



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
STÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIF

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département :** Microbiologie

**قسم :** الميكروبيولوجيا

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

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Biotechnologie

**Spécialité :** .Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé :

---

## **Etude bibliographique sur la production des cellulases d'origines fongiques**

---

**Présenté et soutenu par :**

**REHAMNIA AMINA**

**OUAR ROUMEISSA**

**Le : 20 / 06 / 2023**

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury :** Melle. ABDELAZIZ O.

**Promotrice :** Melle. BELMESSIKH A.

**Examinatrice :** Mme. LEGHLIMI H.

M. C. B- UFM Constantine1

M. A. A- UFM Constantine1

M. C. A- UFM Constantine1

*Année universitaire  
2022 /2023*

# *Remerciements*

*Tout d'abord, nous tenons à remercier **Allah** ,  
de nous avoir donné la santé, la volonté et la patience pour réaliser ce  
travail de recherche.*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer toutes nos  
reconnaisances et nos profond respects à notre encadreur **Melle**  
**BELMESSIKH Aicha** M.A.A Université des Frères Mentouri  
Constantine 1 pour sa patience, sa rigueur et ses précieux conseils qui  
nous ont aidé dans la réalisation de ce travail.*

*Nos remerciements sont adressés aux membres de jury qui ont bien  
voulu accepter de juger ce modeste travail ; A **Melle ABDELAZIZ**  
**Ouided** M.C.B Université des Frères Mentouri Constantine 1, merci  
infiniment de présider notre jury.*

*A **Mme LEGHLIMI Hind** M.C.A Université des Frères Mentouri  
Constantine 1, nous excusons beaucoup pour le temps sacrifié pour  
l'examen de ce document.*

*Enfin, nos reconnaissances et nos remerciements vont à toutes les  
personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce  
travail*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A mes chers parent, qu'ils trouvent ici témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encourage et leur soutien tout au long de mes années études en lui souhaitant une longue vie pleine de joie et de santé.*

*A mes frères : **Houssam, Imad, Seife eddine***

*A ma sœur **sihem** et sa fille **Roukia***

*A la femme de mon frère **Manel***

*A mon fiancé **hamza** qui m'toujours soutenu*

*A tout ma famille*

*À mon binôme «**Roumeissa**» on a passé des bons moments ensemble que Dieu garde notre amitié pour toujours.*

*A tous mes amis (es) sont exception*

*A toutes la promotion de*

*Mycologie et Biotechnologie Fongique 2022/2023*

*A tous les enseignants qui ont contribué à ma Formation durant tout le parcours de mes études.*

*Tous ceux qui sont proche de mon coeur et dont je n'ai pas cité le nom  
Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement  
et le respect que j'ai toujours eu pour vous.*

*A tous ceux que j'aime  
**Amina***

# *Dédicaces*

*J'ai Le grand plaisir de dédie ce travail*

*À mon cher père **ABDESLEM***

*Celui qui est mon soutien et la source de ma force, qui c'est sacrifié pour mon éducation. Et la confiance qu'il m'a accordée*

*À ma mère **THOURIA***

*Qui me soutient toujours. La source de mon inspiration et de mon courage*

*À Mes chers Sœurs*

***NOUR EL Houda, KAOUTAHER, Douaâ***

*À mon binôme **Amina**, qui à contribué la réalisation de ce modeste travail*

*À tout la famille **OUAR** et **OULMI***

*Et aussi la famille **BOUHOUHOU***

*À tout la promotion 2022/ 2023*

***Mycologie et biotechnologie fongique***

**ROUMEISSA**

## Résumé

Les cellulases sont des enzymes hydrolases (EC 3.2.1.4) largement utilisées dans l'industrie biotechnologique. Elles sont nécessaires en grande quantité en raison de leur application dans de nombreuses industries, telles que le textile, les détergents, nutrition animale, le papier et la pâte à papier. La production de cellulase a été signalée à partir d'une grande variété de bactéries et de champignons. Cependant, les champignons filamenteux sont préférés pour la production commerciale d'enzymes, car le niveau des enzymes produites par ces cultures est plus élevé que ceux obtenus à partir de levures et de bactéries, dont les moisissures du genre *Aspergillus* et *Trichoderma spp.* sont les plus dominants dans la synthèse de la cellulase. Les cellulases sont obtenues principalement à partir de la fermentation submergée (FML) en raison de la facilité de manipulation et du meilleur contrôle des facteurs environnementaux tels que la température et le pH. Cependant, la technique de fermentation à l'état solide (FMS) peut améliorer le rendement et réduire le coût de la production d'enzymes.

**Mots clés:** Cellulase, les champignons cellulolytiques, fermentation, *Aspergillus*, *Trichoderma*, sous-produits lignocellulosiques.

## ملخص

السليولاز هي إنزيمات هيدرولاز (EC 3.2.1.4) تستخدم على نطاق واسع في صناعة التكنولوجيا الحيوية. هي لازمة بكميات كبيرة نظرا لتطبيقاتها في عدة صناعات، كالنسيجية، التنظيفية، التغذية الحيوانية، صناعة الورق. إنتاج السليولاز سجل عند مجموعة واسعة من البكتيريا والفطريات. ومع ذلك ، تفضل الفطريات الخيطية لإنتاج الإنزيمات التجارية لأن مستوى الإنزيمات التي تنتجها هته الزراعات أعلى من تلك التي يتم الحصول عليها من الخمائر والبكتيريا، بما في ذلك *Aspergillus* و *Trichoderma spp* هي الأكثر انتشارا في إنتاج السليولاز. يتم الحصول على السليولاز أساسا من التخمير المغمورة (SmF) نظرا لسهولة التعامل والتحكم الأفضل في العوامل البيئية مثل درجة الحرارة ودرجة الحموضة. ومع ذلك، يمكن لتقنية التخمير في الحالة الصلب (SSF) تحسين المحصول وتقليل تكلفة إنتاج الإنزيم.

**الكلمات المفتاحية:** السليولاز ، الفطريات المحللة للسليولوز، التخمير, *Aspergillus* , *Trichoderma*, المخلفات اللينوسيليلوزية.

## Abstract

Cellulases are hydrolase enzymes (EC 3.2.1.4) widely used in the biotechnology industry. They are needed in large quantities due to their application in many industries, such as textiles, detergents, animal nutrition, paper and pulp. Cellulase production has been reported from a wide variety of bacteria and fungi. However, filamentous fungi are preferred for commercial enzyme production because the level of enzymes produced by these cultures is higher than those obtained from yeasts and bacteria, where *Aspergillus* and *Trichoderma spp.* are the most dominant in cellulase synthesis. Cellulases are obtained mainly from submerged fermentation (SmF) due to easy of manipulation and better control of environmental factors such as temperature and pH. However, the solid state fermentation technique (SSF) can improve the yield and reduce the cost of enzyme production.

**Key words:** cellulase, cellulose mushrooms, fermentation, *Aspergillus*, *Trichoderma*, lignocellulosic-by-products.

# *Table des matières*

**Les abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction.....1**

## **Chapitre I : Les cellulases**

**1. Définition des cellulases.....3**

**2. Nomenclature des cellulases.....3**

**3. Structure des cellulases.....3**

**4. Classification des cellulases.....5**

**5. Mode d'action.....5**

**6. Mécanisme d'action des cellulases.....6**

**7. Origines des cellulases.....7**

**7.1. Origine végétale.....8**

**7.2. Origine animale.....8**

**7.3. Origine microbienne.....8**

**8. Applications industrielles des cellulases.....10**

**8.1. Industrie agro-alimentaire.....10**

**8.2. Industrie du textile et des détergents.....10**

**8.3. Industrie du papier ou papetière.....10**

<b>8.4. Nutrition animale.....</b>	<b>11</b>
<b>8.5. Industrie thérapeutique.....</b>	<b>11</b>
<b>9. Les microorganismes cellulolytiques.....</b>	<b>11</b>
<b>9.1. Microorganismes procaryotes.....</b>	<b>11</b>
<b>9.2. Microorganismes eucaryotes.....</b>	<b>13</b>
<b>9.2.1. Les protozoaires.....</b>	<b>13</b>
<b>9.2.2. Les champignons cellulolytiques.....</b>	<b>13</b>
<b>9.2.2.1. Les champignons imparfaits.....</b>	<b>13</b>
<b>9.2.2.2. Les Basidiomycètes.....</b>	<b>14</b>
<b>9.2.2.3. Les Ascomycètes.....</b>	<b>14</b>

## **Chapitre II : La Production des cellulases fongiques**

<b>1. Méthodes d'isolement et sélection des souches cellulolytiques.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1. Echantillonnage.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2. Isolement.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.1. Préparation des suspensions- dilutions.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.2. Ensemencement.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3. Purification.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4. Conservation.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5. Sporulation.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6. Identification des souches isolées.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6.1. Etude Macroscopique.....</b>	<b>19</b>

<b>1.6.2. Etude Microscopique.....</b>	<b>19</b>
<b>1.7. Criblage des souches cellulolytiques.....</b>	<b>20</b>
<b>1.7.1. Test des plaques à trous (en milieu solide).....</b>	<b>20</b>
<b>1.7.2. Test au papier filtre (en milieu liquide).....</b>	<b>20</b>
<b>2. Méthodes de Production.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Les milieu de production des cellulase.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Les types de fermentation.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.1. Fermentation en milieu solide.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.2. Fermentation en milieu liquide.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3. Etapes de production.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.1. Préparation de l'inoculum.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.2. Conduite de fermentation.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.3. Extraction de cellulase.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Méthodes de Dosage de cellulase.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Activité papier filtre (APF).....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Activité CMC<sub>Case</sub>.....</b>	<b>23</b>
<b>4. Optimisation de la production de cellulase.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Effet de pH.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2. Effet de température.....</b>	<b>24</b>
<b>4.3. Effet de source de carbone.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4. Effet de source d'azote.....</b>	<b>25</b>

4.5. Effet de taux d'inoculation.....	25
4.6. Effet de la période d'incubation.....	25
4.7. Effet de divers sels métalliques.....	25
4.8. Effet de la spécificité du substrat.....	25
<b>5. Méthodes de Purification de cellulase.....</b>	<b>25</b>
5.1. La précipitation au sulfate d'ammonium.....	26
5.2. Dialyse.....	26
5.3. Chromatographie échangeuse d'ions.....	26
5.4. Chromatographie gel filtration.....	26
5.5. Electrophorèse SDS PAGE.....	27

### CHAPITRE III : Discussion générale

<b>1. Meilleurs substrats inducteurs.....</b>	<b>29</b>
1.1. Son de blé.....	29
1.1. Son de riz.....	30
1.3. Bagasse de canne à sucre.....	31
<b>2. Meilleurs souches fongiques productrices.....</b>	<b>32</b>
2.1. Champignons du genre <i>Aspergillus</i> .....	33
2.1.1. <i>Les Aspergilli</i> .....	33
2.1.2. <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	33
2.2. Champignons du genre <i>Trichoderma</i> .....	34
2.2.1. <i>Les Trichoderma</i> .....	34
2.2.2. <i>Trichoderma reesei</i> .....	34

<b>3. Comparaison entre FMS et FML.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Fermentation en milieu solide et la production de cellulase.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2. Facteurs influençant la production de cellulase microbienne par FMS.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.1. Température.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.2. pH.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.3. Activité de l'eau / teneur en humidité.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.4. Processus de transfert de masse.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.4.1. Diffusion de gaz.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.4.2. Diffusion des nutriments.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.5. Taille des particules du substrat.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3. Avantages et Inconvénients de la fermentation solide.....</b>	<b>38</b>
<b>3.4. Domaines d'application de la fermentation en milieu solide.....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>43</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>45</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>52</b>

# *Liste des abréviations*

**APF:** Activité papier filtre

*Aw:* Activity of water

**CBH:** Cellobiohydrolases

**CMC:** CarboxyMéthylCellulose

**CMCase:** Activité Carboxyméthylcellulose.

**DNS :** Acide Dinitrosalicylique

**EG :** Endoglucanases

**FML :** Fermentation en milieu liquide

**FMS :** Fermentation sur milieu solide

**GEM :** Gélose à l'Extrait de Malt

*PDA:* Potato dextrose agar

*Rpm:* rounds per minute

**SR :** Le son de riz

# Liste des figures

<b>Figure 01.</b> Structure de la cellulase (Hamoudi, 2011 ; Claisse, 2012).....	4
<b>Figure 02.</b> Différentes topologies des sites actifs des cellulases. (a) : Topologie en poche ; (b) : Topologie en crevasse ; (c) : Topologie en tunnel (Claisse, 2012).....	4
<b>Figure 03.</b> Les enzymes cellulolytiques qui dégradent de la cellulose (Mussatto et Teixeira, 2010).....	6
<b>Figure 04.</b> Mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par la cellulase (Béguin et Aubert, 1994).....	7
<b>Figure 05.</b> Méthode de préparation des suspensions diluées.....	17
<b>Figure 06.</b> Modèle de développement d'un champignon filamentueux en FMS (Prevot, 2013).....	21
<b>Figure 07.</b> Structure anatomique du son de blé (Bourdeau et <i>al.</i> , 1992).....	29
<b>Figure 08.</b> Son de riz (Sadh et <i>al.</i> , 2018).....	31
<b>Figure 09.</b> Bagasse de canne à sucre (Kumar et <i>al.</i> , 2014 ; Postdam et <i>al.</i> , 2019).....	32
<b>Figure 10.</b> Tête aspergillaire bisériée (gauche) et unisériée (droite). (Guillaume et Alcindor, 2006).....	33
<b>Figure 11.</b> Aspect microscopique de <i>Trichoderma</i> (Botton et <i>al.</i> , 1990).....	34

# Liste des tableaux

<b>Tableau 01.</b> Classification des enzymes cellulolytiques (Sadhu et Maiti, 2013).....	<b>5</b>
<b>Tableau 02.</b> Les microorganismes producteur de cellulase (Muhammad et <i>al.</i> , 2016).....	<b>9</b>
<b>Tableau 03.</b> Principaux bactéries cellyolytiques et pseudocellulolytiques (Bayer et <i>al.</i> , 1983).....	<b>12</b>
<b>Tableau 04.</b> Composition biochimique de son de blé (Benkerrou et Hamaili, 2012).....	<b>30</b>
<b>Tableau 05.</b> Comparaison entre la FMS et FML (Sobal, 2002).....	<b>35</b>
<b>Tableau 06.</b> Avantages et inconvénients de la FMS (Lonsane et <i>al.</i> , 1985 ; Hesseltine, 1987 ; Pandey et Soccol, 2000).....	<b>39</b>
<b>Tableau07.</b> Principaux domaines d'applications de la FMS (Prevot, 2013).....	<b>40</b>

# **Introduction**

Les enzymes produites grâce à la biotechnologie sont identiques à celles trouvées dans la nature, de tels enzymes incluent les cellulases qui occupent la troisième place mondiale dans l'industrie des enzymes. L'intérêt des cellulases s'est développé à travers le monde, en raison de leurs applications industrielles multiples telles que l'industrie du papier et de la pâte, des textiles, aussi dans l'extraction de jus de fruits et légumes. En outre, les cellulases étaient commercialement valables pour plus de 30ans, et présentent une cible pour les recherches aussi bien académiques ou industrielles (Bahouli et Zidalmal, 2020).

Selon leur mécanisme de dégradation de la cellulose, les cellulases sont subdivisées en cellulases non processives (endocellulases) ou en cellulases processives (comprenant différentes exocellulases et certaines nouvelles endocellulases processives).

Une grande variété de microorganismes notamment les champignons filamenteux produit les enzymes cellulolytiques, que ce soit par fermentation sur milieu liquide ou bien sur milieu solide. En fait, la fermentation solide présente un certain nombre d'avantages économiques et technologiques dont la faiblesse des couts et la simplicité des équipements (Durant, 2003).

La production des enzymes hydrolases particulièrement les cellulases par des procédés biotechnologiques, nécessite non seulement l'identification et la sélection des microorganismes cellulolytiques, mais également le choix d'un substrat de fermentation à faible coût d'une part, et d'autre part convenable d'un point de vu composition en éléments nutritifs nécessaires au développement de microorganismes et à la production des enzymes ciblée (Yaiche et Aidouni, 2016).

L'objectif de ce travail est subdivisé en trois chapitres :

- Le premier chapitre, est une synthèse bibliographique sur les cellulases..
- Le deuxième chapitre représente les méthodes de la production des cellulases fongiques.
- Le troisième chapitre est consacré à la discussion générale de quelques résultats des travaux sur le rendement de production de la cellulase.

# **Chapitre I :**

# **Les Cellulases**

## 1. Définition des cellulases

Les cellulases représentent un vaste groupe d'enzymes hydrolytiques, qui catalysent l'hydrolyse des liaisons  $\beta$ -1,4 présentes dans la cellulose pour donner des sucres simples (cellobiose, glucose) (Kader et *al.*, 1999; Korish, 2003). C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes: Endo  $\beta$  (1-4)-glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4), Exo  $\beta$  (1-4)- glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91),  $\beta$  (1-4)-glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) (Xu, 2002).

## 2. Nomenclature des cellulases

Nom codifié : E.C.3.2.1.4.

Nom systématique : 1,4-(1,3 ; 1,4)- $\beta$ -D-Glucan 4-glucanohydrolase.

Nom recommandé : Cellulase.

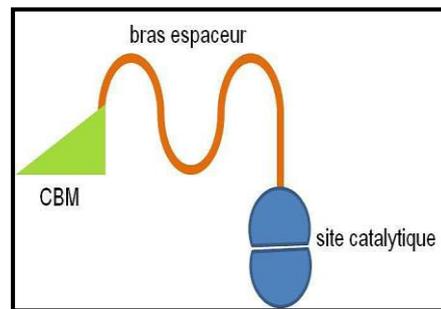
Synonyms: Endoglucanase, Endo-1,4- $\beta$ -Glucanase, Cellulase carboxyméthylrique,  $\beta$ - 1,4-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase, ect. (Schamburg et Salzman, 1991).

## 3. Structure de la cellulase

La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés acides (Beldman et *al.*, 1985) et ne sont pas des métalloprotéines (Saha et *al.*, 1994). Elles ont généralement une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels distincts : Le site catalytique et le domaine d'accrochage à la cellulose (ou CBM pour *Carbohydrate Binding Module*), habituellement reliés entre eux par un peptide glycosylé flexible riche en Ser / Pro et Thr appelé bras espaceur ou "*Linker* " qui permet d'établir une distance entre le CBM et le site catalytique (Figure 01) (Hamoudi, 2011 ; Claisse, 2012). La présence du domaine de fixation est essentielle pour la dégradation de la cellulose cristalline de coton, car elle augmente la concentration de l'enzyme autour du substrat et de ce fait améliore la catalyse enzymatique (Din et *al.*, 1991 ; Boraston et *al.*, 1998).

Le site actif situé dans le domaine catalytique, a la forme d'un tunnel où la réaction hydrolytique a lieu (Henrissat et Bairoch, 1996).

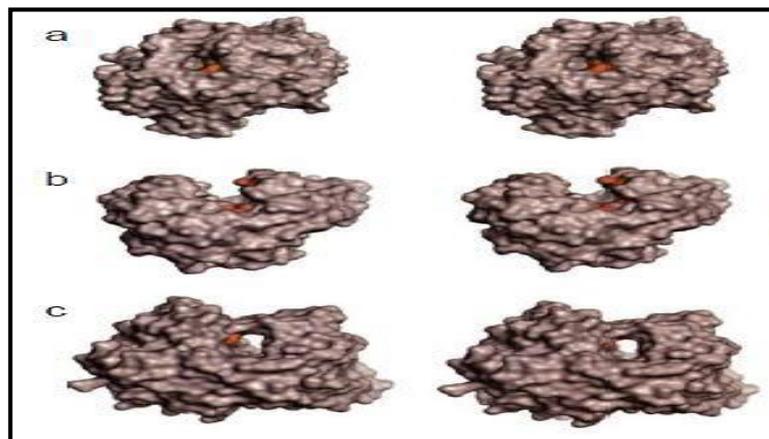
Le domaine de fixation des cellulases fongiques comporte 36 acides aminés et se fixe de façon réversible à la cellulose (Linker et Teeri., 1996), grâce à la tyrosine qui joue un rôle important dans la fixation du substrat par une interaction hydrophobe (Reinikainen, 1994).



**Figure 01.** Structure de la cellulase (Hamoudi, 2011 ; Claisse, 2012).

Le type d'activité enzymatique est lié à la topologie de son site actif. La prise en charge d'un substrat dépend en partie de sa morphologie et de sa structure. Il existe trois différents types de topologie pour les cellulases schématisés dans la Figure 02 (Claisse, 2012).

- La topologie de type « poche » permet la reconnaissance de l'extrémité non-réductrice des sucres et elle se trouve chez les  $\beta$ -glucosidases.
- La topologie de type « crevasse » permet de se lier aléatoirement à plusieurs unités de glucose à la fois et elle se trouve chez les endoglucanases.
- La topologie de type « tunnel » qui permet le déplacement de l'enzyme le long de la chaîne. Ce type de site se trouve chez les exoglucanases.



**Figure 02.** Différentes topologies des sites actifs des cellulases, (a) : Topologie en poche ; (b) : Topologie en crevasse ; (c) : Topologie en tunnel (Claisse, 2012).

#### 4. Classification des cellulases

Les cellulases ont d'abord été classées selon leur mode d'action catalytique. Elles sont maintenant aussi classées selon leur structure, comme toutes les enzymes agissant sur les sucres.

Les cellulases sont classées en plusieurs familles de glucoside hydrolases sur la base de leur similarité de séquence (Tableau 01) (Sadhu et *al.*, 2013).

**Tableau 01.** Classification des enzymes cellulolytiques (Sadhu et Maiti, 2013).

Enzymes	Nombre E.C.	Réaction	Autre nom	Famille
<b>Endo -1,4 <math>\beta</math>-D-Glucanglucanohydrolase</b>	E. C. 3. 2. 1.4	Casse la liaison Interne de cellulose amorphe et libérant les Oligosaccharides	Endoglucanase, Endo-1,4- $\beta$ –glucanase, Carboxymethyl cellulase, $\beta$ -1,4-endoglucohydrolase  Endocellulase	5, 6, 7, 8, 10, 12, 44, 51, 61, 74
<b><math>\beta</math> - Glucosidases ou <math>\beta</math>-D-glucoside gluco-hydrolases</b>	E.C.3.2.1.21	Hydrolyse la cellobiose et libérant le glucose	Gentobiasse,  Cellobiasse,  Amygdalase.	1, 3, 9
<b>Exoglucanase or 1,4-<math>\beta</math>-D-glucan-Cellobiohydrolases cellobiohydrolases</b>	E.C.3.2.1.91	Hydrolyse la liaison 1,4-bêta D-glucosidique de cellulose et libérant le cellobiose	Exoglucanase,  Exocellobiohydrolase  1,4- $\beta$ cellobiohydrolase	5, 6, 7, 9, 10, 48

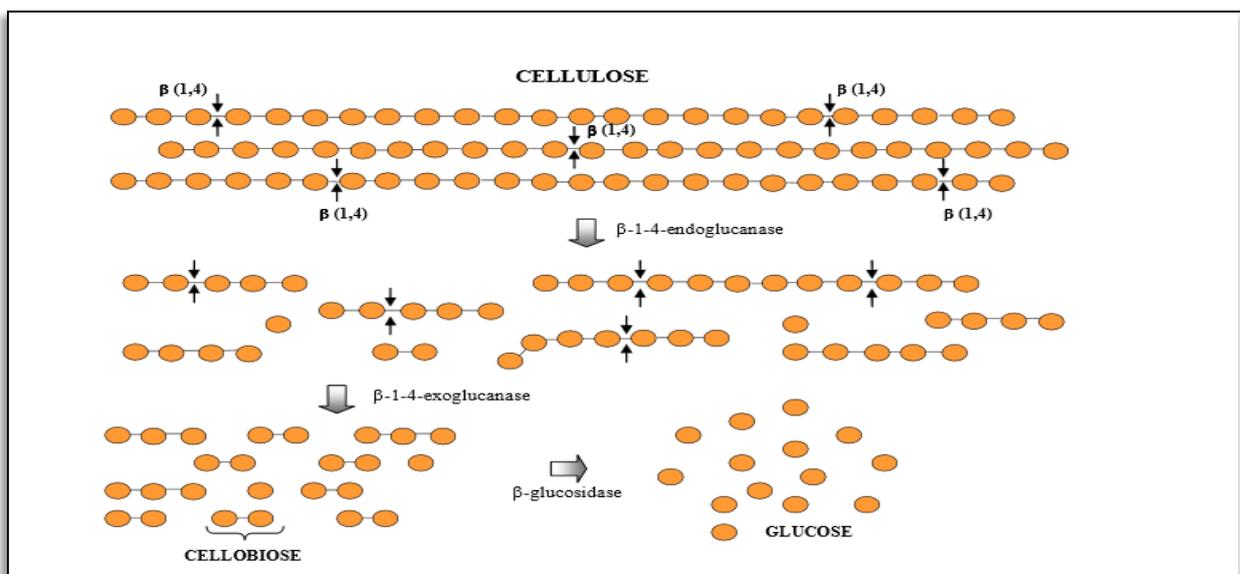
## 5. Mode d'action

Il existe trois types d'activités enzymatiques cellulolytiques complémentaires pour l'hydrolyse totale de la cellulose (Scriban, 1993).

► La première enzyme endo- $\beta$ 1-4-gluconates (EC 3.2.1.4) : Les endoglucanases sont produites par des archées, des bactéries, champignons, plantes et animaux avec différents catalyseurs, elles coupent de manière aléatoire les liaisons interne ( $\beta$  -1,4 glucosidique) de cellulose en petits sucre et polysaccharide oligomère.

► La deuxième enzyme exo- $\beta$ 1-4-gluconase (EC 3.2.1.91) : Les exoglucanases agissent de manière processive et attaque les liaisons  $\beta$  (1-4) glycosuriques des chaînes de cellulose par les extrémités non réductrices du polysaccharide et libérant soit du cellobiose soit du glucose (Teeri, 1997; Xu, 2002). Elles sont de deux types: Les cellobiohydrolases (1,4-B-D-glucane-cellobiohydrolase, Ec3.2.1.91) ou cellobiohydrolases (CBH) et Les exo-1,4- $\beta$ -D-glucosidases (Ec3.2.1.74), encore appelées glucohydrolases.

►  $\beta$ -glucosidase ou cellobiases (EC 3.2.1.21); complète le processus d'hydrolyse de la cellulase, la cellobiase hydrolyse la liaison  $\beta$ -glucosidique du cellobiose et libère deux molécules de glucose. Elles n'ont pas d'action sur la cellulose insoluble (Saddler et *al.* 2010 ; Ballerini, 2011) (Figure 03).



**Figure 03.** Les enzymes cellulolytiques qui dégradent de la cellulose (Mussatto et Teixeira, 2010).

## 6. Mécanisme d'action de la cellulase

Les hydrolases glycosides clivent les liaisons glucosidiques en utilisant catalyse acido basique. L'hydrolyse est effectuée par deux résidus catalytiques de l'enzyme : un acide (proton donneur) et une base nucléophile (Figure 04).

Cette hydrolyse se produit par rétention ou inversion de la configuration anomérique (Davies et Henrissat, 1995).

La voie par laquelle la cellulase agit dépend de la distance entre les sites catalytiques. Dans le mécanisme d'inversion, il n'y a pas de formation de complexe enzyme-substrat tout au long de la réaction, l'hydrolyse est réalisée directement par déprotonation séquentielle. Le mécanisme de rétention est réalisé par l'extrémité carboxylique des résidus d'acides aminés, qui agit comme une base nucléophile et attaque la liaison glycosidique, rompant la liaison et se liant à une fraction de l'oligomère, formant un complexe enzyme-substrat (Siqueira et *al.*, 2020).

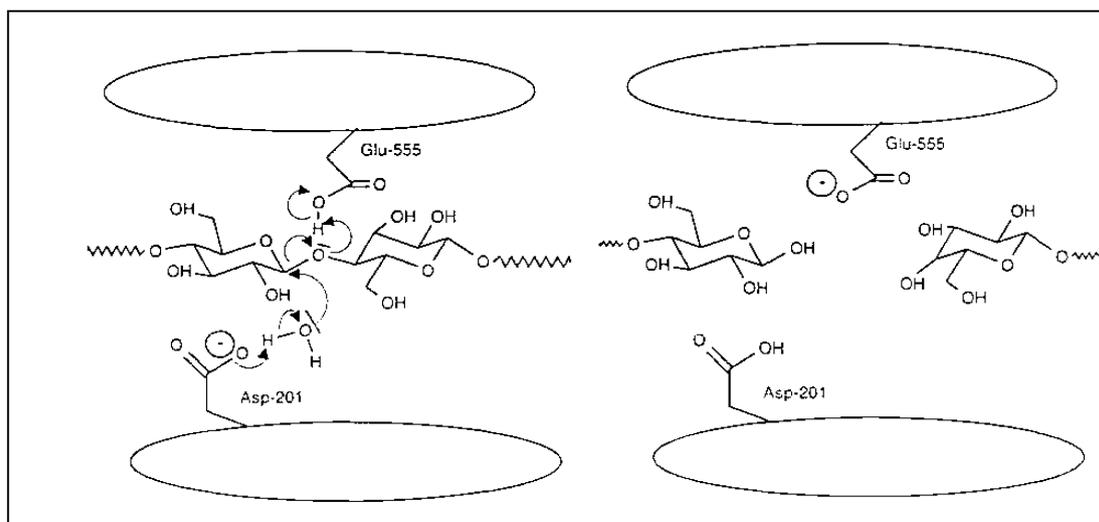


Figure 04. Mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par la cellulase (Béguin et Aubert, 1994).

## 7. Origines des cellulases

Les cellulases forment une classe d'enzymes largement répandues dans la nature, synthétisées principalement par les champignons microscopiques, les bactéries et les protozoaires. Cependant, d'autres cellulases sont produites par les plantes, les vers, les mollusques, les insectes, etc. (Reffas, 2017). À cet effet, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : végétale, animale et microbienne.

### 7.1. Origine végétale

Les cellulases d'origine végétale sont généralement obtenues à partir des végétaux supérieurs. Ces enzymes, jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes (Cordonnier *et al.*, 1986; Chatterjee et Sanwal, 1999). sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces (Riccio *et al.*, 1999), de l'avocat *Persea americana* (Blume et Ennis, 1991), des céréales tels que l'orge (Dan *et al.*, 2000) et le riz de la variété *Oryzasativa* (Xu *et al.*, 2000). Les préparations cellulasiques d'origine végétale sont dépourvues d'exo- $\beta$ -glucanases (Mandelset *et al.*, 1976).

### 7.2. Origine animale

Plusieurs espèces animales utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif (Smant *et al.*, 1998). Ainsi, peu de cellulases endogènes ont été décrites chez des organismes supérieurs (Xu *et al.* 2000).Cependant, des enzymes cellulolytiques ont été isolées à partir du suc digestif d'escargot comestible *Helix pomatia*, de la glande digestive de la moule verte *Perna viridis*, de la moule bleue *Mytilusedulis*, et du mollusque marin *Littorina brevicula*. Des cellulases ont été également dans les glandes de l'œsophage de kyste des nématodes *Globodera restochiensis* et *Heterdera glycines*, parasites obligatoires des plantes (Smant *et al.*, 1998).D'autres cellulases ont été également identifiées chez les termites (Korish, 2003) et les protozoaires (Konig *et al.*, 2002),comme *Epidinium caudatum* et *Eudiplodinium ostracodinium*. De plus, l'amibe *Dictyostelium discoideum* produit une cellulase extracellulaire pendant la germination de ses spores (Blume et Ennis, 1991).

### 7.3. Origine microbienne

Ces microorganismes appartiennent à des groupes taxonomiques très disparait comprenant des champignons et des bactéries, leur température de croissance qui permet de distinguer les microorganismes mésophiles et les microorganismes thermophiles, et enfin suivant leur comportement vis à vis de l'oxygène pouvant être aérobie ou anaérobies (Beguin *et al.*, 1994). Certains de ces micro-organismes sont récapitulés dans le Tableau 02 :

**Tableau 02.** Les microorganismes producteur de cellulase (Muhammad et al., 2016).

Groupes	Genres	Espèces
Bactérie	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>Acidothermus</i>	<i>A. cellulyticus</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. cellulosa</i>
	<i>Clostridium</i>	<i>C. thermocellum</i>
	<i>Clostridium</i>	<i>C. acetobutylium</i>
Champignons	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. acculeatus</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. nidulans</i>
	<i>Humicola</i>	<i>H. grisea</i>
	<i>Humicola</i>	<i>H. insolens</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. reesai</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. koningii</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. viride</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. harjianum</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. branchiatum</i>
	<i>Sclerotium</i>	<i>S. rolfsii</i>
	<i>Acremonium</i>	<i>A. cellulyticus</i>
	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>
	<i>Sporotrichum</i>	<i>S. cellulophilum</i>
<i>Penicillium</i>	<i>P.fumiculosum</i>	
Actinomycètes	<i>Streptomyces</i>	<i>S. lividans</i>
	<i>Streptomyces</i>	<i>S. drozdowiejii</i>
	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. uda</i>
	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. fimi</i>
	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. bioajotea</i>
	<i>Thermonospora</i>	<i>T. curvata</i>
	<i>Thermonospora</i>	<i>T. fusca</i>

## 8. Applications industrielles des cellulases

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale et en suite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier. Actuellement, elle occupe environ 20% du marché mondial des enzymes (Deguchiet *al.*, 2006 ; Acharyaet *al.*, 2012).

Les performances élevées atteintes leurs ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (Scriban et Arnaud, 1993).

### 8.1. Industrie agro-alimentaire

Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993). Elles sont utilisées dans l'extraction et la clarification des jus de fruits et de légumes, la production de nectars et de purées de fruits et dans l'extraction de l'huile d'olive (Sirohi, 2018).Elles sont également utilisées pour la production d'agents colorants alimentaires et pour l'extraction des caroténoïdes (Kuhad et Singh, 2013).

### 8.2. Industrie du textile et des détergents

Les cellulases sont les enzymes les plus efficaces utilisées dans le traitement humide des textiles, en particulier la finition des textiles à base de cellulose, dans le but d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs. Les cellulases ont été utilisée pour le bio laquage des jeans et le bio polissage du coton et d'autres tissus cellulosique. Les cellulases agissent sur le tissu de coton par la rupture des petites extrémités des fibres sur la surface du fil, desserrant ainsi le colorant, qui est facilement éliminé par abrasion mécanique dans le cycle de lavage. Les cellulases acides améliorent la douceur et la propriété d'absorption d'eau par les fibres, et fournir ainsi, une structure de surface plus propre (Sharadaet *al.*, 2014).

### 8.3. Industrie du papier ou papetière

L'utilisation de cellulases dans les industries du papier et de la pâte à papier est principalement basée sur la capacité de désencrage des papiers, les cellulases sont impliqués dans la délignification de la pâte sans modifier la résistance du papier. Ils sont effectivement utilisés pour les fibres de recyclage. En outre, ils sont également utilisés efficacement pour séparer l'encre à partir de fibres pendant le processus de désencrage.

Ainsi, les cellulases peuvent être une alternative écologique dans les procédés de fabrication du papier (Kenealy et Jeffries, 2003). L'addition de cellulases aux suspensions de pâtes (en cours de lavage) ou en suspension de pâtes de papiers de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1999).

#### **8.4. Nutrition animale**

Les applications des cellulases et hemicellulases dans l'industrie des aliments pour animaux ont reçu une attention considérable en raison de leur potentiel pour améliorer la valeur nutritive et les performances des animaux. Le prétraitement de l'ensilage agricole et des céréales fourragères par les cellulases et les xylanases peut améliorer sa valeur nutritionnelle. Les enzymes peuvent aussi éliminer les facteurs antinutritionnels présents dans les céréales fourragères, dégradent certains constituants pour améliorer la valeur nutritive, et de fournir des enzymes digestives supplémentaires telles que des protéases, amylases, et glucanases. Par exemple, les fibres alimentaires sont constituées de polysaccharides non amylacés tels que des arabinoxylyanes, de cellulose et d'autres composants végétaux y compris les dextrines résistantes, l'inuline, la lignine, les cires, les chitines, les pectines,  $\beta$ -glucane, et oligosaccharides, qui peuvent agir comme facteur antinutritionnel pour plusieurs animaux, (Sharada et al., 2014).

#### **8.5. Industrie thérapeutique**

L'utilisation quasi confidentielle de certaines cellulases dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive (Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1993). Ainsi, des cellulases de *Trichoderma viridae* sont utilisées en association avec des amylases fongiques, pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Rivière, 1975).

### **9. Les microorganismes cellulolytiques**

Ces micro-organismes cellulolytiques contiennent quatre types différents : les bactéries, les virus, les protozoaires et les champignons, qui pouvant être groupés suivant leur appartenance au groupe Eucaryotes ou Procaryotes.

#### **9.1. Microorganismes procaryotes**

Ce groupe comprend les bactéries cellulolytiques et pseudocellulolytiques. Suivant le mode de respiration, on distingue les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aérobies-

anaérobies facultatives. *Clostridium thermocellum* est la bactérie cellulolytique la mieux connue et la plus étudiée; elle permet la conversion directe de la cellulose en éthanol, en acides organiques et en gaz (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>). C'est l'une des rares bactéries qui produit des cellulases aussi efficaces dans l'hydrolyse de la cellulose cristalline que les cellulases de *Trichoderma reesei*. *Cl. Thermocellum* est une bactérie anaérobie saprophyte, son système enzymatique est très étudié. Les cellulases secrétées par cette bactérie ont tendance à s'associer en un complexe de haute masse molaire appelé cellulosome (Tableau 03) (Bayer et al., 1983).

**Tableau 03.** Principaux bactéries cellylolytiques et pseudocellulolytiques (Bayer et al., 1983) .

Organisme	Température de croissance	Métabolisme énergétique
<i>Les procaryotes</i>	M	Ae
<i>Pseudomonadaceae</i>	M	Ae
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio gilvus</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio fulvus</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio vulgaris</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio mixtus</i>	M	Ae
<i>Bacteroidaceae</i>	M	Ae
<i>Bactroides succinogenes</i>	M	An
<i>Bacteroides cellulosolvans</i>	M	An
<i>Butyvibrio fibrisolvens</i>	M	An
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	M	An
<i>Acetivibrio cellulosolvans</i>	M	An
Bacillaceae	M	An
<i>Bacillus circulans</i>	M	Ae/ An
<i>Bacillus coagulans</i>	M	fac

**M:** mésophile, **T:** thermophile, **M/Tt:** mésophile thermo tolérant, **Ae:** aérobie, **An:** anaérobie, **Ae/An**

**fac:** aérobie anaérobie facultative.

## 9.2. Microorganismes eucaryotes

Ce groupe comprend les protozoaires et les champignons.

### 9.2.1. Les protozoaires

L'étude de la dégradation de la cellulose en sucres par les protozoaires présente des difficultés dues à l'interférence des métabolismes des bactéries symbiotiques hébergées (Tchunden, 1990).

### 9.2.2. Les champignons cellulolytiques

C'est en 1950 que REESE a mis en évidence une activité cellulolytique chez les champignons saprophytes. Ces champignons appartiennent plusieurs classes : les Champignons imparfaits, les Basidiomycètes et les Ascomycètes

#### 9.2.2.1. Les champignons imparfaits

Dans la nature, la biodégradation de la cellulose en glucose est essentiellement réalisée par des champignons cellulolytiques appartiennent à différents genres (*Aspergillus*, *Schizophyllum*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Sporotrichum*, *Trichoderma*). Chez des champignons aérobies stricts (*Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* et *Piromonas communis*), il a été mis en évidence 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 par leur capacité à dégrader la cellulose dans les appareils gastro-intestinaux des ruminants (Carlile et Watkinson, 1997).

Dans le genre *Aspergillus* aussi, quelques espèces sont capables de produire des cellulases parmi lesquelles : *A. oryzae*, *A. versicolor*, *A. aculeatus*, *A. niger* et *A. wentii*, cette production reste cependant faible et limitée à des conditions particulières de culture (Hebraud, 1988). D'autre espèce d'*Aspergillus* comme *A. terreus* et *A. fumigatus*, sont capables de se développer sur la cellulose microcristalline en produisant des quantités importantes de  $\beta$ -glucosidases (Riccio et al., 1999). Les cellulases produites par des espèces d'*Aspergillus* sont généralement riches en endo- $\beta$ -glucanase et  $\beta$ -glucosidases, mais pauvres en exo- $\beta$ -glucosidases. De ce fait, elles ont une action limitée sur la cellulose microcristalline (Riccio et al., 1999).

### 9.2.2.2. Les Basidiomycètes

Le représentant de ce groupe le plus étudié est le genre *Sporotrichum* (Ander et Erikson, 1977), deux espèces ont été particulièrement étudiées :

*Sporotrichum thermophile* anamorphe de *P. Thermophile*

*Sporotrichum pulverulentum* anamorphe de *P. Chrysosporum*.

Toutes ces espèces attaquent le bois et sont appelées à ce titre « pourriture blanche du bois ».

### 9.2.2.3. Les Ascomycètes

Dans ce groupe, l'espèce *Talaromyces emersoni* iproduit de grandes quantités de cellulases (Mc hale et Couglan, 1980-1981). Orpin (1987) a mis en évidence dans le rumen, un champignon anaérobie strict, *Neocallimatrix frontails*. Bauchop (1979) a montré que les particules végétales du rumen du bovin et du mouton sont colonisées par une population importante de phycomycètes anaérobies qui se développent sur les substrats cellulosiques lentement dégradés dans le rumen (Botton et *al.*, 1990).

**Chapitre II:**  
**La Production des**  
**Cellulases**  
**Fongiques**

## 1. Méthodes d'isolement et de sélection des souches cellulolytiques

### 1.1. Echantillonnage du sol

Les prélèvements de sol sont réalisés à l'aide d'une tarière tout en écartant la couche supérieure à l'aide d'une cuillère stérile (Buhot, 1973 ; Mihail et Alcoren, 1987 ; Saadoune et Momani, 1997). Les sols prélevés d'où on a éliminé les gros débris et cailloux, sont ensuite recueillis dans des sacs en plastique stériles soigneusement fermés ou dans des boîtes stériles puis transférés directement sous froid au laboratoire où ils subiront les différentes étapes d'isolement.

Les analyses mycologiques sont effectuées dans les 24h qui suivent l'échantillonnage (Mathieu et Pieltain, 2003 ; Rodriguez-Zarazoga et al., 2005).

### 1.2. Isolement

L'isolement des souches cellulolytiques est réalisé selon des techniques microbiologiques standard, technique de suspension –dilution et étalement sur des milieux gélosés (Dav et Rouxe, 1997).

Le milieu de base utilisé pour l'isolement des champignons cellulolytiques et la production de la cellulase est le plus souvent CMC-agar, décrit par (Mandels et Weber, 1969), dont la composition par litre d'eau distillée est la suivante : NaNO<sub>3</sub>, 2g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g ; MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), 1g ; KCl, 0.5g ; CuSO<sub>4</sub> (5H<sub>2</sub>O), 0.001g ; MnCl<sub>2</sub>, 0.001g ; ZnSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), 0.005g ; CMC, 2.5g ; Agar, 16g. Le milieu est ajusté à pH 5 et stérilisé à 120°C pendant 20 min. De plus, d'autres milieux de culture pourront être utilisés pour la production de cellulase :

- GEM (Gélose à l'Extrait de Malte) ;
- PDA (*Potato Dextro Agar*);
- Milieu Czapeck-Dox.

Ces milieux dont la composition figure en Annexe 01

### 1.2.1. Préparation des suspensions- dilutions

Pour chaque traitement, 10g de sol sont mis en suspension dans 90ml d'eau physiologique stérile. La solution est agitée pendant 30 min sur un agitateur magnétique puis laissée décanter une 2min. La suspension obtenue correspond à la solution mère

Un ml de la solution mère est versé dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique stérile, c'est la dilution  $10^{-2}$ . Après agitation, 1ml de la solution  $10^{-2}$  est prélevé stérilement, puis transféré dans un deuxième tube contenant comme le premier, 9ml d'eau physiologique stérile. La dilution se fait ainsi jusqu'à  $10^{-7}$ (Figure 05).

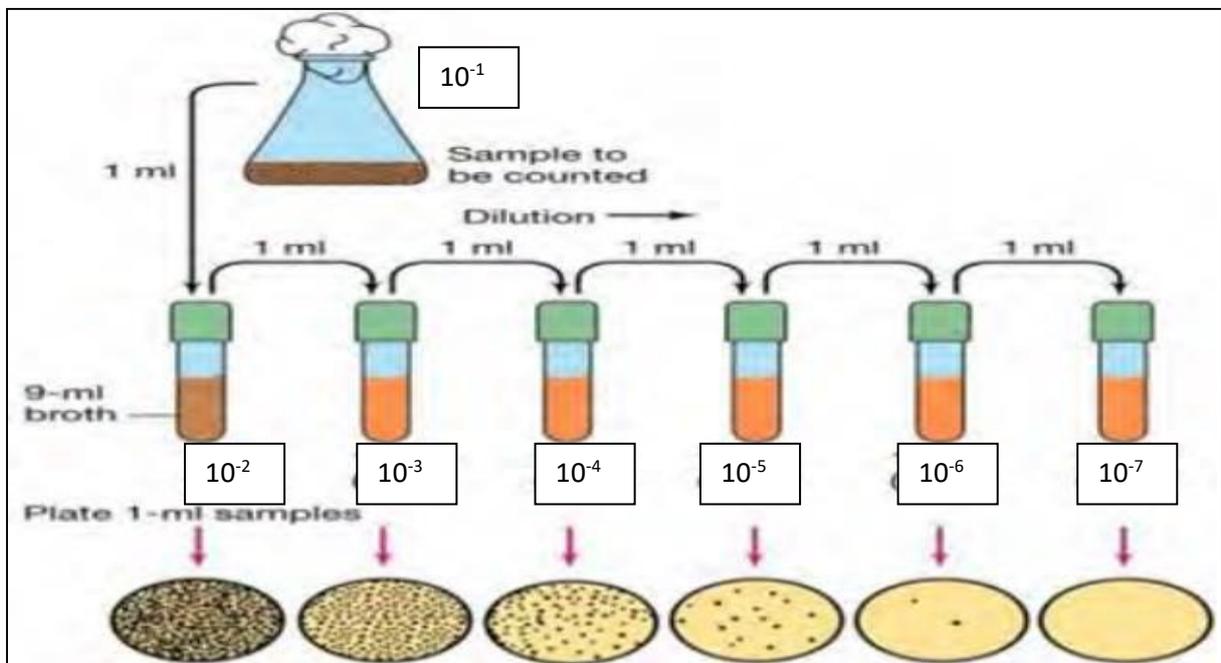


Figure 05. Méthode de préparation des suspensions dilutions (Botton et al. 1990).

### 1.2.2. Ensemencement

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, 0.1ml de chaque suspension-dilution est étalé sur le milieu CMC-agar ou sur autre milieu solide avec trois répétitions. Elles sont par la suite incubées à 25-30°C pendant sept jours (Botton et al., 1990).

L'isolement des champignons sur milieu de culture gélosé, à partir d'un sol est une étape indispensable car elle permet, d'une part, d'effectuer un dénombrement des champignons par comptage des colonies isolées ainsi obtenues et d'autre part, de vérifier la pureté des isolats d'un échantillon de sol pour réaliser des identifications.

### **1.3. Purification**

Après incubation, une microflore variée s'est développée. La purification concerné principalement les colonies dont les caractères cultureux sont différents. Il s'agit donc de prélever quelques spores ou une petite bouture mycélienne à la marge du thalle et de l'ensemencer de manière aseptique dans des boites de Pétri contenant le même milieu d'isolement (CMC-agar) ou sur les milieux PDA, GEM ou Czapeck-Dox. Un développement typique du champignon est obtenu par inoculation réalisé en un seul point au centre de la boite (Botton et *al.*, 1990). Les colonies obtenues sur ce milieu solide ont été repiquées sur le même milieu jusqu'à l'obtention de culture pure.

La pureté des souches est vérifiée par repiquage successif sur différents milieux.

### **1.4. Conservation**

Les suspensions des spores sont ensuite stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation (Botton et *al.*, 1990). Pour une conservation à -20°C, les spores sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée avec le glycérol à 20% (agent cryoprotecteur). Ces suspensions des spores sont ensuite stockées au congélateur, afin de garder leur viabilité et de limiter les possibilités de variation, jusqu'à leur utilisation (Botton et *al.*, 1990).

### **1.5. Sporulation**

Les moisissures sporulent sur milieu PDA, après 7 jours à 30°C (Kwak et Rhee, 1992).

### **1.6. Identification des souches isolées**

L'identification d'une souche fongique est effectuée par deux techniques classiques : une étude macroscopique et une étude microscopique des souches, peut être suffisante pour déterminer le genre des moisissures isolées et cela en réalisant des ensemencements par touche sur des milieux d'étude solides favorisant la croissance et la sporulation des moisissures. Les milieux les plus souvent utilisés à ces fins sont l'Agar Blanc (Annexe 01), utile pour éviter certains phénomènes de pléomorphisme (Guiraud, 1998), le Czapeck-Dox Agar et le milieu MEA (Annexe 01), utilisés simultanément (Botton et *al.*, 1990).

### **1.6.1. Etude macroscopique**

Cette étude est basée sur l'observation des colonies à l'œil nu et à la loupe binoculaire. L'observation des caractères porte sur :

- Vitesse de croissance (diamètre de la colonie à 7 jours : rapide  $\geq 3$  cm ; modérée : entre 1 et 3 cm et lente  $\leq 1$  cm).
- L'aspect de la colonie (couleur de la surface et du revers de la boîte, texture de la surface des colonies).
- Production de pigment diffusible.
- Relief de la colonie (face et revers).
- Présence ou absence de gouttelettes sur le mycélium.

### **1.6.2. Etude microscopique**

L'identification des champignons nécessite l'observation au microscope optique. Elle est basée sur les critères d'identification microscopique réalisés par Breton (1990) et Roquebert (1998) quand c'est possible à identifier. Pour cela, à l'aide d'une aiguille stérile on prélève superficiellement un fragment de la culture que l'on dépose sur une lame. Le fragment est ensuite coloré par bleu coton (Annexe 02), Ensuite la lame est recouverte d'une lamelle, puis observée au microscope photonique à un grossissement Gx40.

L'observation des caractères porte sur :

- Hyphes : septées ou non.
- Conidiophores : absents, simples, ramifiés...
- Cellules conidiogènes : annellide, phialide...
- Conidies : uni- ou pluricellulaires, solitaires, en amas ou en chaînes, forme (ronde, ovale, en massue...).
- Organes de fructification : périthèces, cléistothèces (sexué), pycnides (asexué).
- Mycélium diffus, épais, coloré ou incolore,

- Présence de types de spores sexuelles (oospores, zygosporés, ascospores, basidiospores) ou asexuées,
- Type et apparence du système sporal.
- Présence de type de structure particulière.

### **1.7. Criblage des souches cellulolytiques**

La mise en évidence de l'activité cellulolytique des souches isolées, est testée sur deux types de milieux :

#### **1.7.1. Mise en évidence sur milieu gélosé (en milieu solide)**

La technique la plus évidente serait de faire apparaître la capacité des champignons à assimiler la cellulose sur un milieu gélosé (CMC-agar) contenant 1% de CarboxyMéthylCellulose, comme seule source carbonée et d'énergie. Le réactif iodo-ioduré (solution de lugol) ou le réactif rouge Congo sont utilisés pour mettre en évidence la zone d'hydrolyse de la cellulose qui apparaît autour de la colonie.

#### **1.7.2. Test au papier filtre (en milieu liquide)**

Le principe reste le même, un milieu liquide totalement dépourvu d'une quelconque source de carbone, exception faite pour les bandes de papier filtre Whatman n°1 qui servent de source de carbone, a été utilisé. Les cultures de champignons sont incubées à 28°C en présence de bandelettes de papier Whatman n°1 (1 cm de largeur et 10 cm de longueur) stériles plongées dans 10 ml du milieu minéral sans CMC préalablement stérilisé. L'ensemencement se fait par 1 ml d'une préculture de chaque souche. Un témoin négatif (sans inoculum) est soumis aux mêmes conditions. La dégradation du papier est observée visuellement et quotidiennement (Gunnar et *al.*, 1999).

## **2. Méthodes de production**

### **2.1. Les milieux de production des cellulase**

Les cellulases sont produites par deux types de fermentation sur des milieux de culture riches en substrats cellulosiques. Le milieu doit contenir aussi des sources azotées et des sels minéraux.

## 2.2. Les types de fermentation

Initialement, la fermentation stricte est définie par Pasteur comme « la vie sans air ». Dans ce contexte, le terme de fermentation s'applique aux réactions microbiennes en absence d'oxygène se déroulant en milieu liquide. Suite à ces travaux, de nombreuses applications industrielles ont été développées. Les industriels ont alors conçu des fermenteurs permettant la culture de micro-organismes anaérobies. Rapidement, ils se sont aperçus que les micro-organismes aérobies étaient également capables de produire des métabolites d'intérêt. Ils ont donc modifiés les fermenteurs afin d'y cultiver des micro-organismes aérobies. Ceci a alors provoqué une dérive du sens « fermentation ». Ainsi, le terme de fermentation s'est étendu aux processus microbiens à la fois aérobie ou anaérobie et en phase liquide ou solide (Duchiron et Copin, 2011).

### 2.2.1. Fermentation en milieu solide

Le terme "Fermentation en Milieu Solide" est la traduction de "*Solide State Fermentation*" ou de "*Solide Substrate Fermentation*" (Hesseltine, 1965). La fermentation en milieu ou en phase solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux et des champignons supérieurs, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique (Figure 06) (Holker et Lenz, 2005).

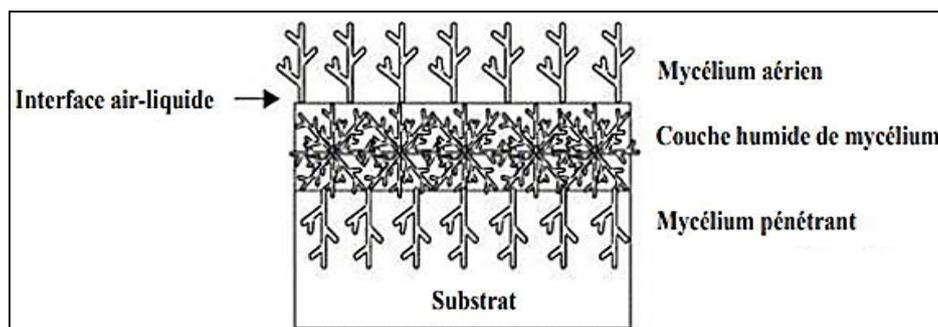


Figure 06. Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS (Prevot, 2013).

La FMS est donc constituée de trois phases : une matrice (phase) solide, une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci.

### **2.2.2. Fermentation en milieu liquide**

Une large gamme de produits commercialisés issus de la fermentation industrielle sont produits par SmF "*Submerged Fermentation*". Il s'agit d'une technique dans laquelle les microorganismes sont en suspension dans un milieu liquide contenant les éléments nutritifs dissous. Elle consiste à utiliser des substrats liquides libres, tels que les mélasses et les bouillons. Les substrats sont utilisés rapidement par les microorganismes pour produire différentes molécules bioactives (Colla et *al.*, 2010 ; Subramaniyam et Vimala, 2012 ; Salihu et *al.*, 2012). Cette technique est mieux adaptée pour les microorganismes qui nécessitent une haute teneur en humidité tels que les bactéries (Subramaniyam et Vimala, 2012). La fermentation submergée a été couramment utilisée dans l'industrie biotechnologique et enzymatique au cours des dernières décennies (Wolski et *al.*, 2009). Elle est avantageuse dans le contrôle des paramètres de la fermentation, la récupération facile des métabolites, des mycéliums ou des spores et fournit de bons rendements en enzymes (extraits enzymatiques plus stable) (Sun et Xu, 2009 ; Colla et *al.*, 2010 ; Subramaniyam et Vimala, 2012).

### **2.3. Etapes de production**

#### **2.3.1. Préparation de l'inoculum**

La culture du champignon a été maintenue sur des géloses inclinées ou gélose en boîtes de Pétri au dextrose de pomme de terre est incubée à 30°C. Les surfaces entièrement sporulées obtenues après 5 jours ont été soit utilisées immédiatement, soit conservées à 4°C au réfrigérateur. Une suspension de conidies de champignon est préparée en ajoutant de l'eau physiologique ou de l'eau distillée additionnée de 0,1 % (v/v) de Tween 80 sur la surface du milieu gélosé, afin de déloger les spores. Le nombre de spores est déterminé à l'aide de cellules hématie métrique, puis ajusté à  $10^7$  la concentration en spore voulue. Ce qui correspond à l'inoculum (Shobana et *al.*, 2013).

#### **2.3.2. Conduite de fermentation**

La fermentation à l'état liquide est réalisée dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml contenant 50ml du milieu de culture bouillon.

La fermentation à l'état solide est réalisée dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml contenant 10 g du substrat solide et humidifié avec un volume bien convenable d'eau distillée contenant des sels minéraux (agent humectant).

Les flacons des deux types de fermentation sont stérilisés à 121°C pendant 15 min et refroidis à température ambiante. Environ 1 ml d'inoculum est ajouté, bien mélangé et incubé à 30°C dans un incubateur humidifié pendant 72-96 h, le flacon a été mélangé périodiquement par agitation douce pour la FMS (Shobana et al., 2013). Les flacons inoculés destinés pour la FML sont incubés à 30°C pendant 72-96 h et sous agitation (150-200rpm).

### **2.3.3. Extraction de cellulase**

A la fin de la fermentation liquide, le bouillon de culture issu de la fermentation immergée a été centrifugé à 6000(rpm) pendant 15min et le surnageant a été utilisé comme source d'enzyme extracellulaire.

Dans la fermentation à l'état solide, l'enzyme est extraite du produit en mélangeant de manière homogène une quantité connue du substrat fermenté avec de l'eau distillée ou un autre type d'extractant (1:10 w/v) et agitée sur un agitateur rotatif (120 rpm) à 30°C avec un temps de contact de 1 heure. Une étamine humide est utilisée pour filtrer l'extrait et les extraits regroupés sont centrifugés à 6000(rpm) pendant 15 minutes et le surnageant clair est utilisé comme source d'enzyme extracellulaire (Shobana et al., 2013).

## **3. Méthodes de Dosage de cellulase**

### **3.1. Activité Papier Filtre (APF)**

Cette activité est utilisée pour déterminer l'activité total dans un complexe cellulosique selon la méthode de Ghose (1987), dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés (lors de l'hydrolyse d'un substrat cellulosique ) pendant 60 minutes dans un mélange réactionnel d'une solution d'enzyme (0.5 ml), le tampon citrate (0.1 M, pH 4.8, 1 ml) en présence de 50mg de papier filtre Whatman N° 1 (des morceaux de 1x6 cm), incubé à 50°C.

### **3.2. Activité CMCCase**

Endoglucanase (CMCase, endo 1,4-B-D-glucanase ; EC 3. 2. 1. 4) est mesurée dans un volume total de 1 ml d'un mélange réactionnel contient 0.5 ml d'extrait enzymatique dilué (dans du tampon) et 0.5ml d'une solution de CMC (CarboxyMethylCellulose) à 1% (w/v) dans du tampon citrate (0.1 M, pH 4.8). Ce mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 30 minutes (Mandels et al., 1976).

La quantité des sucres libérés de l'hydrolyse du papier filtre et du CarboxyMéthylCellulose est mesurée selon la méthode de Miller (1959) par une réaction colorimétrique due à la présence du réactif : Acide Dinitro Salicylique (DNS) (Annexe 03), tous les échantillons sont analysés en trois essais.

#### **4. Optimisation de la production de cellulase**

Les paramètres analysés pour l'optimisation sont en général : le pH, la température, la source de carbone, source d'azote, effet du taux d'inoculation etc.

##### **4.1. Effet de pH**

Le pH un facteur très important qui affecte d'une manière significative la production des cellulase (Haltrich et *al.*, 1997). Chaque micro-organisme préfère un pH optimum pour son développement et sa croissance.

Le pH des milieux a été ajusté en utilisant NaOH 1N et HCl 1N (Bhagat et Kokitkar, 2021).

##### **4.2. Effet de température**

L'effet de la température sur la production de cellulase a été réalisé en incubant le milieu de production à des températures de 4°C, 10°C, 28°C, 37°C et 50°C (Bhagat et Kokitkar, 2021).

##### **4.3. Effet de source de carbone**

L'effet de la source de carbone sur la production des cellulases est examiné en préparant le milieu de production avec différents substrats carbonés tels que : le glucose, le saccharose, l'amidon, le CMC et le maltose qui sont étudiés par Bhagat et Kokitkar (2021).Egalement, ces sources carbonés sont examinées dans le milieu de production de Sethi et *al.*, (2013) à la concentration de 1 à 5% et à 0,5 à 3% par Gautam et *al.* (2011).

L'évaluation de l'effet de la concentration du substrat incorporé dans le milieu de production, sur la production de cellulase a été effectuée en testant différentes concentrations de CMC comprenant 0,2%, 0,5%, 1% et 1,5% (Shaikh et *al.*, 2013) .

#### 4.4. Effet de source d'azote

L'effet de la source de d'azote sur la production d'enzymes est étudié en préparant le milieu de production avec différentes sources d'azote organiques tels que la peptone, l'extrait de levure et l'urée ou inorganiques comme le sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et le nitrate de sodium  $(\text{NaNO}_3)$  (Abada et *al.*, 2021). Egalement, ces sources sont examinés pour leur effet sur la production d'enzymes en remplaçant la peptone de 0,5% dans le milieu de production (Sethi et *al.*, 2013).

#### 4.5. Effet du taux d'inoculation

L'effet de taux d'inoculum sur la production d'enzymes est analysé en ajoutant la suspension fongique au milieu de production à différentes concentrations de spore par exemple : 1 %, 2 %, 3 %, 4 % et 5 (v/v) (Abada et *al.*, 2021).

#### 4.6. Effet de la période d'incubation

La période d'incubation du champignon est un paramètre important pour la production d'enzymes. Ce paramètre est vérifié par une expérience de fermentation d'*A. niger* et de *Trichoderma sp.* effectuée jusqu'à 7 jours et le taux de production est mesuré à des intervalles de 24 h (Gautam et *al.*, 2011).

#### 4.7. Effet de divers sels métalliques

L'effet de divers sels métalliques sur la production de cellulase est déterminé en ajoutant des sels métalliques différents dans le milieu basal fongique sans sels métalliques. Tels que :  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  et  $\text{NaCl}$  à différentes faibles concentrations (Laouni, 2021).

#### 4.8. Effet de la spécificité du substrat

Les cellulases possèdent des affinités différentes vis-à-vis les substrats cellulosiques. Yin et *al.*, (2010) ont évalué la spécificité du substrat d'une cellulase purifiée, contre 1% CMC, avicel, coton, filtre papier, xylan et pnitrophénol- $\beta$ -d-glucopyrananoside dans un tampon de phosphate de 20 mm (pH 7).

### 5. Méthodes de purification de cellulase

Pour purifier la cellulase, différentes étapes de purification sont utilisées pour obtenir l'enzyme pure. Ces étapes de purification comprennent les suivantes:

### **5.1. La précipitation au sulfate d'ammonium**

La précipitation au sulfate d'ammonium est utilisée pour la purification de la cellulase, dans un premier temps en utilisant les taux de saturation pour précipiter l'enzyme brute dans les conditions optimales. L'activité spécifique de la cellulase a diminué avec l'augmentation du taux de précipitation du sulfate d'ammonium (Mouhmed et *al.*, 2015).

### **5.2. Dialyse**

Après la précipitation au sulfate d'ammonium, le précipité est dissous dans une petite quantité de tampon. Ensuite, culot dissous est dialysé contre le même tampon avec trois changements au minimum pendant 24 heures et sous agitation à 4°C (Gautam et Sharma, 2012).

### **5.3. Chromatographie échangeuse d'ions**

Pour réaliser une chromatographie échangeuse d'ions, 20ml du dialysat est chargés sur une colonne de diéthylaminoéthyl (DEAE)-Sephrose (1,5 x 20 cm). Avant de charger l'échantillon, la colonne est pré équilibrée avec du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. La colonne est lavée avec 2 volumes de colonne du même tampon et la protéine adsorbée est éluée avec un gradient linéaire de 0 à 0,8 M de NaCl dans un tampon d'équilibrage à un débit de 1 ml/min. Chaque fraction de 3ml est collectée pour estimer la concentration en protéines (absorbance 280 nm) et l'activité CMC<sub>ase</sub> (U/ml)(Gautam et Sharma, 2012).

### **5.4. Chromatographie gel filtration**

La cellulase purifiée par la technique de chromatographie échangeuse d'ions est purifiée davantage en utilisant la technique de chromatographie pour obtenir une enzyme purifiée avec une activité spécifique élevée. Pour cela, on peut utiliser 3 mg/ml de l'échantillon et l'appliquer au sephadex-G200 qui a été préalablement équilibré avec du tampon Tris-HCl 0,02M pH (Mohamed et *al.*, 2015). Les fractions éluées collectées (2 ml) sont contrôlées pour la concentration en protéines à 280 nm et ainsi que pour l'activité enzymatique. La fraction présentant une activité élevée sera regroupée et utilisée pour l'analyse SDS-PAGE (Gopinath et *al.*, 2012).

### **5.5. Electrophorèse SDS PAGE**

L'objectif de la technique électrophorèse sur gel de DodécylSulfate de Sodium Polyacrylamide (SDS-PAGE) est la détection de la pureté de l'enzyme purifiée et la détermination de sa masse moléculaire (Laemmli, 1970). Un marqueur de haut poids moléculaire (20–205 kDa) (Genei, Inde) est utilisé pour estimer le poids moléculaire de la cellulase. Les bandes de protéines résolues sont visualisées par la méthode de coloration à l'argent (Morissey 1981). L'activité est dosée par analyse zymogramme en utilisant un gel de résolution à 10 % avec 0,1 % de CMC (Gopinath et *al.*, 2012).

# **Chapitre III**

## **Discussion générale**

## 1. Meilleurs substrats inductrices

Les déchets agricoles lignocellulosique résultant de l'industrie agroalimentaire représentent une source très importante de matières premières bon marché comme substrat pour la production de cellulase surtout par fermentation en milieu solide (FMS) (Verma et *al.*, 2020).

Parmi ces sous-produits, on cite :

### 1.1. Son de blé

Ce produit est obtenu au cours des opérations de transformation du blé en farine blanche destinée à l'alimentation humaine. Le son est particulièrement constitué du tégument externe du grain qui renferme des glucides pariétaux peu digestibles pour la volaille (Figure 07) (Jacquemin, 2012).

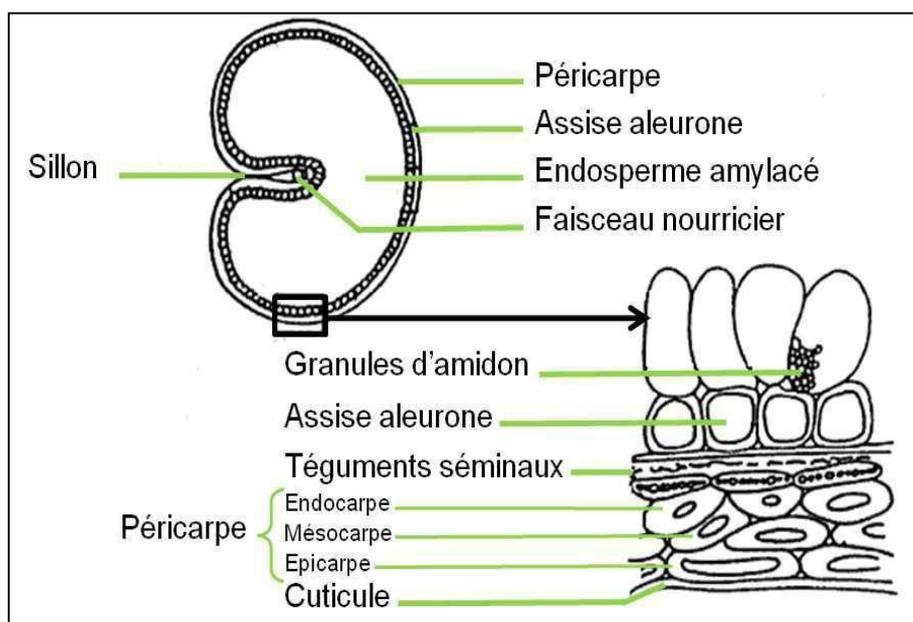


Figure 07. Structure anatomique du son de blé (Bourdeau et *al.*, 1992).

Le son de blé est un coproduit de la semoulerie issu des parties externes du grain, il contient principalement de la cellulose (fibres alimentaire), des protéines, des vitamines, des sels minéraux (calcium, magnésium, phosphore) et de l'acide phytique.

Cette composition varie en fonction de ses variabilités génétiques et éco-physiologiques ainsi qu'en fonction du mode de fractionnement et de mouture (Benkerrou et Hamaili., 2012). Sa composition est illustrée dans le tableau 04

**Tableau04.** Composition biochimique de son de blé (Benkerrou et Hamaili, 2012).

Constituants	Teneur en matière sèche (%)
Hémicellulose	30
Cellulose	22
Lignine	5

La valeur nutritive du son de blé le fait employer pour la fabrication des aliments concentrés pour les ruminants, volailles. Il constitue une bonne source d'acide linoléique. *Aspergillus fumigatus* à cultivé sur son de blé par une fermentation à l'état du substrat solide pour la synthèse de cellulase, les xylanase et les  $\beta$ -glucosidase. (Delabona, 2001).

Par ailleurs, le son de blé lorsque il a été mélangé avec de la paille du riz en proportions égales (1 : 1), il a donné un bon rendement en cellulase (Sherief et *al.*, 2010).

### 1.1. Son de riz

Le riz est l'une des cultures les plus importantes au monde, car il contribue à satisfaire la demande alimentaire d'une grande partie de la population mondiale. Il est bien connu que la production de riz génère un nombre considérable de sous-produits, parmi lesquels le son de riz mérite une attention particulière.

Ce sous-produit est exceptionnellement riche en nutriments, car il contient un large spectre de macronutriments (protéines, lipides, glucides) ainsi que des fibres alimentaires et des composés bioactifs (Garofalo et *al.*, 2020).

Le son de riz (Figure08) est un sous-produit agricole à haute teneur en cellulose. Des recherches ont été menées pour utiliser le son de riz comme support / substrat pour produire la cellulase au moyen du processus de fermentation (Soeka et Sulistiani, 2018).



**Figure 08.** Son de riz (Sadh et *al.*, 2018).

Il est principalement composé de cellulose, d'hémicellulose et de lignine, il peut être utilisé comme source de carbone et inducteur enzymatique pendant la production de cellulases, les déchets de son de riz sont des sources abondantes, renouvelables, et présentent de nombreux avantages opérationnels, notamment un faible coût, nécessitent peu d'espace et facilement accessibles de nutriments pour la croissance de champignons cellulotiques (Sugiwati et *al.*, 2020).

Le son de riz (SR) est l'un des résidus de déchets agro-industriels les plus populaires préférés par de nombreux chercheurs pour produire des métabolites à valeur ajoutée par FMS à partir de divers micro-organismes (Bahouli et Zidalmal, 2020).

Navaneethapandian et *al.* (2020) ont réalisé une étude pour examiner la production de cellulase par des espèces d'*Aspergillus* en utilisant le son de riz comme substrats de fermentation à l'état solide (FMS). Les résultats de cette étude ont révélé un rendement élevé de la production de l'enzyme cellulase. En effet, dans leur travail, le son de riz a été sélectionné comme meilleur substrat pour la production de cellulase à l'aide d'*Aspergillus*.

### **1.3. Bagasse de canne à sucre**

La bagasse de canne à sucre (Figure 09) est un résidu agricole à grand quantité qui est généré sur une base d'environ 540 millions de tonnes métriques/an dans le monde. Les trois principaux pays producteurs d'Amérique latine étant respectivement le Brésil (~ 181 millions de tonnes métriques/an), le Mexique (~ 15 millions de tonnes métriques/an) et la Colombie (~ 7 millions de tonnes métriques/an) (Bezerra et Ragauskas, 2016).

La bagasse de canne à sucre est une biomasse lignocellulosique formée par de fibres végétales broyées, et peut présenter jusqu'à 30% de la matière issue de la canne, la bagasse est fortement générée par les industries sucrières plus ou moins partout dans le monde (Plancher, 2011).

Elle constitue un bon substrat pour la production d'enzymes cellulolytiques en fermentation en milieu solide puisque cette biomasse est composée principalement de cellulose (40-50%), d'hémicellulose (25-35%) et de lignine (7-29%) (Rodríguez-Zúñiga et al., 2013).

Une étude a été faite pour la production de cellulases à partir des moisissures *Penicillium sp.*, *Rhizomucor sp.*, et *Trichoderma koningii*, en utilisant la bagasse de canne à sucre naturelle et prétraitée par une solution acide-alcaline et du peroxyde d'hydrogène comme substrats.

Les résultats ont montré que la moisissure la plus appropriée pour la production de cellulases était *T. koningii*, suivi par *Penicillium sp.* De plus, les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant la bagasse de canne à sucre naturelle comme substrat pour tous les champignons (Salomãoa et al., 2019).

En outre, la bagasse de canne à sucre séchés à l'air, broyé et fractionnée par la taille. La bagasse d'une taille de particule comprise entre 500 et 1000  $\mu\text{m}$  a été utilisée comme substrat pour SSF sans aucun prétraitement (Naveen Kumar Mekala et al., 2008).



Figure 09. Bagasse de canne à sucre (Kumar et al., 2014 ; Postdam et al., 2019).

## 2. Meilleurs souches fongiques productrices

Les champignons sont principalement préférés aux bactéries en raison de leur utilisation polyvalente du substrat et de leur capacité de pénétration dedans. Des champignons comme *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Verticillium* et *Chaetomium* ont été étudiés pour la production de cellulase.

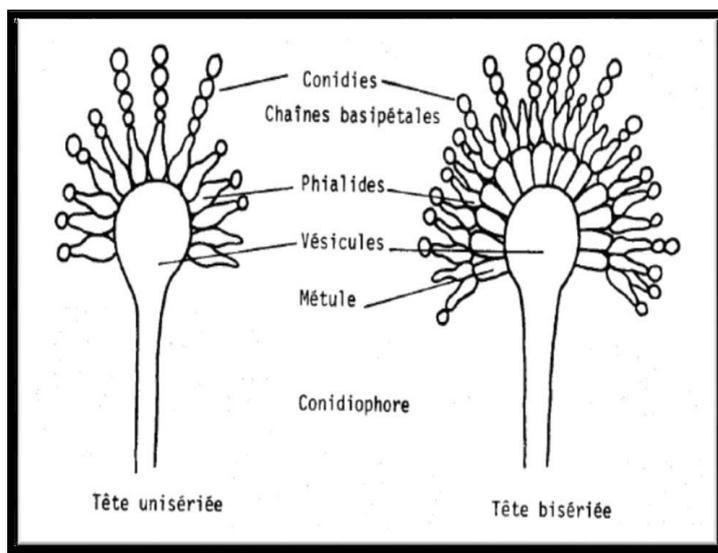
Parmi eux *Aspergillus* et *Trichoderma* sont principalement étudiés, car ils sont utilisés à des fins industrielles et agricoles (Chineduet al., 2011 ; Pradeep et al., 2012 ; Singh et al., 2019).

## 2.1. Champignons du genre *Aspergillus*

### 2.1.1. Les *Aspergilli*

Les *Aspergilli* ont été décrits pour la première fois par Micheli en 1729 (Figure 10). Le nom est dû à leur structure portant les spores ressemblant à *l'Aspergillum*. Ce sont des champignons filamenteux, ou moisissures, ubiquitaires (Bennett, 2009).

Ils regroupent 180 espèces officiellement reconnues. Parmi les *Aspergilli*: *Aspergillus nidulans*, *niger*, *oryzae* et *fumigatus* sont les plus étudiés.



**Figure 10.** Tête aspergillaire bisériée (gauche) et unisériée (droite) (Guillaume et Alcindor, 2006).

### 2.1.2. *Aspergillus fumigatus*

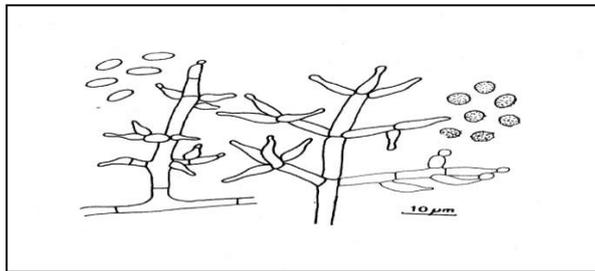
*Aspergillus fumigatus* ont été criblés pour leur capacité de production de cellulase. La production de cellulase a été analysée dans les déchets agricoles tels que le son de riz, la moelle de coco, le son de blé et la balle de riz (Shobana et al., 2013).

Parmi les études, *Aspergillus fumigatus* a une activité enzymatique élevée dans le son de riz. La production maximale de cellulase a été remarquée à une température de 25 °C et pH 4, concentration de substrat 5g pour *Aspergillus fumigatus*. Ce qu'a été conclu, *l'Aspergillus fumigatus* a montré le plus haut niveau de production de cellulase qui était recommandé pour la production de cellulase au niveau industriel (Shobana et al., 2013).

## 2.2. Champignons du genre *Trichoderma*

### 2.2.1. Les *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* (Figure 11) regroupe un ensemble de champignons imparfaits saprophytes de type mésophile aérobie, qui se retrouve couramment dans le sol, sur le bois mort, les débris végétaux et les organes aériens des plantes. Les espèces du genre *Trichoderma* sont les plus utilisées pour l'étude du mécanisme du complexe enzymatique ainsi que pour la production de cellulase. En effet, des quantités importantes d'exo enzymes capables d'hydrolyser complètement la cellulose et des matières lignocellulosiques en glucose (Merino et cherry, 2007 ; Sims, 2010).



**Figure 11.** Aspect microscopique de *Trichoderma* (Botton et al., 1990).

### 2.2.2. *Trichoderma reesei*

Le champignon *Trichoderma reesei* est le principal organisme producteur de cellulases utilisé par l'industrie, est cultivé dans des réacteurs fermés et les enzymes sont récupérés à la fin du processus (Lynd, 2002 ; Merino et cherry, 2007 ; Kubicek, et penttila, 1998). Il produit au moins 2 exoglucanases (Shomaker et al., 1983 ; Chen et al., 1987), 5 endoglucanases (Penttila et al., 1987) et 2  $\beta$ -glucosidases ( Barnett et al., 1991 ; Takashima et al., 1999). Cette espèce a été isolée de substrats et habitats divers, entre autres : algues, bois (sain, en décomposition), matières synthétiques (plastique), papier, produits alimentaires (céréales, tomates), sol, textile (coton). Au cours de sa croissance, *T. reesei* produit des quantités importantes de cellulase très actives capables d'hydrolyser complètement les substrats cellulosiques (Berlin, 2005 ; Jørgensen, 2005), et elle a fait l'objet d'utilisation industrielle (Godfrey et al., 1996 ; Nieves et west, 1998 ; Merino et cherry , 2007 ).

### 3. Comparaison entre FMS et FML

Le tableau 05 présente une comparaison entre les forces et les faiblesses de chaque technologie.

**Tableau 05.** Comparaison entre la FMS et FML (Sobal, 2002).

<b>Facteur</b>	<b>Fermentation en milieu liquide</b>	<b>Fermentation en milieu solide</b>
<b>Substrats</b>	Substrats solubles (sucres).	Substrats polymères insolubles.
<b>Conditions aseptiques</b>	Stérilisation par la chaleur/ asepsie contrôlée.	Traitement à la vapeur, conditions non stériles.
<b>L'eau</b>	Grands volumes d'eau utilisés et d'effluents pollués.	Consommation limitée d'eau /peu d'effluent.
<b>Chaleur métabolique</b>	Contrôle de la température facile.	Faible capacité de transfert thermique.
<b>Aération</b>	Limitée à l'oxygène soluble, haut niveau d'air requis.	Aération simple et haute (échange d'air / substrat).
<b>Contrôle du PH</b>	Facile	Substrat solide tamponné.
<b>Agitation mécanique</b>	Bonne homogénéisation.	Conditions statiques.
<b>Echelle</b>	Equipements industriels Disponibles.	Besoin de conception de nouveaux équipements.
<b>Inoculation</b>	Inoculation simple/ procédé continu.	Par spores ou mycélium.
<b>Contamination</b>	Risques de contaminations.	Risque, notamment si le microorganisme pousse lentement.
<b>Consommation d'énergie</b>	Consommation élevée.	Faible consommation.
<b>Volume de l'équipement</b>	Grand volume et grand coût.	Petit volume et petit coût.
<b>Effluents et pollution</b>	Grands volumes d'effluents pollués.	Absence d'effluents, moins de Pollution.
<b>Concentration S/produits</b>	30- 80/L	100-300/L

### 3.1. Fermentation en milieu solide et la production de cellulase

Ces dernières années, la production d'enzymes à partir de FMS a attiré l'attention en raison de la simplicité, de la productivité élevée et de la stabilité qui les rendent adaptées aux processus industriels. Plusieurs revues sur la production d'enzymes à partir de FMS ont été publiées ces dernières années.

Les champignons, les levures et les bactéries sont capables de produire diverses enzymes par FMS, car l'environnement dans FMS est favorable à la plupart des micro-organismes (Abu Yazid et *al.*, 2017).

La production de cellulases par FMS gagne rapidement un intérêt en tant que technologie rentable car les microorganismes, en particulier les cultures fongiques, produisent des titres relativement élevés de cellulase en raison des conditions de fermentation qui présentent une similitude avec l'environnement naturel. Des champignons filamenteux tels que *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, etc. ont été employés pour la production de cellulase en utilisant une fermentation à l'état solide où un milieu de sels minéraux basaux a été utilisé pour humidifier le substrat.

### 3.2. Facteurs influençant la production de cellulase microbienne par FMS

#### 3.2.1. Température

La température affecte directement la germination des spores, la croissance des micro-organismes, et la production de cellulase dans la FMS (Farinas et *al.*, 2011; Liu et *al.*, 2014). De plus, le niveau de température atteint est fonction du type de micro-organismes et la porosité, le diamètre des particules et la profondeur du substrat (Yoon et *al.*, 2014).

Habituellement, un intervalle de températures de 25 à 30°C s'avère optimale pour la plupart des microorganismes mésophiles dans la FMS (Farinas et *al.*, 2011 ; Bhalla et *al.*, 2013 ; Liu et *al.*, 2014). La température optimale des cellulases fongiques varie entre 40 et 70°C, alors que celle des bactéries varie entre 50 et 100°C, ce qui explique leur utilisation en industrie du textile (Boulila et Hamalt, 2002).

### 3.2.2. pH

Le pH est un facteur qui peut agir comme un agent régulateur de production par les micro-organismes dans la FMS (Caceres et *al.*, 2015). Le pH d'une culture peut changer en réponse aux activités métaboliques microbiennes. La raison la plus claire est la sécrétion d'acides organiques tels que les acides citriques, lactiques et acétiques, en particulier dans les cultures fongiques, cela fera baisser le pH (Parmar et Rupasinghe, 2012 ; Liet et *al.*, 2013).

La plupart des préparations cellulolytiques étudiées ont un pH optimum variant de 3 à 7 (Lynd et *al.*, 2002). Celles d'origine fongique ont une gamme plus limitée (pH de 4 à 5), contrairement aux cellulases bactériennes dont le pH optimum est proche de la neutralité (Hocini et Meziani, 2013).

### 3.2.3. Activité de l'eau / teneur en humidité

La teneur en humidité est un facteur critique pour les processus FMS, car cette variable stimule la croissance des microorganismes et la biosynthèse de la cellulase (Menon et Rao, 2012). Cependant, les besoins en humidité des micro-organismes doivent être mieux définis en termes d'activité de l'eau ( $A_w$ ), plutôt que la teneur en humidité du substrat solide (Van Dyk et Pletschke, 2012). De plus, l' $A_w$  affecte le développement de la biomasse et les processus de transfert de masse. L' $A_w$  optimale pour la croissance d'un certain nombre de champignons utilisés dans les processus SSF est d'au moins 0.96 (Buck et *al.*, 2015).

### 3.2.4. Processus de transfert de masse

En FMS, les processus de transfert de masse liés aux gaz et à la diffusion des nutriments sont fortement influencés par la structure physique de la matrice et par la phase liquide du système (Li et *al.*, 2013).

#### 3.2.4.1. Diffusion de gaz

L'aération a essentiellement deux fonctions : (1) l'apport d'oxygène pour le métabolisme aérobie et (2) l'élimination du CO<sub>2</sub>, de la chaleur, de la vapeur d'eau et des composants volatils produits au cours du métabolisme (He et Chen, 2013).

En général, la diffusion de gaz augmente avec la taille des pores et diminue avec la réduction du diamètre de la particule due à l'emballage du substrat (Rodrigues-Zuniga et *al.*, 2013; Chen et *al.*, 2014).

#### **3.2.4.2. Diffusion des nutriments**

La diffusion des nutriments fait référence au transfert de masse des nutriments et des enzymes, qui comprend à la fois la diffusion des nutriments intra particulaires vers les cellules et l'hydrolyse des substrats solides par les enzymes microbiennes (Guo *et al.*, 2010). Les processus de diffusion des nutriments sont particulièrement importants dans les processus FMS bactérien et de levure processus (Zhi et Wang, 2014).

#### **3.2.5. Taille des particules du substrat**

La taille des particules du substrat joue un rôle crucial dans la production d'enzymes. L'effet de la taille des particules sur la croissance et la formation des produits a été étudié par différents auteurs (Xin et Geng, 2010; Membrillo *et al.*, 2011; Schmidt et Furlong, 2012; Wan et Li, 2012 ).

Ils ont utilisé différentes souches sur différents substrats (différentes tailles de particules), des différences ont été signalées dans la production d'enzymes lignocellulolytiques (Membrillo *et al.*, 2011 ). Généralement, une plus petite taille de particules de substrat fournit de plus grandes surfaces pour une attaque microbienne et est donc un facteur souhaitable (Zhang et Sun, 2014).

Cependant, l'utilisation de particules de substrat trop petites peut entraîner une accumulation de substrat, ce qui peut interférer avec la respiration /aération microbienne et, par conséquent, entraîner une mauvaise croissance. En revanche, les particules plus grosses offrent une meilleure efficacité de respiration / aération (en raison de l'augmentation de l'espace inter-particules).

Cependant, elles fournissent une surface limitée pour une attaque microbienne. Cela nécessite une taille de particules compromise pour un processus particulier ainsi qu'un substrat particulier (Caceres *et al.*, 2015 ).

### **3.3. Avantages et Inconvénients de la fermentation solide**

Plusieurs avantages et inconvénients de la FMS par rapport à la FML sont résumés dans le tableau 06.

**Tableau 06.** Avantages et inconvénients de la FMS (Lonsane et *al.*, 1985 ; Hesseltine, 1987 ; Pandey et Soccol, 2000).

Les principaux avantages de la FMS	Les principaux inconvénients de la FMS
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Matériel utilisés moins complexes d'où réduction des coûts.</li> <li>-- Le produit final (spores, métabolites...) est facilement récupérable.</li> <li>- Diminution des risques de contaminations microbiennes à cause de la faible humidité.</li> <li>- Simplicité des milieux de culture, en effet le substrat de fermentation est généralement très simple et le plus souvent naturel.</li> <li>- Production plus importante.</li> <li>- La technologie de production d'enzymes commerciales par FMS est simple, elle ne porte pas sur des micro-organismes génétiquement modifiés (Raimbault, 1980).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Choix limité des micro-organismes utilisables en raison du faible taux d'humidité.</li> <li>- La quantité d'eau utilisée en début de fermentation doit être mesurée avec une grande précision.</li> <li>- Les procédés de la FMS sont plus lents que ceux de la FML d'où la nécessité de prétraitements du substrat pour favoriser l'accès du champignon aux nutriments.</li> <li>- Difficulté de contrôle et d'automatisation de la fermentation (Durand, 1983).</li> <li>- Difficulté de régulation de certains paramètres (pH, température, niveau d'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub>...) surtout à grande échelle.</li> </ul>

### 3.4. Domaines d'application de la fermentation en milieu solide

La fermentation en milieu solide est traditionnellement utilisée pour la fabrication de nombreux produits alimentaires dans les pays orientaux et africains (Prevot, 2013). La FMS est brièvement associée à la production d'aliments fermentés traditionnels tels que les « *Koji* », « *Tempeh* » indonésien ou « *Ragi* » indien (Mienda1 et *al.*, 2011). La FMS a ouvert un nouveau paradigme de bioconversion des déchets solides organiques à travers la production des métabolites biologiquement actifs à la fois en laboratoire et à l'échelle industrielle. L'application de la FMS dans la production de différents bioproduits a été largement rapportée, notamment des enzymes, des acides organiques, biofertilisants, biopesticides, biosurfactants, bioéthanol, composés aromatiques, aliments pour animaux, pigments, vitamines, antibiotiques, etc. (Noraziah et *al.*, 2017).

La FMS s'est développée progressivement à d'autres domaines d'applications autres que l'alimentaire (Tableau 07).

**Tableau 07.** Principaux domaines d'applications de la FMS (Prevot, 2013).

<b>Domaine d'application</b>	<b>Produits</b>	<b>Microorganismes</b>
<b>Alimentaire</b>	Champignons supérieurs  Fromages à pâte persillée  Fromages à croûte fleurie (camembert, brie, etc.)  Pain	<i>Agaricus bisporus</i> (Champignon de Paris)  <i>Penicillium roquefortii</i>  <i>P. camembertii</i>  <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Acides organiques</b>	Acide citrique  Acide lactique	<i>Aspergillus niger</i>  <i>Rhizopus oryzae</i>
<b>Enrichissement nutritif (protéines) des aliments</b>	Canne à sucre, manioc, pulpe de betterave, etc.	<i>Aspergillus spp.</i> <i>Trichoderma spp.</i>
<b>Métabolites secondaires</b>	Arômes  Antibiotiques (Pénicilline)  Hormones végétales (acide gibbérellique)  Alcaloïdes (Ergot)	<i>Penicillium spp.</i> <i>Trichoderma</i>  <i>P. notatum</i>  <i>Gibberella fujikuroi</i>  <i>Claviceps purpurea</i>
<b>Lutte biologique (biocontrôle/biopesticide)</b>	Biofongicides, bioinsecticides, etc.	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Coniothyrium minitans</i>

<b>Enzymes</b>	Amylases, Glucoamylases	<i>Aspergillus spp.</i>
	Cellulases	<i>Trichoderma spp.</i>
	Xylanases	<i>Aspergillus spp.</i>

# Conclusion

Ce document vise à une recherche bibliographique sur les cellulases produites par des souches fongiques.

L'immense potentiel des cellulases à hydrolyser les composés cellulosiques les rend extrêmement applicables aux industries, telles que l'industrie du textile, l'industrie alimentaire, l'industrie du papier, l'alimentation animale, etc.

Les cellulases microbiennes occupent une place importante dans l'industrie à l'échelle mondiale.

La bioconversion de la lignocellulose est réalisée par des micro-organismes qui ont la capacité de produire des enzymes telles que les cellulases et les xylanases (Kluepfel et *al.*, 1992). Parmi ces micro-organismes, les moisissures des genres *Aspergillus* et *Trichoderma* sont considérées comme les champignons modèles pour étudier la production de la cellulase sur milieu à base de résidus agroindustriels tels que son de blé, le son de riz et les bagasse de canne qui peuvent servir comme substrats idéaux pour les processus microbiens de production des enzymes cellulolytiques.

D'après la littérature l'*Aspergillus fumigatus* a montré le plus haut niveau de production de cellulase qui a été recommandé pour la production de cellulase au niveau industriel.

La synthèse de la cellulase par fermentation à l'état solide pourrait potentiellement réduire le coût de production en raison de certains avantages en comparant avec celle par fermentation liquide, tels que la faible consommation d'énergie et le rendement élevé du produit.

L'effet de la température, du taux d'inoculation, du pH initial et de source carbonée sur la production des enzymes, est aussi établi. La production maximale de cellulase a été remarquée à une température de 25 °C et pH 4, concentration de substrat 5g pour *Aspergillus fumigatus*.

Et comme perspectives nous pensons à encourager beaucoup la production de cellulase par fermentation solide en cultivant des moisissures sur milieu à base de différents résidus agroindustriels.

# **Références Bibliographiques**

**Aabdani I., Bakhti A. (2017).** Composition biochimique et nutritionnelle de différentes variétés de blé commercialisé en Algérie. Mémoire Master Recherche. Sciences agronomiques. Université Abdelhamid Iben Badiss, Mostaganem.

**Abada E., Elbaz R., Sonbol H., Korany S. (2021).** Optimization of cellulase production from *Bacillus albus* (MN755587) and its involvement in bioethanol production. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30(3): 2459-2466.

**Abdullah J., Greethan J., Pensnpa D., Tucker N., G A., Du C. (2016).** Optimizing cellulase production from municipal solid waste (MSW) using solid state fermentation (SSF). *Journal of fundamental of Renewables Energy and application*, 6(3): 1-10.

**Achorya A., Joshi D., Shrestha K., Bhatta D. (2012).** Isolation and screening of thermophilic cellulolytic bacteria from compost piles. *The scientific world journal*, 10(10): 43-46.

**Agrawal S. (2014).** Cellulase of bacterial origin and their application : A review. *International journal of science and research (IJSR)*, 3: 2319-7064.

**Bakare M. et al. (2005).** Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Afri. J. Biotechnol*, 4: 898–904.

**Balac H., Natorajan S. (2014).** Production, purification and characterization of a new cellulase from *Bacillus subtilis* that exhibit halophilic alkalophilic and solvent-tolerant properties. *Ann Microbiol.* 64 : 1839 – 1848.

**Bèguin P., Aubert J P. (1994).** The biological degradation of cellulose, *fems, microbiol. Rev.* 13 p: 25-58.

**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 Master Recherche. Génie Biologique. Université A. Mira, Bejaia. Algérie.

**Bezerra T. Ragauskas A. (2016).** A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. *Biofuels, bioproducts. & biorefining*, 1-14. DOI: 10.1002/bbb.1662.

**Bhagat S., et al. (2021).** Isolation and identification of bacteria with cellulose-degrading potential from soil and optimization of cellulase production. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 9(6): 1-6.

**Blume J.E., Ennis H.L. (1991).** A dictistelium dicoideum cellulose is a member of a spore germination-specific gene family. *J. Biol. Chem.* 266 (23). p:15432-15437.

**Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris.

**Bourdeau A. G. Ménard. (1992).** Le blé, éléments fondamentaux et transformation. Laval, Les Presses de l'Université de Laval.

**Caceres R., Coromina N., Malinska K., Marfa O. (2015).** Evolution of process control parameters during extended co-composting of green waste and solid fraction of cattle slurry to obtain growing media. *Bioresource Technology*, 9(179), 398–406.

**Chow- chin T., et al. (1992).** Effect of carbon and nitrogen sources of the production of cellulase enzymes of a newly isolated *Aspergillus*. *Biochemistry and Microbiology*, 15(1):44-50.

**Claisse N. (2012).** Préparation et modification d'oligosaccharides de cellulose par chimie douce bio-inspirée. Thèse de doctorat en chimie organique, Université de Grenoble France.

**Coughlan M. P. (1985).** The Properties of Fungal and Bacterial Cellulases with Comment on their Production and Application. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3(1): 39–110.

**Da-Vinha F.N.M., Gravina-Oliveira M.P., Franco M.N., Macrae A., Da-Silva-Bon E.P., Nascimento R.P., Coelho. R.(2011).** Cellulase Production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 Using Lignocellulosic Biomass as Inducer Substrate. *Appl Biochem Biotechnol*, 164: 256–267.

**Esen A. (1993).**  $\beta$ -Glucosidase: Biochemistry and Molecular Biology. American Chemical Society, Washington DC.

**Gideon D., Brnard H. (1992).** Structures and mechanisyes of g lycoyl hydrolysed. *Current biology* 3:853-859.

**Guo Y. et al. (2010).** The preparation and application of crude cellulase for cellulose-hydrogen production by anaerobic fermentation. *international journal of hydrogen energy*, 35, 459–468.

**Hamoudi H., (2011).** *Criblage de souches d'actinomycètes productrices de cellulases industrielles.* Mémoire De Magister. Université A. Mira de Bejaia. Algérie.

**Hocini A., Meziani w. (2013).** Isolement et caractérisation de chompignons cellulolytique de sols de Béjaïa. Mémoire Master Recherche. Université Abderrahmane Mira de Béjaïa, 48p.

**Korish M. (2003).** Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast isolate.

**Laouni H. (2021).** Optimisation de la production de cellulase par différent souche bactérienne. Mémoire Master Recherche: Microbiologie Appliqué. Université Mohamd Khider de Bishra, 40 p.

**Leghlimi H. (2013).** Cellulases de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de Doctorat en Sciences.

**Li-Jung Y., Hsin-Hung L., Zheng-Rong X. ( 2010).** Purifucation and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilisyj1*. *Journal of Marine Science and Technology*, 18(3): 466-471.

**Lokhande S., Pethe A. (2017).** Isolation and screening cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production. *International journal of life sciences*, 5 :277 – 282.

**Lynd L., et al. (2002).** Microbial Cellulose Utilization. Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577.

**MacKenzie C., et al. (1987).** Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces spp.* *Applied and environmental microbiology*. 53(12): 2835-2839.

**Mai C., Kües U., Militz H. (2004).** Biotechnology in the wood industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63:477–494.

**Navaneethapandian U. et al. (2020).** Biocatalyst. Cellulase Production in Solid State Fermentation (SSF) Using Rice Bran as Substrate. *Biointerface research in applied chemistry*, 11(1), 7689 – 7699. DOI: 10.33263/BRIAC111.76897699.

**Padmavathi T., vaswati N., Puneet A. (2012).** Optimization of the medium for the production of cellulase by *Aspergillus Terreus* and *Mucor Plumbens*. *European journal of experimental Biology*, 2(4):1161-1178.

**Plancher W. (2011).** Comparaison des performances techniques, des qualités physico-chimiques et microbiologiques du sirop de canne issu de trois types d'ateliers à Gros morne (Etude de cas : Savane carrée et Ravine Gros morne). Mémoire Master recherche. Agronomiques. Université d'état d'Haïti.

**Prevot Vincent. (2013).** Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne.

**Ramesh C., Richa S., Hena D., Som D., Arvind G. (2008).** A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *CrruMicrobial*. 57: 503 – 507.

**Ramos L., et al. (2010).** chapter 21. Enzymatic Saccharification of Cellulosic Materials. *Methods in Biotechnology. Environmental Microbiology. Methods and Protocols*. 219-233.

**Reffas F. (2017).** *Isolement et caractérisation de bactéries productrices de cellulase*. Thèse de doctorat en sciences biologique, Université Djillali Liabes Sidi Bel Abbas, Algérie.

**Richa G., Jitender Sharma. ( 2014).** Optimization, Purification of Cellulase Produced From *Bacillus Subtilis* Subsp. *Inaquosorum* Under Solid State Fermentation And Its Potential Applications in Denim Industry. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 3: 1759- 1763.

**Robson L., et al. (1989).** Cellulase of bacterial origin. *Enzyme and Microbial technology*. 11(10): 626- 644.

**Rodjana O., Yanling H., Onnop Wara., Tkashi A., Jisnuson S., Asim E., Jones R., Ketudat Saurns. (2004).** B-glucosidase,exo-B -glucanase pyridoxine transglucosylase activities of vice B Glu 1. *Biochemical society*. 379:125-131.

**Rodrigues et al. (2010).** Enhancement of Escherichia coli cellulolytic activity by co-production of Beta-glucosidase and endoglucanase enzymes. *Electronic journal of Biotechnology*, 3: (10):222-225.

**Rodríguez-Zúñiga U. Couri S., Neto V. Crestana, S., Farinas, C. (2013).** Integrated Strategies to Enhance Cellulolytic Enzyme Production Using an Instrumented Bioreactor for Solid-State Fermentation of Sugarcane Bagasse. *Bioenergy research*, 6, 142–152. DOI 10.1007/s12155-012-9242-y.

**Sadh P., Duhan, S., Duhan J. (2018).** Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation. A review. *Bioresources and bioprocessing*, 5(1), 1-15.

**Schamburg D., Salzman M. (1991).** Cellulase. *In: Enzyme Handbook, Vol IV.* Springer-Verlag Berlin, p: 1-11.

**Scriban R. (1993).** *Trichoderma reesei* exhibitis true revercibility and a high exchange rate on cristalline cellulose. *Biotechnologie*. P : 32-690,4<sup>é</sup>me édition.

**Shareda et al. (2014).** Application of cellulase. *International journal of pharmaceutical, chemical and biological science*, 4(02): 424-437.

**Sikyta B. (1983).** Development of microbial process. *Microbial Culture Methods*. 250-274.

**Siqueira J. et al. (2020).** Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. *Biomass and Bioenergy* 132(105419), 1-12.

**Soeka Y. Sulistiani S. (2018).** Production and characterization of cellulase from the newly isolated *Bacillus subtilis* A8 on rice bran and corncob. *Earth and environmental science*, 308(012033), 1-11.

**Soma M., Rangasamy M. (2011).** Production of cellulase by *Aspergillus Niger* under submerged and solid state fermentation. Using coir wastes ASA substrate. *Brazilian journal of microbiology*, 42: 1119- 1127.

- Sugiwati S., Hanafi M., Nuryanilioe H., Suhartono T. (2020).** Effect of growth conditions on  $\beta$ -glucosidase production by local isolate of *Aspergillus niger* using rice bran substrate. *Biodiversitas*, 21(9).
- Sukumaran R., et al. (2005).** Microbial cellulase – production, application and challenges. *Journal of scientific and industrial research*, 64(11): 832- 844.
- Tbsea E. (2006).** Extraction, purification et caractérisation de deux cellulase du termite *Macrotermes subhyalinus*. *Agronomie Africain*. 18(1): 57-65.
- Verma N., Kumar V., Bansal, M. (2020).** Valorization of Waste Biomass in Fermentative Production of Cellulases. A Review. *Waste and Biomass Valorization*, 1-28.
- Xin F., Geng A. (2010).** Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 295–306.
- Xu B. (2002).** Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*: Purification, Characterization, Gene and Three Dimensional Structure. Thèse de doctorat. Faculty of Science and Technology, Uppsala University, Sweden.
- Yin L. J., Huang P. Lin H. (2010).** Isolation of cellulase- production bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *cellulomanas Sp Y J 5*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(17): 9833-9837.
- Zhang L., Sun X. (2014).** Effects of rhamnolipid and initial compost particle size on the two-stage composting of green waste. *Bioresour. Technol*, 163, 112–122.
- Zhi Z., Wang, H. (2014).** White-rot fungal pretreatment of wheat straw with *Phanerochaete chrysosporium* for biohydrogen production. simultaneous saccharification and fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37, 1447–1458.

# **Les Annexes**

**Annexe 01****Composition des milieux de culture****1/ Agar blanc :**

Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml

**2/ Czapeck Dox**

Saccharose .....	30g
NaNO <sub>3</sub> .....	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O. ....	0.5g
KCl.....	0.5g
F <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O .....	0.01g
Agar .....	15g
Eau distiller .....	1000ml

**3/Gélose à l'extrait de Malt**

Extrait de malt.....	20g
Acide citrique .....	5g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000 ml

Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 30 min.

**4/ Potato Dextrose Agar « PDA »:**

Extrait de pomme de terre.....	Infusât de 200g pomme de terre
Glucose.....	20g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

**Préparation de l'extrait pomme de terre :**

200 g de pommes de terre non pelées et vieilles, sont lavés et coupés en petits cubes. Ensuite, mis dans un litre d'eau distillée et portés à ébullition pendant 1 heure. Ils sont enfin écrasés, filtrés.

Préparation du milieu :

Le glucose et l'agar sont dissous à chaud dans l'extrait. Compléter à un litre d'eau distillée et stériliser à 110°C pendant 30 minutes (Botton et *al.*, 1990).

**5/ Malt extract agar « MEA »**

Extrait de malt.....	20 g
Peptone.....	1 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau distillée .....	1000 ml

Préparation du milieu :

Dissoudre les constituants dans l'eau distillée, compléter le volume à 1000 ml, stériliser le mélange à 121°C pendant 15 minutes.

**Annexe 02****Composition de Bleu coton**

Glycérol.....	40g
Phénol.....	20g
Acide lactique.....	20g
Colorant bleu coton .....	0.05g
Eau distillée.....	20ml

**Annexe 03****Préparation de réactif DNS**

Dissoudre 1g de DNS dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée. Ajouter 30g tartrate double Na, K. Compléter à 100ml avec l'eau distillée, agité. Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière. Il se conserve environ un mois (Miller, 1959).

# Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

Date de soutenance : Le 20 / 06 / 2023

Présenté par : REHAMNIA AMINA

OUAR ROUMEISSA

Thème : **Etude bibliographique sur la production des cellulases d'origines fongiques**

## ***Résumé***

Les cellulases sont des enzymes hydrolases (EC 3.2.1.4) largement utilisées dans l'industrie biotechnologique. Elles sont nécessaires en grande quantité en raison de leur application dans de nombreuses industries, telles que le textile, les détergents, nutrition animale, le papier et la pâte à papier. La production de cellulase a été signalée à partir d'une grande variété de bactéries et de champignons. Cependant, les champignons filamenteux sont préférés pour la production commerciale d'enzymes, car le niveau des enzymes produites par ces cultures est plus élevé que ceux obtenus à partir de levures et de bactéries, dont les moisissures du genre *Aspergillus* et *Trichoderma spp.* sont les plus dominants dans la synthèse de la cellulase. Les cellulases sont obtenues principalement à partir de la fermentation submergée (FML) en raison de la facilité de manipulation et du meilleur contrôle des facteurs environnementaux tels que la température et le pH. Cependant, la technique de fermentation à l'état solide (FMS) peut améliorer le rendement et réduire le coût de la production d'enzymes.

**Mots clés :** Cellulases, les champignons cellulolytiques, fermentation, *Aspergillus*, *Trichoderma*, sous-produits lignocellulosiques.

### **Jury d'évaluation :**

<b>Présidente du jury :</b>	Melle. ABDELAZIZ O.	M. C. B - UFM Constantine 1
<b>Promotrice :</b>	Melle. BELMESSIKH A.	M. A. A - UFM Constantine 1
<b>Examinatrice :</b>	Mme. LEGHLIMI H.	M. C. A - UFM Constantine 1

**Année universitaire : 2022 /2023**