisé comme substrat de fermentation par Ertan *et al.*, (2006) qui ont rapporté que l'activité enzymatique maximale de *P. chrysogenum* était de 944U/gds dans des conditions d'humidité initiale de 75% un niveau d'inoculum de 20%, une période d'incubation de 7 jours à 30°C. Notant ici, que les résultats sont distincts et c'est dû à la différence de milieu de production et de substrat qui a influencé la production des amylases .

1.2 Application des amylases dans le désencollage des tissus

Le désencollage consiste à éliminer les produits d'encollage présents sur le tissu à fin de renforcer les fibres pour éviter leurs cassures lors du passage par les différentes machines. Ces produits sont constitués d'amidons, d'agents mouillants et de lubrifiants, nous avons choisi les α -amylases de *Penicillium chrysogenum* en raison de leur action écologique efficace et spécifique, ce qui en fait de meilleurs traitements des textiles.

L'analyse du tissu désencollé indique l'intensité de la couleur bleue avec le réactif iodé ce qui signifie l'efficacité de l'élimination de l'amidon du tissu gris. L' α -amylase produite a montré un indice de 7 à 8, tandis que l'amylase purifiée (Hi Media) et l'amylase industrielle ont obtenu une note de 9. Les résultats de l' α -amylase produite et de l'amylase purifiée (Hi-media) était presque similaire. Cependant, le tissu traité avec l' α -amylase produite présentait une tache de couleur foncée en raison de la couleur de l'extrait enzymatique (Figure 10) (Kalia,S *et al.*, 2021). Ces résultats sont les plus élevées, dues à la

compétence de la souche productrice, en comparaison avec Aggarwal *et al.*, (2019) qui ont traité le tissu de coton gris par deux amylases; la première isolée de *Aspergillus sp.* et la deuxième était une enzyme commercialisée. Les résultats obtenus à 70°C , pH 5.5 et 45 minutes du traitement ont indiqué que l'enzyme isolée présente un indice de 5-6 alors que l'enzyme commercialisée présente un indice de 7 sur l'échelle de TEGEWA ce qui montre l'efficacité du processus de désencollage de tissu de coton gris en utilisant l'amylase. Rochman et Mauliza (2019) ont utilisé une amylase produite par *Aspergillus sp.* Ils ont montré que cette enzyme élimine elle aussi efficacement l'amidon contenu dans les tissus de coton associée d'une réduction de poids de 7,24% à pH 7 et température 70°C pendant 70min du traitement. Cette réduction signifie l'élimination d'amidon et donc l'efficacité du processus de désencollage.

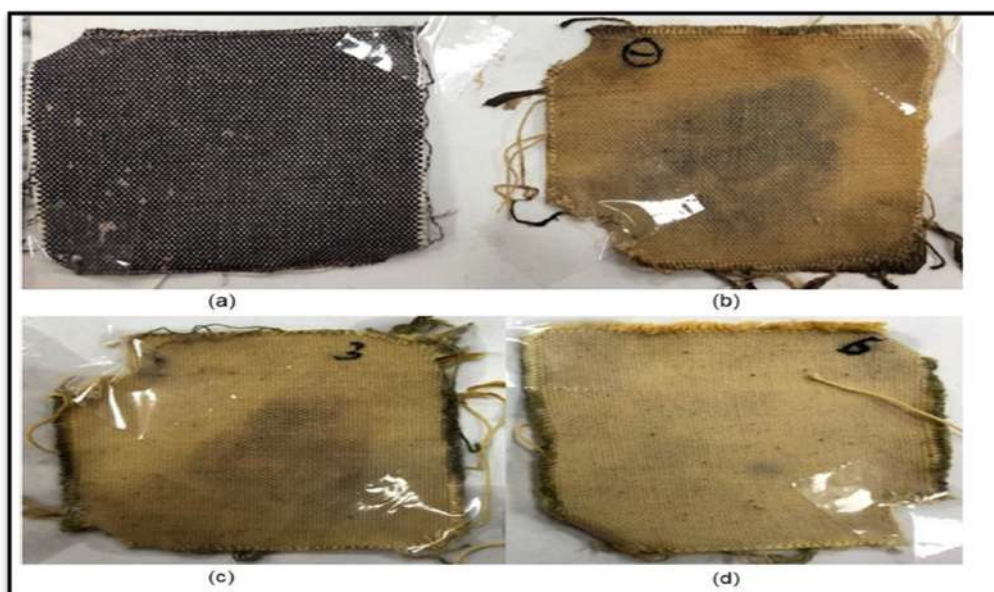


Figure 10 : Tissus désencollés par l'amylase à des concentrations d'enzyme de 1% sur le poids du tissu (p.p.a.) (a) contrôle (sans enzyme), (b) 1% amylase produite, (c) 1% amylase purifiée (Hi-Media) et, (d) amylase industrielle à 1 % (Kalia,S *et al.*, 2021).

2 Xylanases

2.1 Production

P. chrysogenum a montré une activité xylanolytique après quatre à dix jours de croissance dans tous les substrats complexes testés (biomasse). Les valeurs d'activité maximales étaient

de 1,081U/ml et de 0,940U/ml en présence de paille de canne à sucre et de bagasse de canne à sucre, respectivement, après quatre à dix jours de croissance (Ullah *et al.*, 2019).

On peut considérer ces activités comme relativement faibles en comparaison avec les travaux de Terron *et al.*, (2018) et Debbache *et al.*, (2019). La culture de *P. chrysogenum* a été réalisée dans différents glucides (Glucose, xylose, CM-cellulose, xylane d'épeautre d'avoine, drêche de brasserie, épis de maïs moulus, son d'avoine, écorce d'orange, bagasse de canne à sucre, son de blé), la production de xylanase la plus élevée est observée avec le son d'avoine (4,56U/ml) et des niveaux intermédiaires de xylanase ont été vérifiés avec le xylose (2,57 U/ml) et la bagasse de canne à sucre (1,12U/ml). La différence entre les résultats est peut être due au changement de la source de carbone présente dans les deux manipulations (Terron *et al.*, 2018) tandis que Debbache *et al.*, (2019) ont testé la production de xylanase par une souche d'*Aspergillus sp.* sur deux milieux: un milieu synthétique à base de xylane de maïs, en fermentation submergée, et un milieu préparé à base d'alfa (Annexe 3) naturel, en fermentation solide, dans des conditions de température 40°C, pH 6.5. Après 72 heures les résultats enregistrés étaient 0.52UI/mg et 14.12UI/ml, respectivement. La variance entre ces résultats confirme que le milieu et la souche peuvent influencer la production d'enzyme et les milieux à base de biomasse présentent une meilleure activité par rapport aux milieux synthétiques.

2.2 Application du xylanase dans la saccharification du poudre d'épi de maïs

La production de bioéthanol a suscité un grand intérêt industriel ces dernières années. A fin d'obtenir les sucres nécessaires pour ce processus, des résidus agricoles tels que la paille de blé, la paille de riz et l'épi de maïs sont hydrolysés par des enzymes comme les xylanases.

L'hydrolyse, par les extraits xylanasiques bruts, a donné des rendements maximaux en xylose de 43.86, 148.89, 236.63 mg/g de substrat sec et en sucre réducteur de 152.92, 369.71, 553.94 mg/g de substrat sec respectivement pour la CCP non traitée, de la CCP traité par l'hydroxyde de sodium (CCP SHSP) et de la CCP traité par l'ammoniac (PCC AASP). Les rendements maximaux obtenus après 24h de la saccharification enzymatique effectuée dans des conditions acides et à température 37°C-50°C sont 449.15 mg/g de substrat sec pour le sucre réducteur et 195.93 mg/g de substrat sec pour le xylose (Zhang *et al.*, 2015).

Ces résultats sont relativement élevés en comparaison avec ceux de Shibata *et al.*, (2017) qui ont évalué l'efficacité de la saccharification de la bagasse traitée en milieu alcalin par les

préparations enzymatiques (JN11H et JN13H) produites par des souches de *Trichoderma reesei* recombinant(X3AB1 et E1AB1) respectivement. La saccharification a été effectuée en utilisant JN11H ou JN13H à pH 5,0 et 50 °C pendant 72 h, et la dose d'enzyme était de 1,0 ou 2,0 mg/g-biomasse. Lors du traitement avec JN11H, les rendements en glucose et en xylose étaient respectivement de 43 ± 1 et $46 \pm 1\%$ (1.0 mg/g-biomasse) et de 73 ± 1 et $68 \pm 1\%$ (2.0 mg/g-biomasse). Après traitement par JN13H, les rendements en glucose et en xylose étaient respectivement de 43 ± 1 et $49 \pm 0\%$ (1.0 mg/g-biomasse) et de 69 ± 1 et $70 \pm 2\%$ (2.0 mg/g-biomasse). Par contre, les résultats analysés sont inférieurs de ceux obtenus par De Cassia Pereira *et al.*, (2015) qui ont travaillé sur la saccharification de la bagasse de canne à sucre par la xylanase produite par *Myceliphtora thermophila* à température de 50°C pendant 48h. Les rendements en glucose et xylose obtenus après saccharification enzymatique de la bagasse *in vivo* étaient de 0,64% (0.09g/l) et 1,7% (0.24g/l) respectivement. Par contre, lors de l'utilisation de bagasse prétraitée les rendements après la saccharification enzymatique sont : de glucose 15,6 % (2.2g/l) et de xylose 35,13% (1.95 g/l) ce qui confirme l'effet de xylanase sur la saccharification de la bagasse de canne à sucre. Cette différence entre les résultats est due aux différences de substrat et de souche utilisées.

3 Laccase

3.1 Production

Après une incubation à 32°C pendant 5 jours. Le surnageant de la culture contenant l'enzyme a montré une activité laccase de 7,9U/ml sur milieu synthétique dans les conditions optimisées (Senthivelan *et al.*, 2019). Ces résultats sont prometteurs par rapport à ceux obtenus par Bouaouine *et al.*, (2015) ainsi que Dhakar *et al.*, (2014). Bouaouine *et al.*, (2015) ont testé la production de laccase sur milieu à base de déchets de citrouille par deux souches fongiques, *Chaetomium sp.* et *Trametes sp.* Les résultats étaient respectivement 400U/l après 15 jours et 186U/l après 6 jours de fermentation submergée alors que la production de laccase par *Penicillium pinophilum*, réalisée par Dhakar *et al.*, (2014) dont la culture est faite dans un environnement à basse température (25°C) et pH 7.5 pendant 28 jours. L'activité maximale constatée était de $11.6 \pm 0.52\text{U/L}$.

Abd El Monssef *et al.*, (2016) ont étudié la production de laccase par *Trichoderma harzianum* sur un milieu liquide contenant le glucose comme source de carbone. La production est réalisée à pH 5.5, à température 30°C pendant 12 jours sur un agitateur rotatif (150 rpm). Les résultats montrent que la production s'est débute au cours du troisième jour et qu'elle atteint son maximum 1,286U/ml au sixième jour. Ces résultats s'éloignent de ceux obtenus par Senthivelan *et al.*, 2019 à cause de la souche productrice (*Trichoderma harzianum*)

3.2 Application des laccases dans la clarification de jus

Dans le but d'améliorer le rendement et la valeur diététique et organoleptique; le jus est traité par de différentes enzymes, notamment la laccase. Lors du traitement, les enzymes ligninolytiques catalysent l'oxydation des phénols du jus en o-quinones; ces derniers subissent une polymérisation et donnent des composés (des polymères insolubles) à poids moléculaire élevé qui peuvent être éliminé par centrifugation; cependant, les oligomères plus légères restantes provoquent la turbidité et le brunissement de jus.

Les résultats du traitement par les laccases libres sur la teneur en polyphénols du jus de grenade aux baies montrent que cette dernière est réduite jusqu'à 45% de sa valeur initiale avec une clarté et couleur 1.91 et 4.7 mesurés à 650 nm et 420 nm respectivement (Gassara-Chatti *et al.*, 2013). D'un côté, Neifar *et al.*, (2009) ont travaillé sur le jus de grenade et ont montré que la valeur d'absorbance augmente jusqu'à 360, 390 et 480 avec les températures 20°C, 35°C et 50°C, respectivement. Lorsque ils ont utilisé une quantité élevée d'enzyme (>2,75U/ml) et un temps d'incubation élevé (>165 min). Les réponses expérimentales obtenues sont : une concentration de polyphénols = 1100 mg/l; clarté = 370 ; et couleur = 740. Le traitement optimisé a conduit à une réduction des phénols totaux d'environ 40%. D'un autre côté, Alper *et al.*, (2004) ont traité le jus de grenade avec des laccases pour tester son pouvoir à éliminer les composés phénoliques, après mesurer l'absorbance à 420 nm et 650 nm; ils ont observé une augmentation de la couleur et de la clarté jusqu'aux valeurs maximales 3.75 et 0.096, respectivement après 120 min de traitement. Tandis que la quantité en phénols a diminué de 1675 mg/ml jusqu'à 1400 mg/l après 1 heure de traitement. On observe que les résultats cités se rapprochent, mais ceux de Gassara-Chatti *et al.*, (2013) sont inférieures aux autres en raison de la quantité faible d'enzyme utilisée et la durée courte du traitement par rapport aux autres travaux.

Conclusion

Notre étude opte d'un travail théorique et vise à mettre en évidence le potentiel de production enzymatique d'une moisissure "*Penicillium chrysogenum*" et les majeurs utilisations industrielles de ces enzymes. La culture de la souche *Penicillium chrysogenum* dans différents milieux (liquides, solides, synthétiques et naturels) suivie par la récupération des extraits et le dosage d'activités enzymatiques a permis de confirmer l'activité amylasique, xylanolytique et laccasique de cette souche (8.5 U/mg; 1,081 U/ml - 0,940 U/ml et 7,9 U/ml selon les travaux de Jyostna *et al.*, (2020), Ullah *et al.*,(2019) et Senthivelan *et al.*,(2019) respectivement.

Ces trois enzymes ont un grand intérêt industriel; leurs différentes applications a pour but d'obtenir un meilleur rendement avec un coût minimisé. L'application des amylases dans le désencollage des tissus permet de décoller efficacement les tissus et améliorer leurs qualités et leurs résistances. La saccharification de la poudre d'épi de maïs est réduite et économisée par la xylanase qu'élimine les coûts de prétraitement et améliore l'efficacité de la fermentation; en plus, cette enzyme est plus stable dans cette application est capable d'hydrolyser efficacement les hémicelluloses et les composants cellulosiques de la biomasse en sucres riches en énergie. Dans la clarification des jus, les laccases jouent un grand rôle dans la stabilité de ces boissons et dans l'amélioration de leur qualité en augmentant la clarté des jus par l'élimination des composés polyphénoliques.

Les résultats acquis au cours de ce travail peuvent servir de base à des études plus approfondies d'abord pour améliorer la productivité de *Penicillium chrysogenum* (par exemple: l'utilisation de milieux à base de déchets agroalimentaires); ensuite, pour attirer l'attention aux utilisations des enzymes fongiques dans le domaine industriel comme alternatives écologiques de certains procédés chimiques et enfin la recherche de nouvelles applications de ces enzymes.

Références bibliographiques

- **Abdelaziz,G.Urooza,E.Muhammad,S.(2021).**Cellulases:From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications[en ligne],6(44),(consultée le 7 avril 2022). <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- **Abd el monsef, RA. Hassan,EA. Ramadan, EM. (2016).** Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. *Annals of Agricultural Sciences*[en ligne], 61(1)(consulté le 05/07/2022). doi:10.1016/j.aogas.2015.11.007
- **Aggarwal,R. Dutta,T. Sheikh,J.(2019).** Extraction of amylase from the microorganism isolated from textile mill effluent vis a vis desizing of cotton. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*.[en ligne] , 14. (consulté le 05/06/2022) doi:10.1016/j.scp.2019.100178
- **Alper,N. Acar,J.(2004).**Removal of phenolic compounds in pomegranate juices using ultrafiltration and laccase-ultrafiltration combinations. *Nahrung/Food* .[en ligne],48(3),(consulté le 03/06/2022) DOI: 10.1002/food.200200258
- **Badiee, P. Jafarpour,Z .Albouzi,UN et al.,(2012).** Mucor species-microscopic morphology, 400x Lactophenol cotton blue. (December 2012)[carte].In :Research gate : Orbital mucormycosis in an immunocompetent individual. (Consulter le 26 mars 2022)Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/233831182_Orbital_Mucormycosis_in_an_Immunocompetent_Individual?enrichId=rgreq-4e-b5797c7b949dd2b1f63c0f92ee5b7cXXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdl-OzIzMzgzMTE4MjtBUzoXOTA4NzI1MTc3MDE2MzRA-MTQyMjUxODk2MjM3Mw%3D%3D&el=1_x_2&esc=publicationCoverPdf.
- **Belmssikh,A.(2011).** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire Magistère : Biotechnologie microbienne.Constantine : université Mentouri Constantine,102 p.
- **Benkahoul,M. (2018)** .Généralités sur les enzymes.Cour d'enzymologie 3éme année microbiologie . Université Frères Mentouri Constantine1

- **BEX,V. Boissier,N. Fabre,C et al., (2006).**Contamination fongique en milieu intérieur : Diagnostic effet sur la santé respiratoire conduite a tenire. Conseil supérieure d'hygiène publique de France[en ligne](consulté le 26/05/2022)
- **Boudoukha,C.(2017).**cours de enzymologie appliquée-université Ferhat Abbas Setif 1 .27p-32p
- **Bouaouine,AS . Gharfi,M. (2015).**Production de la laccase par des mycètes filamenteux sur milieu à base de déchets de citrouille (*cucurbita sp.*).Mémoire de Master :Biotechnologie fongique/fermentation et production des substances fongiques. Constantine : Université Frères Mentouri Constantine 1,63p.
- **Bouchoukh,I. (2016) .** Cours de Botanique :2ème année LMD.Constantine.
- Bouderaoune,S. (2013). La croissance des champignons filamenteux dans les milieux extrêmes[en ligne].Mémoire Des Etudes Supérieures :Microbiologie.Jijel :Université de Jijel,52p .
- **Bradford,M.(1976) .**A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry [en ligne],72,248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- **Chabasse,D .Bouchara ,JP.De Gentile ,L. et al.,(2002).**Cahier de formation biologie médicale :les moisissures d'intérêt industriel .Bioforma[en ligne],2(1),(consultée le 7 avril 2022) URL <http://www.fspublishers.org>
- **Correia,D.(2011).**LE GOUT MOISI-TERREUX DU VIN : Contribution à la caractérisation cinétique et métabolique des moisissures associées a ce défaut organoleptique. Thèse de doctorat : Alimentation et Nutrition. France : Université de Bourgogne,188p.
- **Davet,P. (1996).**Vie microbienne du sol et production végétale. Éditions Quae.383 p.
- **De Cassia Pereira,J. Paganini Marques,N. Rodrigues,A et al.,(2015).** Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. Journal of Applied Microbiology[en ligne], 118(4) (consulté le 04/06/2022). doi:10.1111/jam.12757

- **Debbache,K. Derdour,S. (2019).**Étude de la production de xylanase par une souche d'*Aspergillus sp* (S3).Mémoire de Master : Bioindustrie, analyse et contrôle. Constantine: Université Frères Mentouri Constantine 1 ,87p. consulté le 03/06/2022).
- **Delphine ,M . (2012).**Exposition aux moisissures en environnement intérieur : méthodes de mesure et impact sur la santé. Mémoire pour grade de Docteur :Biologie et science de la santé. Bretagne :Université de Rennes 1,175p.
- **Dhakar,K. Jain,R. Tamta,S. et al.,(2014).**Prolonged laccase production by a cold and pH tolerant strain of *Penicillium pinophilum* (MCC 1049) isolated from a low temperature. environment. Enzyme Res[en ligne](consulté le 05/06/2022). doi: 10.1155/2014/120708
- **D'Halewyn ,MA. Leclerc ,JM. King ,N.et al., (2003).**Moisissures en milieu intérieur et risque pour la santé. Disponible sur : <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00033-6>>
- **Djellal ,N.** Cour de mycologie : 3éme année microbiologie . Université Ferhat Abbas Setif 1.Disponible sur : <https://fsnv.univ-setif.dz/microbiologiec/71-micro-cours-en-ligne>
- **Ejaz,U. Saohail,M. Ghanemi,A. (2021).**Cellulase : From Bioactivity to a variety of industrial Applications. Biomimetics[en ligne],6(44)(consulté le 09/03/2022) <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- **El-Gendi,H. Saleh,AK. Badierah,R. et al., (2022).** A comprehensive insight into fungal enzymes: structure, classification ,and their role in mankind's challenges. Journal of fungi [en ligne],8(23) (consulté le 29/05/2022).<https://doi.org/10.3390/jof8010023>
- **Environnement :** Des enzymes blanchisseuses naturelles du papier.l'usine nouvelle[en ligne].(consultée le 3 avril). [https : //www.usinenouvelle.com](https://www.usinenouvelle.com)
- **Ertan,F. Balkan,B. Balkan,S et al.,(2006).**Solid state fermentation for the production of a-amylase from *Penicillium chrysogenum* using mixed agricultural by-products as substrate. Biologia[en ligne],61(6),(consulté le :16/05/2022) doi:102478/s11756-006-0137-2

- **Gassara-Chatti,F. Brar,SK. Ajila,CM . et al.,(2013).**Encapsulation of ligninolytic enzymes and its application in clarification of juice. Food chemistry.[en ligne],137. (Consulter le 28/05/2022).<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.083>
- **Glover-Bondeau,AS. (2020).**Enzyme :définition, rôle, types, dosage, taux, normes. Journal des femmes[en ligne](consulté le 04 /04/2022) .Disponible sur : [Enzyme : définition, rôle, types, dosage, taux, normes \(journaldesfemmes.fr\)](http://www.journaldesfemmes.fr)
- **Guachi,O. Laiadi,I. (2021).** Détermination du contenu en sucre, polyphénol et protéine des grains de pollen de quelques variétés mâle de palmier dattier(*Phoenix dactylifera L*).Mémoire de master : biotechnologie et valorisation des plantes.Biskra : Université Mohamed Khider,54p. consulté le 03/06/2022).
- **Isabelle,A.(1986).**Étude de l'utilisation d'enzymes dans le domaine médicale: applications analytiques et thérapeutiques. 231 p. -(Lille thèses).
- **Jumpin,J. (2014).**The quince rust fungus ,*Gymnosporangium clavipes* under the microscope.[photo].In:NCSUPDIC.Disponible sur :<http://ncsupdicblog.blogspot.com/2014/03/jumpin-junipers-red-cedarproblems.html?m=1> (consultée le 27/05.2022) .
- **Jyostna,K. kumara,P. Kumar,M. (2020).**Production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*,*Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus stolonifer* causing spoilage of slice bread. IOSR Journal of biotechnology and biochemistry [en ligne] ,6(6) (consulté le:02/03/2022). DOI:10.9790/264X_0606023847
- **Kalia,S. Bhattacharya,A. Kumar,S. Malik,A. (2021).**Utilization of starch effluent from a textile industry as a fungal growth supplement for enhanced α -amylase production for industrial application. Chemosphere, 279 .(consulté le 20 /3/2022) <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130554>
- **Kunamneni,A. Plou,FJ. Alcalde,M. Ballesteros,A. (2014).**Biotechnologie and Biologie of *Trichoderma* : *Trichoderma* enzymes for food industries .339-344 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00024-2>
- **Laib,I. (2011).**Etude des activités antioxydantes et antifongiques de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. Nature et technologie[en ligne],(7) .44-52.(consulté le 27/05/2022).

- **Laronzo ,T.** Rappresentazione schematica e fotografia al microscopio elettronico a scansione della struttura di *P. chrysogenum* costituita da conidiofori, metulae e conidi (2020) [carte].In :Microbiologia italia . Disponible sur : < <https://www.microbiologiaitalia.it/micologia/penicillium-chrysogenum/> > (consulté le 18 /04/2022)
- **Leyral ,G . Vierling,E. (2001).** Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. 4ème Edition, DOIN, Paris, 20, 272p.
- **Lowry,HO. Rosebrough,NJ. Lewis Farr,A. et al., (1951).**Protein measurement with the folin phenol reagent. The journal of biological chemistry[en ligne],193(1) (Consulter le 28/05/2022). Doi:10.1016/S0021-9258(19)52451-6
- **Majsov,KD. (2016).** New and Future developments in microbial biotechnology and bioengineering: *Aspergillus* enzymes for food industries.. 215-222.
- **Meziani,A. Mahcene ,H. (2017).**Activités hydrolases des souches fongiques. Production par fermentation de cellulase et α -amylase par *Penicillium sp.* sur substrats solide. Mémoire de Master :Biotechnologie des mycètes :fermentation et production de substances fongiques. Constantine : Université Frères Mentouri Constantine 1.81p. (consulté le 03/06/2022).
- **Mukesh,M. Andleeb,Z. Manish,K. et al. , (2018).** New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering : *Penicillium* Enzymes for the Food Industries[en ligne] ,167–186. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00009-0>
- **Mukhtar,H . UL-HAQ,I. Umber,H. (2006).**Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through Optimization of Environmental Conditions.JOURNAL OF AGRICULTURE & SOCIAL SCIENCES [en ligne],2(1)(consultée le 07/04/2022) URL <http://www.fspublishers.org>
- **Natalija ,AP. Dzoko,K.** Isolate EJ2- *Piromyces communis*, endogenous sporangium with coiled main rhizoid; some rhizoids are constricted (magnification 40x) (2007) [photo] .In:Research gate .disponible sur :< https://www.researchgate.net/publication/225710621_Comparison_of_morphological_and_enzyme_characteristics_of_anaerobic_fungi_isolated_from_Cervus_dama?enrichId=rgre

[q-dc41a28ce20be0847b4514e9d599d1e0-](https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00523.x)

[XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzIyNTcxMDYyMTtBUzozNTMxOTEzMjIIMDUyMTIAMTQ2MTIxODc4MTkyMQ%3D%3D&el=1_x_2&esc=publicationCoverPdf](https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00523.x) >

(consulté le 26/03/2021).

- **Neifar,M. Ellouz-Ghorbel,R. Kamoun,A. et al.,(2009).**Effective clarification of pomegranate juice using laccase treatment optimized by response surface methodology followed by ultrafiltration .Journal of Food process Engineering[en ligne],34.(consulté le 28/05/2022). Doi:10.1111/j.1745_4530.2009.00523.x
- **Redouane-Salah ,S .(2016).** Caractérisation mycologique des fourrages pour ruminants et recherche d’Aflatoxine M1 dans le lait cru de vache : étude comparative aux laits pasteurisé et lyophilisé [en ligne] .Thèse de Doctorat : Toxicologie. Constantine :Université des Frères Mentouri-Constantine1 ,150p
- **Rochman,IF.Mauliza,IN.(2019).**Biodesizing cotton fabric using amylase enzyme production from raw cotton fabric waste fermented by *Aspergillus niger*.Proceeding textile conference [en ligne],1. (consulté le 05/06/2022) <https://doi.org/10.5281/zenodo.3470816>
- **Saranraj,P. et Stella (2013).** Fungal amylase -A review. International journal of Microbiological Research[en ligne],4(2)(consulté le :15/05 / 2022). DOI:10.5829/idosi.ijmr.2013.4.2.75170
- **Schoch,CL. et al.,(2020).** NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools [en ligne] .(consulté le 06/06/2022) .URL : [Taxonomy browser \(Penicillium chrysogenum var. chrysogenum\) \(nih.gov\)](https://taxonbrowser.ncbi.nlm.nih.gov/)
- **Senthivelan ,T. Kanagaraj,J. Panda,RC. et al., (2019).** Screening and production of a potential extracellular fungal laccase from *Penicillium chrysogenum*: Media optimization by response surface methodology (RSM) and central composite rotatable design (CCRD). Biotechnology Reports [en ligne] (Consulter le 28/05/2022). doi:10.1016/j.btre.2019.e00344
- **Settouti,W. Beggar,A. (2017).**Essai d'incorporation de lactosérum en poudre dans la fabrication de fromage fondu. Mémoire de Master: Sciences et biotransformation du lait. Boumerdes : Université M'hamed Bougara Boumerdes,73p.

- **Seyyed,HK. Omide,V. Nahid ,A. et al.,(2021).**Glucose oxidase: Applications, sources, and recombinant production[en ligne],1.,(12), (consultée le 7 avril 2022). DOI: 10.1002/bab.2165
- **Shibata ,N. Suetsugu ,M. Kakeshita,H. et al.,(2017) .** Une nouvelle xylanase GH10 de *Penicillium sp.* accélère la saccharification de la bagasse prétraitée alcaline par une enzyme de *Trichoderma reesei* recombinant exprimant la β -glucosidase d' *Aspergillus* . Biotechnol Biocarburants [en ligne], 10 (.consulté le 03 /06/2022) <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0970-2>
- **Simon,J.Barry,V.(2005).**les enzymes : applications industrielles et analytiques. Megazyme international Ireland Ltd[en ligne],(116),(consulté le 29/03/2022) URL www.Megazyme.com
- **Singh,S. Khajuria,R. (2018).** New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering : *Penicillium* Enzymes for the Textile Industry. 201–215. doi:10.1016/b978-0-444-63501-3.00011-9
- **Singh,S.(2016).** New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Aspergillus* Enzymes for Textile Industry.191-198. doi:10.1016/b978-0-444-63505-1.00014-2
- **Swain,T. Hillis,WE. (1959).** The phenolic constituents of *Prunus domestica* I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. Journal of the Science of Food and Agriculture[en ligne],10(1), (Consulter le 28/05/2022).doi:10.1002/jsfa.2740100110
- **Terrone,CC. Freitas,C. Terrasan, et al., (2018).** Agroindustrial biomass for xylanase production by *Penicillium chrysogenum* : Purification, biochemical properties and hydrolysis of hemicelluloses. Electronic Journal of Biotechnology [en ligne] ,33 (consulté le :20/05/2022) . doi:10.1016/j.ejbt.2018.04.001
- *Trichoderma sp.*Trichoderma : contrôle des champignons phytopathogènes .(26 avril 2016) [carte] In : MITRE Y EL CAMPO : Intérêt général technologie .disponible sur : <[http : //agriculturers.com](http://agriculturers.com) > (Consulter le 27 mars 2022)
- **Pearson ,RC . Goheen ,AC.** Iriis phytoprotection[en ligne].(consulté le 27 /05/2022)

- Pierre CACHAN, Georges MANGENOT, « SYMBIOSE », Encyclopædia Universalis [en ligne], consulté le 6 juin 2022. URL : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/symbiose/>
- **Uchikoba,T. Mase,T. Arimq,K et al., (2001).**isolation and caractérisation of a Trypsine-Like protease from *Trichoderma viride*. Biological chemistry[en ligne],382.(consulté le 09/05/2022
- **Ullah,SF. Souza,AA. Hamann,PRV. et al.,(2019).** Structural and functional characterisation of xylanase purified from *Penicillium chrysogenum* produced in response to raw agricultural waste. International Journal of Biological Macromolecules[en ligne] , 127 (consulté le 24/02/2022)doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.057
URL : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/champignons/> (Consulter le 27 mars 2022)
- **Vikineswary,S. Noorlidah,A. Renuvathani,M. et al., (2006).** Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues. Bioresource Technology[en ligne], 97(1) (consulté le 31/05/2022) doi:10.1016/j.biortech.2005.02.015
- **Webb,I. Edwin,C. (1992).** Enzyme nomenclature 1992 : recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzyme. California : Academic Press, Inc.865.
- **Webster,J. Weber,RWS. (2007).** Introduction to fungi : Third edition .New York: Cambridge University Press.875p.
- **Zhang,H. Sang,Q. (2015).** Production et optimisation de l'extraction de la xylanase et de la β -mannanase par *Penicillium chrysogenum* QML-2 et application primaire dans la saccharification de la rafle de maïs.Biochemical engineering journal.[en ligne],97 (consulté le 12/04/2022)<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.bej.2015.02.014>

Sites Web :

- **Net 1:** CANOPé .Hyphe [carte] In : Cour biotechnologies terminale STL .Disponible sur :< <https://sites.crdp-aquitaine.fr/stl/lexique/hyphe/>>

- **Net 2 :** Institut national de santé publique de Québec .*Aspergillus niger* [carte] In : INSPQ . disponible sur : <https://www.inspq.qc.ca/> (Consulter le 26 mars 2022).
- **Net 3:** *Spizellomyces punctatus*. Tout tailles *spizellomyces accuminatum*. [carte]In : compagnon de botanique.disponible sur :<https://botany.companion.wordpress.com/model-page-fungi/Alm-sizes-spizellomyces-accuminatum-Flickr-photos-sharing> >(consulter le 27 mars 2022)<https://www.santepubliqueottawa.ca/fr/public-health>
- **Net 4 :** Calderon ,C. cesar calderon pathology collection [photo] .In: USDA APHIS PPQ. disponible sur< <https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=2171004>
- **Net 5 :** Institut national de santé publique du Québec .*Phoma glomerata* - Microscopie (culture EM) [carte] In : INSPQ .disponible sur : <https://www.inspq.qc.ca/> (Consulter le 26 mars 2022)
- **Net 6 :** *Fusarium spp. Fusarium spp* | compendium sur les moisissures (2019)[carte]In : INSPQ centre d'expertise et de référence en santé publique. Disponible sur : <http://mobile.inspq.qc.ca/moisissures/fiches/Fusarium-spp> (Consulter le 27 mars 2022)
- **Net 7 :** <http://www.aspergillus.man.ac.uk>
- **Net 8 :** [Définition Sources - Les enzymes alimentaires - Synpa](#)
- **Net 9 :** Bouchard ,R .*penicillium chrysogenum* spores[photo] In :Décontamination Québec Inc. Disponible sur :<https://decontaminationquebec.com/penicillium-moisissure-commune-maisons/> (consulté le 26/03/2022).

Annexes

Annexes

➤ **Annexe 1 : Réactifs Lowry**

• **Solution A**

Soude 0.1N (0.4g/100ml)100ml

Carbonate de sodium Na₂CO₃ a 2g.....100ml

• **Solution B**

Tartrate double de Na et K 1g.....100ml

• **Solution C**

Sulfate de cuivre 0.5g.....50ml

• **Solution réactive**

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

Solution réactive =0.5 ml Solution C +0.5ml Solution B+0.5ml Solution A

➤ **Annexe 2 : Réactif BBC**

100 mg de BBC (poudre) + 50 ml d'éthanol (95%) misent dans une éprouvette, après une agitation de mélange pendant 2 h et filtration avec un papier whatman 100 ml d'acide orthophosphorique (80%) sont ajoutés et la dilution par l'eau distillée jusqu'à 100 ml est faite.

➤ **Annexe 3 : L'Alfa**

C'est une herbe vivace typiquement méditerranéenne, qui est caractérisée par sa structure hétérogène, et est constituée principalement de cellulose (40 % – 50 %), de lignine (17,71 % – 24 %), d'hémicellulose (22,15 % – 28 %) et de 5% de cire .

<p align="center">Année universitaire : 2021-2022</p>	<p align="center">Présenté par : ARIBA Rekia ABDELLI Sondous</p>
<p align="center">Titre</p> <p align="center">Recherche des enzymes à intérêt industriel produites par <i>Penicillium chrysogenum</i></p>	
<p align="center">Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et biotechnologie fongique</p>	
<p>Résumé</p> <p>Ce travail théorique s'intéresse à la mise en évidence des enzymes produites par la souche <i>Penicillium chrysogenum</i> et leurs applications dans l'industrie. Pour cela la première partie de ce travail de recherche porte sur la production de trois enzymes: amylases, xylanases et laccases sur différents milieux (milieu à base de biomasse et milieu synthétique) par cette moisissure. Les activités enzymatiques obtenues après récupération des extraits et dosage sont 8.5μ/mg, de 1.081 à 0.940μ/ml et 7.9μ/ml pour les amylases, les xylanases et les laccases respectivement. Ces trois enzymes ont des applications intéressantes dans le domaine industriel; les amylases sont appliquées dans le désencollage des tissus. Après un traitement à 80°C pendant 45 minutes suivi d'un lavage à froid à 30°C pendant 10 minutes, on a obtenu un indice de 9. Les xylanases sont utilisées dans la saccharification de la poudre d'épi de maïs, en les appliquant pendant 24h à 50°C avec une légère agitation. Ce processus a donné un rendement en xylose de 449.15 mg/g et en sucre réducteur et 195.93 mg/g. Enfin un traitement des jus par les laccases (à température ambiante pendant 5 heures) montre une réduction des polyphénols à 45 % et une augmentation de la clarification avec une DO de 1.91 et 4.7 mesurée à 650 nm et 420 nm respectivement</p>	
<p>Mots-clés : <i>Penicillium chrysogenum</i> ; Amylases ; Xylanases ; Laccases ; Tissus ; Jus ; Maïs.</p>	
<p>Encadreur : BOUCHERIT Zeyneb (MAA - UFM, Constantine 1).</p> <p>Examineur 1 : LEGHLIMI Hind (MCA - UFM, Constantine 1).</p> <p>Examineur 2 : LABBANI Kenza Fatima-Zohra (MCA - ENS, Constantine).</p>	

