



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



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

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie Appliquée

قسم: البيولوجيا التطبيقية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie et Biothérapie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Etude de la saccharification enzymatique de la biomasse
lignocellulosique par des cocktails (hémi-)cellulolytiques de *Bacillus
velezensis* H1**

Présenté par : GUERRAS Maroua

Le: 11/06/2024

HAFIANI Nihal

Jury d'évaluation :

Président: Mme. BENCHIHEUB Meriem (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Mlle. DJELID Hadjer (MAB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examineur : Mme. MADI Aicha (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Année universitaire
2023 - 2024**

Remerciement

À la fin de ce travail, nous souhaitons exprimer notre gratitude envers Allah, le Tout-Puissant, pour nous avoir donné la patience et le courage nécessaires pour mener à bien ce travail.

Tout d'abord, nous tenons à remercier notre belle encadrante, « Dr. DjelidHadjer », pour son expertise, sa patience, son soutien tout au long de ce travail, ainsi que pour ses commentaires constructifs et ses suggestions judicieuses. Ces éléments ont permis d'améliorer la qualité de notre travail et de développer nos compétences en recherche. Nous sommes également reconnaissants pour sa disponibilité et sa volonté de répondre à nos questions, même les plus complexes.

Nous souhaitons exprimer notre gratitude à tous ceux qui ont contribué au succès de notre travail ainsi qu'à ceux qui nous ont apporté leur soutien, y compris les enseignants et les employés. Nous tenons également à remercier chaleureusement nos collègues du laboratoire pour leur gentillesse et leur bon traitement envers nous.

Dédicace

Alhamdulillah qui nous a aidés à mener à bien ce travail

Je dédie ce modeste travail, à mes parents « Rabie » et « Fatima », à ma source de générosité et de patience tout au long de ma carrière scolaire. Que Dieu vous protèges, vous prêtez bonne santé et longue vie.

A mes frères « Samire » dieu ait son âme, « Saïf Dinne » et « Boubaker », mes sœurs « Naïma » « Nacima », « Amina » et « Zineb » et sa petite famille qui ont eu un grand impact sur de nombreux obstacles et difficultés et qui m'ont toujours indiqué.

La bonne voie et qui ont su m'aider.

À mon binôme « Nihal », ma partenaire gentille, calme et sage.

À tous mes professeurs et mes collègues et mes aimés « Rahma », « Choubaila », « Bouchra ».

MAROUA

Dédicace

Je Dédie ce travail à

À ma chère mère « Wissem », qui me donne toujours espoir de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi, elle a toujours été ma première source de soutien et d'encouragement, et c'est elle qui mérite le plus de gratitude et d'éloges pour tous ses efforts. Que dieu te protège.

À mon cher père « Nadir », je tiens à exprimer ma gratitude pour son soutien, son encouragement et son sacrifice pour que mes études se déroulent sans obstacles. Que Dieu te garde pour moi.

À mon frère "Khaleed", et aux princesses de notre maison, « Ilham », « Loujain » et « Sidra », je vous souhaite réussite et excellence dans vos études et votre vie.

À mes aimantes et gentilles grand-mères, « Warda » et « Zakia », que Dieu les protège et prolonge leur vie.

À mes amis et mes camarades qui m'ont soutenu, m'ont donné amour et réconfort et m'ont encouragé à traverser les moments les plus difficiles, je vous souhaite tout le meilleur. Que Dieu vous protège et vous aide.

Je vous aime tous et merci pour tout.

Tables des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Chapitre I : Revue bibliographique

1. Biomasse lignocellulosique.....3

1.1. Définition.....3

1.2. Composition et structure de la biomasse lignocellulosique.....3

1.2.1. Cellulose.....4

1.2.2. Hémicellulose.....5

1.3. Résidus agricoles lignocellulosique en Algérie.....6

1.3.1. Epluchures de pomme de terre.....6

1.3.2. Epluchures d'orange.....7

1.3.3. Résidus agricoles de tomate.....8

2. (hémi-)cellulases et les bactéries (hémi-)cellulolytiques9

2.1. Définition de la cellulase.....9

2.2. Différents modes d'action des cellulases.....9

2.2.1. Endoglucanases.....10

2.2.2. Exoglucanases.....10

2.2.3. β -glucosidases.....10

2.3. Définition de l'hémicellulase.....11

2.4. Différents modes d'action des hémicellulases.....12

2.4.1. Xylanases.....12

2.4.2. Mannanases.....12

2.4.3. Arabinofuranosidases.....13

2.5. Bactéries (hémi-)cellulolytiques impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique..... 14

3. Biosynthèse enzymatique des oligosaccharides.....15

Table des matières

3.1. Activité prébiotique des oligosaccharides.....	15
3.2. Utilisation des oligosaccharides comme additif alimentaire.....	16
3.3. Utilisation des oligosaccharides dans l’agriculture.....	16

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel biologique.....	18
1.1. Revivification de la souche bactérienne.....	18
1.2. Evaluation de la pureté de la souche.....	18
1.2.1. Examen macroscopique.....	18
1.2.2. Examen microscopique	18
1.2.3. Test de la catalase.....	19
1.2.4. Test oxydase.....	19
1.3. Détermination du taux de sporulation de la souche	19
2. Etude de l’activité cellulolytique et hémicellulolytique de <i>B. velezensis</i> H1.....	20
2.1. Production de cellulases et d’hémicellulase par fermentation submergée.....	21
2.1.1. Préparation des substrats hémicellulosiques.....	21
2.1.2. Préparation de l’inoculum.....	21
2.1.3. Inoculation des fioles et suivie des fermentations.....	21
2.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	22
2.2.1. Préparation du réactif de Bradford.....	22
2.2.2. Courbe d’étalonnage d'albumine sérique bovine (BSA).....	23
2.2.3. Dosage des protéines synthétisées par <i>B. velezensis</i> H1.....	23
3. Dosage des activités cellulases et hémicellulases.....	23
4. Saccharification enzymatique de la biomasse lignocellulosique.....	25
4.1. Identification des oligosaccharides par la méthode de chromatographie sur couche mince (CCM).....	26

Chapitre III : Résultats et Discussions

1. Caractérisation macro et microscopique de la souche <i>B. velezensis</i> H1.....	28
2. Evaluation du taux de sporulation	29
3. Potentiel (hémi-)cellulolytique de la souche <i>B. velezensis</i> H1.....	29
4. Production de protéines totales extracellulaires par <i>B. velezensis</i> H1	30

Table des matières

5. Production d'enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques par <i>B. velezensis</i> H1.....	32
6. Saccharification de la matière lignocellulosique par le cocktail enzymatique	35
6.1. Production d'oligosaccharides	36
6.2. Recherche d'autres activités enzymatiques	38
Conclusion	40
Références bibliographiques	42
Annexes	51

Résumé

Face aux coûts de production élevés des enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques à partir de substrats commerciaux, de nombreuses études visent à améliorer la production de ces enzymes par des microorganismes capables de les sécréter en grande quantité en utilisant comme substrat les déchets agricoles. Ces enzymes de type glycoside hydrolases ont le potentiel de saccharifier la biomasse lignocellulosique et la transformer en sucres simples fermentescibles, ce qui leur confère un grand potentiel biotechnologique dans plusieurs domaines. Le potentiel (hémi-)cellulolytiques de la souche de *B. velezensis* H1 a été initialement évalué sur un milieu gélosé contenant la carboxyméthyl-cellulose (CMC) et le xylane de maïs comme seules sources de carbone. L'apparition d'un halo clair autour de la colonie après 5 jours d'incubation à 30 °C, a indiqué la présence d'activités CMCCase et xylanase. La culture liquide de la souche sur ces mêmes substrats a montré une production maximale de protéines de 5.3 mg/mL sur le xylane de maïs après 48 h d'incubation à 30 °C. Pendant ce processus des activités xylanase, CMCCase, endo- β -1,4-glucanase et β -mannanase ont atteints respectivement 12 U/min/mL ; 24 U/min/mL ; 20 U/min/mL et 11 U/min/mL. L'hydrolyse de la matière lignocellulosique par ces enzymes a été étudiée en fermentation submergée, en utilisant 5% d'épluchures de pomme de terre (PDT) et d'orange (ORG), et des résidus de tomate (TMT) comme seules sources de carbone. Le suivi de la production de protéines totales a montré une production maximale après 72 h d'incubation avec des valeurs allant de 4.3 à 5.6 mg/mL. Les extraits enzymatiques ont révélé diverses activités (hémi-)cellulolytiques, telles que l'activité cellulase par la présence de CMCCase et d'endo- β -1,4-glucanase avec des activités maximales de 28 U/min/mL et 24 U/min/mL respectivement, ainsi que des activités hémicellulases comme la xylanase et la β -mannanase avec des activités enzymatiques de 14 U/min/mL et 20 U/min/mL respectivement. Une saccharification de TMT ORG, et de PDT non traités a été effectuée en utilisant l'extrait enzymatique obtenu. Les résultats ont révélé la libération de divers oligosaccharides provenant de la dégradation de la cellulose et l'hémicellulose des substrats utilisés avec des concentrations totales en sucres réducteurs allant de 4.4 à 11.6 mg/mL. L'identification de ces sucres à travers une chromatographie sur couche mince de silice a montré la présence de plusieurs oligosaccharides tels que le glucose, cellobiose, cellotriose, cellopentaose, rhamnose, xylose, fructose, indiquant la présence d'autres activités enzymatiques telles que β -fructosidase, α -l-rhamnosidase et β -glucosidase. Ces résultats indiquent le grand potentiel de la souche à dépolymériser et saccharifier la fraction complexe hémicellulosique afin de produire des sucres fermentescibles à haute valeur ajoutée.

Mots clés : Cellulase, Hémicellulase, Biomasse lignocellulosique, *B. velezensis* H1, Saccharification, Oligosaccharides

Abstract

Faced with the high production costs of cellulolysis and hemicellulysis enzymes from commercial substrates, many studies are aimed at improving the production of these enzymes by microorganisms capable of secreting them in large quantities using agricultural waste as a substratum. These types of hydrolase glycoside enzymes have the potential to saccharize lignocellulose biomass and transform it into fermentable simple sugars, giving them great biotechnological potential in several areas. The (hemi-)cellulolytic potential of the strain of *B. velezensis* H1 was initially evaluated on agar plates containing carboxymethyl cellulose (CMC) and maize xylane as the only carbon sources. The appearance of a clear halo around the colony after 5 days of incubation at 30 °C indicated the presence of CMCase and xylanase activities. Liquid strain culture on the same substrate showed maximum proteins production of 5.3 mg/mL on maize xylane after 48 hours of incubation at 30 °C. During this process, the activity of xylanase, CMCase, endo- β -1,4-glucanase and β -mannanase reached 12 U/min/mL; 24 U/ min/ml; 20 U/m/ml and 11 u/min/mL respectively. The hydrolysis of lignocellulose material by these enzymes has been studied in submerged fermentation, using 5% potato (PDT) and orange (ORG) peels, and tomato residues (TMT) as the only carbon.sources. Total protein production monitoring showed maximum production after 72 hours of incubation with values ranging from 4.3 to 5.6 mg/mL. The enzyme extracts revealed various (hemi-)cellulolytic activities, such as cellulase activity in the presence of CMCase and endo- β -1,4-glucanase with maximum activities of 28 U/min/mL and 24 U/ min/ml respectively, as well as hemicellular activities such as xylanase and β -mannanase with enzymatic activities of 14 U/min/ml and 20 U/ml, respectively. A saccharization of ORG, TMT, and untreated PDT was performed using the enzyme extract obtained. The results revealed the release of various oligosaccharides from cellulose and hemicellulose degradation from substrates used with total reducing sugar concentrations ranging from 4.4 to 11.6 mg/mL. Identification of these sugars through a thin-layer chromatography of silica showed the presence of several oligosaccharides such as glucose, cellobiosis, cellotriosis, celopentaosis, rhamnosis, xylose, fructose, indicating the existence of other enzyme activities such as β -fructosidase, α -l-rhamnosidase and β -glucosidase. These results indicate the high potential of the strain to depolarize and saccharize the hemicellulose complex fraction in order to produce high-value fermentable sugars.

Keywords: Cellulase, Hemicellulose, Lignocellulose biomass, *B.velezensis* H1, Saccharification,Oligosaccharide.

ملخص

في مواجهة ارتفاع تكاليف إنتاج الإنزيمات المحللة للسيلولوز و الهيميسيلولوز باستعمال الركائز التجارية، تهدفنا لعدد من الدراسات إلى تحسين إنتاج هذه الإنزيمات بواسطة الكائنات الحية الدقيقة القادرة على إفرازها بكميات كبيرة باستخدام البقايا الزراعية كركيزة. تتمتع إنزيمات جليكوسيد هيدرولاز بالقدرة على تحليل الكتلة الحيوية اللجنوسليلوزية وتحويلها إلى سكريات بسيطة قابلة للتخمر، مما يمنحها قيمة تكنولوجية حيوية كبيرة في العديد من المجالات. تم تقييم إمكانية تحليل السلولوز والهيميسيلولوز لسلالة *B. velezensis* H1 مبدئيًا على وسط زراعي صلب يحتوي على كربوكسيميثيل السلولوز (CMC) وكزيلان الذرة كمصادر وحيدة للكربون. يشير ظهور هالة واضحة حول المستعمرة بعد 5 أيام من الحضانة عند 30 درجة مئوية إلى وجود نشاط إنزيمي من نوع CMCCase و xylanase. أظهرت الزراعة السائلة للسلالة على هذه الركائز نفسها أقصى إنتاج للبروتين قدره 5.3 ملغم/مل بالنسبة إلى كزيلان الذرة بعد 48 ساعة من الحضانة عند 30 درجة مئوية. خلال هذه العملية، وصلت أنشطة Xylanase و CMCCase و endo-1,4- β -glucanase و β -mannanase إلى 12 وحدة / دقيقة / مل ؛ 24 وحدة/دقيقة/مل؛ 20 وحدة/دقيقة/مل و 11 وحدة/دقيقة/مل، على التوالي. تمت دراسة التحلل المائي للمادة اللجنوسليلوزية بواسطة هذه الإنزيمات في التخمر المغمر، باستخدام قشور البطاطا (PDT) وقشور البرتقال (ORG) وبقايا الطماطم (TMT) كمصادر وحيدة للكربون. أظهر رصد إجمالي إنتاج البروتين أقصى إنتاج بعد 72 ساعة من الحضانة بقيم تتراوح من 4.3 إلى 5.6 ملغم / مل. كما كشفت مستخلصات الإنزيم عن أنشطة تحلل السلولوزية و هيميسيلولوزية مختلفة، مثل نشاط cellulase من خلال وجود CMCCase و endo-1,4- β -glucanase مع أقصى نشاط يبلغ 28 وحدة / دقيقة / ملو 24 وحدة / دقيقة / مل على التوالي. بالإضافة إلى أنشطة الهيميسيلولولاز مثل xylanase و β -mannanase مع أنشطة إنزيمية تبلغ 14 وحدة / دقيقة / ملو 20 وحدة / دقيقة / مل على التوالي. تم إجراء دراسة تحلل TMT و PDT غير المعالج باستخدام المستخلص الأنزيمي الذي تم الحصول عليه. كشفت النتائج عن إطلاق العديد من السكريات قليلة التعدد من تحلل السلولوز و الهيميسيلولوز للركائز المستخدمة مع إجمالي تركيزات السكر المختزل التي تتراوح بين 4.4 إلى 11.6 ملجم/مل. وأظهر التعرف على هذه السكريات من خلال كروماتوغرافيا على طبقة السيليك الرقيقة وجود العديد من السكريات قليلة التعدد مثل الجلوكوز، السيلوببوز، السلوترينوز، السيلوبنتاوز، الرامنوز، الكزيلوز، الفركتوز، مما يشير إلى وجود أنشطة إنزيمية أخرى مثل β -fructosidase و β -glucosidase و α -1-rhamnosidase تشير هذه النتائج إلى القدرة الكبيرة للسلالة على إزالة الاستقطاب والسكر للجزء المركب الهيمسلولوزي من أجل إنتاج سكريات قابلة للتخمر ذات قيمة مضافة عالية.

الكلمات المفتاحية: السلولوز، الهيميسيلولوز، الكتلة الحيوية اللجنوسليلوزية، *B. velezensis* H1، السكريات قليلة التعدد.

Liste des figures

Figure 1: Composition chimique de la biomasse lignocellulosique.....	4
Figure 2: Structure chimique de cellulose.....	5
Figure 3: Structure chimique d'hémicellulose.....	6
Figure 4: Evolution de la production alimentaire de la pomme de terre en Algérie.....	7
Figure 5: Production alimentaire des agrumes en Algérie en 2024.....	8
Figure 6: Mode d'action des différents types de cellulase.....	11
Figure 7: Différents types dexylanases.....	12
Figure 8: Différents types de mannanases.....	13
Figure 9: Photographies de différentes matières lignocellulosiques utilisées comme substrats de fermentations.....	21
Figure 10: Courbe d'étalonnage de BSA.....	23
Figure 11: Courbes d'étalonnages de glucose et de xylose.....	25
Figure 12: Aspect macroscopique des colonies de <i>B. velezensis</i> H1.....	28
Figure 13 : Photographies de l'observation microscopique à l'état frais (objectif ×40 (A) et ×100 (B)) et après coloration de Gram (C).....	28
Figure 14: Photographies de test oxydase (A) et de catalase (B)	29
Figure 15: Activité cellulolytique(A) et hémicellulolytique(B) de <i>B. velezensis</i> H1 sur gélose à base de CMC et de xylane de maïs respectivement.....	30
Figure 16: Fermentation submergée de <i>B. velezensis</i> H1.....	30
Figure 17: Concentrations de protéines extracellulaires totales produites dans chaque milieu de fermentation à différents temps d'incubation.....	31
Figure 18: Histogramme comparatif des meilleures concentrations protéiques pour chaque substrat.....	32
Figure 19: Histogramme comparatif des activités cellulolytiques et hémicellulolytiques détectées dans les différents extraits enzymatiques.....	33
Figure 20: Analyse CCM de produit d'hydrolyse de la matière lignocellulosique par le cocktail enzymatique produit par <i>B. velezensis</i> H1.....	37

Liste des tableaux

Tableau 1: Exemples de différentes biomasses lignocellulosiques et leurs composition en cellulose, hémicellulose et en lignine.....	3
Tableau 2: Composition chimique des résidus de tomate.....	9
Tableau 3: Bactéries (hémi-)cellulolytiques dégradant différentes biomasses lignocellulosiques.....	15
Tableau 4: Récapitulatif des conditions de réalisation du test de saccharification.....	26
Tableau 5: Aspect morphologique des colonies obtenues sur YPG.....	28
Tableau 6: Meilleure activité enzymatique obtenu pour chaque substrat utilisé (CMC, β – glucane, gomme de caroube, xylane de maïs) en comparaisons avec des autres études.....	34
Tableau 7: Quantité de sucres réducteurs libérés après la saccharification de PDT, ORG et TMT.....	36
Tableau 8: Oligosaccharides libérés durant la saccharification et activité enzymatique correspondante.....	38

Liste des abréviations

- ARA:** α -L-arabino-furanosidases
BL: Biomasselignocellulosique
BSA: Albumine sérique bovine
CBH: Cellobiohydrolases
CCM: Chromatographie sur couche mince
CMC: Carboxyméthyl-cellulose
DNS: Acide 3,5-dinitrosalicylique
DO: Densité optique
E-1,4- β -G : Endo-1,4- β -glucanase
GC: Gomme de caroube
GH: Glycoside hydrolases
H₂O₂: Eau oxygénée
IE: Indice enzymatique
mM: Millimolaire
nm: Nanomètre
O₂ : Dioxygène
ORG: Les épluchures d'oranges
PDT: Les épluchures de pommes de terre
pH: Potentiel hydrogène
rpm: Rotation par minute
TMT: Résidus de tomates
UFC: Unité Formant Colonie
Xyn: Xylane de maïs
YPG: Yeastextract peptone glucose
 β -Man: β -mannanase
 μ L: Microlitre
 μ M: Micromole

INTRODUCTION

Introduction

Ces dernières années, la conversion enzymatique de la biomasse lignocellulosique a suscité l'intérêt de nombreuses recherches à travers le monde. La communauté scientifique cherche à reproduire le processus naturel de dégradation de la biomasse lignocellulosique en utilisant différentes enzymes d'origine microbienne telle que les bactéries et les champignons (Bhardwaj *et al.*, 2020). Au cours de la dernière décennie, ces recherches ont considérablement progressé, envisageant son utilisation comme une solution prometteuse pour l'avenir.

En effet, les matériaux lignocellulosiques constituent la matière première la plus prometteuse et la plus abondante tant que ressource biologique renouvelable sur terre. On estime que 140 Gt de résidus agricoles sont produits chaque année à l'échelle mondiale (Hills *et al.*, 2020). Malheureusement, cela provoque des problèmes environnementaux résultant de l'accumulation des grandes quantités de ces déchets lignocellulosiques mal exploités. Pourtant cette matière à haute valeur ajoutée peut être largement sous-utilisée. Elle est majoritairement composée de cellulose, d'hémicellulose, et de lignine dans des proportions variables, la cellulose et l'hémicellulose étant les composants majeurs avec respectivement 44.16 %, et 27.4 % de sa masse totale (Zhu *et al.*, 2022).

Actuellement, le fractionnement de la matière lignocellulosique selon le concept de la bioraffinerie attire de plus en plus l'attention des chercheurs et des industriels notamment pour la production d'enzymes (hémi-)cellulolytiques destinées à la conversion de diverses matières, telles que des cultures dédiées ou des résidus agricoles, en produits biosynthétiques à haute valeur ajoutée comme les oligosaccharides, dans le but de promouvoir des bénéfices sur le plan économique qu'environnemental.

Les premiers procédés de conversion de la biomasse lignocellulosique utilisaient principalement des prétraitements chimiques. Cependant ces procédés sont devenus peu compétitifs en raison des coûts des réactifs et de la génération de nombreux sous-produits ou composés non désirables qui agissent comme inhibiteurs et rendent les hydrolysats peu fermentescibles. Ces procédés chimiques sont désormais concurrencés par les voies enzymatiques, qui sont plus spécifiques et permettent une hydrolyse dans des conditions moins sévères et moins coûteuses. Les cellulases et les hémicellulases sont des enzymes non ligninolytiques classées parmi les «*Carbohydrate-Active enZymes*» ou communément appelées CAZymes. La base de données CAZy (Anonyme 1), regroupe les enzymes connues pour leur capacité à dégrader ou à modifier les substrats hémicellulosiques et à générer des

Introduction

sucres simples fermentescibles. Ces sucres ont un grand potentiel biotechnologique pour diverses industries et sont utilisés dans des nombreuses applications, telles que les prébiotiques ou la production d'éthanol, d'acides organiques et d'autres produits chimiques, notamment les additifs alimentaires, l'alimentation animale et l'agriculture.

C'est donc dans cette optique que s'inscrit le présent travail. Cette étude porte sur la valorisation de la production d'enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques par la souche de *B. velezensis* H1, et l'utilisation de ces enzymes dans la saccharification de la biomasse lignocellulosique non traitée afin d'obtenir des sucres fermentescibles ou oligosaccharides, avec des rendements rentables à l'échelle industrielle. Les oligosaccharides obtenus à partir de cette dégradation enzymatique ont des propriétés physicochimiques uniques et intéressantes qui les rendent utiles pour de nombreuses applications industrielles, telles que la production de prébiotiques, de médicaments et d'additifs alimentaires. En somme, les enzymes (hémi-) cellulolytiques sont un élément-clé dans le processus de production d'oligosaccharides, offrant ainsi une alternative écologique et économique pour la production de composés chimiques et biologiques.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres. Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique se basant sur la littérature pour fournir, un état de l'art de la recherche dans le domaine développé. Ce chapitre est composé de trois parties principales la première partie est une revue bibliographique sur la biomasse lignocellulosique en général et quelques exemples spécifiques trouvés en Algérie. La deuxième partie porte sur les enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques. La troisième partie traite le potentiel biotechnologique de la saccharification enzymatique de la lignocellulose et des applications industrielles des oligosaccharides.

Le deuxième chapitre décrit le matériel et les méthodes expérimentales utilisées, pour produire les enzymes (hémi-)cellulolytiques par la souche de *B. velezensis* H1 à travers des fermentations submergées et pour produire des oligosaccharides à partir de la biomasse lignocellulosique.

Enfin, le dernier chapitre présente les résultats numériques et expérimentaux obtenus dans cette étude, suivi d'une conclusion qui résume l'essentiel du travail effectué.

Chapitre I :

Revue bibliographique

1. Biomasse lignocellulosique

1.1. Définition

La biomasse lignocellulosique (BL) représente la matière organique végétale la plus abondante dans la nature. Elle est constituée de déchets agricoles et forestiers, de résidus industriels et municipaux, ainsi que de cultures énergétiques dédiées (Oke *et al.*, 2017). C'est une matrice très complexe, constituée généralement de polysaccharides, polymères phénoliques et protéines qui constituent la partie majeure de parois cellulaires ligneuses des plantes (Yousuf *et al.*, 2020). De ce fait, la biomasse lignocellulosique représente une source majeure de matière organique renouvelable et constitue une valeur inestimable en tant que source d'énergie alternative (Tandon 2014).

1.2. Composition et structure de la biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est principalement constituée de trois polymères structuraux à savoir : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (figure 1) (Zhou *et al.*, 2016). Ces polymères sont les principaux composants de la paroi cellulaire des plantes lignocellulosiques. Le composant majeur est généralement la cellulose (35 à 50%), suivie des hémicelluloses (20 à 30%) et de la lignine (10 à 25%). La proportion de chacun des constituants peut varier en fonction de nombreux facteurs tels que la nature du tissu considéré, le type de biomasse et le stade de croissance (Ben Ali 2021). Le tableau 1, récapitule la teneur en cellulose, en hémicelluloses et en lignine retrouvés par plusieurs auteurs. D'autres composants mineurs tels que les protéines, les huiles et les cendres constituent la fraction restante de la biomasse lignocellulosique (Tandon 2014).

Tableau 1 Exemples de différentes biomasses lignocellulosiques et leurs compositions en cellulose, hémicellulose et en lignine (Ang *et al.*, 2012).

Biomasse	Composition(%)		
	Cellulose	Hémicellulose	Lignine
Alfaalfa	33	18	8
Palmes sèches	60	22	18
Paille de riz	36	17	23
Bagasse de canne à sucre	41	30	21
Sorgho sucré	36	18	16
Paille de blé	49	28	8

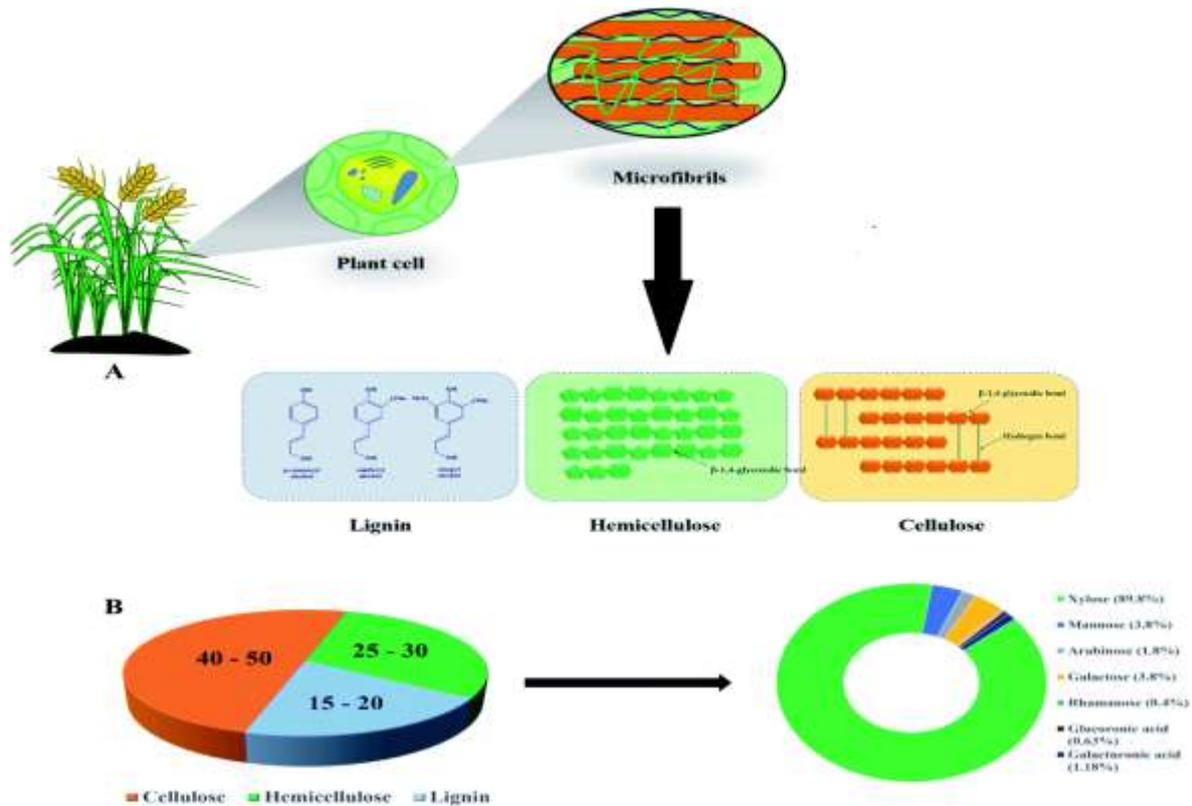


Figure 1 Composition chimique de la biomasse lignocellulosique (Narisetty *et al.*, 2022)

1.2.1. Cellulose

La cellulose est le polymère naturel le plus abondant dans la biosphère, avec une production mondiale (et décomposition) d'environ 1.5×10^{12} tonnes par an (Heinze 2015). Cette macromolécule glucidique est un élément structural de premier ordre pour la grande majorité des parois végétales, représente environ 50% de la biomasse végétale (Harmsen *et al.*, 2010). Elle est utilisée dans de nombreux produits et industries, notamment pour la fabrication de papier, de textiles, de combustibles et de plastiques biodégradables. La cellulose est également une source importante de fibres alimentaires dans l'alimentation humaine et animale.

La cellulose est un homopolymère linéaire, composée de longues chaînes de plus de 10 000 unités de glucose (D-glucose), Ces unités sont liées par des liaisons β -1,4-glycosidiques qui entraînent une rotation alternative de l'axe de la chaîne de la cellulose de 180° (figure 2) (Heinze 2015). Cela engendre la création d'un lien hydrogène entre l'atome d'oxygène du cycle et le groupe OH situé en position 3, ce qui donne lieu à une structure fibreuse de la cellulose, un anhydroglucose, un résidu glucose, est un monomère de cellulose. Le dimère,

deux résidus de glucose liés en β (1-4), appelé cellobiose, qui est l'unité structurelle répétitive de la chaîne cellulosique (Reginaldo 2007).

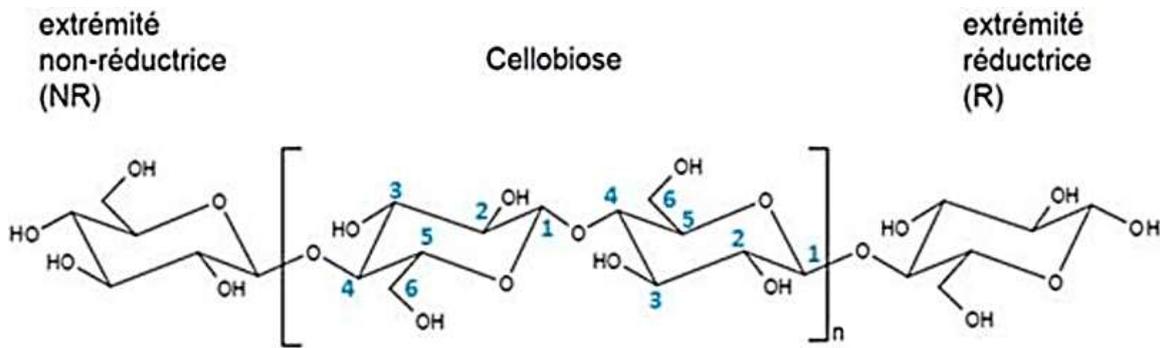


Figure 2 Structure chimique de cellulose (Decroix *et al.*, 2019)

2.2. Hémicellulose

Les hémicelluloses sont définies comme des polysaccharides qui intègrent dans la paroi cellulaire primaire des nombreux végétaux. Ils comptent jusqu'à 50% de la biomasse des plantes annuelles et pérennes (Angone *et al.*, 2010). Il y a une vaste gamme d'hémicelluloses, chacune présentant différentes structures biochimiques, comme : galactoglucomannanes, arabinoglucuronoxylanes, arabinogalactanes, glucuronoxylanes, glucomannanes, xyloglucanes, hétéroxylanes, galactomannanes (Zhou *et al.*, 2017) Les hémicelluloses sont un mélange hétérogène de polysaccharides qui peuvent contenir différents types de monosaccharides reliés entre eux par des liaisons β (1-4), tels que le xylose, l'arabinose, le galactose, le mannose, le fructose, le glucose et l'acide glucuronique (Zhou *et al.*, 2017) (figure3). Ces sucres peuvent être liés de différentes manières pour former des chaînes ramifiées, donnant lieu à une structure amorphe. Les xylanes sont les principaux composés hémicellulosiques, ils représentent environ 20-30% de biomasse des plantes dicotylédones (Angone *et al.*, 2010). L'hémicellulose est donc un mélange de polymères de différentes tailles, compositions et structures qui peuvent varier selon les plantes et les tissus végétaux.

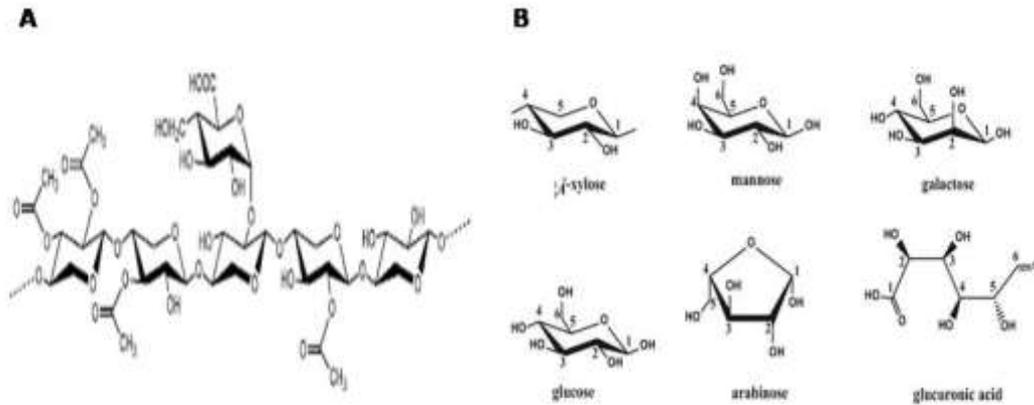


Figure 3 (A) Structure chimique d'hémicellulose (Hu *et al.*, 2020). (B) Les différents types de monosaccharides composés d'hémicellulose (Fu *et al.*, 2019).

1.3. Résidus agricoles lignocellulosique en Algérie

Les matières lignocellulosiques sont les matières premières les plus prometteuses comme ressources naturelles et renouvelables, un nombre considérable de ces déchets sont générés par les pratiques agricoles (Anwar *et al.*, 2014). Il s'agit de l'ensemble des déchets champêtres d'origine végétale et animale ou les déchets de l'industrie agroalimentaire, parmi les résidus agricoles la paille de blé et la paille d'orge sont les matières premières les plus répandues de la biomasse au monde et en Algérie (Gares *et al.*, 2020), suivies par plusieurs résidus agro-industrielle comme les épluchures d'orange et de la pomme de terre et les résidus de tomate ainsi que les grignons d'olives et maïs. Les ressources de résidus lignocellulosiques sont généralement répertoriées selon les secteurs économiques qui les produisent, tels que l'agriculture, la sylviculture, la consommation des ménages ou l'industrie agro-alimentaire, en Algérie, les résidus issus de cette dernière pourraient fournir jusqu'à 0.67 Mtep (Akbi *et al.*, 2017 ; Gares *et al.*, 2020) qui se retrouvent, malheureusement, déclassés alors qu'il s'agit d'une matière à haute valeur ajoutée. Malgré les récentes études, les estimations de la production totale algérienne de résidus lignocellulosiques sont encore peu précises.

1.3.1. Epluchures de pomme de terre

La pomme de terre (*Solanum tuberosum*) appartient à la famille des *Solanacées*, cette dernière comprend 1000 espèces dont plus de 200 sont tubéreuses et regroupe plusieurs espèces connues telles que la tomate. La pomme de terre est l'une des premières ressources

alimentaires dans le monde, qui génère une importante quantité de déchets ménagers et industriels (épluchures), en Algérie, la production annuelle totale est estimée en 2017 de 41 Millions de quintaux pour une superficie de près de 130 000 ha dont 7 wilayas produisent près de 70% de la production annuelle, El Oued (28%), Ain Defla (12%), Mostaganem (11%), Mascara (8%), Tiaret, Bouira, Tlemcen (4%) chacune (Bessaoud et Lefki., 2018). La pomme de terre fraîche est considérée comme un légume pour sa forte teneur en eau, et un féculent pour sa teneur en fibre, elle est constituée de 80% d'eau, 16% de glucides et d'amidon, 2% de protéines, 1.5% de fibre, 1% de vitamines (CetB9) et minéraux (fer, potassium, calcium, phosphore et sodium), 0.3% de lipides (Navarre et Pavek., 2014).

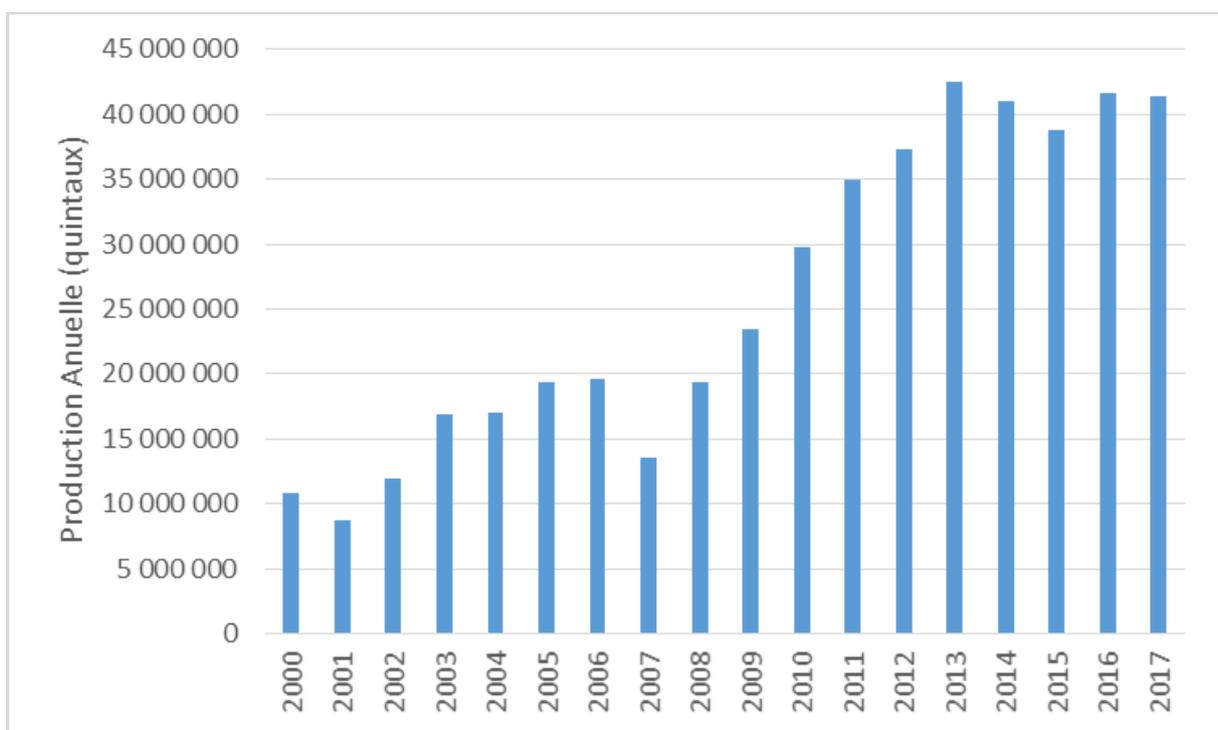


Figure4 Evolution de la production alimentaire de la pomme de terre en Algérie (Bessaoud et Lefki., 2018).

1.3.2. Epluchures d'orange

Selon le site web Algérie Eco, la production d'agrumes a augmenté en Algérie durant la saison agricole en cour 2023-2024 atteignant plus de 18 millions de quintaux (Anonyme 2). L'industrie alimentaire de traitement des oranges en Algérie produit et rejette chaque année des centaines de tonnes de déchets d'orange dans la nature ces déchets sortent des ateliers d'extraction de jus ou de pulpe (Mlle Boukroufa 2016). L'utilisation de ces résidus pour la production de substances à hautes valeurs ajoutées comme les enzymes, constitue l'une des

moyens de leur valorisation (Benkahoul *et al.*, 2017). Les déchets d'oranges sont caractérisés par leur composition en sucres solubles (glucose et saccharose) et insolubles (pectine, cellulose) (Nishio et Nagai., 1981).

Les oranges sont aussi connues pour leur teneur en vitamine C qui a un puissant antioxydant, ilssont également une bonne source de fibres, de vitamines B en particulier B12 et B9, vitamine A, calcium et potassium.

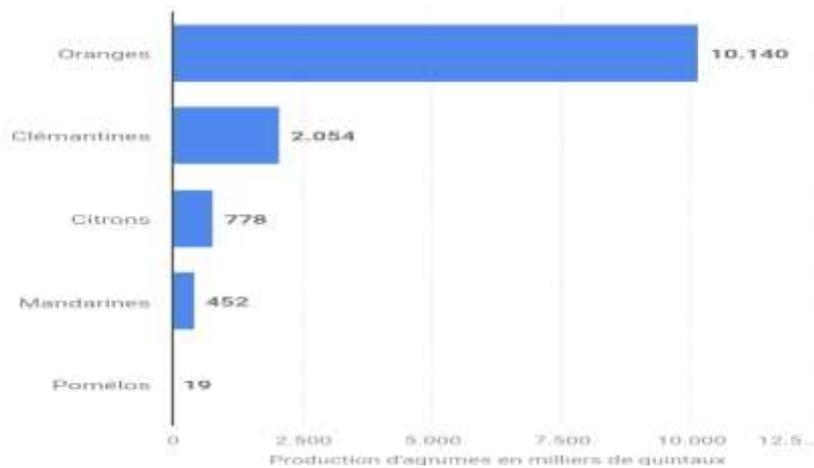


Figure 5 Production alimentaire des agrumes en Algérie de site (Anonyme 2).

1.3.3. Les résidus agricoles de tomate

La tomate (*Lycopersicon esculentum*) est une plante originaire d'Amérique du sud. En Algérie la production de la tomate industrielle s'est élevée à plus de 23 millions de quintaux en 2021, enregistrant une croissance de plus de 17% par rapport à l'exercice précédent ce qui a permis à l'Algérie d'assurer son autosuffisance en double concentré et triple concentré de tomate, à travers ces biens la transformation commerciale de la tomate pour les jus ou la pâte ou ses usages multiples génèrent annuellement une grande quantité de déchets en provenance de canaux d'eau, du lavage, du tri sur table et autre étapes du traitement (Anonyme 3, 2021). Les principaux constituants de ces résidus sont récapitulés dans le tableau 2.

Tableau 2 Composition chimique des résidus de tomate (Szymańska-Chargot *et al.*, 2017).

Pulpe	Teneur en matière sèche	cellulose	Hémicellulose	Lignine	NDF
	%	100/g pulpe sec	100/g pulpe sec	100/g pulpe sec	100/g pulpe sec
Tomate	6.03 (+0.22)	8.60 (+0.34)	5.33 (+0.92)	5.85 (+0.32)	19.77 (+1.52)

2. (hémi-)cellulases et les bactéries (hémi-)cellulolytiques

2.1 Définition de la cellulase

Les cellulases sont un groupe d'enzymes responsables de la dégradation de la cellulose dans la nature. La dégradation complète de la cellulose en glucose nécessite le clivage de toutes les liaisons β -(1 \rightarrow 4) de la cellulose (Kuhad *et al.*, 2016), ce qui nécessite l'intervention de trois types d'activités enzymatiques complémentaires. Les modules catalytiques des cellulases ont été classés en de nombreuses familles en fonction de leurs séquences d'acides aminés et de leurs structures cristallines (Zhang et Zhang 2013). Dans la nature, il existe trois principaux types de cellulases : les endoglucanases (EC 3.2.1.4), les exoglucanases, y compris les cellobiohydrolases (CBHs) (EC 3.2.1.91), et la β -glucosidase (BG) (EC 3.2.1.21) (Kuhad *et al.*, 2016). Grâce à leurs différences de spécificité, les différents types d'enzymes agissent de manière synergique sur la cellulose. Les cellulases sont produites principalement par des microorganismes (bactéries et champignons) (Lynd *et al.*, 2002), mais aussi par des organismes représentant le règne animal, y compris des insectes, des mollusques, des nématodes et des protozoaires (Watanabe et Tokuda 2001).

Les cellulases possèdent un potentiel intéressant dans plusieurs secteurs industriels tels que la production textile, les détergents, la fabrication de pâte et de papier, la production des oligosaccharides et des composés bioactifs, l'alimentation humaine et animale ainsi que les biocarburants (Singh *et al.*, 2021).

2.2 Différents modes d'action des cellulases

Grâce à leurs différences de spécificité, les différents types d'enzymes agissent de manière synergique sur la cellulose.

2.2.1. Endoglucanases

Les endoglucanases (EC 3.2.1.4). Est un sous-groupe d'une famille plus large d'enzymes cellulases, elles varient dans leur spécificité de substrat (Rahman *et al.*, 2018), étant capables de cliver la liaison β -1,4- glycosidique au hasard et de préférence dans les régions amorphes (Hamid *et al.*, 2015). Elles diminuent le degré de polymérisation de la cellulose en attaquant aléatoirement les chaînes de cellulose et permettent de libérer de nouveaux cellobiosaccharides (cellotriose, le cellotetraose et le cellopentaose) ce qui conduit à la formation de nouvelles extrémités de chaîne qui peuvent par la suite être attaquées par les cellobiohydrolases (les exoglucanases) (Nagl *et al.*, 2021).

2.2.2 Exoglucanases

L'exoglucanase (EC 3.2.1.91), également connues sous le nom de cellobiohydrolases (CBH) est une enzyme qui agit sur les extrémités réductrices et non-réductrices des oligosaccharides et libère des unités de cellobiose, qui sont composées de deux ou trois unités de glucose (Mahmood *et al.*, 2013). Il y a deux sortes de cellobiohydrolases : CBH I et II qui fonctionnent respectivement de manière processuelle à partir de l'extrémité réductrice et non réductrice de la chaîne cellulosique (Annamalai *et al.*, 2016).

2.2.3. β -glucosidases

Les β -glucosidases (β -D-glucoopyranoside glucohydrolases, E.C. 3.2.1.21) sont des enzymes très importantes pour de nombreux processus industriels. Ils agissent en synergie avec les endoglucanases et les exoglucanases pour la conversion de la lignocellulose en sucres fermentescibles, Ils catalysent l'étape finale et limitant de la réaction, en convertissant la cellobiose en deux molécules de glucose (Costa *et al.*, 2019). On peut distinguer trois catégories de β -glucosidases : l'aryl- β -glucosidase qui a tendance à rompre les aryl-glucosides ; les cellobiases, qui participent à la transformation du cellobiose en glucose ; et les glucosidases, qui sont les plus répandues et ont une capacité spécifique de substrat étendue, couvrant une large gamme de matériaux (Srivastava *et al.*, 2019). Ainsi, Les β -glucosidases ont été classées en plusieurs familles de glycoside hydrolases (GH), tel que les GH1, GH3, GH5, GH9 et les GH30, selon leurs séquences d'acides aminés (Ketudat et Esen 2010). Donc, ils ont une structure variable, mais dans chaque famille de GH, le domaine catalytique global est identique (Srivastava *et al.*, 2019). Le mode d'action de cellulase se fait de manière

complémentaire entre leurs différents types de classes (les endoglucanases, les exoglucanase, et la β -glucosidase) (Figure 6), pour favoriser la décomposition de la matière cellulosique en sucres simples.

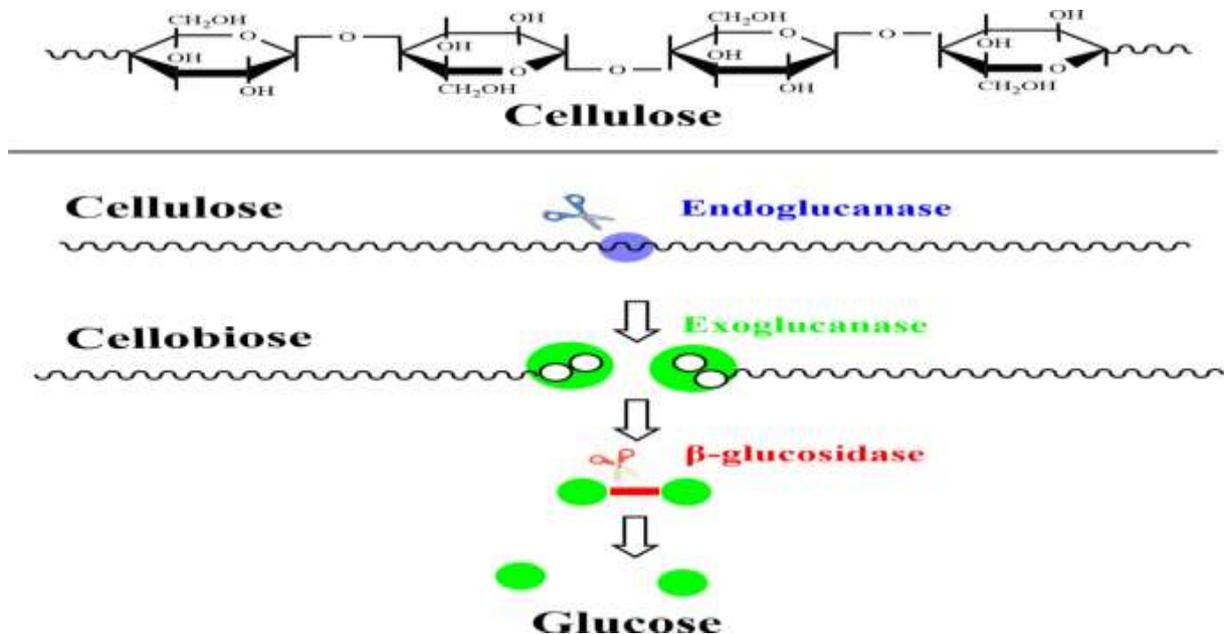


Figure 6 Mode d'action de différents types de cellulase (les endoglucanases, les exoglucanase, et la β -glucosidase) (Zhou *et al.*, 2023).

2.3. Définition de L'hémicellulase

L'hémicellulase est une enzyme capable de dégrader l'hémicellulose présente dans la paroi cellulaire des végétaux, rassemblant tous les éléments pariétaux hétéropolymères tel que le xylane, le mannane, le galactane, l'arabinane sauf la cellulose et la lignine. On distingue généralement les enzymes qui s'attaquent au squelette de xylane qui sont les xylanases et celle qui responsables de la dégradation du mannane sont l'endomannanase et la β -mannosidase. Cependant, les xylanes et les mannanes possèdent généralement plusieurs substituants différents liés au squelette principal, tels que l'arabinose, l'acétyle qui nécessitent une multitude d'enzymes auxiliaires à éliminer du squelette pour donner accès au noyau (Van Dyk et Pletschke 2012).

2.4. Différents modes d'action des hémicellulases

Les enzymes nécessaires à l'hydrolyse des hémicelluloses peuvent être classées en deux catégories : des enzymes de dépolymérisation qui clivent le squelette principal et des enzymes qui éliminent les substituants pouvant bloquer les enzymes de dépolymérisation au niveau stérique (enzymes accessoires ou débranchantes) (Bouchat 2022).

2.4.1. Xylanases

Les xylanases sont des enzymes glycosidiques (O-glycosidiques hydrolases) qui favorisent la rupture des liaisons 1,4-D-xylosidiques présentes dans les parties non substituées des chaînes de xylanes pour aboutir au xylose, en considération hétérogénéité et la complexité d'hydrolyse complète des xylanes requiert l'action combinée d'endo- et d'exoenzymes. Les endoxylanases coupent le squelette du xylane en oligosaccharides plus courts, les exo-xylanases et les β -xylosidases (EC 3.2.1.37) hydrolysent les petites oligomères libérées par les endoxylanases, en xylose (figure 7) (Haberra 2014).

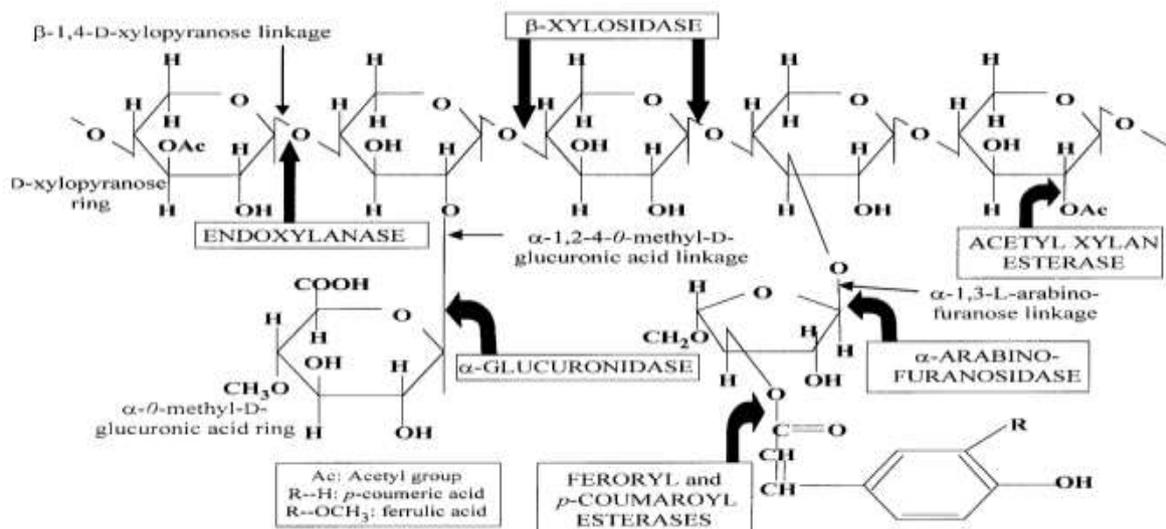


Figure7 Différents types de xylanases (Haberra 2014).

2.4.2. Mannanases

Les enzymes dégradant le mannane polymère de mannose, comprennent les β -mannanases, les β -glucosidases et les β -mannosidases, ainsi que certaines enzymes supplémentaires telles que l'acétylmannaneestérase et l' α -galactosidase. Ces enzymes sont nécessaires pour éliminer les substituants de la chaîne latérale qui sont attachés à divers points du mannane créant plus

de sites pour une hydrolyse enzymatique ultérieure. La β -mannanase, une enzyme de type endo est responsable du clivage des liaisons internes liées au β -1,4 du mannan de manière aléatoire pour produire de nouvelles extrémités de chaîne (Moreira et Filho 2008), la β -mannosidase est une enzyme de type exo qui clive les mannosides liés aux β -1,4, libérant le mannose de l'extrémité non réductrice des mannanes et la β -glucosidase une enzyme de type exo hydrolyse le 1,4- β -D-glucopyranose à l'extrémité non réductrice du oligosaccharides libérés par la β -mannanase (figure 8) (Moreira et Filho 2008).

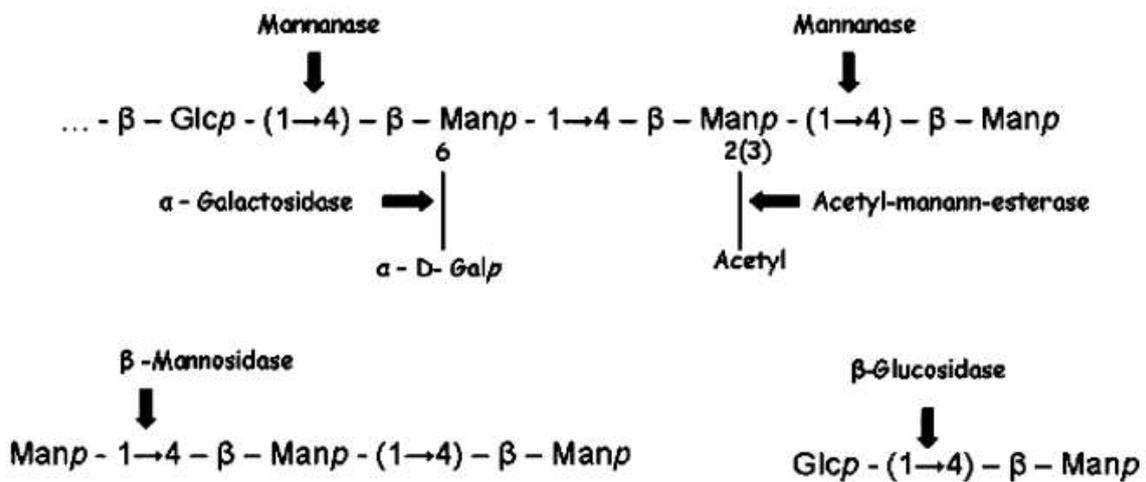


Figure 8 Différents types de mannanases (Moreira et Filho 2008).

2.4.3. Arabinofuranosidases

Les arabinofuranosidases peuvent être classés en différentes catégories en fonction de leur mécanisme et de leur spécificité au substrat. Selon Beldman (1997) les enzymes qui dégradent les arabinanes sont classées en enzymes à action exo ou endo. Les enzymes dégradant les polysaccharides contenant la chaîne (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinane au niveau des sites internes sont classées selon la nomenclature des enzymes comme (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinane (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinanohydrolases. Les enzymes qui agissent de manière exo pour libérer le L-arabinose des substrats polymères par exemple l'arabinoxylanes, l'arabinanes et l'arabinogalactanes ou à partir d'arabino-oligosaccharides sont systématiquement appelées α -L-arabino-furanohydrolases ou α -L-arabino-furanosidases (ARA).

2.5. Bactéries (hémi-)cellulolytiques impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique

Les cellulases sont produites naturellement par une grande variété de bactéries et de champignons (Juturu et Wu 2014). Les champignons ont généralement un taux de croissance inférieur à celui des bactéries, ce qui permet une production recombinante plus élevée d'enzymes chez les bactéries (Maki *et al.*, 2009). Les principaux genres bactériens producteurs d'enzymes (hémi-)cellulolytiques sont les bactéries de genre *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nonomuraea*, *Pseudoxanthomonas* et *Rhodothermus* (Haberra 2014). Ces enzymes sont particulièrement intéressantes en raison de la capacité des souches bactériennes productrices à prospérer dans des conditions extrêmes de température, de salinité et de pH.

De plus, leur croissance rapide et leur temps de génération réduit par rapport aux champignons, ainsi que leur capacité à produire une variété de métabolites d'intérêt, en font des candidats attractifs. Ces caractéristiques sont souvent essentielles pour les applications biotechnologiques. Le (tableau 3) répertorie les principales bactéries productrices des (hémi-)cellulases à partir de la matière lignocellulosique. Les bactéries (hémi-)cellulolytiques décomposent l'hémicellulose en libérant les enzymes (hémi-)cellulolytiques mentionnées dans les sections précédentes, ces enzymes agissent sur la biomasse (Singhvi et Gokhale 2019) hydrolysent l'hémicellulose et la convertissent en sucres simples fermentescibles, puis la fermentation, qui fait référence à l'hydrolyse de ces sucres, se produit et cela produit du dioxyde de carbone, de l'hydrogène et des acides organiques (Hassan *et al.*, 2019). Après cette étape, les bactéries dominantes utilisent ces produits secondaires pour produire divers produits utiles (Beaton *et al.*, 2019). Le genre *Bacillus* est largement étudié pour ses capacités à hydrolyser la cellulose. Par exemple, la séquence complète du génome de *Bacillus velezensis* ZY-1-1 a montré des gènes capables de produire de la xylanase et de la cellulase en utilisant des substrats hémicellulosiques et cellulosiques.

Tableau 3 Bactéries (hémi-) cellulolytiques dégradant différentes biomasses lignocellulosiques

Bactérie	Biomasse lignocellulosique	Enzyme	Référence
<i>Thermotogamaritima</i>	Lolium	endo1,4- β -xylanase	(Saini <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bacillus subtilis</i> BC-001	La paille de blé	Cellulase	(Tunio <i>et al.</i> , 2024)
<i>Bacillus halodurans</i>	Son de blé	Xylanase	(Kumar <i>et al.</i> , 2013)
<i>B. paralicheniformis</i> BC-002	Canne à sucre Bagasse	Cellulase	(Tunio <i>et al.</i> , 2024)

3. Biosynthèse enzymatique des oligosaccharides

L'utilisation des enzymes hydrolytiques comme outils de synthèse des oligosaccharides à partir de la matière lignocellulosique est considérée comme un processus de prétraitement biologique intégral qui rassemble en un seul processus la production des enzymes cellulolytiques, l'hydrolyse de l'hémicellulose et la production de biocommodités à haute valeur ajoutée. Ce processus est largement accepté car il permet de casser le complexe hémicellulosique en réduisant les impacts environnementaux comparés aux prétraitements acide ou alcalin (Alfenore et Molina-Jouve 2016). Le processus d'hydrolyse est l'une des étapes clés de la dégradation de l'hémicellulose. Elle implique la dépolymérisation de l'hémicellulose à l'aide des (hémi-)cellulases en plusieurs oligosaccharides fermentescibles (sucres réducteurs) qui pourront être métabolisés par des levures, des bactéries ou des champignons lors de la fermentation afin de synthétiser plusieurs métabolites secondaires à haute valeur ajoutée (Alfenore et Molina-Jouve 2016).

3.1. Activité prébiotique des oligosaccharides

Certaines composantes de la microflore intestinale (probiotiques), en particulier les bifidobactéries, ont la capacité de fermenter des substances essentiellement non digestibles (oligosaccharides) dans le côlon grâce à leur important pouvoir saccharolytique. Cette aptitude favorise la croissance ou l'activité de micro-organismes spécifiques du tractus gastro-intestinal, telles que les bactéries du genre *Bifidobacterium sp.* et *Lactobacillus sp.*, influençant positivement la santé de l'hôte. La croissance de ces bactéries bénéfiques favorise la production d'acides gras à chaîne courte tels que l'acétate, le propionate et le butyrate qui sont associés à la prévention des infections intestinales et d'autres troubles chez les humains et les animaux (Karnaouri *et al.*, 2018).

Les effets bénéfiques générés par ces interactions ont conduit au développement du nouveau concept de « prébiotiques ». L'une des activités majeures des oligosaccharides est leur activité

fonctionnelle prébiotique, qui leur permet de résister aux premières étapes de la digestion gastrique et d'atteindre presque intacts le gros intestin (Jiao *et al.*, 2014). Les oligosaccharides issus de la dégradation de polysaccharides naturels comme les xylo-oligosaccharides, les fructo-oligosaccharides, les galacto-oligosaccharides, et les arabinogalacto-oligosaccharides sont largement étudiés pour leur action prébiotique.

En effet, les réactions enzymatiques sont menées dans des conditions réactionnelles douces : température modérée, pas de solvant ni de produits chimiques requis, pression atmosphérique respectueuses de l'environnement, limitant la consommation d'énergie et la génération de sous-produits indésirables (Bouchat 2022). Les principaux types d'enzymes utilisés pour le fractionnement des biomasses lignocellulosiques sont les cellulases, les hémicellulases et les enzymes ligninolytiques. Des stratégies différentes ont été proposées pour la production d'oligosaccharides par l'enzyme. Ceux-ci comprennent la conception de cocktails enzymatiques sur mesure qui offrent une rupture contrôlée de la fission des polysaccharides ou par la modification des conditions de réaction par exemple, l'échange de tampons pour abolir l'inhibition de l'activité enzymatique (Ávila *et al.*, 2021; Vanderghem *et al.*, 2010).

3.2. Utilisation des oligosaccharides comme additif alimentaire

Dans le secteur alimentaire, les consommateurs réduisent leur acceptation des additifs chimiques. Par conséquent, l'utilisation de substances naturelles saccharidiques connues sous le nom d'oligosaccharides, prébiotiques et biopreservatifs suscitent un intérêt grandissant dans la production alimentaire (Barreteau *et al.*, 2005).

Pour cela, l'industrie alimentaire utilise les oligosaccharides naturels comme additifs alimentaires depuis qu'elle a pris conscience de leur potentiel d'application technologique et nutritionnel, de leur capacité à améliorer la qualité globale et à augmenter la valeur nutritive des produits alimentaires, ainsi que pour leur capacité à perfectionner la texture par leur utilisation comme fibres alimentaires (Nobre *et al.*, 2015). Ces oligosaccharides proviennent de diverses sources telles que les bactéries, les algues, les champignons et les plantes supérieures est ont été largement utilisés à la fois comme ingrédients alimentaires et comme compléments pharmacologiques en raison de leurs diverses propriétés bénéfiques pour la santé (Patel et Goyal 2011).

3.3. Utilisation des oligosaccharides dans l'agriculture

Il y a environ 20 ans, une première étude a évoqué l'éventuelle utilisation d'oligosaccharides dérivés de la paroi cellulaire en tant que régulateurs pour la croissance, le développement et la défense des plantes (Cabrera *et al.*, 2013). Des recherches ont montré que certains oligosaccharides ont des propriétés éliciteurs, ce qui signifie qu'ils peuvent activer les mécanismes de défense des plantes, dont lequel ils sont impliqués dans les interactions plantes-pathogènes.

Ainsi que plusieurs études ont identifié les oligosaccharides comme des inducteurs potentiels de la résistance des plantes, car ils peuvent réduire la gravité des maladies et des infections fongiques tout en minimisant les risques pour l'environnement et l'opérateur, ils offrent également l'avantage de réduire le risque de développement de résistances aux fongicides, ce qui en fait une méthode durable et efficace pour la protection des cultures (Guarnizo *et al.*, 2020).

Chapitre II :

Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur la valorisation des épluchures de pomme de terre, d'orange et les résidus de transformation industrielle de tomate par la souche de *B. velezensis* H1, en vue de produire des enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques par fermentation submergée, et de la saccharification de cette biomasse par voie enzymatique pour l'obtention des sucres fermentescibles avec des rendements rentables à l'échelle industrielle. Ce travail a été réalisé entre les laboratoires pédagogiques de la faculté de sciences de la nature et de la vie et le laboratoire de mycologie de biotechnologie et de l'activité microbienne. Université des Frères Mentouri Constantine 1.

1. Matériel biologique

La souche halotolérante de *B. velezensis* H1, utilisée dans cette étude (numéros d'accès GenBank OM510337 et OM523097 pour les séquences de gènes 16 S rRNA et *gyrA*, respectivement), a été fourni par Dr. Djelid Hadjer. Cette bactéries a été isolé du sol salin d'une palmeraie, située à 20 mètre du lac salé d'El M'Ghair dans la ville d'El-Oued, en Algérie, et a été sélectionnée comme souche (hémi-)cellulolytique (Djelid *et al.*, 2022; 2023).

1.1. Revivification de la souche bactérienne

La souche de *B. velezensis* H1 est réactivée sur milieu YPG (Annexe 1) et incubée pendant 24h à 30°C. Après incubation, des colonies apparaissent sur la boîte de Pétri indiquant la réactivation de la souche. Ce processus a été réalisé de manière routinière tout au long du travail pratique, afin d'assurer l'obtention des colonies fraîches à chaque fois.

1.2. Evaluation de la pureté de la souche

1.2.1. Examen macroscopique

La pureté de *B. velezensis* H1 a été évaluée en effectuant des examens macroscopiques et microscopiques. Après avoirensemencé la souche par stries sur un milieu YPG solide, elle a été incubée à 30 °C pendant 24 h. Une observation à l'œil nu détaillée des colonies a été réalisée pour confirmer leur homogénéité.

1.2.2. Examen microscopique

Afin de pouvoir observer la forme des bacilles, le mode de regroupement et la mobilité des cellules bactériennes, une observation microscopique à l'état frais a été réalisée en déposant entre lame et lamelle une goutte d'eau physiologique (Annexe 2) et une colonie de *B. velezensis* H1. L'observation a été réalisée à l'aide d'un microscope optique (OPTECH-

Optical Technology) à l'objectif x40 et à l'immersion (objectif x100). La pureté de la souche bactérienne a été aussi évaluée en utilisant la méthode standard de la coloration de Gram afin d'observer de la morphologie cellulaire et la classification selon le type de Gram (*Galisteo et al.*, 2019).

1.2.3. Test de la catalase

Principe : La catalase est une enzyme qui permet d'éliminer le peroxyde d'hydrogène, qui est un composé très toxique chez les bactéries, en eau et en oxygène. Ainsi ce test permet de mettre en évidence la présence de la catalase chez une espèce bactérienne.

Méthode : Une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) a été déposée aseptiquement sur une lame neuve et propre. Ensuite une colonie fraîche de la bactérie a été prélevée et émulsionnée dans la goutte à l'aide d'une anse de platine préalablement stérilisée et refroidie (*Yin et al.*, 2022).

Lecture : La formation immédiate de bulle d'air indique une réaction positive, ce qui signifie que la bactérie est catalase positive et dans le cas contraire, la bactérie est considérée comme catalase négative.

1.2.4. Test oxydase

Principe : Ce test permet de détecter l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries. L'oxydase est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction dans laquelle une molécule de dioxygène (O_2) est utilisée comme accepteur d'électron.

Méthode : À l'aide d'une anse de platine préalablement stérilisée et refroidie, une colonie bactérienne est déposée sur un disque oxydase (*Yin et al.*, 2022).

Lecture : Une coloration violette immédiate signifie une réaction positive. Et si le disque reste incolore alors la réaction est considérée négative.

1.3. Détermination du taux de sporulation de la souche

Pour évaluer le taux de sporulation, la souche de *B. velezensis* H1 est cultivée dans une fiole de 500 mL contenant 100 mL du milieu YPG liquide (Annexe 1). L'incubation est faite à 30°C sous agitation de 150 rpm pendant 72 h. Ensuite, la suspension bactérienne est soumise à un choc thermique à 80 °C pendant 12 min, suivi d'un refroidissement immédiat dans de l'eau froide, afin d'éliminer les formes végétatives et de récupérer les spores.

Cette suspension bactérienne traitée est ensuite diluée dans de l'eau physiologique stérile. Des inoculations de 100 µL de chaque dilution sont effectuées dans des boîtes contenant du milieu YPG gélosé, puis incubées à 30°C pendant 24 h. Les boîtes contenant entre 20 et 200 colonies sont sélectionnées pour le calcul de la concentration de spores par millilitre de milieu YPG (Ait-Kaki *et al.*, 2014).

Le calcul est effectué selon la méthode de l'UFC (Unité Formant Colonie). Cela se fait en conformité avec la loi suivante :

$$UFC = \frac{N \times F}{V}$$

Dont:

N : nombre des colonies

F : facteur de dilution

V : volume de dilution

2. Etude de l'activité cellulolytique et hémicellulolytique de *B. velezensis* H1

La souche de *B. velezensis* H1 est évaluée pour son potentiel cellulolytique et hémicellulolytique suivant la méthode de Teather et Wood (1988). La production des cellulases et hémicellulases est examinée sur milieu gélosé de base (Annexe 3) contenant 10 g/L de Carboxyméthyl-cellulose (CMC) ou de xylane de maïs comme seule source de carbone. Les boîtes ont été inoculées par piqûre centrale par la bactérie. Après incubation de 5 jours à 30 °C, permettant le développement de la colonie, les surfaces des boîtes ont été recouvertes par 15 mL d'une solution aqueuse au rouge Congo à 1 g/L. Après incubation à température ambiante pendant 30 min, la solution a été éliminée délicatement et remplacée par 20 mL d'une solution de NaCl 1M (Annex 4).

Après 5 min d'incubation à température ambiante, l'apparition de zones claires (halo) sur la gélose autour des colonies, indique la présence de cellulase et d'hémicellulase. L'indice enzymatique (IE), défini comme le rapport du diamètre de la zone claire sur le diamètre de la colonie (Ibrahim *et al.*, 2018). Le test est réalisé en double exemplaire pour chaque substrat.

2.1. Production de cellulases et d'hémicellulase par fermentation submergée

2.1.1. Préparation des substrats hémicellulosiques

La production des enzymes étudiées est réalisée sur différents substrats synthétiques tel que la CMC, le xylane de maïs (Xyn) et la gomme de caroube (GC), ainsi que sur trois résidus agricoles naturels. Ces résidus incluent les épluchures des pommes de terre (PDT) et des oranges (ORG) qui ont été récupérées des déchets organiques ménagères, ainsi que des résidus de tomates (TMT) qui ont provenant de l'usine de conserves alimentaires « Latina » située à Chelghoum Laïd dans la Wilaya de Mila. L'ensemble des résidus a été séché à l'air libre pendant 15-20 jours ensuite broyé finement à l'aide d'un moulin à café propre. Les échantillons sont ensuite conservés dans des bocaux en verre jusqu'à utilisation.

2.1.2. Préparation de l'inoculum

La souche de *B. velezensis* H1 est repiquée sur gélose YPG et incubée à 30°C pendant 24 h. Ensuite, des colonies sont prélevées afin d'inoculer 50mL de milieu YPG liquide, l'incubation est faite à 30°C sous agitation de 150 rpm pendant 24 h.

2.1.3. Inoculation des fioles et suivie des fermentations

L'inoculation est faite dans trois fioles de 250 mL, chacune contenant 50 mL de milieu de fermentation composé de 0.5% d'extrait de levure et 1% de CMC, de Xyn ou de GC, les substrats naturels tels que les épluchures de PDT et d'ORG ainsi que les résidus de TMT sont ajoutés, séparément, avec une concentration de 5%. Le pH des milieux est ajusté à 7. Après bouchage au coton cardé, l'ensemble des fioles est stérilisé à l'autoclave durant 20 min à 120°C. Après refroidissement, les fioles sont inoculées à 2% avec l'inoculum préparé (la préculture). Les fioles sont ensuite incubées à 30 °C sous agitation de 150 rpm pendant 72 h (3 jours). Des prélèvements sont réalisés chaque 24 h afin d'évaluer la production de protéines totales, les activités enzymatiques de la souche *B. velezensis* H1, ainsi que la capacité de ces derniers à produire des oligosaccharides.



Figure 9 Photographies de différentes matières lignocellulosiques utilisées comme substrats de fermentations (A): PDT (B): TMT (C):ORG

2.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Principe de la méthode

Parmi les méthodes les plus couramment utilisées pour l'estimation de la concentration des protéines, celle de Bradford est la méthode privilégiée pour quantifier les protéines (Nouroozi *et al.*, 2015). Cette technique est plus simple, plus rapide et plus sensible que les autres méthodes. De plus, elle est moins sujette aux interférences de réactifs courants et de composants non protéiques d'échantillons biologiques (Kruger 2009). La méthode de Bradford est un dosage spectrophotométrique qui repose sur la capacité du colorant Coomassie « bleu brillant G-250 » à se fixer sur les protéines.

Le maximum d'absorption de ce colorant se déplace de 465 nm à 595 nm (Ernst et Zor 2010). L'absorption de l'échantillon à 595 nm est utilisée pour mesurer la concentration en protéines. Le mécanisme de base de l'essai repose sur la liaison du colorant bleu de Coomassie G-250 à pH acide avec des résidus d'acides aminés basiques tels que l'arginine, l'histidine, la phénylalanine, le tryptophane, la tyrosine, ainsi que des interactions hydrophobes dans les protéines, ce qui entraîne un changement de couleur en bleu (Nouroozi *et al.*, 2015).

2.2.1. Préparation du réactif de Bradford

Avant de l'utiliser, le réactif de Bradford, qui est disponible commercialement sous forme liquide concentrée (Bio Rad), est dilué cinq fois avec de l'eau distillée. Pour effectuer cette dilution, 4 mL d'eau distillée sont ajoutés à 1 mL de réactif de Bradford, suivie d'une vortexation de 3 sec.

2.2.2. Courbe d'étalonnage d'albumine sérique bovine (BSA)

La concentration des protéines est calculée par référence à une courbe de calibration (figure10) qui a été effectuée avec l'albumine provenant du sérum bovin (BSA) comme substance de référence de 0 à 1 mg/mL. 10 mg de BSA sont pesés avec précision et sont dissouts dans 10 mL d'eau distillé stérile pour obtenir une solution de concentration finale de 1 mg/mL (solution mère). Ensuite des dilutions appropriées sont réalisées à partir de la solution mère afin d'obtenir des solutions de BSA de différentes concentrations (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 et 0.5 mg/mL).

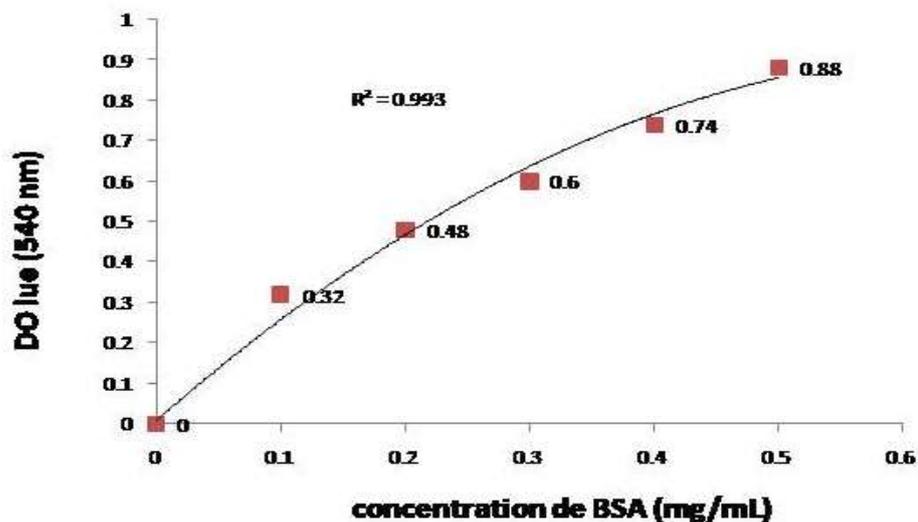


Figure10 Courbe d'étalonnage de BSA utilisé pour déterminé la concentration des protéines selon la méthode BRADFORD.

2.2.3. Dosage des protéines synthétisées par *B. velezensis* H1

Les échantillons prélevés de différents âges (de 24 h, 48 h et 72 h) des milieux synthétiques (CMC, GC et Xyn), ainsi que les autres échantillons provenant de résidus naturels (PDT, ORG, TMT) sont centrifugés puis filtrés avec un filtre de 0,22 µM. Ensuite, 800 µL de chaque échantillon sont mélangés avec 200 µL de réactif de Bradford dilué 5 fois et incubés à température ambiante pendant 20 min, la lecture des DO est réalisée à 595 nm.

3. Dosage des activités cellulases et hémicellulases

Ce test a été effectué pour évaluer et identifier l'activité du cocktail enzymatique cellulolytiques et hémicellulolytique, produit par la souche *B.velezensis* H1 durant les

Matériel et méthodes

différentes fermentations réalisées. Quatre substrats synthétiques à 1% (CMC, GC, Xyn et le β -glucane) sont utilisés pour identifier l'activité enzymatique de CMCase, xylanase, mananase et l'endo-1,4- β -glucanase.

Tout d'abord, les substrats ont été testés avec les surnageants acellulaires obtenus à partir de la fermentation des substrats naturels (TMT, PDT, ORG) de 72 h, ainsi qu'avec le surnageant acellulaire de xylane de maïs de 48 h, chacun séparément.

Le test est réalisé selon le protocole suivant : 50 μ L de substrat ont été déposés dans un tube Eppendorf avec 50 μ L de surnageant et 50 μ L de tampon acétate sodium à 100 mM, pH 6.5. Ensuite, ils ont été incubés pendant 10 min à 40°C pour accélérer la réaction enzymatique. Ensuite, le dosage enzymatique est réalisé par la méthode de DNS. Cette méthode est basée sur la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique en 3-amino-5-nitrosalicylate coloré en milieu alcalin (Başkan *et al.*, 2016). 100 μ L de réactif de DNS (Annexe 5) sont ajoutés dans chaque Eppendorf avec des conditions de faible luminosité. Après incubation à 100°C dans un bain-marie pendant 5 min, les Eppendorfs sont rapidement transférés dans un bain d'eau froide pour arrêter la réaction, ensuite, chaque Eppendorfa été refroidi en ajoutant 750 μ L d'eau distillée. La lecture se fait par la mesure de l'absorbance sur spectrophotomètre à la longueur d'onde de 540 nm. L'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme libérant un micromole de sucres réducteurs équivalent au glucose en une minute dans des conditions d'essai standard (Khan *et al.*, 2020). Le calcul est réalisé par référence à des courbes standards de glucose ou xylose (figure 11).

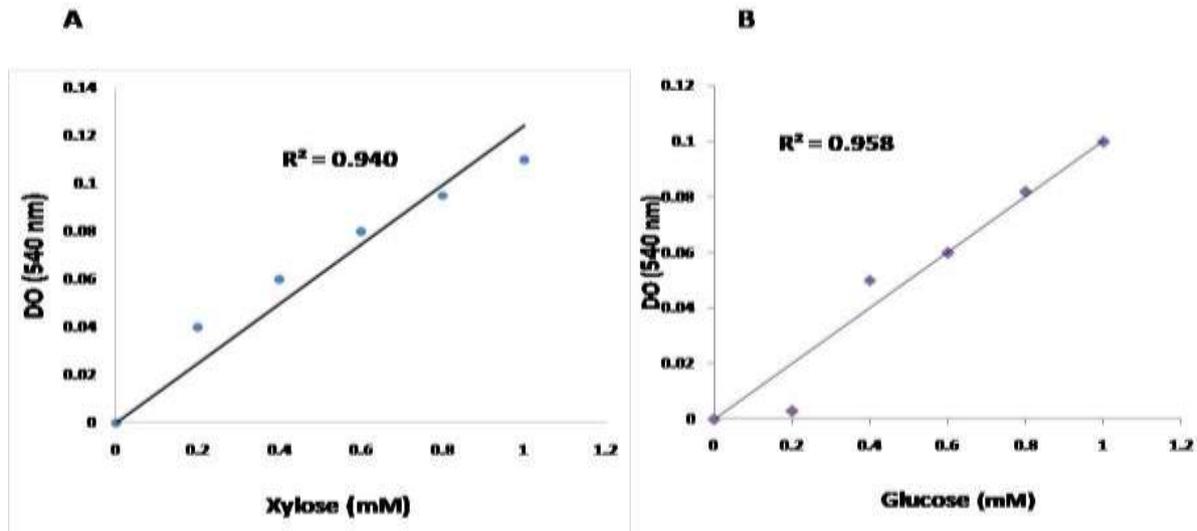


Figure 11 Courbes d'étalonnages standards utilisés durant le teste de l'activité enzymatique et de saccharification pour identifier les unités enzymatiques et le taux des sucres réductase (A) la courbe standard de xylose, (B) la coudre standard de glucose.

4. Saccharification enzymatique de la biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique peut être convertie en sucres fermentescibles par l'action synergique d'enzymes (hémi-)cellulolytiques (Bhardwaj *et al.*, 2020), la capacité du complexe enzymatique produit par la souche de *B. velezensis* H1 à hydrolyser la matière lignocellulosique présentée dans les trois substrats naturels (PDT, TMT, ORG), a été évaluée par la mesure de la quantité de sucres réducteurs (RS) libérés par les enzymes en utilisant la méthode d'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) (Pinheiro *et al.*, 2021).

Pour réaliser ce test, six tubes Falcon contenant les solutions stériles des matières lignocellulosique sont préparées à 5 % (PDT, TMT, ORG), les extraits enzymatiques filtrés provenant des fermentations de ces mêmes substrats ainsi que le xylane de maïs, et le tampon acétate de sodium à 100 mM, pH 6.5 (filtré), sont ajoutés avec un rapport volumique de 1:2:1 respectivement (tableau 4). Les tubes sont ensuite incubés pendant 48 h à 30 °C sous agitation de 150 rpm.

Tableau4 Récapitulatif des conditions de réalisation du test de saccharification.

Substrat à 5%	Complexe enzymatique ajouté	Tampon	Température	Temps d'incubation
PDT	Surnageant acellulaire de la fermentation de PDT (72h)	acétate de sodium (100 mM, pH 6.5)	30 °C	48 h
TMT	Surnageant acellulaire de la fermentation de TMT (72h)	acétate de sodium (100 mM, pH 6.5)	30 °C	48 h
ORG	Surnageant acellulaire de la fermentation d'ORG (72h)	acétate de sodium (100 mM, pH 6.5)	30 °C	48 h
PDT	Surnageant acellulaire de la fermentation de xylane de maïs (48h)	acétate de sodium (100 mM, pH 6.5)	30 °C	48 h
TMT	Surnageant acellulaire de la fermentation de xylane de maïs (48h)	acétate de sodium (100 mM, pH 6.5)	30 °C	48 h
ORG	Surnageant acellulaire de la fermentation de xylane de maïs (48h)	acétate de sodium (100 mM, pH 6.5)	30 °C	48 h

Après l'incubation, les tubes ont été bouillis pendant 5 min au bain-marie à une température de 100°C pour dénaturer les enzymes et conserver uniquement les sucres produits à partir de la dégradation de la matière lignocellulosique présente dans les substrats naturels utilisés.

La prochaine étape consiste à doser les sucres réducteurs en utilisant la méthode de DNS, par la même méthode réalisée durant le dosage enzymatique. La lecture est réalisée toujours à 540 nm. La quantité de sucres réducteurs est calculée en comparant la densité optique (DO) de l'échantillon avec les courbes standards de glucose (Khan *et al.*, 2020) (Figure 11). La quantité de sucres réducteurs présente dans les substrats stériles (avant l'incubation avec l'extrait enzymatique), a été prise en considération.

4.1. Identification des oligosaccharides par la méthode de chromatographie sur couche mince (CCM)

La technique de CCM est souvent employée pour déterminer le nombre de composants dans un mélange, vérifier l'identité et la pureté d'un composé (Cai 2014). Cette technique est réalisée pour séparer et identifier les différents oligosaccharides libérés durant le test de saccharification en utilisant les échantillons mentionnés dans la section précédente.

Matériel et méthodes

Pour cela, à l'aide d'une micropipette, 20 μ L de chaque échantillon sont déposés sur une plaque de silice sur support aluminium (le format de plaque : 20×20 cm, l'épaisseur de couche : 2 mm) séparées entre elles avec un diamètre de 1.5 cm, ensuite elles sont placées à une hauteur de 1.5 cm du bord de la plaque, suivi par un séchage rapide de chaque goutte grâce à un sèche-cheveux, cette étape correspond à la phase stationnaire de CCM. La première et la deuxième position de la plaque représentent les témoins préparés à partir d'un mélange de différents sucres simples préalablement préparés à une concentration de 10 mg/L, tels que le glucose (C1), le cellobiose (C2), le cellotriose (C3), le cellotetraose (C4), le cellopentaose (C5) et le galactose (Gal) pour l'évaluation de la production de cello-oligosaccharides, ainsi que le saccharose (Sac), le fructose (Fru), le rhamnose (Rha), le mannose (Man), le xylose (Xyl) afin d'évaluer la production héli-oligosaccharides. Ces sucres font l'objet de tests individuels sur CCM pour mesurer leur temps et leur distance de migration, en comparant leur distance de migration avec celle des sucres inconnus dans les échantillons. Ensuite, seule la partie inférieure de la plaque, où le repérage a été effectué, est immergée dans une cuve en verre contenant une solution de phase mobile composée de n-butanol, méthanol et eau distillée dans un rapport de 2:1:1, d'un volume total de 100 mL.

La chambre a été couverte et la phase mobile a été autorisée à voyager. Une fois que le liquide avait atteint le sommet de la plaque, le chromatogramme a été sorti et séché (Khan *et al.*, 2020), ensuite, il a été pulvériser avec une solution de révélation composée de méthanol contenant 0.2 % d'orcinol, d'acide sulfurique concentré, et d'eau distillée (83:10:7), chauffé à 100°C pendant 10 min, puis observé.

CHAPITRE III :

Résultats et discussions

1. Caractérisation macro et microscopique de la souche *B. velezensis* H1

L'observation macroscopique de la bactérie *B. velezensis* H1 sur milieu YPG après incubation à 30°C pendant 24h, a montrée l'apparition des colonies distinctes visible à l'œil nu (figure 11), et un aspect morphologique prescrivant la souche *B. velezensis* H1 (tableau 5).



Figure 12 Aspect macroscopique des colonies de *B.velezensis* H1

Tableau 5 Aspect morphologique des colonies obtenues sur YPG.

Taille	Forme	Contour	Aspect	Consistance	Surface	Couleur	Opacité
1 à 3 mm	Circulaire	Régulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Beige	Translucide

L'aspect microscopique a été observé à l'état frais et après la coloration de Gram. Cette observation a révélé que la souche de *B. velezensis* H1 se présente sous forme de bâtonnets, de petites tailles droites, leurs contours réguliers sont regroupés sous formes de diplo-bacilles ou chainettes à Gram positif, elles sont mobiles avec une endospore ovale (figure13).

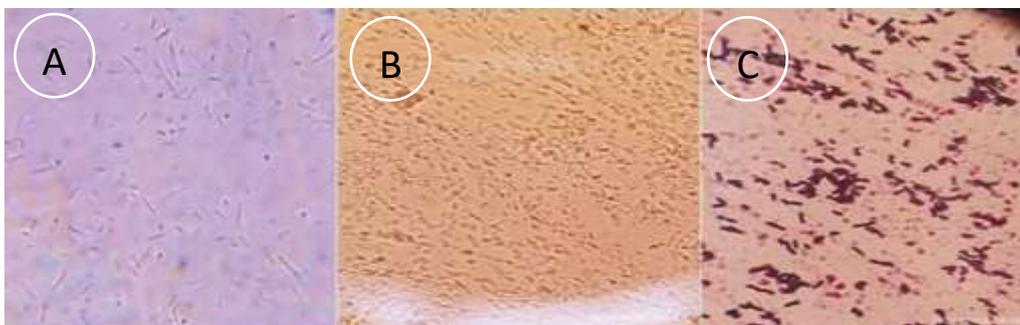


Figure 13 Photographies de l'observation microscopique à l'état frais (objectif ×40(A) et ×100(B)) et après coloration de Gram (C)

Dans le test de catalase la détection de la libération de bulles d'air indique que la souche est catalase positif (figure 14), ce qui signifie que la bactérie est aérobie. Cependant dans le test de l'oxydase la couleur violette n'apparaissait pas sur le disque oxydase (Figure 14) signifiant que la réaction est négative et la bactérie *B. velezensis* H1 considéré comme oxydase négative.

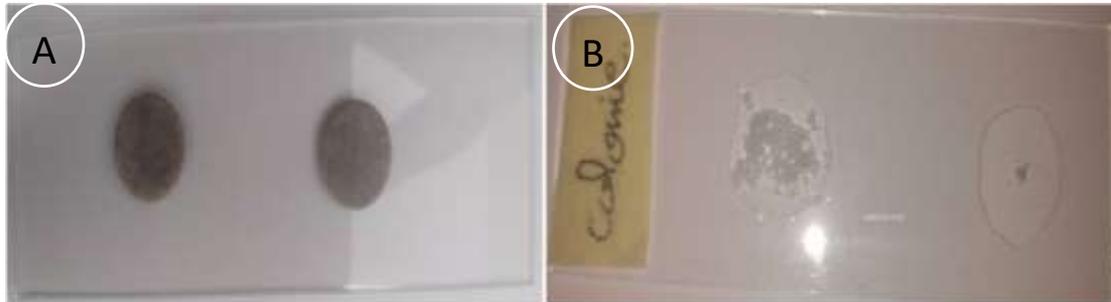


Figure 14 Photographies de test oxydase(A) et de catalase (B)

2. Evaluation du taux de sporulation

Les résultats du test de sporulation de la souche de *B. velezensis* H1 ont montré que la souche produit à la fin de fermentation, une concentration de 5×10^5 spores/mL. Ce résultat démontre que *B. velezensis* H1 possède la capacité de produire des spores, tout comme les autres genres de *Bacillus*. Cela lui offre une protection et une résistance dans des conditions difficiles et défavorables (Elegbeleye *et al.*, 2021).

3. Potentiel (hémi-)cellulolytique de la souche *B. velezensis* H1

L'activité (hémi-)cellulolytique de *B. velezensis* H1 est détectée par l'indicateur rouge Congo (0.1%) qui a une forte interaction avec les polysaccharides contenant des unités de β -1-4-D-glucopyranosyle, suivi d'une décoloration avec du NaCl pour faire apparaître l'halo visible jaune autour de l'enzyme hydrolase dérivée de la colonie (Castro *et al.*, 1995). Le rapport de le diamètre est de 3.11 et 2.5 pour la gélose de CMC et de xylane de maïs, respectivement (figure 15). Ce résultat confirme le potentiel cellulolytique et hémicellulolytique de la souche de *B.velezensis* H1.

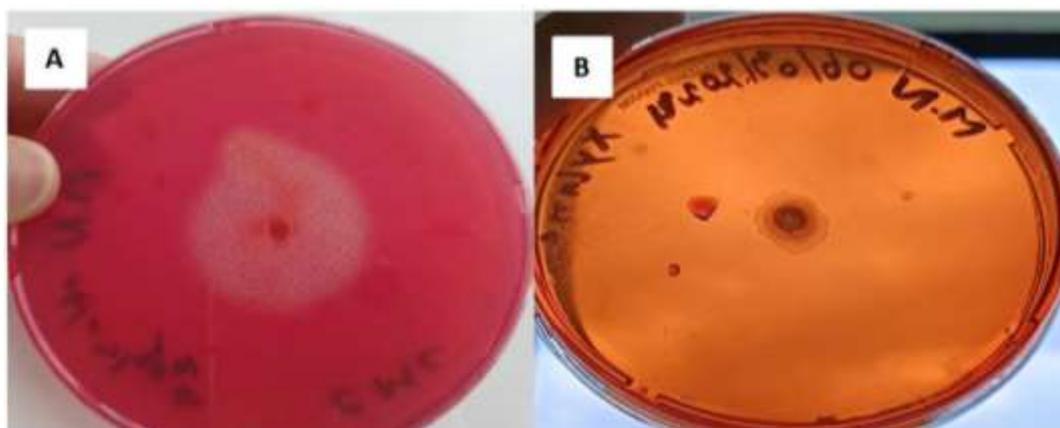


Figure 15 Activité cellulolytique (A) et hémicellulolytique (B) de *B. velezensis* H1 sur gélose à base de CMC et xylane de maïs

4. Production de protéines totales extracellulaires par *B. velezensis* H1

Le suivi de la production des protéines par la souche de *B. velezensis* H1 est réalisé durant 72 hde fermentations sur 6 substrats différents.



Figure 16 Fermentation submergée de *B. velezensis* H1

Le dosage des protéines extracellulaires bactériennes semble être une bonne méthode pour l'estimation de la croissance bactérienne dans les cas où la détermination de la croissance cellulaire par la méthode de dénombrement est impossible à cause de la contamination des échantillons prélevés par la fraction solide de la matière lignocellulosique. En effet, Les résultats présentés dans les graphiques de la (figure 16) montrent qu'une concentration croissante de protéines produites est obtenue pour tous les substrats étudiés.

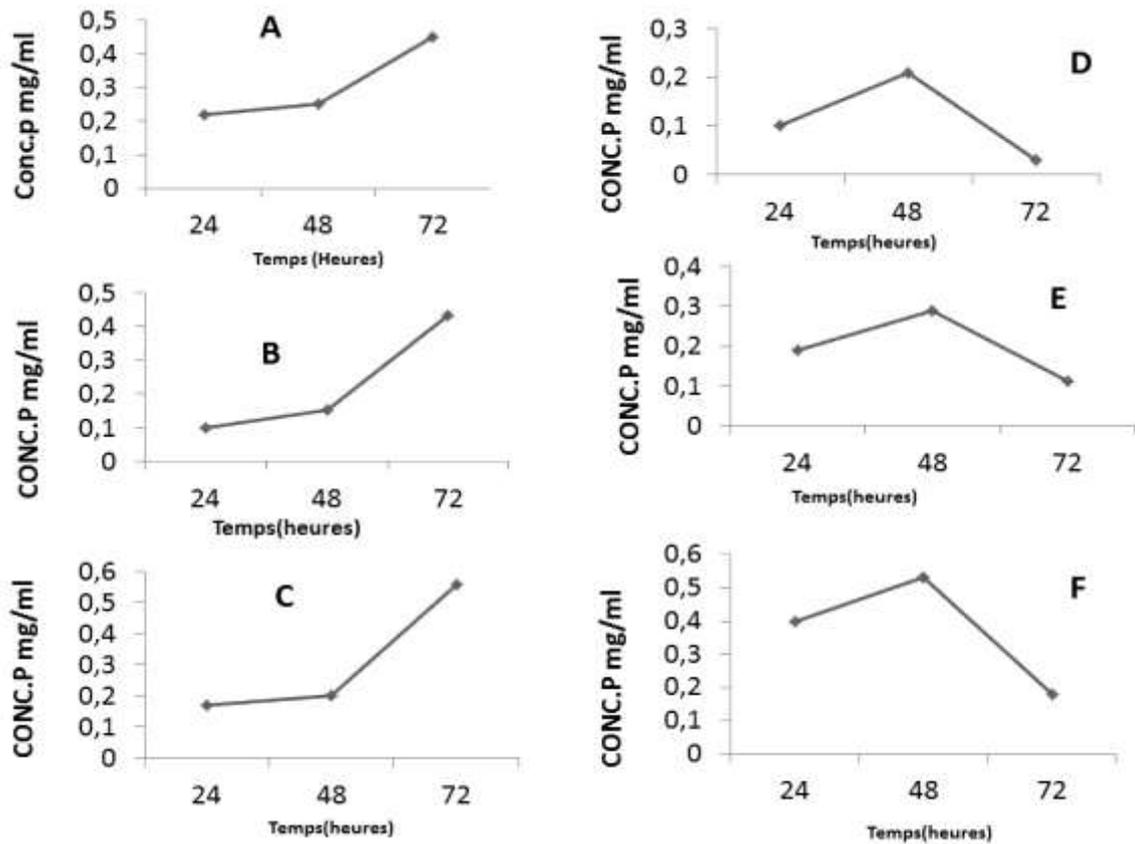


Figure 17 Concentration de protéines extracellulaire totales produites dans chaque milieu de fermentation à différents temps d'incubation (A : TMT, B : ORG, C : PDT, D : GC, E : CMC, F : XLN)

Ce résultat confirme aussi que la souche a le potentiel de dégrader la matière lignocellulosique en tant que substrat insoluble ainsi que les substrats hémicellulosiques synthétiques solubles. Les différences dans les concentrations montrent que la production de ces derniers est étroitement influencée par la nature de substrat. Les graphiques dans la figure X montrent que la production maximale de protéines est atteinte après 72 h d'incubation pour les substrats lignocellulosiques utilisés (TMT, PDT, ORG), avec des valeurs allant de 4.3 à 5.6 mg/mL. Tandis que les cultures sur substrats hémicellulosiques synthétiques (Xyn, GC, CMC), la concentration maximale est atteinte après 48 h d'incubation avec une valeur maximale de 5.3 mg/mL pour la culture sur le xylane de maïs, les résultats obtenus sur les substrats lignocellulosique sont nettement supérieurs à ceux obtenus par Zafar (2021) et Ayodele (2024) malgré leur utilisation des matières lignocellulosique prétraitées chimiquement pour améliorer le rendement de la fermentation.

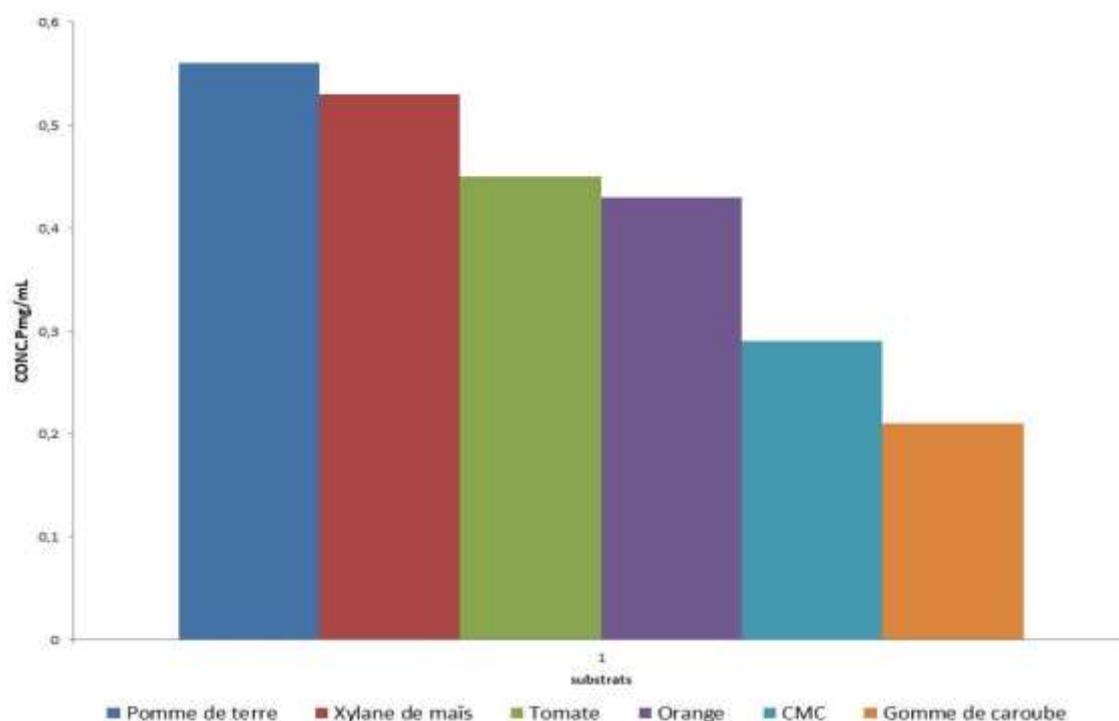


Figure 18 Histogramme comparatif des meilleures concentrations protéiques pour chaque substrat.

5. Production d'enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques par *B. velezensis* H1

Pour hydrolyser la biomasse lignocellulosique, il est essentiel de produire des enzymes lignocellulolytiques et de vérifier la viabilité économique de ce processus. De nombreuses études mentionnent la synthèse d'enzymes lignocellulolytiques d'origine bactérienne en utilisant des matériaux lignocellulosiques. (Song 2011 ; Saini *et al.*, 2022 ; Ilić *et al.*, 2023; Tunio *et al.*, 2024). Les bactéries couramment utilisés dans l'industrie de production des enzymes appartiennent aux genres *Bacillus* en raison de leurs grandes capacités de production et de sécrétion. Par exemple, l'endo-1,4- β -D-glucanase commercialisée par Megazyme et originaire de la souche de *Bacillus amyloliquefaciens* peut atteindre une activité spécifique de 60 U/mg. (<https://www.megazyme.com/cellulase-endo-1-4-beta-d-glucanase-bacillus-amyloliquefaciens>)

La TMT, l'ORG et la PDT ont été utilisés pour la production d'enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques, ces derniers étant considérés comme des substrats de choix pour la fermentation en milieu submergé en raison de leur haute valeur nutritionnelle, ainsi que leur disponibilité en quantité suffisante en Algérie.

La détermination de l'activité enzymatique totale de chaque surnageant découlant de la fermentation des matières lignocellulosique (PDT, TMT, ORG), par la souche *B. velezensis* H1 après 72 h

d'incubation, de même pour le surnageant de culture de *B. velezensis* H1 sur le xylane de maïs qui montre une production des protéines par valeur extrêmement précieuse qui déjà mentionné dans la section (4), en suivant la méthode établie par Ghose (1987) avec des modifications par l'addition des autres substrats (hémi-)cellulosiques synthétiques : xylane de maïs (xyl), gomme de caroube (GC), β -galactane avec la carboxyméthyl cellulose (CMC) qui a été utilisé par Ghose pour évaluer l'activité CMCCase. Des activités cellulolytiques de type CMCCase et endo- β -1,4-glucanase et des activités hémicellulolytiques telles que la xylanase et la β -mannanase, ont été enregistrées dans tous les surnageants des fermentations étudiées avec des concentrations différentes (figure 19).

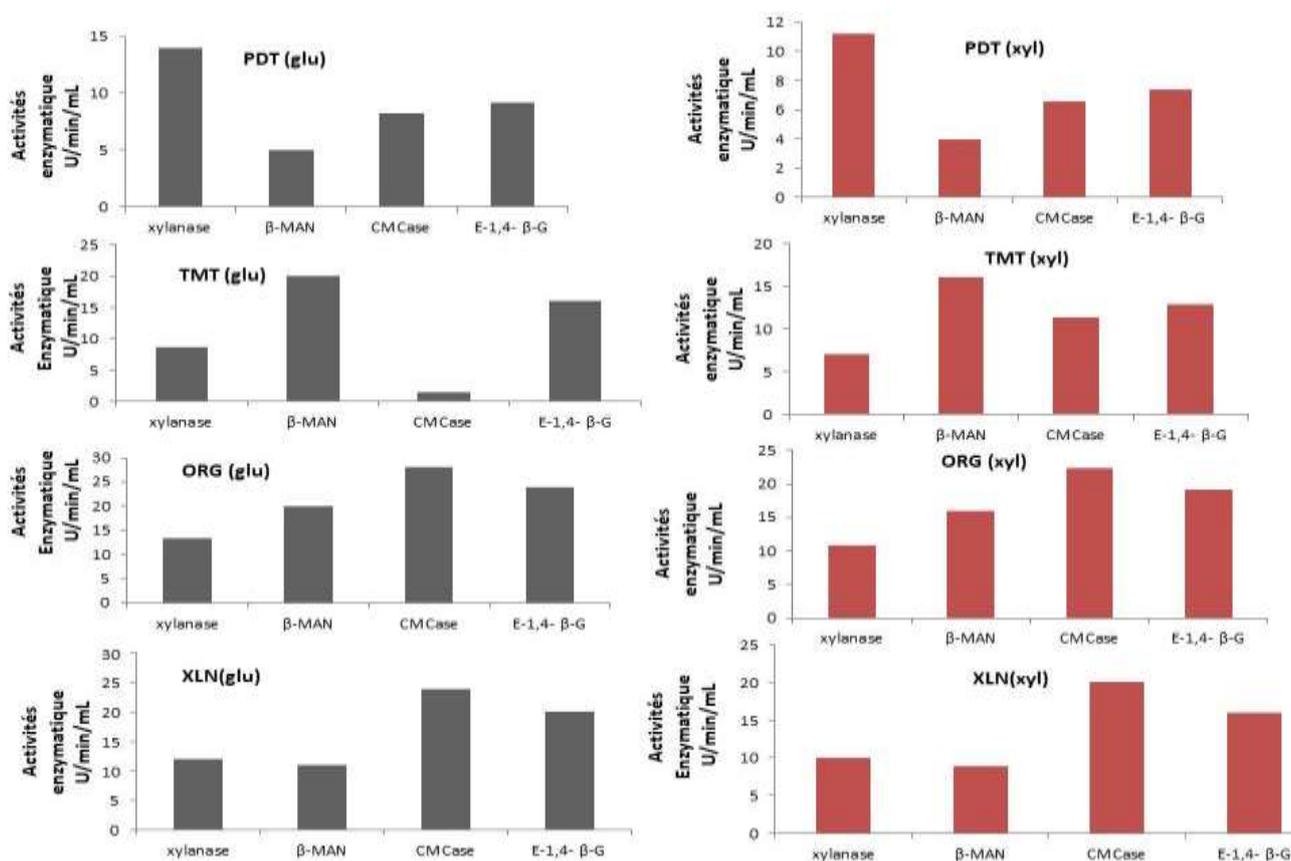


Figure 19 Histogramme comparatif des activités cellulolytiques et hémicellulolytiques détectées dans les différents extraits enzymatiques (CMCase, xylanase, β mannanase et β -1,4-endoglucanase).

Cela confirme que la souche ayant un grand potentiel (hémi-)cellulolytique, de fait que la production de β -mannanase est normalement expliquée par la présence de mannane dans la composition des substrats utilisés, mais dans ce cas la souche de *B. velezensis* H1 a libéré l'enzyme de β -mannanase même si il n'y a aucun substrat de fermentation utilisé, qui contient le mannane dans sa composition. Cela indique que la souche a une grande capacité à synthétiser des enzymes en permanence et de manière indépendante de la présence ou de l'absence de substrats spécifiques. Ces différentes enzymes sont largement utilisées dans le domaine industriel notamment

pour la production pharmaceutique et alimentaire, pétrolière et textile, la formulation de détergents. ainsi que dans la synthèse des pâtes et papiers (Chauhan *et al.*, 2012 ;Sadhu *et al.*, 2013).

Tableau 6 Activités cellulolytiques et hémicellulolytiques détectées dans les extraits enzymatiques et comparaison avec d'autres études

Enzyme	Substrat	activités enzymatiques	Production en (U/min/mL)	Microorganisme	Référence
Surnageant de culture de <i>B. velezensis</i> H1 sur la PDT	CMC	CMCase	8.2	<i>B. velezensis</i> H1	Cette étude
	β -glucane	β-1,4-endoglucanase	9.2		
	Gomme de caroube	β-mannanase	5		
	Xylane de maïs	Xylanase	14		
Surnageant de culture de <i>B. velezensis</i> H1 sur la TMT	CMC	CMCase	11.4	<i>B. velezensis</i> H1	Cette étude
	β -glucane	β-1,4-endoglucanase	16		
	Gomme de caroube	β-mannanase	20		
	Xylane de maïs	Xylanase	8.6		
Surnageant de culture de <i>B. velezensis</i> H1 sur l'ORG	CMC	CMCase	28	<i>B. velezensis</i> H1	Cette étude
	β -glucane	β-1,4-endoglucanase	24		
	Gomme de caroube	β-mannanase	20		
	Xylane de maïs	Xylanase	13.4		
Surnageant de culture de <i>B. velezensis</i> H1 sur xylane de maïs	CMC	CMCase	24	<i>B. velezensis</i> H1	Cette étude
	β -glucane	β-1,4-endoglucanase	20		
	Gomme de caroube	β-mannanase	11		
	Xylane de maïs	Xylanase	12		
Surnageant de culture de <i>B. Velezensis</i> (FAY0103)	CMC	CMCase	1.3	<i>B. velezensis</i> (FAY0103)	(AbdElhameed <i>et al.</i> , 2020)
Surnageant b-1, 3-1, 4-glucanase de culture de <i>B. velezensis</i>	Lichenan	β-1,4-endoglucanase	1.53	<i>B. velezensis</i>	(Xu <i>et al.</i> , 2016)
Surnageant de culture de <i>B.velezensis</i> NRC-1	Gomme de caroube	β-mannanase	1440	<i>B. velezensis</i> NRC-1	(Mazeed 2012)
xylanase purifiée de la <i>B. velezensis</i> AG20	xylane de bois de boeuf	Xylanase	19	<i>B. velezensis</i> AG20	(Ghosh <i>et al.</i> , 2021)

6. Saccharification de la matière lignocellulosique par le cocktail enzymatique

La structure variable et l'organisation de la cellulose et des hémicelluloses dans les résidus lignocellulosiques nécessitent l'action concertée de nombreuses enzymes (hémi-)cellulolytiques pour atteindre leur dégradation complète. La recherche de l'effet de tout le cocktail enzymatique présent dans les surnageants des cultures de *B. velezensis* H1 sur le xylane de maïs, l'ORG, la PDT et la TMT a été effectuée sur ces mêmes substrats (tableau 7). Après 48 h d'incubation, le dosage des sucres réducteurs par la méthode de DNS a démontré qu'il y a une importante production de sucres réducteurs par les enzymes sécrétées par la souche de *B. velezensis* H1. Différentes concentrations de sucres réducteurs a été obtenue par le surnageant de culture sur xylane de maïs incubé avec la PDT (11.6 mg/mL), la TMT (8 mg/mL) et l'ORG (5.4 mg/mL). Des concentrations comparables allant de 4.4 à 7 mg/mL ont été obtenus par les surnageants des cultures sur les substrats lignocellulosiques, ce qui démontre le potentiel saccharifiant élevé du cocktail enzymatique produit par *B. velezensis* H1 que ce soit pour les substrats synthétiques ou pour les substrats complexes naturels non prétraités chimiquement. Ce procédé à faible impact, connu sous le nom de "saccharification", offre une opportunité intéressante pour la fabrication de biocarburants, de prébiotiques ainsi que plusieurs matériaux biologiques (Guo *et al.*, 2018).

Tableau 7 Quantité de sucres réducteurs libérés après la saccharification de PDT, ORG et TMT

Origine du cocktail enzymatique	Substrat saccharifié	Quantité des sucres réducteurs (glucose) (mg/mL)	Quantité des sucres réducteurs (xylose) (mg/mL)	Référence
Culture de <i>B. velezensis</i> H1 sur PDT	PDT	7.2	6.18	Cette étude
Culture de <i>B. velezensis</i> H1 sur TMT	TMT	4.4	4	Cette étude
Culture de <i>B. velezensis</i> H1 sur ORG	ORG	6.8	6.5	Cette étude
culture <i>B. velezensis</i> H1 sur xylane de maïs	PDT	11.6	10.54	Cette étude
culture <i>B. velezensis</i> H1 sur xylane de maïs	TMT	8	7.27	Cette étude
culture <i>B. velezensis</i> H1 sur xylane de maïs	ORG	5.4	4.9	Cette étude
<i>Bacillus</i> <i>aestuarii</i> ,	Canne à sucre	0.44	/	(Zafar <i>et al.</i> , 2021)
β -mannanase de <i>Bacillus pumilus</i> GBSW19	Gomme de caroube	1.19	/	(Saini <i>et al.</i> , 2022)
xylanase	<i>Populus tomentosa</i> (peuplier blanc de chine)	4	/	(Saini <i>et al.</i> , 2022)

6.1. Production d'oligosaccharides

Les résultats de la CCM sur la figure 10 et le tableau 8 révèlent que les cocktails enzymatiques sécrétés par *B. velezensis* H1 durant les différentes fermentations présentent un grand potentiel de dégradation des différents substrats lignocellulosiques utilisés dans cette étude (PDT, TMT et ORG). En effet, une panoplie d'oligosaccharides a été libérée pendant les 48 h d'incubation des surnageants des cultures avec les différents substrats naturels testés.

L'analyse a démontré que les enzymes présentes dans le surnageant de culture de *B. velezensis* H1 sur PDT ont libérées du rhamnose, du cellobiose, du cellotriose et du cellopentaose comme produits d'hydrolyse de la PDT. De même, le surnageant de culture sur xylane de maïs, a montré un potentiel de libération de rhamnose, de cellotriose et de cellopentaose en plus de xylose à partir de la PDT. Ces oligosaccharides sont issus de la composition de la fraction cellulosique et hémicellulosique

caractérisant la PDT (Ryden et Selvendran 1990; van Marle *et al.*, 1997). La libération de cellobiose, de glucose, de rhamnose et de fructose ainsi que le xylose ont également été détectés après l'hydrolyse de la TMT par les enzymes présentes dans les surnageants des cultures sur TMT et sur xylane de maïs. Selon des études précédentes, tous ces oligosaccharides proviennent des composés cellulosiques et hémicellulosiques de la TMT (Puspaningrum et Yuwono 2019; Dzandu *et al.*, 2022). En outre, l'hydrolyse des polysaccharides de l'épluchure d'orange par les enzymes du surnageant de culture de *B. velezensis* H1 sur l'ORG a également démontré sa capacité à générer du fructose, du cellobiose et du cellotriose. Ces résultats (cellobiose et cellotriose) sont identiques à ceux obtenus par (Cano *et al.*, 2020) lorsque ils ont utilisé un mélange d'enzymes (hémi-)cellulolytique (cellulase, endo-cellulase et xylanase). Cependant, les enzymes du surnageant de culture sur xylane de maïs ont libéré seulement de xylose (Kerimi *et al.*, 2019). Plusieurs d'autres taches inconnus, qui ne correspondent pas aux standards déposés, ont été détectés dans le chromatogramme indiquant la probabilité de présence d'autres oligosaccharides. La diversité des oligosaccharides obtenus démontre la capacité du complexe enzymatique synthétisé par *B. velezensis* H1 à découper les polysaccharides de différents matières lignocellulosique et à libérer des sucres fermentescibles à haute valeur ajoutée sans avoir recours à des prétraitement chimique, étant donné qu'aucun produit chimique n'a été utilisé dans ce processus, il n'est pas nécessaire de recycler les produits chimiques et de ne pas libérer de composés toxiques dans l'environnement.

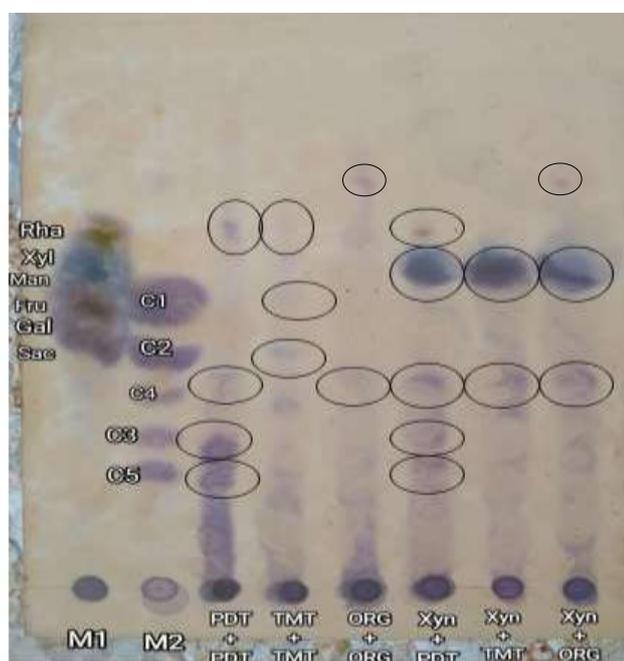


Figure 20 Analyse CCM de produit d'hydrolyse de la matière lignocellulosique par le cocktail enzymatique produit par *B. velezensis* H1

6.2. Recherche d'autres activités enzymatiques

Les activités enzymatiques présentes dans les surnageants acellulaires ont été déjà identifiées dans la section 5. Or, le test de saccharification de la matière lignocellulosique par ces surnageants, a permis de détecter de nouvelles activités enzymatiques. Les résultats du test de saccharification ont montré la présence de plusieurs cello-oligosaccharides tels que le glucose, le cellobiose, le cellotriose et le cellopentaose. Cela prouve la présence d'une activité enzymatique cellulolytique dans les différents surnageants testés. L'identification de ces oligosaccharides permettra de sélectionner quel type d'enzyme cellulase réagit pour la dégradation de la matière cellulosique. Il est plus approprié de le classer comme endoglucanase pour sa capacité à attaquer les régions amorphes de la cellulose en clivant les liaisons β -1,4-glycosidiques existantes dans les polysaccharides de ORG, PDT et la TMT (Nagl *et al.*, 2021 ; Djelid *et al.*, 2022) ce qui conduit à la libération de fragments de chaînes de cellotriose et de cellopentaose. Ainsi que la présence de cellobiose et de glucose chez certains échantillons montre la présence d'enzyme exoglucanase et la β -glucosidase (Velleste *et al.*, 2010) (Nagl *et al.*, 2021).

Tableau 8 Oligosaccharides libérés durant la saccharification et activité enzymatique correspondante.

Origine du surnageant acellulaire	Substrat saccharifié	Oligosaccharides libérés	Activité enzymatique détectée
Culture sur PDT	PDT	Rhamnose, cellopentaose, cellobiose, cellotriose	endoglucanase, exoglucanase α -l-rhamnosidase
Culture sur TMT	TMT	Glucose, fructose cellobiose, rhamnose	exoglucanase β -glucosidase β -fructosidase α -l-rhamnosidase
Culture sur ORG	ORG	Cellobiose cellotriose. fructose	Exoglucanase endoglucanase β -fructosidase
Culture sur Xylane de maïs	PDT	Xylose, cellopentaose, cellotriose, rhamnose	Endoglucanase α -l-rhamnosidase xylanase
Culture sur Xylane de maïs	TMT	xylose	Xylanase
Culture sur Xylane de maïs	ORG	xylose	Xylanase

L'activité hémicellulolytique de la souche est expliquée par la présence des xylo-oligosaccharides. La libération de xylose est attribuée à l'activité de l'enzyme xylanase, qui peut être de type exo-xylanase ou β -xylosidase, et la libération de fructose et de rhamnose est le résultat de l'action de

Résultats et discussions

certains enzymes débranchasses, tels que le β -fructosidase et le α -l-rhamnosidase [E. C. 3.2.1.40](Yadav *et al.*, 2010; Porras-Domínguez *et al.*, 2014). Le tableau ci-dessous présente les différents surnageants utilisés avec leur composition en oligosaccharides et l'activité enzymatique correspondante.

Conclusion

Conclusion

L'utilisation de micro-organismes pour la conversion enzymatique de la biomasse lignocellulosique, est devenue aujourd'hui, la méthode la plus efficace pour produire divers produits biosynthétiques à haute valeur ajoutée pour les industries. Cette approche implique la décomposition de la biomasse à l'aide d'enzymes d'origine microbienne, sans recourir à des prétraitements chimiques, afin de synthétiser plusieurs bio-produits essentiels avec des rendements plus économiques et avec un faible impact environnemental.

L'objectif de cette étude est de développer des biocatalyseurs de la matière hémicellulosique par fermentation bactérienne submergée, et de les utiliser par la suite pour la saccharification et la production de sucres fermentescibles à partir de cette matière. A cet effet, l'hémicellulose issue de déchets agro-industriels tels que les résidus de tomate et les déchets ménagers tels que les épluchures de pommes de terre et d'orange sont utilisés comme matière première. La souche de *B. velezensis* H1 a initialement été évalué pour sa capacité à dégrader la CMC et de xylane de maïs, les résultats sur milieu gélosé et liquide ont montré la capacité de la souche à dégrader ces substrats en produisant divers types de cellulases et d'hémicellulases telles que la xylanase, la CMCase, l'endo- β -1,4-glucanase et la β -mannanase avec des valeurs de 12 U/min/mL ; 24 U/min/mL ; 20 U/min/mL et 11 U/min/mL respectivement. La production de ces memes enzymes en hydrolisant la biomasse lignocellulosque a été étudiée à travers des fermentations submergées en présence de 5% résidus de tomate, d'épluchures de pommes et d'orange. Après 72 h d'incubation à 30 °C, les memes activités enzymatiques ont été détectées avec des valeurs maximales de 28 U/min/mL pour la CMCase, 24 U/min/mL pour l'endo-1,4- β -glucanase, 14 U/min/mL pour la xylanase et 20 U/min/mL pour la β -mannanase. Un dosage des protéines a été réalisé afin d'estimer la quantité des protéines totales produites par la souche durant les fermentations réalisés, une production maximale a été obtenue après 72 h d'incubation avec des valeurs allant de 4.3 à 5.6 mg/mL. Le potentiel du cocktail enzymatique à saccharifier la matière lignocellulosique et à libérer ses oligosaccharides a été réalisé à 30 °C et 150 rpm pendant 48 h, des concentrations totales en sucres réducteurs allant de 4.4 à 11.6 mg/mL ont été détectées. L'identification de ces sucres par la méthode de CCM a révélé la présence de plusieurs oligosaccharides tels que le glucose, le cellobiose, le cellotriose, le cellopentaose, le rhamnose, le xylose et le fructose. La présence de ces sucres a indiqué la présence d'autres activités enzymatiques telles que la β -fructosidase, l' α -l-rhamnosidase et la β -glucosidase. Les résultats obtenus dans ce travail sont pertinents car ils révèlent que la souche de *B. velezensis* H1 représente un candidat prometteur pour une dégradation efficace de la biomasse lignocellulosique grâce à l'effet synergique du cocktail (hémi-)cellulolytique qu'elle peut produire. La production réussie de 7 enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques par cette souche est particulièrement encourageante.

Conclusion

Néanmoins, certaines observations faites au cours de ce travail peuvent servir de base à de futures recherches pour approfondir cette thématique :

- Optimisation des paramètres de production des enzymes et détermination des valeurs optimales des facteurs sélectionnés
- Etudes des caractéristiques extremophiles des enzymes produites
- Etude des caractéristiques prébiotiques des oligosaccharides libérés et la capacité de la souche de *Bacillus velezensis* H1 ainsi que d'autres bactéries probiotiques à les hydrolyser.

Références bibliographiques

- AbdElhameed, Esraa, Alaa R. M. Sayed, Tharwat E. E. Radwan, et Gamal Hassan. 2020. « Biochemical and Molecular Characterization of Five Bacillus Isolates Displaying Remarkable Carboxymethyl Cellulase Activities ». *Current Microbiology* 77(10): 3076-84. doi:10.1007/s00284-020-02135-8.
- Ait-Kaki, Asma, Noredine Kacem-Chaouche, Marc Ongena, Mounira Kara-Ali, Laid Dehimat, Karima Kahlat, et Philippe Thonart. 2014. « In Vitro and In Vivo Characterization of Plant Growth Promoting Bacillus Strains Isolated from Extreme Environments of Eastern Algeria ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172(4): 1735-46. doi:10.1007/s12010-013-0617-0.
- Akbi, Amine, Meryem Saber, Majda Aziza, et Noureddine Yassaa. 2017. « An overview of sustainable bioenergy potential in Algeria ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 72: 240-45. doi:10.1016/j.rser.2017.01.072.
- Alfenore, Sandrine, et Carole Molina-Jouve. 2016. « Current status and future prospects of conversion of lignocellulosic resources to biofuels using yeasts and bacteria ». *Process Biochemistry* 51(11): 1747-56. doi:10.1016/j.procbio.2016.07.028.
- Ang, Teck Nam, Gek Ngoh, Adeline Chua, et Min Lee. 2012. « Elucidation of the effect of ionic liquid pretreatment on rice husk via structural analyses ». *Biotechnology for biofuels* 5: 67. doi:10.1186/1754-6834-5-67.
- Angone, S. A., E. Nguema-Ona, et A. Driouich. 2010. « La thérapie par les plantes en Afrique: activités immunostimulantes des polysaccharides de la paroi végétale ». *Phytothérapie* 8(4): 223-30. doi:10.1007/s10298-010-0567-4.
- Annamalai, Neelamegam, Mayavan Veeramuthu Rajeswari, et Nallusamy Sivakumar. 2016. « Cellobiohydrolases: Role, Mechanism, and Recent Developments ». In *Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass, Biofuel and Biorefinery Technologies*, éd. Vijai Kumar Gupta. Cham: Springer International Publishing, 29-35. doi:10.1007/978-3-319-43679-1_2.
- Anwar, Zahid, Muhammad Gulfraz, et Muhammad Irshad. 2014. « Agro-Industrial Lignocellulosic Biomass a Key to Unlock the Future Bio-Energy: A Brief Review ». *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7(2): 163-73. doi:10.1016/j.jrras.2014.02.003.
- Ávila, Patrícia F., Marcos F. Silva, Manoela Martins, et Rosana Goldbeck. 2021. « Cello-Oligosaccharides Production from Lignocellulosic Biomass and Their Emerging Prebiotic Applications ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37(5): 73. doi:10.1007/s11274-021-03041-2.
- Barreteau, Hélène, Cédric Delattre, et Philippe Michaud. 2005. « Production of Oligosaccharides as Promising New Food Additive Generation ». *Food Technology and Biotechnology*.
- Başkan, Kevser Sözgen, Esmâ Tütem, Esin Akyüz, Seda Özen, et Reşat Apak. 2016. « Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction ». *Talanta* 147: 162-68. doi:10.1016/j.talanta.2015.09.049.

- Beaton, Danielle, Phillip Pelletier, et Richard R. Goulet. 2019. « Microbial Degradation of Cellulosic Material and Gas Generation: Implications for the Management of Low- and Intermediate-Level Radioactive Waste ». *Frontiers in Microbiology* 10.
- Beldman, G., H. A. Schols, S. M. Pitson, M. J. F. Searle-van Leeuwen, et A. G. J. Voragen. 1997. « Arabinans and Arabinan Degrading Enzymes. » In *Advances in Macromolecular Carbohydrate Research, Vol 1*, , 1-64. <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/39733> (27 avril 2024).
- Ben Ali, Wissal. 2021. « Criblage de la diversité fongique marine visant à identifier de nouvelles oxydases pour les biotechnologies et le développement durable ». These de doctorat. Aix-Marseille. <https://theses.fr/2021AIXM0178> (19 avril 2024).
- Benkahoul, Malika, Aïcha Belmessikh, Hayet Boukhalfa-Lezzar, et Aïcha Maza. 2017. « Optimisation à l'aide d'un plan d'expériences de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels ». *Déchets, sciences et techniques* N°75-décembre 2017. doi:10.4267/dechets-sciences-techniques.3703.
- Bessaoud, O., et K. Lefki. 2018. *Diagnostic du système de régulation de la pomme de terre en Algérie*. CIHEAM-IAMM. Research Report. <https://hal.science/hal-02140788> (23 avril 2024).
- Bhardwaj, Nisha, Bikash Kumar, Komal Agrawal, et Pradeep Verma. 2020. « Bioconversion of rice straw by synergistic effect of in-house produced ligno-hemicellulolytic enzymes for enhanced bioethanol production ». *Bioresource Technology Reports* 10: 100352. doi:10.1016/j.biteb.2019.100352.
- Bouchat, Romain. 2022. « XYLANFACTORY - Optimisation de la culture d'une bactérie thermophile en bioréacteurs pour la production d'hémicellulases et la valorisation des xylanes des biomasses lignocellulosiques ». These de doctorat. Reims. <https://theses.fr/2022REIMS049> (26 avril 2024).
- Cabrera, J.C., G. Wégria, R.C.A. Onderwater, G. González, M.C. Nápoles, A.B. Falcón-Rodríguez, D. Costales, et al. 2013. « PRACTICAL USE OF OLIGOSACCHARINS IN AGRICULTURE ». *Acta Horticulturae* (1009): 195-212. doi:10.17660/ActaHortic.2013.1009.24.
- Cai, Li. 2014. « Thin Layer Chromatography ». *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 8(1): 6.3.1-6.3.18. doi:10.1002/9780470089941.et0603s08.
- Cano, María Emilia, Alberto García-Martin, Pablo Comendador Morales, Mateusz Wojtusik, Victoria E. Santos, José Kovensky, et Miguel Ladero. 2020. « Production of Oligosaccharides from Agrofood Wastes ». *Fermentation* 6(1): 31. doi:10.3390/fermentation6010031.
- Castro, Guillermo R, Mario D Baigorí, et Faustino Siñeriz. 1995. « A plate technique for screening of inulin degrading microorganisms ». *Journal of Microbiological Methods* 22(1): 51-56. doi:10.1016/0167-7012(94)00063-D.

- Chauhan, Prakram Singh, Neena Puri, Prince Sharma, et Naveen Gupta. 2012. « Mannanases: Microbial Sources, Production, Properties and Potential Biotechnological Applications ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 93(5): 1817-30. doi:10.1007/s00253-012-3887-5.
- Costa, Leon Sulfierry Corrêa, Diego César Batista Mariano, Rafael Eduardo Oliveira Rocha, Johannes Kraml, Carlos Henrique da Silveira, Klaus Roman Liedl, Raquel Cardoso de Melo-Minardi, et Leonardo Henrique Franca de Lima. 2019. « Molecular Dynamics Gives New Insights into the Glucose Tolerance and Inhibition Mechanisms on β -Glucosidases ». *Molecules* 24(18): 3215. doi:10.3390/molecules24183215.
- Decroix, Camille. 2019. « Développement d'un matériau à base d'acétate de cellulose par plastification réactive en extrusion ». phdthesis. Université de Lyon. <https://theses.hal.science/tel-02896408> (19 avril 2024).
- Djelid, Hadjer, Sigrid Flahaut, Corinne Vander Wauven, Yamina Oudjama, Serge Hiligsmann, Bertrand Cornu, Radia Cherfia, Maroua Gares, et Noredine Kacem Chaouche. 2022. « Production of a Halotolerant Endo-1,4- β -Glucanase by a Newly Isolated *Bacillus velezensis* H1 on Olive Mill Wastes without Pretreatment: Purification and Characterization of the Enzyme ». *Archives of Microbiology* 204(11): 681. doi:10.1007/s00203-022-03300-2.
- Dzandu, Bennett, Arranee Chotiko, et Subramaniam Sathivel. 2022. « Antioxidant activity and viability of *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Lactocaseibacillus casei*, and Co-culture in fermented tomato juice during refrigerated storage ». *Food Bioscience* 50: 102085. doi:10.1016/j.fbio.2022.102085.
- Elegbeleye, James A., Ramon Gervilla, Artur X. Roig-Sagues, et Elna M. Buys. 2021. « Ultraviolet-C inactivation and hydrophobicity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* spores isolated from extended shelf-life milk ». *International Journal of Food Microbiology* 349: 109231. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109231.
- Ernst, Orna, et Tsaffrir Zor. 2010. « Linearization of the Bradford Protein Assay ». *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (38): e1918. doi:10.3791/1918.
- Fu, Gen-Que, Ya-Jie Hu, Jing Bian, Ming-Fei Li, Feng Peng, et Run-Cang Sun. 2019. « Isolation, Purification, and Potential Applications of Xylan ». In *Production of Materials from Sustainable Biomass Resources, Biofuels and Biorefineries*, éd. Zhen Fang, Richard L. Smith, Jr, et Xiao-Fei Tian. Singapore: Springer Singapore, 3-35. doi:10.1007/978-981-13-3768-0_1.
- Galisteo, Cristina, Cristina Sánchez-Porro, Rafael R. de la Haba, Clara López-Hermoso, Ana B. Fernández, María E. Farias, et Antonio Ventosa. 2019. « Characterization of *Salinivibrio socompensis* Sp. Nov., A New Halophilic Bacterium Isolated from the High-Altitude Hypersaline Lake Socompa, Argentina ». *Microorganisms* 7(8). doi:10.3390/microorganisms7080241.
- Gares, Maroua, Serge Hiligsmann, et Noredine Kacem Chaouche. 2020. « Lignocellulosic Biomass and Industrial Bioprocesses for the Production of Second Generation Bio-Ethanol, Does It Have a Future in Algeria? ». *SN Applied Sciences* 2(10): 1-19. doi:10.1007/s42452-020-03442-2.

- Ghose, T. K., et Virendra Swarup Bisaria. 1987. « Measurement of Hemicellulase Activities: Part I Xylanases ». *Pure and Applied Chemistry* 59(12): 1739-51. doi:10.1351/pac198759121739.
- Ghosh, Arabinda, Anshuman Chandra, Avinash Dhar, Pratyosh Shukla, et Debabrat Baishya. 2021. « Multi-efficient thermostable endoxylanase from *Bacillus velezensis* AG20 and its production of xylooligosaccharides as efficient prebiotics with anticancer activity ». *Process Biochemistry* 109: 59-71. doi:10.1016/j.procbio.2021.06.011.
- Guarnizo, Nathalie, Diego Oliveros, Walter Murillo-Arango, et María Bianney Bermúdez-Cardona. 2020. « Oligosaccharides: Defense Inducers, Their Recognition in Plants, Commercial Uses and Perspectives ». *Molecules* 25(24): 5972. doi:10.3390/molecules25245972.
- Guo, Hongliang, Yingju Chang, et Duu-Jong Lee. 2018. « Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses ». *Bioresource Technology* 252: 198-215. doi:10.1016/j.biortech.2017.12.062.
- Haberra, SOUMAYA. 2014. « Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet ».
- Hadjer Djelid, Sigrid Flahaut, Yamina Oudjama, Corinne Vander Wauven, et Noredine Kacem Chaouche. 2023. « High NaCl concentrations induce the resistance to thermal denaturation of an extremely halotolerant (salt-activated) β -mannanase from *Bacillus velezensis* H1 ».
- Hamid, Sharifah Bee Abd, Mohammed Moinul Islam, et Rasel Das. 2015. « Cellulase Biocatalysis: Key Influencing Factors and Mode of Action ». *Cellulose* 22(4): 2157-82. doi:10.1007/s10570-015-0672-5.
- Hani Zafar, Iqra Rehman, et Uroosa Ejaz. 2021. « Production of multienzyme by *Bacillus aestuarii* UE25 using ionic liquid pretreated sugarcane bagasse ».
- Harmsen, P. F. H., W. Huijgen, L. Bermudez, et R. Bakker. 2010. *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass*. Wageningen: Wageningen UR - Food & Biobased Research. <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/396201> (23 avril 2024).
- Hassan, Shady S., Gwilym A. Williams, et Amit K. Jaiswal. 2019. « Moving towards the Second Generation of Lignocellulosic Biorefineries in the EU: Drivers, Challenges, and Opportunities ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 101:590-99. doi: 10.1016/j.rser.2018.11.041.
- Heinze, Thomas. 2015. « Cellulose: Structure and Properties ». In *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials*, Advances in Polymer Science, éd. Orlando J. Rojas. Cham: Springer International Publishing, 1-52. doi:10.1007/12_2015_319.
- Hills, Colin D., Nimisha Tripathi, Raj S. Singh, Paula J. Carey, et Florence Lowry. 2020. « Valorisation of Agricultural Biomass-Ash with CO₂ ». *Scientific Reports* 10(1): 13801. doi:10.1038/s41598-020-70504-1.

- Hu, Lisong, Xuezhi Fang, Menghao Du, Fan Luo, et Shaohai Guo. 2020. « Hemicellulose-Based Polymers Processing and Application ». *American Journal of Plant Sciences* 11(12): 2066-79. doi:10.4236/ajps.2020.1112146.
- Ibrahim, Syahriar Nur Maulana Malik, Sibyandhita Erhaa Amalia, Bunga Agatha, Mustikayanti Yuni Lestari, Antonius Dwi Saputra, Nur Laily Fachira Ikmala, Fazareyna Hyuwan Argi Ryanto, et al. 2018. « Screening and identifying of cellulolytic bacteria from Alas Purwo National Park ». *AIP Conference Proceedings* 2002(1): 020064. doi:10.1063/1.5050160.
- Ilić, Nevena, Marija Milić, Sunčica Beluhan, et Suzana Dimitrijević-Branković. 2023. « Cellulases: From Lignocellulosic Biomass to Improved Production ». *Energies* 16(8): 3598. doi:10.3390/en16083598.
- Jiao, L. F., Z. H. Song, Y. L. Ke, K. Xiao, C. H. Hu, et B. Shi. 2014. « Cello-oligosaccharide influences intestinal microflora, mucosal architecture and nutrient transport in weaned pigs ». *Animal Feed Science and Technology* 195: 85-91. doi:10.1016/j.anifeedsci.2014.05.014.
- Juturu, Veeresh, et Jin Chuan Wu. 2014. « Microbial cellulases: Engineering, production and applications ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33: 188-203. doi:10.1016/j.rser.2014.01.077.
- Karnaouri, Anthi, Evangelos Topakas, Leonidas Matsakas, Ulrika Rova, et Paul Christakopoulos. 2018. « Fine-Tuned Enzymatic Hydrolysis of Organosolv Pretreated Forest Materials for the Efficient Production of Cellobiose ». *Frontiers in Chemistry* 6. doi:10.3389/fchem.2018.00128.
- Kerimi, Asimina, Julia S. Gauer, Susannah Crabbe, Jia W. Cheah, Jay Lau, Rosa Walsh, Paul F. Cancalon, et Gary Williamson. 2019. « Effect of the Flavonoid Hesperidin on Glucose and Fructose Transport, Sucrase Activity and Glycaemic Response to Orange Juice in a Crossover Trial on Healthy Volunteers ». *British Journal of Nutrition* 121(7): 782-92. doi:10.1017/S0007114519000084.
- Ketudat Cairns, James R., et Asim Esen. 2010. « β -Glucosidases ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(20): 3389-3405. doi:10.1007/s00018-010-0399-2.
- Khan, Maria Tariq, Uroosa Ejaz, et Muhammad Sohail. 2020a. « Evaluation of Factors Affecting Saccharification of Sugarcane Bagasse Using Cellulase Preparation from a Thermophilic Strain of *Brevibacillus* Sp. ». *Current Microbiology* 77(9): 2422-29. doi:10.1007/s00284-020-02059-3.
- Khan, Maria Tariq, Uroosa Ejaz, et Muhammad Sohail. 2020b. « Evaluation of Factors Affecting Saccharification of Sugarcane Bagasse Using Cellulase Preparation from a Thermophilic Strain of *Brevibacillus* Sp. ». *Current Microbiology* 77(9): 2422-29. doi:10.1007/s00284-020-02059-3.
- Kruger, Nicholas J. 2009. « The Bradford Method For Protein Quantitation ». In *The Protein Protocols Handbook*, éd. John M. Walker. Totowa, NJ: Humana Press, 17-24. doi:10.1007/978-1-59745-198-7_4.
- Kuhad, Ramesh Chander, Deepa Deswal, Sonia Sharma, Abhishek Bhattacharya, Kavish Kumar Jain, Amandeep Kaur, Brett I. Pletschke, Ajay Singh, et Matti Karp. 2016. « Revisiting

- cellulase production and redefining current strategies based on major challenges ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 55: 249-72. doi:10.1016/j.rser.2015.10.132.
- Kumar, Vikash, Poonam Syal, et T. Satyanarayana. 2013. « Highly Thermo–Halo–Alkali-Stable β -1,4-Endoxylanase from a Novel Polyextremophilic Strain of *Bacillus Halodurans* ». *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36(5): 555-65. doi:10.1007/s00449-012-0811-4.
- Lynd, Lee R., Paul J. Weimer, Willem H. van Zyl, et Isak S. Pretorius. 2002. « Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3): 506-77. doi:10.1128/mubr.66.3.506-577.2002.
- Mahmood, Raja Tahir, Muhammad Javaid Asad, Nazia Mehboob, Maria Mushtaq, Muhammad Gulfraz, Muhammad Asgher, Nasir M. Minhas, et Saqib Hussain Hadri. 2013. « Production, Purification, and Characterization of Exoglucanase by *Aspergillus Fumigatus* ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170(4): 895-908. doi:10.1007/s12010-013-0227-x.
- Maki, Miranda, Kam Tin Leung, et Wensheng Qin. 2009. « The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass ». *International Journal of Biological Sciences* 5(5): 500-516.
- van Marle, J. Trinet, Kees Recourt, Cees van Dijk, Henk A. Schols, et Alphons G. J. Voragen. 1997. « Structural Features of Cell Walls from Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars Irene and Nicola ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(5): 1686-93. doi:10.1021/jf9607627.
- Mazeed, Tarek. 2012. « OPTIMIZATION OF NUTRIENT COMPOSITION MEDIUM AND CULTURE CONDITION FOR MANNANASE PRODUCTION BY *BACILLUS VELEZENSIS* NRC-1 USING TAGUCHI METHOD ». *Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences* 45(1): 198-207. doi:10.21608/ajps.2012.7240.
- Mlle Boukroufa, Meryem. 2016. « Sciences et Techniques de l'Environnement ».
- Moreira, L. R. S., et E. X. F. Filho. 2008. « An Overview of Mannan Structure and Mannan-Degrading Enzyme Systems ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 79(2): 165-78. doi:10.1007/s00253-008-1423-4.
- Nagl, Martin, Oskar Haske-Cornelius, Lukas Skopek, Alessandro Pellis, Wolfgang Bauer, Gibson Stephen Nyanhongo, et Georg Guebitz. 2021b. « Biorefining: The Role of Endoglucanases in Refining of Cellulose Fibers ». *Cellulose* 28(12): 7633-50. doi:10.1007/s10570-021-04022-2.
- Narisetty, Vivek, Rylan Cox, Rajesh Bommarreddy, Deepti Agrawal, Ejaz Ahmad, Kamal Kumar Pant, Anuj Kumar Chandel, et al. 2022. « Valorisation of Xylose to Renewable Fuels and Chemicals, an Essential Step in Augmenting the Commercial Viability of Lignocellulosic Biorefineries ». *Sustainable Energy & Fuels* 6(1): 29-65. doi:10.1039/D1SE00927C.
- Navarre, Roy, et Mark J. Pavek. 2014. *The Potato: Botany, Production and Uses*. CABI.
- Nishio, Naomichi, et Shiro Nagai. 1981. « Single Cell Protein Production from Mandarin Orange Peel ». *European journal of applied microbiology and biotechnology* 11(3): 156-60. doi:10.1007/BF00511254.

- Nobre, Clarisse, Miguel Ângelo Cerqueira, Lígia Raquel Rodrigues, António Augusto Vicente, et José António Teixeira. 2015. « Chapter 19 - Production and Extraction of Polysaccharides and Oligosaccharides and Their Use as New Food Additives ». In *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*, éd. Ashok Pandey, Rainer Höfer, Mohammad Taherzadeh, K. Madhavan Nampoothiri, et Christian Larroche. Amsterdam: Elsevier, 653-79. doi:10.1016/B978-0-444-63453-5.00021-5.
- Nouroozi, Rouhollah Valipour, Mouloud Valipour Noroozi, et Masoumeh Ahmadizadeh. 2015. « Determination of Protein Concentration Using Bradford Microplate Protein Quantification Assay ». *Disease and Diagnosis* 4(1): 11-17.
- Oke, Mushafau Adebayo, Mohamad Suffian Mohamad Annuar, et Khanom Simarani. 2017. « Mixed Lignocellulosic Biomass Degradation and Utilization for Bacterial Cellulase Production ». *Waste and Biomass Valorization* 8(3): 893-903. doi:10.1007/s12649-016-9595-0.
- Patel, Seema, et Arun Goyal. 2011. « Functional Oligosaccharides: Production, Properties and Applications ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(5): 1119-28. doi:10.1007/s11274-010-0558-5.
- Pinheiro, Vanessa Elisa, Iona Sárvári Horváth, Magnus Lundin, et Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli. 2021. « Screening and Cocktail Optimization Using Experimental Mixture Design: Enzymatic Saccharification as a Biological Pretreatment Strategy ». *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 15(5): 1447-60. doi:10.1002/bbb.2251.
- Porras-Domínguez, Jaime R., Ángela Ávila-Fernández, María Elena. Rodríguez-Alegría, Alfonso Miranda-Molina, Adelfo Escalante, Rina González-Cervantes, Clarita Olvera, et Agustín López Munguía. 2014. « Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase ». *Process Biochemistry* 49(5): 783-90. doi:10.1016/j.procbio.2014.02.005.
- Puspaningrum, Dylla Hanggaeni Dyah, et Cornelius Sri Murdo Yuwono. 2019. « POTENTIAL TABAH BAMBOO SHOOTS FLOUR (GIGANTOCHLOA NIGROCILIATA BUSE-KURZ) IN STIMULATE LACTIC ACID BACTERIA GROWTH ». *International Journal of Applied Science and Sustainable Development (IJASSD)* 1(2). <https://e-journal.unmas.ac.id/index.php/IJASSD/article/view/509> (9 mai 2024).
- Rahman, M. Shafiqur, Sheran Fernando, Brian Ross, Jiangning Wu, et Wensheng Qin. 2018. « Endoglucanase (EG) Activity Assays ». In *Cellulases, Methods in Molecular Biology*, éd. Mette Lübeck. New York, NY: Springer New York, 169-83. doi:10.1007/978-1-4939-7877-9_13.
- Reginaldo, Sidney Guerra. 2007. « O povo: fundamentos do estado democrático de direito ».
- Ryden, Peter, et Robert R. Selvendran. 1990. « Structural features of cell-wall polysaccharides of potato (*Solanum tuberosum*) ». *Carbohydrate Research* 195(2): 257-72. doi:10.1016/0008-6215(90)84170-Y.
- Sadhu, Sangrila, Pradipta Saha, Sukanta K. Sen, Shanmugam Mayilraj, et Tushar Kanti Maiti. 2013. « Production, Purification and Characterization of a Novel Thermotolerant Endoglucanase (CMCase) from Bacillus Strain Isolated from Cow Dung ». *SpringerPlus* 2(1): 10. doi:10.1186/2193-1801-2-10.

- Saini, Reetu, Anil Kumar Patel, Jitendra Kumar Saini, Chiu-Wen Chen, Sunita Varjani, Reeta Rani Singhania, et Cheng Di Dong. 2022. « Recent advancements in prebiotic oligomers synthesis via enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass ». *Bioengineered* 13(2): 2139-72. doi:10.1080/21655979.2021.2023801.
- Singh, Anita, Somvir Bajar, Arti Devi, et Deepak Pant. 2021. « An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications ». *Bioresource Technology Reports* 14: 100652. doi:10.1016/j.biteb.2021.100652.
- Singhvi, Mamata S., et Digambar V. Gokhale. 2019. « Lignocellulosic Biomass: Hurdles and Challenges in Its Valorization ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(23): 9305-20. doi:10.1007/s00253-019-10212-7.
- Song, Letian. 2011. « Study and Engineering of a GH11 endo-beta-xylanase, a biomass-degrading hemicellulase ». These de doctorat. Toulouse, INSA. <https://theses.fr/2011ISAT0039> (20 mai 2024).
- Srivastava, Neha, Rishabh Rathour, Sonam Jha, Karan Pandey, Manish Srivastava, Vijay Kumar Thakur, Rakesh Singh Sengar, et al. 2019. « Microbial Beta Glucosidase Enzymes: Recent Advances in Biomass Conversion for Biofuels Application ». *Biomolecules* 9(6): 220. doi:10.3390/biom9060220.
- Szymańska-Chargot, Monika, Monika Chylińska, Karolina Gdula, Arkadiusz Koziół, et Artur Zdunek. 2017. « Isolation and Characterization of Cellulose from Different Fruit and Vegetable Pomaces ». *Polymers* 9(10): 495. doi:10.3390/polym9100495.
- Tandon, Ghanshyam. 2014. « Bioproducts from residual lignocellulosic biomass ». In , 52-75.
- Tawakalt Ayodele, Kudirat Alarape, et Ibrahim Adebayo Bello. 2024. « Microbial Protein Production using Lignocellulosic Biomass and Nitrogen Fixation ».
- Tunio, Azhar Ali, Muhammad Naqvi, Abdul Sattar Qureshi, Imrana Khushk, Abdul Nabi Jatt, Abdul-Sattar Nizami, Habib Ahmed Naqvi, et al. 2024. « Multi enzyme production from mixed untreated agricultural residues applied in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass for biofuel ». *Process Safety and Environmental Protection* 186: 540-51. doi:10.1016/j.psep.2024.04.039.
- Tunio, Azhar Ali, Abdul Sattar Qureshi, Imrana Khushk, Abdul Nabi Jatt, Yusuf Chisti, Muhammad Naqvi, Habib Ahmed Naqvi, et al. 2024. « Ionic-liquid-tolerant enzymes from an adapted *Bacillus paralicheniformis* for one-pot conversion of lignocellulosic substrates to ethanol ». *Industrial Crops and Products* 209: 117988. doi:10.1016/j.indcrop.2023.117988.
- Van Dyk, J. S., et B. I. Pletschke. 2012. « A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy ». *Biotechnology Advances* 30(6): 1458-80. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.03.002.
- Vanderghem, Caroline, Pascal Boquel, Christophe Blecker, et Michel Paquot. 2010. « A Multistage Process to Enhance Cellobiose Production from Cellulosic Materials ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160(8): 2300-2307. doi:10.1007/s12010-009-8724-7.

- Velleste, Riin, Hele Teugjas, et Priit Väljamäe. 2010. « Reducing End-Specific Fluorescence Labeled Celluloses for Cellulase Mode of Action ». *Cellulose* 17(1): 125-38. doi:10.1007/s10570-009-9356-3.
- Watanabe, H., et G. Tokuda. 2001. « Animal Cellulases ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58(9): 1167-78. doi:10.1007/PL00000931.
- Wood, Peter J., James D. Erfle, et Ronald M. Teather. 1988. « Use of complex formation between Congo Red and polysaccharides in detection and assay of polysaccharide hydrolases ». In *Methods in Enzymology, Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose*, Academic Press, 59-74. doi:10.1016/0076-6879(88)60107-8.
- Xu, Ting, Tianhui Zhu, et Shujiang Li. 2016. « β -1,3-1,4-Glucanase Gene from *Bacillus Velezensis* ZJ20 Exerts Antifungal Effect on Plant Pathogenic Fungi ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(2): 26. doi:10.1007/s11274-015-1985-0.
- Yadav, Vinita, Pramod K. Yadav, Sarita Yadav, et K. D. S. Yadav. 2010. « α -L-Rhamnosidase: A review ». *Process Biochemistry* 45(8): 1226-35. doi:10.1016/j.procbio.2010.05.025.
- Yin, Ling, et Wang. 2022. « *Halomonas salinarum* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil in Yingkou, China | Archives of Microbiology ». <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-022-03032-3> (8 mars 2024).
- Yousuf, Abu, Domenico Pirozzi, et Filomena Sannino. 2020. « Chapter 1 - Fundamentals of lignocellulosic biomass ». In *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*, éd. Abu Yousuf, Domenico Pirozzi, et Filomena Sannino. Academic Press, 1-15. doi:10.1016/B978-0-12-815936-1.00001-0.
- Zhang, Xiao-Zhou, et Yi-Heng Percival Zhang. 2013. « Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications ». In *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, éd. Shang-Tian Yang, Hesham A El-Enshasy, et Nuttha Thongchul. Wiley, 131-46. doi:10.1002/9781118642047.ch8.
- Zhou, Shuzhen, Miaomiao Zhang, Linying Zhu, Xiaoling Zhao, Junying Chen, Wei Chen, et Chun Chang. 2023. « Hydrolysis of lignocellulose to succinic acid: a review of treatment methods and succinic acid applications ». *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 16(1): 1. doi:10.1186/s13068-022-02244-5.
- Zhou, X., L. J. Broadbelt, et R. Vinu. 2016. « Chapter Two - Mechanistic Understanding of Thermochemical Conversion of Polymers and Lignocellulosic Biomass ». In *Advances in Chemical Engineering, Thermochemical Process Engineering*, éd. Kevin M. Van Geem. Academic Press, 95-198. doi:10.1016/bs.ache.2016.09.002.
- Zhou, Xiaowei, Wenjun Li, Ross Mabon, et Linda J. Broadbelt. 2017. « A Critical Review on Hemicellulose Pyrolysis ». *Energy Technology* 5(1): 52-79. doi:10.1002/ente.201600327.
- Zhu, Xianqing, Man Liu, Qintao Sun, Jingjing Ma, Ao Xia, Yun Huang, Xun Zhu, et Qiang Liao. 2022. « Elucidation of the interaction effects of cellulose, hemicellulose and lignin during degradative solvent extraction of lignocellulosic biomass ». *Fuel* 327: 125141. doi:10.1016/j.fuel.2022.125141.

Références bibliographiques

Anonyme 1 : <http://www.cazy.org/>

Anonyme 2 : <https://www.algerie-eco.com>

Anonyme 3 : <https://www.aps.dz> (Algérie Presse Service)

ANNENES

Annexes

Annexe 1

Gélose YPG	
Composition	Quantité
L'extrait de levure	10 g
Peptone	10 g
Glucose	10 g
Agar (pour milieu solide)	15-20 g
pH 7.0	

Annexe 2

Eau physiologique	
Composition	Quantité
NaCl	9 g
Eau distillée	1L

Annexe 3

CMC (carboxyméthylcellulose)/Xylane de maïs	
Composition	Quantité
CMC ou Xylane de maïs	10 g
NaNO ₃	1,2 g
KH ₂ PO ₄	3 g
K ₂ HPO ₄	6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂	0,05 g
Mn SO ₄ .7H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,001 g
Agar	20 g
pH	7

Annexe 4

NaCL 1M	
Composition	Quantité
NaCL	38 g
Eau distillée	1 L

Annexe 5

DNS 100 mL	
Composition	Quantité
l'acide 3,5-dinitrosalicylique	1 g
NaOH 2M	20 mL
Tartrate de sodium	30g
Eau distillée	80 mL

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : GUERRAS Maroua
HAFIANI Nihal

Etude de la saccharification enzymatique de la biomasse lignocellulosique par des cocktails (hémi-)cellulolytiques de *Bacillus velezensis* H1

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master professionnel en Biothéchnologie et biothérapie

Face aux coûts de production élevés des enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques à partir de substrats commerciaux, de nombreuses études visent à améliorer la production de ces enzymes par des microorganismes capables de les sécréter en grande quantité en utilisant comme substrat les déchets agricoles. Ces enzymes de type glycoside hydrolases ont le potentiel de saccharifier la biomasse lignocellulosique et la transformer en sucres simples fermentescibles, ce qui leur confère un grand potentiel biotechnologique dans plusieurs domaines. Le potentiel (hémi-)cellulolytiques de la souche de *B. velezensis* H1 a été initialement évalué sur un milieu gélosé contenant la carboxyméthyl-cellulose (CMC) et le xylane de maïs comme seules sources de carbone. L'apparition d'un halo clair autour de la colonie après 5 jours d'incubation à 30 °C, a indiqué la présence d'activités CMCCase et xylanase. La culture liquide de la souche sur ces mêmes substrats a montré une production maximale de protéines de 5.3 mg/mL sur le xylane de maïs après 48 h d'incubation à 30 °C. Pendant ce processus des activités xylanase, CMCCase, endo- β -1,4-glucanase et β -mannanase ont atteints respectivement 12 U/min/mL ; 24 U/min/mL ; 20 U/min/mL et 11 U/min/mL. L'hydrolyse de la matière lignocellulosique par ces enzymes a été étudiée en fermentation submergée, en utilisant 5% d'épluchures de pomme de terre (PDT) et d'orange (ORG), et des résidus de tomate (TMT) comme seules sources de carbone. Le suivi de la production de protéines totales a montré une production maximale après 72 h d'incubation avec des valeurs allant de 4.3 à 5.6 mg/mL. Les extraits enzymatiques ont révélé diverses activités (hémi-)cellulolytiques, telles que l'activité cellulase par la présence de CMCCase et d'endo- β -1,4-glucanase avec des activités maximales de 28 U/min/mL et 24 U/min/mL respectivement, ainsi que des activités hémicellulases comme la xylanase et la β -mannanase avec des activités enzymatiques de 14 U/min/mL et 20 U/min/mL respectivement. Une saccharification de TMT ORG, et de PDT non traités a été effectuée en utilisant l'extrait enzymatique obtenu. Les résultats ont révélé la libération de divers oligosaccharides provenant de la dégradation de la cellulose et l'hémicellulose des substrats utilisés avec des concentrations totales en sucres réducteurs allant de 4.4 à 11.6 mg/mL. L'identification de ces sucres à travers une chromatographie sur couche mince de silice a montré la présence de plusieurs oligosaccharides tels que le glucose, cellobiose, cellotriose, cellopentaose, rhamnose, xylose, fructose, indiquant la présence d'autres activités enzymatiques telles que β -fructosidase, α -l-rhamnosidase et β -glucosidase. Ces résultats indiquent le grand potentiel de la souche à dépolariser et saccharifier la fraction complexe hémicellulosique afin de produire des sucres fermentescibles à haute valeur ajoutée.

Mots-cles: Cellulase, Hémicellulase, Biomasse lignocellulosique, *B. velezensis* H1, Saccharification, Oligosaccharides

Laboratoires de recherche: Laboratoires pédagogiques de la faculté de sciences de la nature et de la vie et le laboratoire de mycologie de biotechnologie et de l'activité microbienne. (U Constantine 1 Frères Mentouri).

Président du jury: Mme. BENCHIHEUB Meriem (MCB- UConstantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant: Mlle. DJELID Hadjer (MAB- U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examineur(s) : Mme. MADI Aicha (MCA- UConstantine 1 Frères Mentouri).