

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية.

République algérienne démocratique et populaire.

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي.

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique.



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
Constantine 1 - Frères Mentouri University
Université Frères Mentouri - Constantine 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Microbiologie

قسم المكر وبيولوجيا

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

Domaine : Science de la nature et de la vie.

N° d'ordre : **Filière :** Sciences biologiques.

N° de série : **Spécialité :** Microbiologie appliquée

Intitulé :

Optimisation d'enzymes produites par *Penicillium sp.*

Présenté par :

BEKKOUCHE Zouina Nourhene.

LASSAKEUR Yassmine

SLIMANI Manar

Jury d'évaluation:

Président : LEGHLIMI Hind (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : BOUCHERIT Zeyneb (MAA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examineur : BENHAMDI Asma (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire 2023/2024

Remerciements

On exprime nos remerciements et notre profonde gratitude avant tout à Dieu, qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de biologie et environnement, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des frères MENTOURI Constantine1.

Nos premiers remerciements à notre encadreur Madame BOUCHERIT zeyeneb, pour sa guidance, ses conseils éclairés et sa patience tout au long de ce projet. Son expertise et son dévouement ont été essentiels pour la réalisation de ce travail. Son encouragement et son soutien nous ont permis de surmonter les défis et de progresser à chaque étape. Merci pour votre temps, votre énergie et vos précieux conseils qui ont grandement contribué à la qualité de ce travail.

On tient aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect à Madame LEGHLIMI Hind pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'être présidente de Jury et à Madame BENHAMDI Asma de nous avoir honoré en tant qu'examinatrice.

On adresse un remerciement particulier à tout le personnel du laboratoire pour leur accueil et leur soutien.

Enfin, un remerciement est adressé à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Votre aide et votre soutien ont été précieux et indispensables.

Merci à tous

Dédicaces

Révérance et gratitude soient rendues à dieu tout puissant pour m'avoir conféré la force et la volonté d'accomplir ce travail. Tout ce que j'ai atteint jusqu'à ce jour vient de dieu et je lui en suis profondément

À mes parents, Pour leur soutien infaillible, leur amour et leurs encouragements constants.

Maman, Papa, votre foi en moi a été ma plus grande source de motivation.

A mon cher papa, ce mémoire est le fruit de plusieurs années de travail et de persévérance, mais il n'aurait jamais vu le jour sans votre soutien indéfectible et votre amour inconditionnel. De tout cœur, merci pour vos encouragements, votre patience et vos sages conseils qui m'ont guidé tout au long de ce parcours. Votre force et votre dévouement m'ont constamment inspiré à donner le meilleur de moi-même. À vous, qui avez toujours cru en moi, je dédie ce travail avec une immense gratitude et une profonde admiration.

A yasmine et Manar, Pour leur soutien moral, leur compréhension et leurs encouragements durant les moments difficiles. Votre amitié et votre camaraderie ont été une source constante de motivation et de réconfort. Les moments de partage, de rires et de défis communs ont rendu ce parcours bien plus enrichissant. Votre aide précieuse, tant sur le plan personnel que professionnel, m'a permis de rester concentré et de persévérer. Je suis immensément reconnaissante pour votre présence à mes côtés tout au long de ce voyage.

À mon encadrant Madame BOUCHRIT Zeyneb, Pour sa guidance, ses conseils éclairés et sa patience tout au long de ce projet. Votre expertise et votre dévouement ont été essentiels pour la réalisation de ce travail. Votre encouragement et votre soutien constant m'ont permis de surmonter les défis et de progresser à chaque étape. Vous avez su m'orienter avec bienveillance et rigueur, Votre implication personnelle dans mon mémoire a été d'une grande valeur et je vous en suis profondément reconnaissante. Merci pour votre temps, votre énergie et vos précieux conseils qui ont grandement contribué à la qualité de ce travail.

À tous mes enseignants,

Pour leur dévouement à l'enseignement, leur sagesse et leur soutien tout au long de mon parcours académique. Chacun de vous a contribué à ma formation et à mon développement personnel.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont cru en moi et m'ont soutenu tout au long de ce parcours. Vous avez tous contribué à ce succès d'une manière ou d'une autre, et je vous en suis profondément reconnaissant.

Nourhene

Dédicaces

Avant tous les mots, louange et remerciement soient à Dieu Tout-Puissant, le nombre de lettres et le nombre de mots, je ne serais pas arrivé là où je suis maintenant sans le succès et l'amour de Dieu pour moi. Par conséquent, tout ce que j'ai. Atteint jusqu'à ce que ma fin vienne de Dieu et envers Dieu.

À ma famille, ma source de force et de motivation tout au long de ce voyage académique.

Ma mère qui m'a allaité, l'amour et le soutien qui n'ont pas diminué jusqu'à ce moment, et à mon père qui m'a appris le sens de la persévérance, de la détermination et de la volonté, et au don de Dieu pour moi, ma sœur Makarim, et au morceau de mon âme, mes frères Chahine, Fahd, Kamil, Sadjed, et Taha je vous offre ma joie de mener à bien ce projet, que je considère comme le début et non la fin du parcours.

À mes chéries yasmine et nourhene l'exemple de l'amitié et la certitude, Mon compagnon et âme sœur Rania, à mes papillons darine et selma et l'inoubliable ilhem et à ma source de support Nour pour leur compréhension, leurs encouragements constants et les moments de légèreté partagés, qui m'ont permis de garder un équilibre essentiel.

A ma chère encadrante Mme BOUCHRIT Zeyneb qu'elle m'a donnée le soutien de l'amie et la sœur avant l'enseignante et mes professeurs et mentors, pour leur sagesse, leurs conseils précieux et leur inspiration continue, qui ont façonné mon parcours et nourri ma passion pour la recherche.

Enfin, à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Que ce mémoire soit le reflet de votre influence positive et de votre soutien inestimable.

*Avec toute ma gratitude et mon affection,
Manar.*

Dédicaces

*Avant tout, je remercie mon Dieu pour Sa guidance, Sa protection et Ses bénédictions infinies.
Sans Sa grâce, ce travail n'aurait pas été possible.*

À ma chère mère, pour son amour inépuisable, ses sacrifices constants, et son soutien indéfectible. Tu as toujours cru en moi, même dans les moments les plus difficiles, et ton encouragement m'a porté tout au long de ce parcours.

À mon père, pour sa force et son dévouement. Ton soutien constant et tes encouragements ont été des piliers essentiels dans la réalisation de ce projet. Ta capacité à surmonter les défis avec courage m'a toujours inspiré à donner le meilleur de moi-même.

À mes copines Nourhene, Manar et Bouchra, pour leur amitié fidèle, leurs encouragements et leur soutien moral qui m'ont aidé à surmonter les défis rencontrés. Vos mots réconfortants et votre présence constante ont été inestimables.

À mon frère Ahmed, pour son soutien et son écoute, et à mes sœurs Wafa et Nouzha, pour leur bienveillance et leurs conseils. Vous avez tous été des piliers sur lesquels j'ai pu m'appuyer.

À mes nièces Asma et Ilham, dont la joie de vivre et l'innocence m'ont inspiré à persévérer et à rester positif. Vos sourires et vos rires ont apporté de la lumière dans les moments d'incertitude.

À mon encadrante Mme BOUCHRIT Zeyneb, pour ses conseils avisés, sa patience infinie et son soutien tout au long de ce projet. Votre expertise et votre dévouement ont été essentiels à la réalisation de ce travail.

Enfin, à mes cousines Dalila, Marwa, Yousra et Aicha pour leur complicité, leur soutien et leurs encouragements constants. Vos mots d'encouragement et votre présence ont été d'un grand réconfort.

Merci à vous tous, du fond du cœur, pour votre amour, votre soutien et vos encouragements. Ce travail est autant le vôtre que le mien.

YASMINE

Liste des abréviations

- AA : Auxotrophe Aminé
- CAZy : Carbohydre Active enZymes
- CO₂ : Dioxyde de Carbone
- EC : Enzyme Commission
- FMS : Fermentation en Milieu Solide
- FS : Fermentation Submergée
- GH : Glycoside Hydrolases
- H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène
- LiP :LigninePeroxydase
- MEB : Malt Extract Broth
- MnP : Manganèse Peroxydase
- PAL : Pectatylases
- PDB : Pomme de Terre Dextrose Broth
- PE : Pectinesterase
- PG : Polygalacturonases
- PL : Pectine Lyases
- SmF : Fermentation en Milieu Submergé
- SSF : Solid-State Fermentation
- UI : Unité Internationale

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la lignocellulose.....	4
Figure 2 : Structure de la cellulose.....	5
Figure 3 : Structure de l'hémicellulose.....	6
Figure 4 : Structure de la lignine	8
Figure5 : Mécanisme d'action de la cellulase	10
Figure 6 : Mécanisme d'action de l'hémicellulase.....	12
Figure 7 : Dégradation de la lignine par les différents types de Ligninase	14
Figure 8 : Mecanisme d'action des Pectinases, (a)Polyméthylgalacturonase, (b) Pectinestérase, (c) Pectinlyase et polygalacturonatelyase.....	16
Figure 9 : Tube contenant les différentes sources d'azote.....	30
Figure 10 : Tubes contenant les différentes sources minérales.....	30
Figure 11 : Expériences de confirmation (a : la souche Penicillium sp ; b : Fermentation solide sur grignons d'olives ; c : Broyage à l'aide de l'ultraturax).....	31
Figure 12 : Méthode analytique : (a : Tubes des courbes d'étalonnage (b : Incubation dans le bain marie ; C : Absorbance à 540nm.....	32
Figure 13 : L'effet de la concentration de Tween 80 sur la production des cellulases.....	34
Figure 14 : L'effet des sources de carbone sur la production des cellulases.....	35
Figure 15 : L'effet des sources d'Azote sur la production cellulases.....	35
Figure 16 : L'effet des ions métalliques sur la production cellulases.....	36
Figure 17 : L'effet de l'humidité sur la production cellulases.....	37
Figure18 : L'effet du temps d'incubation sur la production des cellulases.....	37
Figure 19: L'effet de l'inoculum sur la production de cellulases.....	38

Figure 20 : Comparaison de la production Cellulases sous les conditions optimisée et non optimisée.....	39
Figure21 : L'effet de la concentration de Tween 80 sur la production des xylanases.....	40
Figure22 : L'effet des sources de carbone sur la production des xylanases.....	40
Figure23 : L'effet des sources d'Azote sur la production des xylanases.....	41
Figure24 : L'effet des ions métalliques sur l'activité xylanase.....	42
Figure25 : L'effet de l'humidité sur la production des xylanases.....	42
Figure 26: Courbe de l'activité des xylanases en fonction du temps.....	43
Figure 27 : L'effet de l'inoculum sur la production des cellulases.....	44
Figure28 : Production des xylanases sur milieux optimisé et non optimisé.....	44
Figure29 : L'effet de la concentration de la concentration de tween 80 sur la production des pectinase.....	45
Figure 30 : L'effet des sources de carbone sur la production des pectinases.....	46
Figure31 : L'effet des sources d'Azote sur la production pectinases.....	46
Figure 32: L'effet des ions métalliques sur la production pectinase.....	47
Figure 33 : L'effet de l'humidité sur la production des pectinase.....	48
Figure 34: L'effet du temps d'incubation sur la production des pectinase.....	48
Figure 35: L'effet de l'inoculum sur la production des pectinase.....	49
Figure 36 : Comparaison de la production pectinases sous les conditions optimisée et non optimisée.....	50
Figure 37 :Courbe d'étalonnage du dosage du Glucose.....	68
Figure 38 :Courbe d'étalonnage du dosage du Xylose.....	69
Figure 39 :Courbe d'étalonnage du dosage d'acide galacturonique.....	69

Table des matières

• Introduction	1
I. Revue bibliographique.....	4
1. la Lignocellulose.....	4
1.1. Définition	4
1.2.1. La cellulose	4
1.2.2. Hémicellulose	5
1.2.3. La lignine	6
2. Dégradation enzymatique de la Lignocellulose.....	8
2.1. Cellulases	8
2.1.1. Définition	8
2.1.2. Classification.....	8
2.1.3. Mécanismes d'action.....	9
2.2. Hémicellulases	10
2.2.1. Définition	10
2.2.2. Classification.....	11
2.2.3. Mécanismes d'action	12
2.3. Ligninases.....	12
2.3.1. Définition	12
2.3.2. Classification.....	13
2.3.3. Mécanismes d'action	13
2.4. Les pectinases.....	14
2.4.1. Définition	14
2.4.2. Classification.....	15

2.4.3.	Mecanisme d'action	15
3.	Importance écologiques des enzymes fongique lignocellulolitiques	16
3.1.	Décomposition de la matière végétale	16
3.2.	Cycle du carbone	17
3.3.	Symbiose avec les plantes	17
4.	Importances biotechnologiques des enzymes lignocellullytiques	17
4.1.	Production de biocarburants	17
4.2.	Industrie du papier et de la pâte	18
4.3.	Traitement des déchets	18
4.4.	Production d'aliments et de boissons	18
5.	Origines microbiennes des enzymes lignocellullytiques	18
5.1.	Bactéries	18
5.2.	Actinomycètes	19
5.3.	Levures	19
5.4.	Moisissures	19
6.	Production des enzymes lignocellulosiques fongiques	21
6.1.	Les différents milieux de culture et de production	21
6.1.1.	Milieux de Culture Synthétiques	21
6.1.2.	Milieux de Culture Complexes	21
6.1.3.	Milieux à Base de Sous-produits Agricoles	22
6.2.	Les différents modes de fermentation	23
6.2.1.	Fermentation en Milieu Solide (FMS)	23
6.2.2.	Fermentation Submergée (FS)	23
6.2.3.	Fermentation en Surface	23
6.3.	Mécanismes d'induction de la production d'enzymes	23

6.3.1.	Induction par l'espèce fongique.....	24
6.3.2.	Induction par substrat.....	24
6.3.3.	Induction par régulation transcriptionnelle.....	24
6.4.	Optimisation de la production.....	24
6.4.1.	Optimisation des Conditions de Culture.....	24
6.4.2.	Génie Génétique pour l'Amélioration des Souches.....	25
6.4.3.	Utilisation de Systèmes d'Expression Hétérologue.....	25
6.4.4.	Screening et Évolution Dirigée.....	26
	II. Matériel et méthodes.....	28
1.	Optimisation de la production enzymatique.....	29
1.1.	Étude de la cinétique.....	29
1.2.	Effet de l'humidité.....	29
1.3.	Effet de la quantité d'inoculum de <i>Penicillium</i> sp.....	29
1.4.	Impact de la concentration de Tween 80.....	29
1.5.	Effet des sources de Carbone.....	29
1.6.	Influence des Sources d'Azote.....	29
1.7.	Effet des ions métalliques.....	30
2.	Expérience de confirmation.....	30
3.	Méthodes analytiques.....	31
3.1.	Mesure de l'activité cellulolytique.....	31
3.2.	Mise en évidence de l'activité xylanolytique.....	32
3.3.	Mise en évidence de l'activité pectinolytique.....	32
	III. Résultats et discussion.....	33
1.	Optimisation de la production des cellulases.....	34

1.1. Effet de la concentration du Tween80.....	34
1.2. Effet des sources de carbone.....	34
1.3. Effet des sourcesd'Azote.....	35
1.4. Effet des ions métalliques.....	36
1.5. Effet de l'humidité.....	36
1.6. Effet du temps d'incubation.....	37
1.7. Effet de l'inoculum.....	38
2. Production de cellulases sur milieu optimisé.....	38
3. Optimisation de la production des xylanases.....	39
3.1. Effet de la concentration du Tween80.....	39
3.2. Effet des sources de Carbone.....	40
3.3. Effet des sourcesd'Azote.....	41
3.4. Effet des ions métalliques.....	41
3.5. Effet de l'humidité.....	42
3.6. Effet du temps d'incubation.....	43
3.7. Effet de l'inoculum.....	43
4. Production de xylanases sur milieu optimisé.....	44
5. Optimisation de la production des pectinases.....	44
5.1. Effet de Tween.....	45
5.2. Effet de source de carbone.....	45
5.3. Effet des Sources d'azote.....	46
5.4. Effet des ions métalliques.....	47
5.5. Effet de l'humidité.....	47

5.6.	Effet de temps d'incubation.....	48
5.7.	Effets de l'inoculm.....	49
6.	Production de pectinase sur milieu optimisé.....	49
	IV. Conclusion.....	50
	V. References bibliographiques.....	52

Introduction

Introduction

La lignocellulose, tissée de cellulose, hémicellulose, et lignine, présente une architecture complexe qui défie la dégradation par des moyens conventionnels. Sa robustesse, tout en étant vitale pour la survie des plantes, représente un obstacle considérable pour sa conversion en bioproduits (**Jones *et al.*,2017**).

Néanmoins, la nature, dans sa sagesse infinie, a façonné des mécanismes enzymatiques spécialisés pour naviguer cette complexité. Les enzymes fongiques lignocellulolytiques, avec leur arsenal de cellulases, hémicellulases, et lignases, orchestrent la décomposition de la cellulose et de l'hémicellulose. (**Brown*et al.*,2018**).

L'importance écologique des enzymes lignocellulosiques réside dans leur capacité à dégrader la matière végétale morte, contribuant ainsi au recyclage des éléments nutritifs dans les écosystèmes terrestres et aquatiques (**Smith *et al.*,2019**). Sur le plan biotechnologique, les enzymes lignocellulosiques présentent un intérêt majeur dans des domaines tels que la production de biocarburants, la bioconversion de la biomasse en produits chimiques et la fabrication de produits alimentaires et pharmaceutiques. (**Smith *et al.*,2019**).

Les origines microbiennes des enzymes lignocellulosiques sont variées, avec de nombreux champignons et bactéries capables de produire ces enzymes..... (Brown, C et al. 2017). Parmi ces micro-organismes, les moisissures, tel que le genre *Penicillium*, sont étudiées pour leur capacité à produire des enzymes lignocellulosiques efficaces. (**Smith *et al.*,2018**).

La production des enzymes lignocellulosiques fongiques est un domaine de recherche en plein essor, avec des efforts visant à optimiser les conditions de culture pour maximiser la production enzymatique (**Doe *et al.*,2019**).

Dans ce contexte, notre étude se concentre sur l'optimisation de la production des enzymes lignocellulosiques de *Penicillium sp*, en mettant particulièrement l'accent sur les cellulases, pectinases et xylanases. Pour cela, notre manuscrit contient les parties suivantes :

- **Synthèse bibliographique** : Concepts généraux sur les enzymes lignocellulolytiques, leurs mécanismes d'action, importance écologique et biotechnologique, ainsi que les méthodes de production et d'optimisation.
- **Matériel et méthodes** : Description des protocoles utilisés pour optimiser la production enzymatique, les dosages enzymatiques, et les expériences de confirmation.

- **Résultats et discussions** : Présentation et analyse des résultats obtenus pour chaque condition testée, comparaison avec les données de la littérature.
- **Conclusion et perspectives** : Synthèse des résultats de l'étude et propositions pour des recherches futures.

Synthèse bibliographique

1. La Lignocellulose

1.1 Définition

La lignocellulose constitue la charpente des plantes terrestres, formée par l'assemblage de polymères : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Ces composants interconnectés confèrent aux plantes leur structure et leur résistance (Figure 1)(Fengel et Wegener.,1989).

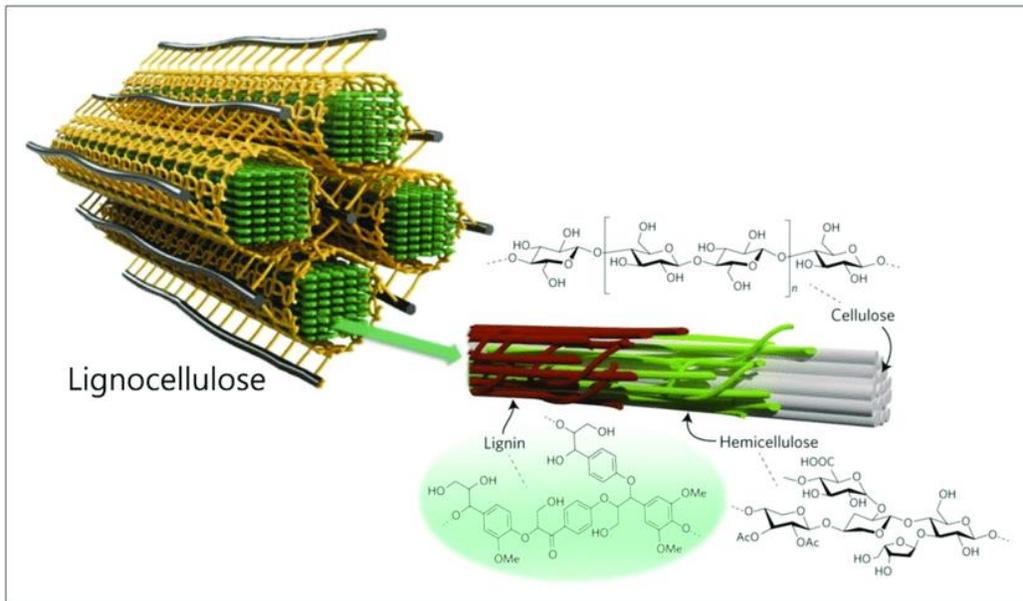


Figure 1 : Structure de la lignocellulose (Han Young *et al.*,2022)

1.2 Composition

1.2.1 La cellulose

La cellulose, le principal composant de la lignocellulose, est un polysaccharide constitué de d'une chaîne linéaire de plusieurs centaines à des milliers d'unités de D-glucose liées par des liaisons glycosidiques β (1 \rightarrow 4). La structure de la cellulose, intensivement étudiée, est formée par des liaisons hydrogène entre les réseaux de groupes hydroxyles. Les hydroxyles des celluloses β -1,4-glucane se trouvent aux positions C2, C3 et C6. Les structures cristallines de la cellulose peuvent avoir une cellule unitaire monoclinique, composée de deux chaînes de cellulose en orientation parallèle (Figure 2).

Grâce à sa structure cristalline et sa capacité à former des fibres fortes, la cellulose confère rigidité et résistance à la structure des plantes.(Klemm *et al.*,2005).

C'est un élément structural important des parois cellulaires primaires des plantes vertes, de nombreuses formes d'algues et des oomycètes. Outre les plantes, certaines bactéries, en particulier celles appartenant au genre *Gluconacetobacter*, produisent également de la cellulose, avec des propriétés mécaniques et structurelles exploitables dans de nombreuses applications. La cellulose bactérienne présente des propriétés physico-chimiques uniques par rapport à la cellulose végétale.

La cellulose est le polymère organique le plus abondant sur Terre, représentant environ 90 % du coton, 40 à 50 % du bois, et environ 57 % du chanvre séché. Elle est principalement utilisée pour produire du carton et du papier, avec des quantités plus petites converties en divers produits dérivés comme la cellophane et le rayon. La cellulose pour usage industriel est principalement obtenue à partir de pâte de bois et de coton(Eugenio et Rodríguez,2019).

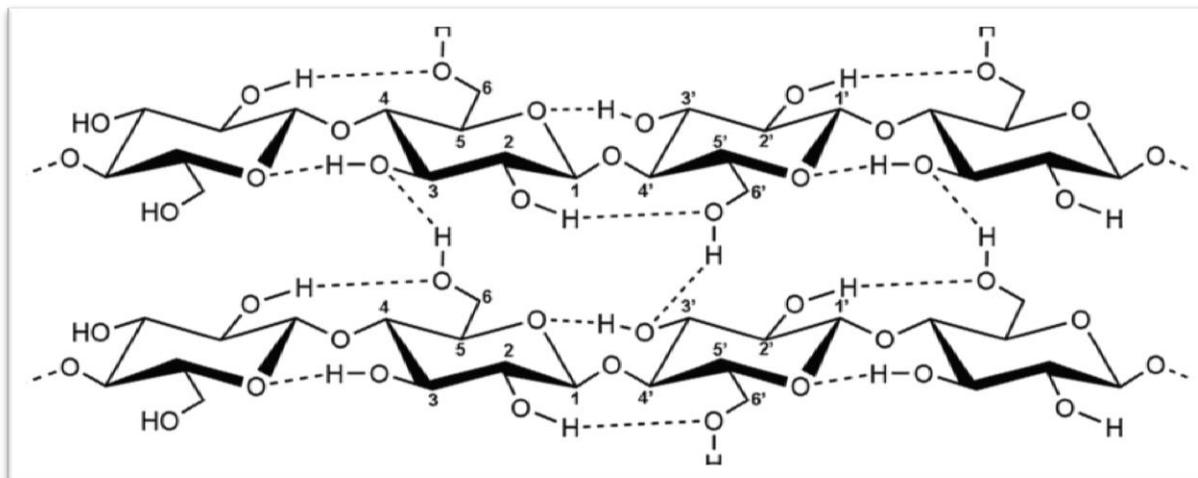


Figure 2 : Structure primaire de la cellulose et liaisons hydrogènes entre les chaînes de cellulose. Une liaison hydrogène entre les hydroxyles C6 et C3 par résidu de glucose est formée entre les chaînes parallèles (Ek 2009).

1.2.2 Hémicellulose

L'hémicellulose est un hétéropolysaccharide, constitutif de la paroi cellulaire végétale et une composante importante du bois(Snehasish *et al.*,2022).Elle est moins cristalline et plus facilement hydrolysable que la cellulose, ce qui la rend plus accessible aux enzymes lors de la

décomposition (**Jun Rao et al.,2023**). Elle sert de lien entre les fibres de cellulose et d'autres composés matriciels dans la paroi cellulaire. L'hémicellulose représente environ 30 à 45 % de la biomasse végétale terrestre, ce qui en fait la deuxième famille de composés par ordre d'abondance dans les plantes.

Contrairement à la cellulose, l'hémicellulose est un polymère branché comprenant divers types de sucres tels que l'xylose, le mannose, le galactose, le rhamnose et l'arabinose. Les principales classes d'hémicelluloses incluent le xylane, le glucuronoxylane, l'arabinoxylane, le glucomannane et le xyloglucane. Environ 50 % des hémicelluloses contiennent des acides uroniques, qui sont des dérivés carboxylés de glucose et de galactose (Figure3).(**Alvaro, et al.2024**).

L'hémicellulose est largement exploitée pour son potentiel biotechnologique et industriel. Son rôle dans la production de biocarburants est notable, car elle est transformée en sucres fermentescibles pour la production de bioéthanol, contribuant à une alternative énergétique renouvelable. Dans l'industrie papetière, l'hémicellulose améliore la qualité et la résistance du papier par ses propriétés de liaison. Son utilisation dans l'industrie alimentaire comme additif alimentaire souligne sa polyvalence, offrant des fonctionnalités telles que l'épaississement, la stabilisation et la gélification. De plus, l'hémicellulose joue un rôle dans la chimie verte, servant de source pour la production de produits chimiques renouvelables tels que le xylitol.(**Alvaro et al.,2024**)

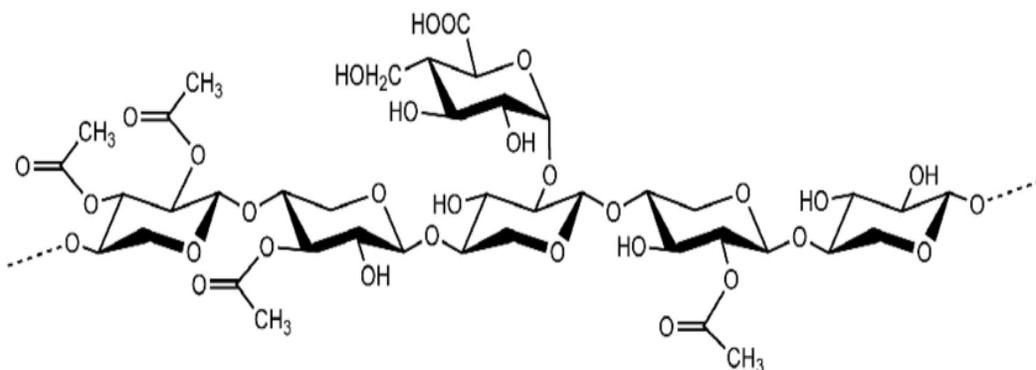


Figure 3 : Structure de l'hémicellulose(Lisong,2020).

1.2.3 La lignine

La lignine est un polymère aromatique complexe qui agit comme un agent de liaison entre les fibres de cellulose et d'hémicellulose, augmentant ainsi la résistance mécanique des plantes et leur imperméabilité. Sa structure tridimensionnelle et sa composition chimique variée la rendent résistante à la dégradation enzymatique. **(Lei Zhao *et al.*,2022).**

Elle est composée de trois types d'unités monomériques d'alcool phénylpropanoïde ; Ces unités sont les "briques" de base de la lignine. Chacune provient d'un type spécifique d'alcool lié à un groupe phényle (un anneau benzénique) :

-Alcool coniféryle (G) : Prédominant dans les conifères et certains types de plantes non ligneuses, donnant naissance à des unités guaiacyl.

-Alcool sinapylique (S) : Présent principalement dans les angiospermes (plantes à fleurs), contribuant à des unités syringyl.

-Alcool paracoumarylique (H) : Moins commun, il donne naissance à des unités p-hydroxyphényl.

La composition exacte et l'arrangement des unités de lignine diffèrent non seulement entre les espèces de plantes mais aussi selon les types de tissus au sein d'une même plante, reflétant la diversité des rôles et des fonctions de la lignine dans les différents contextes biologiques et chimiques (Figure 4)**(Francisco *et al.*,2015).**

La lignine possède des propriétés uniques qui la rendent utile dans diverses applications industrielles telles que dans les énergies renouvelables où on peut l'utiliser comme source de biocarburant ou comme composant dans la production de combustibles solides (les briquettes et les pellets) **(Lei Zhao *et al.*,2022)** la lignine est utilisée aussi, grâce à sa robustesse, comme additif dans la fabrication de matériaux composites, renforçant les propriétés mécaniques de produits tels que les plastiques, les résines et les mousses. **(Lei Zhao *et al.*,2022).** De plus, Elle peut servir de matière première dans synthèse de divers produits chimiques et matériaux, tels que les dispersants, les émulsifiants, les agents de lixiviation et les adhésifs **(Lei Zhao *et al.*,2022).** ou comme coagulant ou floculant pour éliminer les contaminants dans les processus de purification et de traitement de l'eau **(Inamuddin *et al.*,2019).**

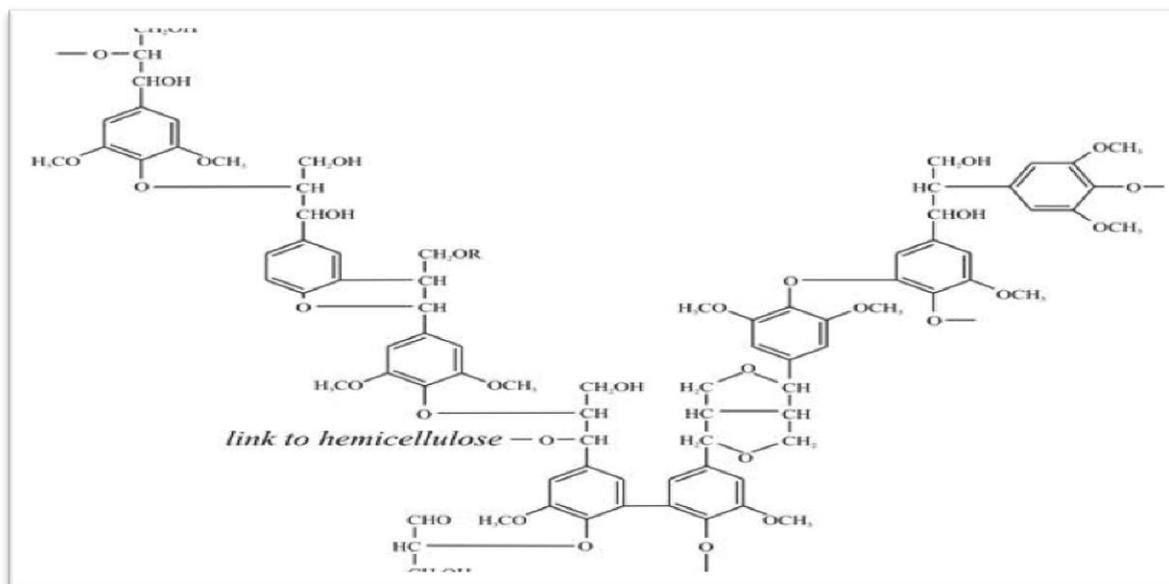


Figure 4 : Structure de la lignine(GREENAGROCHEM.,2013).

2. Dégradation enzymatique de la Lignocellulose

2.1 Cellulases

2.1.1 Définition

Les cellulases sont un ensemble d'enzymes qui catalysent la décomposition de la cellulose en glucose. Elles sont produites par certains microorganismes, y compris des bactéries et des champignons, qui jouent un rôle clé dans le cycle du carbone en décomposant la matière végétale morte (Lynd *et al.*,2002).La cellulase, qui n'a pas un numéro EC unique en raison de sa nature multifonctionnelle, comprend plusieurs enzymes clés travaillant de concert pour hydrolyser la cellulose. Ces enzymes incluent les endoglucanases (EC 3.2.1.4), les cellobiohydrolases (EC 3.2.1.x) et les β -glucosidases (EC 3.2.1.21), qui sont classées dans différentes familles de la classification CAZy, notamment les familles GH5, GH6, GH7, GH9, et GH45 pour les endoglucanases et cellobiohydrolases, et GH1 et GH3 pour les β -glucosidases. (Lynd *et al.*,2002).

2.1.2 Classification

Les cellulases sont classées en fonction de leur mode d'action sur la cellulose. Il existe principalement trois types principaux :

- Endoglucanases (EG): Ces enzymes coupent aléatoirement les liaisons β -1,4-glucosidiques à l'intérieur de la chaîne de cellulose, créant ainsi des extrémités coupées.

- Exoglucanases ou cellobiohydrolases (CBH): Elles agissent en décomposant la cellulose en cellobiose depuis l'extrémité de la chaîne de cellulose.

β -glucosidases: Elles hydrolysent le cellobiose et les oligomères de glucose en glucose (Bhat, 2000).

2.1.3 Mécanismes d'action

Les cellulases agissent de manière synergique pour décomposer la cellulose en glucose. Le processus commence généralement par l'action des endoglucanases qui créent des points d'attaque aléatoires le long de la chaîne de cellulose, suivis par les exoglucanases qui libèrent des unités de cellobiose des extrémités. Finalement, les β -glucosidases hydrolysent la cellobiose en glucose. Cette synergie est cruciale pour une dégradation efficace de la cellulose car elle permet de surmonter la structure cristalline et fortement liée par des liaisons hydrogène de la cellulose (Figure 5) (Kuhadet *al.*, 2011).

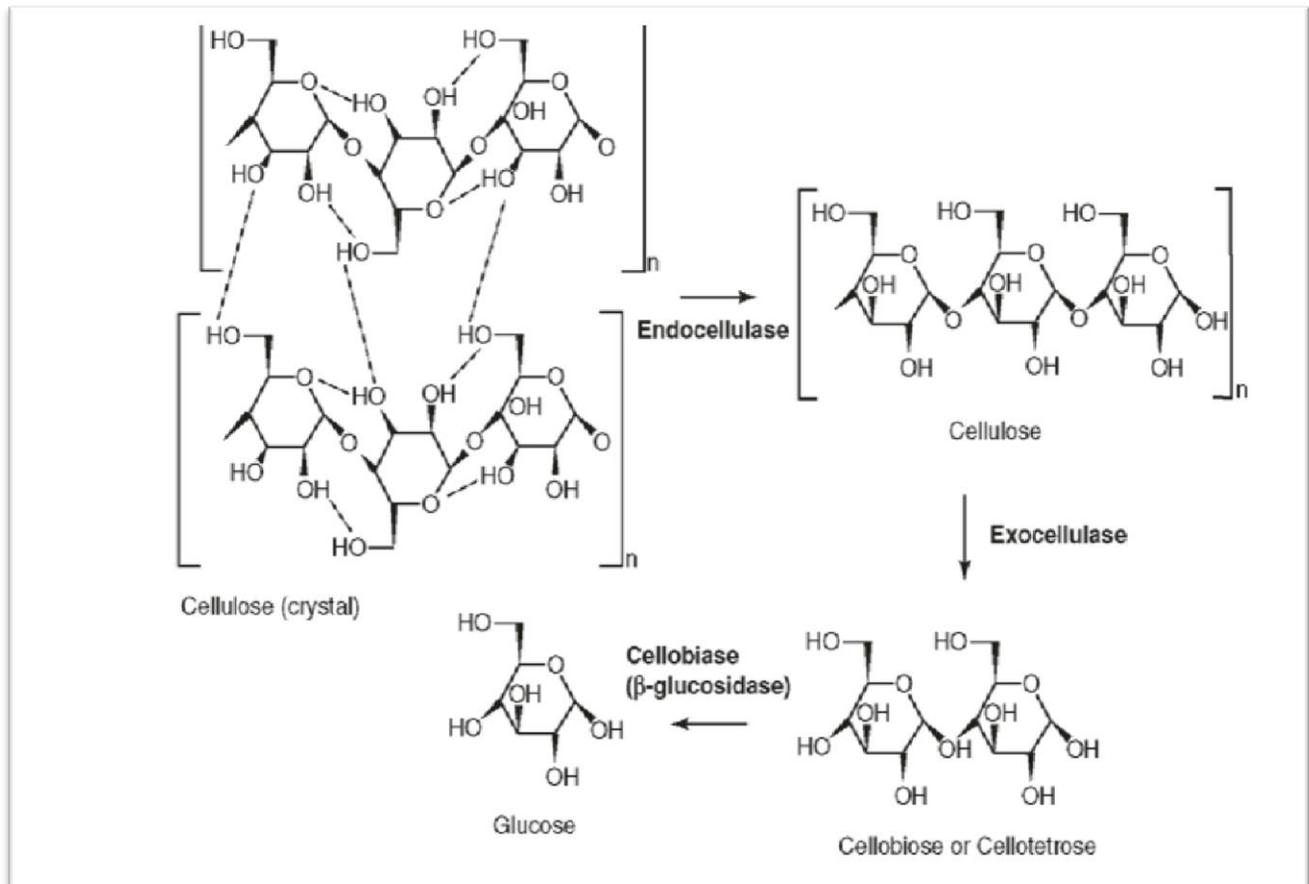


Figure5 : Mécanisme d'action de la cellulase (Anita Singh,2021)

2.2. Hémicellulases

2.2.1 Définition

Les hémicellulases sont des enzymes qui décomposent les hémicelluloses. Elles représentent un groupe diversifié d'enzymes impliquées dans la déconstruction des hémicelluloses, des polysaccharides complexes présents dans la matrice de la paroi cellulaire végétale. Il n'y a pas un unique numéro EC pour les hémicellulases en raison de leur diversité, mais elles incluent des enzymes comme les xylanases (EC 3.2.1.8), les β -mannanases (EC 3.2.1.78), et les β -xylosidases (EC 3.2.1.37), parmi d'autres. Ces enzymes appartiennent à plusieurs familles de la classification CAZy (Carbohydrate Active enZymes), notamment GH10 et GH11 pour les xylanases, GH5 et GH26 pour les mannanases, reflétant la variété de leurs structures et mécanismes d'action. La réaction globale catalysée par les hémicellulases implique l'hydrolyse des liaisons glycosidiques

dans les chaînes d'hémicellulose, résultant en la libération de sucres simples tels que la xylose et le mannose. La diversité fonctionnelle des hémicellulases et leur capacité à dégrader les composants de la paroi cellulaire végétale les rendent cruciales pour la biotechnologie et diverses applications industrielles telles que la production de biocarburants, de papier et les aliments pour animaux (**Collinset al.,2005**).

2.2.2 Classification

Les hémicellulases sont classées en fonction de leur spécificité de substrat et de leur mode d'action. Les principales catégories incluent :

- **Xylanases**: Les xylanases sont des enzymes cruciales dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique, jouant un rôle clé dans la conversion du xylane, l'un des principaux composants des hémicelluloses, en xyloses. Elles trouvent des applications dans plusieurs industries, notamment dans la fabrication du papier pour le blanchiment sans chlore et dans l'industrie alimentaire pour améliorer la qualité de la pâte à pain. (**Polizeli et al.,2005**).
- **Mannanases**: Les mannanases catalysent la dégradation du mannane, un polysaccharide présent dans les parois cellulaires de nombreuses plantes. Elles sont utilisées dans diverses applications industrielles, y compris dans le traitement des aliments pour animaux, pour augmenter la digestibilité, et dans l'industrie du papier pour le blanchiment biologique (**Moreira et Filho,2008**).
- **Arabinofuranosidases**: Ces enzymes sont impliquées dans la déconstruction des chaînes latérales des hémicelluloses, en ciblant spécifiquement les liaisons arabinofuranosidiques. Elles sont importantes pour la complète hydrolyse des hémicelluloses et sont utiles dans la bioconversion des biomasses en sucres fermentescibles(**De Vries et Visser,2001**).
- **Glucuronidases** : Ces enzymes hydrolysent les liaisons glucuroniques dans les hémicelluloses, libérant de l'acide glucuronique. Les glucuronidases sont importantes pour dépolymériser les hémicelluloses complexes, facilitant ainsi l'accès à d'autres enzymes hémicellulolytiques et améliorant l'efficacité de la conversion de la biomasse (**Biely,1985**).

2.2.3 Mécanismes d'action

Les hémicellulases agissent de manière synergique pour hydrolyser les hémicelluloses. Les xylanases, par exemple, attaquent les chaînes de xylane, tandis que les arabinofuranosidases et les glucuronidases ciblent spécifiquement les substitutions latérales, facilitant ainsi une dégradation plus complète. Cette action synergique est cruciale pour la déconstruction efficace de la matrice

complexe de la paroi cellulaire des plantes (Figure6)(Begetal.,2001).

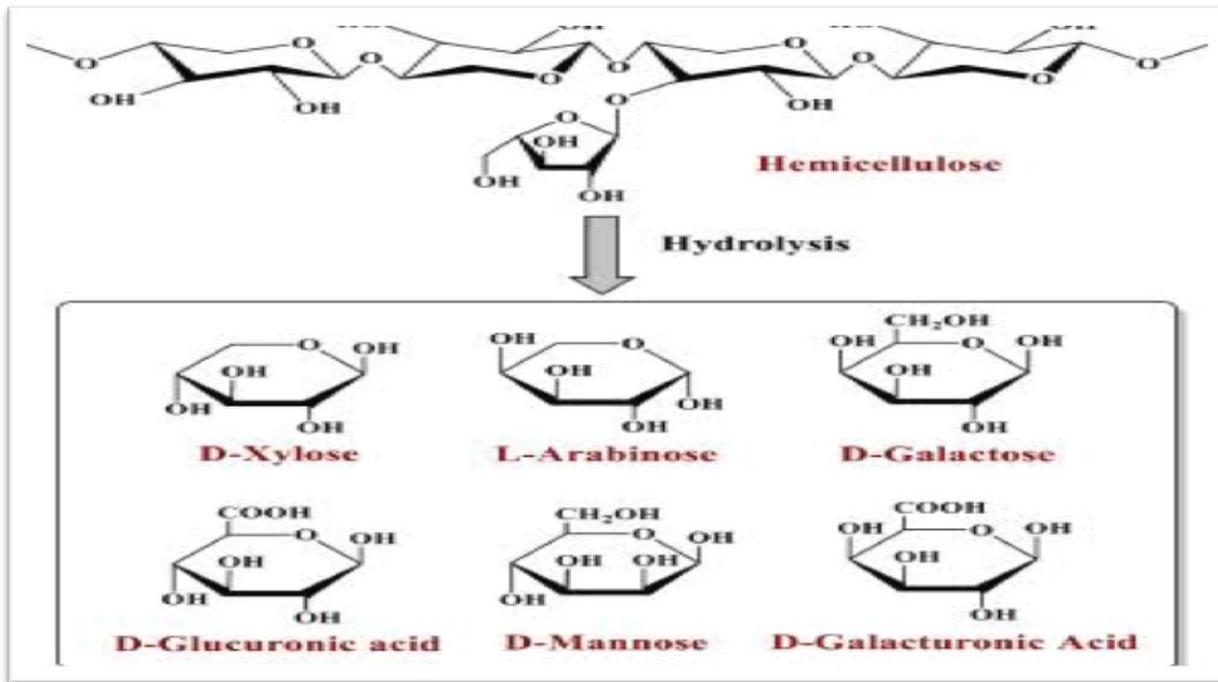


Figure 6: Mécanisme d'action de l'hémicellulase(Lei,2021)

2.3.Ligninases

2.3.1 Définition

Les ligninases sont un groupe d'enzymes capables de catalyser l'oxydation et la décomposition de la lignine. En raison de la structure complexe et hétérogène de la lignine, cette dégradation nécessite une coopération entre plusieurs enzymes ayant différentes spécificités et modes d'action (KirketTien,1988).

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine, souvent regroupées sous le terme générique de "ligninases", comprennent principalement la Manganèse Peroxydase (MnP), la Laccase et la Lignine Peroxydase (LiP). La Manganèse Peroxydase, avec le numéro EC 1.11.1.13, appartient à la famille CAZy AA2 et joue un rôle crucial dans la dégradation de la lignine en oxydant les ions manganèse Mn^{2+} en Mn^{3+} en présence de H_2O_2 ; le Mn^{3+} oxydé agit ensuite comme médiateur dans l'oxydation de la lignine. D'autre part, la Laccase, numérotée EC 1.10.3.2 et appartenant à la famille CAZy AA1, catalyse l'oxydation d'une vaste gamme de composés phénoliques et de certains composés non phénoliques, tout en réduisant l'oxygène moléculaire en eau, sans nécessiter de l'eau oxygénée. Enfin, la Lignine Peroxydase, avec le numéro EC 1.11.1.14 et également membre de la famille CAZy AA2, facilite l'oxydation de la lignine et d'autres composés aromatiques via l'utilisation de l'eau oxygénée, conduisant à la formation de radicaux libres qui brisent la structure polymérique de la lignine. Ces enzymes sont cruciales non seulement pour le recyclage naturel de la matière organique dans les écosystèmes mais sont aussi explorées pour leur potentiel en biotechnologie, notamment dans la biorémediation et la conversion de biomasse lignocellulosique en bioproduits (**Farrell et Kirk,1987**).

2.3.2 Classification

Les ligninases sont généralement classées en trois grandes catégories en fonction de leur mécanisme d'action

- **Laccases** : Les laccases sont des enzymes qui catalysent l'oxydation de substrats phénoliques et non phénoliques en utilisent des ions cuivre comme cofacteurs pour réaliser l'oxydation(**Thurston,1994**).
- **Péroxidases** : Cette catégorie inclut les ligninespéroxidases (LiP) et les manganèses péroxidases (MnP), qui catalysent la dégradation oxydative de la lignine en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les LiP sont capables d'oxyder spécifiquement les composants non phénoliques de la lignine, tandis que les MnP sont plus efficaces dans l'oxydation des composants phénoliques(**Martinez,2002**).
- **Péroxidases de type versatile (VP)** : Les VPs sont des enzymes qui combinent les propriétés des laccases et des péroxidases, étant capables d'oxyder un large éventail de substrats phénoliques et non phénoliques en présence de H_2O_2 (**Floudaset al.,2012**).

2.3.3 Mécanismes d'action

Les ligninases agissent en oxydant les liaisons chimiques complexes de la lignine, ce qui conduit à sa dégradation en molécules plus petites. Les laccases catalysent l'oxydation des groupes phénoliques, tandis que les peroxydases peuvent briser les liaisons non phénoliques en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'électrons(**figure07**). La coopération entre ces enzymes est cruciale pour décomposer efficacement la lignine, en raison de sa structure chimique variée et complexe(**Martinez et al.,2005**).

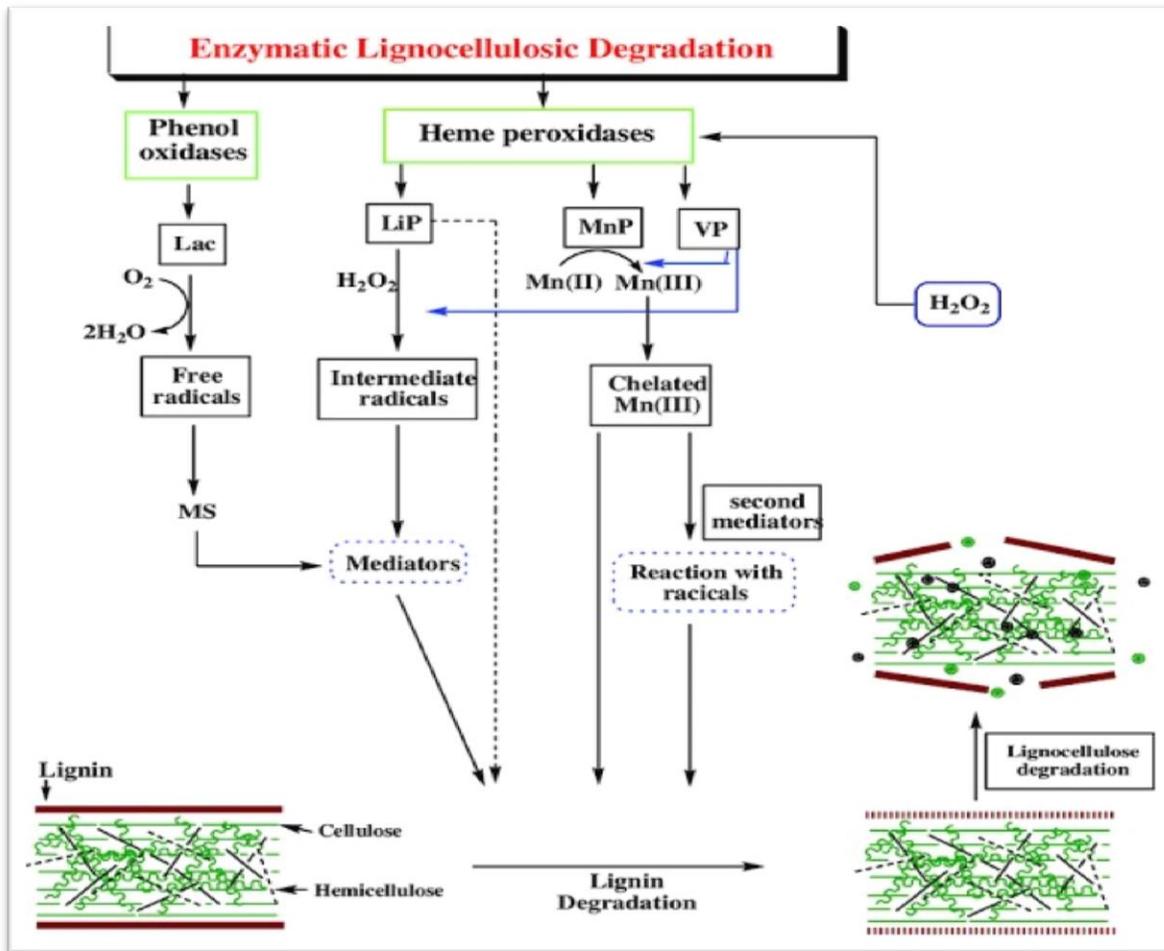


Figure 07 :Dégradation de la lignine par les différents types de Ligninase(Rehman,2019).

2.4 Les pectinases

2.4.1 Définition

Les pectinases également connues sous le nom de pectic enzymes, sont un ensemble d'enzymes qui catalysent le clivage des liaisons glycosidiques dans la pectine, permettant ainsi la modification ou la dégradation de la paroi cellulaire des plantes. (Vanet Whitehurst, 2009).

2.4.2 Classification

Les pectinases sont généralement classées en fonction de leur mode d'action sur la molécule de pectine :

- Polygalacturonases (PG) : les PG, portant le numéro EC 3.2.1.15, sont classées dans la famille des glycoside hydrolases (famille GH28), hydrolysent les liaisons α -1,4-glycosidiques entre l'acide D-galacturonique dans la chaîne principale de la pectine, (Stein, 2010).
- Pectine lyases (PL) : Identifiées par le numéro EC 4.2.2.10, les PL coupent les liaisons glycosidiques par β -élimination pour enlever les blocs de pectate et de pectine (MacCabeet Polaina, 2007).
- Pectatelyases (PAL) : Classées sous le numéro EC 4.2.2.2, ces enzymes agissent également par β -élimination, mais spécifiquement sur les régions dé-méthylées de la pectine (pectate) (Liu et Mander, 2010).
- Pectinesterase (PE) (EC 3.1.1.11): Elles déméthylent la pectine pour former de l'acide pectique et du méthanol, souvent en préparation pour l'action des autres pectinases (Voragen *et al.*, 2002).

2.4.3 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des pectinases est complexe et varie selon le type spécifique d'enzyme :

- Pectinesterases (PE) :

Ces enzymes attaquent les groupes méthyle ester de l'acide galacturonique dans la pectine, libérant de l'acide pectique et du méthanol. Ce processus augmente la quantité de pectine dé-estérifiée disponible pour les réactions de gélification en présence de cations comme le calcium. (Van et Whitehurst, 2009).

- Polygalacturonases (PG) :

Les PG hydrolysent les liaisons α -1,4-glycosidiques entre les résidus d'acide galacturonique dans la chaîne de pectine. Selon qu'elles agissent par l'extrémité non réductrice (exo-PG) ou aléatoirement le long de la chaîne (endo-PG), elles produisent des oligogalacturonides ou des acides galacturoniques libres. (Taylor et Walter, 2001).

Lyases (PectateLyases et PectinLyases) :

- Lespectatylases (PL) et les pectinylases (PNL) clivent les liaisons glycosidiques dans la pectine par un mécanisme de β -élimination. Les PL agissent sur la pectine dé-estérifiée, et les PNL préfèrent la pectine hautement estérifiée. Les produits de cette réaction sont des oligomères avec des extrémités doublement liées, ce qui est différent des monomères produits par les PG. (Visser et Voragen, 1996).

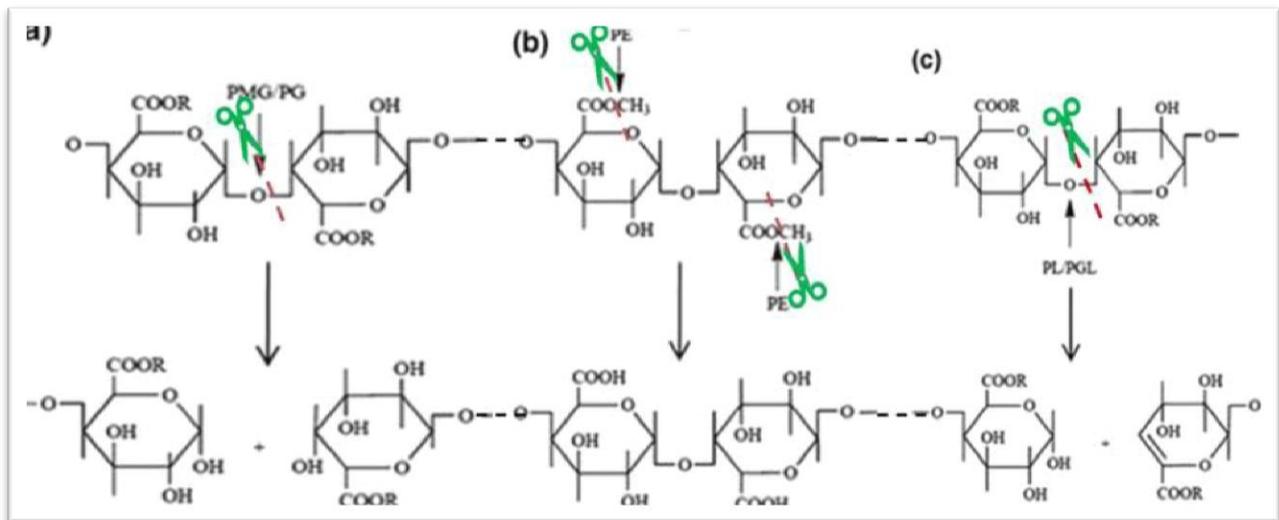


Figure08 :Mecanisme d'action des Pectinases, (a) Polyméthylgalacturonase, (b) Pectinestérase, (c) Pectinlyase et polygalacturonatylase. (Garg 2016)

3. Importance écologique des enzymes fongiques lignocellulolytiques

Les enzymes fongiques lignocellulolytiques jouent un rôle clé à la fois dans les processus naturels et dans le maintien de l'équilibre écologique.

3.1 Décomposition de la matière végétale

Les enzymes fongiques lignocellulolytiques, comme les cellulases, hémicellulases et ligninases, jouent un rôle crucial dans le cycle de vie des écosystèmes en décomposant la lignocellulose, le principal composant structurel des plantes. Cette décomposition libère des nutriments comme le carbone, l'azote et le phosphore, rendant ces éléments à nouveau disponibles pour être utilisés par d'autres organismes, soutenant ainsi la diversité et la productivité des écosystèmes (**Hayashi et Saha, 2020**).

3.2 Cycle du carbone

En dégradant la matière organique végétale, ces enzymes libèrent du dioxyde de carbone (CO₂) dans l'atmosphère, un processus essentiel pour le cycle atmosphérique, ayant ainsi un impact direct sur le climat global et les écosystèmes terrestres du carbone. Cette transformation joue un rôle clé dans la régulation des niveaux de CO₂ atm (**Chen, 2015**).

3.3. Symbiose avec les plantes

Certains champignons lignocellulolytiques forment des associations bénéfiques avec les plantes, comme les mycorhizes. Ces champignons aident à décomposer la matière organique morte, enrichissant ainsi le sol en nutriments disponibles pour les plantes hôtes. En retour, les plantes fournissent aux champignons des sucres et d'autres composés organiques nécessaires à leur croissance. (**Himmel et al., 1994**).

4. Importances biotechnologiques des enzymes lignocellulolytiques

Les enzymes lignocellulolytiques jouent un rôle crucial dans la transformation des biomasses lignocellulosiques. Leur application dans les biotechnologies offre des solutions durables pour divers secteurs industriels.

4.1 Production de biocarburants

Les enzymes lignocellulolytiques décomposent la biomasse en sucres simples, qui peuvent ensuite être fermentés pour produire de l'éthanol ou d'autres biocarburants. Cette approche offre une alternative renouvelable aux combustibles fossiles, réduisant ainsi l'empreinte carbone. (**Chen et Sun, 2002**).

4.2 Industrie du papier et de la pâte

Dans l'industrie papetière, les enzymes lignocellulolytiques sont utilisées pour le blanchiment écologique de la pâte, permettant de réduire l'utilisation de produits chimiques chlorés nocifs. Elles aident également à améliorer la qualité du papier et à économiser l'énergie (**Bajpai,2012**).

4.3.Traitement des déchets

Les enzymes lignocellulolytiques sont utilisées dans le compostage et la bioconversion des déchets agricoles et municipaux en compost ou en produits à valeur ajoutée, contribuant ainsi à la gestion durable des déchets (**Dhouibet *al.*,2006**).

4.4.Production d'aliments et de boissons

Dans l'industrie alimentaire, les enzymes lignocellulolytiques sont utilisées pour clarifier les jus, extraire les arômes et les colorants, et améliorer la texture et la digestibilité des aliments. Elles jouent également un rôle dans la fabrication de produits fermentés comme le vin et la bière (**Pandeyet *al.*,2000**).

5. Origines microbiennes des enzymes lignocellulolytiques

Les enzymes lignocellulolytiques sont produites par une variété de microorganismes, y compris des bactéries, des champignons et même certains protozoaires. Ces microorganismes jouent un rôle crucial dans les cycles écologiques en décomposant la matière végétale morte et en recyclant les nutriments.

5.1 Bactéries

Certaines bactéries sont également connues pour leur capacité à produire des enzymes lignocellulolytiques. Les genres *Clostridium* et *Cellulomonas*, par exemple, produisent une gamme d'enzymes capables de décomposer la cellulose et les hémicelluloses. Les bactéries sont particulièrement intéressantes pour les applications industrielles en raison de leur croissance rapide et de leur facilité de manipulation génétique (**Lyndet *al.*,2002**).

5.2. Actinomycètes

Les actinomycètes, un groupe de bactéries qui partagent certaines caractéristiques avec les champignons, tels que *Streptomyces*, sont connus pour produire un large éventail d'enzymes lignocellulolytiques. Ces microorganismes sont particulièrement intéressants pour la découverte de nouvelles enzymes en raison de leur grande diversité génétique (McCarthy, 1987).

5.3. Levures

Certaines levures, telles que *Pichiastipitis*, sont capables de fermenter les sucres issus de la dégradation de la lignocellulose en alcools et autres composés biochimiques. Bien que moins étudiées que les bactéries et les champignons, ces levures offrent un potentiel intéressant pour la production de biocarburants et d'autres bioproduits. (Jeffries et Jin, 2004).

5.4. Moisissures

Les champignons, en particulier ceux de l'ordre des Basidiomycètes et des Ascomycètes, sont parmi les plus efficaces décomposeurs de la lignine et de la cellulose. Les champignons lignivores tels que *Phanerochaete chrysosporium* (un Basidiomycète) et *Trichoderma reesei* (un Ascomycète) sont largement étudiés pour leur capacité à produire des enzymes lignocellulolytiques, notamment des cellulases et des ligninases (Martinez *et al.*, 2005).

Tableau 1 : Différents genres microbiens et leurs enzymes lignolytiques produites.

Genre Microbien	Type	Enzymes lygnolytiques produites	Références
<i>Trichoderma</i> sp.	Moisissure	Cellulases, Hémicellulases	(Bhat, 2000).
<i>Aspergillus</i>	Moisissure	Cellulases, Hémicellulases ,Ligninases	(Rabinovich <i>et al.</i> , 2002).
<i>Phanerochaete</i>	Moisissure	LiPs, MnPs, Laccases	(Cullen et Kirk, 1998).
<i>Pleurotus</i>	Moisissure	Laccases, VPs, Hémicellulases	(Elisashvili et Kachlishvili, 2009).
<i>Cellulomonas</i>	Bactérie	Cellulases, Hémicellulases	(Lynd <i>et al.</i> , 2002).
<i>Streptomyces</i>	Actinomycètes	Cellulases, Hémicellulases, Ligninases (Laccases, DyP-type Peroxidases)	(McCarthy, 1987).
<i>Bacillus</i>	Bactérie	Cellulases, Hémicellulases, Ligninases (dans certains cas)	(Saha, 2004).
<i>Nocardia</i>	Actinomycète	Hémicellulases, potentiellement des Ligninases	(Flärdh <i>et al.</i> , 1997).
<i>Saccharomyces</i>	Levure	Hémicellulases	(Saha, 2003).
<i>Pichia</i>	Levure	Hémicellulases	(Biely <i>et al.</i> , 1986).

6. Production des enzymes lignocellulosiques fongiques

6.1. Les différents milieux de culture et de production

La production d'enzymes lignocellulosiques par les moisissures nécessite des milieux de culture spécifiques pour optimiser la croissance fongique et l'induction enzymatique.

6.1.1. Milieux de Culture Synthétiques

Les milieux de culture synthétiques sont soigneusement formulés avec des sources de carbone et d'azote définies, des vitamines, des minéraux et des agents inducteurs pour contrôler précisément les conditions de croissance et d'expression enzymatique (**Pundir, 2012**).

comme le milieu de Mandels-Andreotti souvent utilisé pour la culture de *Trichoderma reesei*, une moisissure réputée pour sa capacité à produire des cellulases et des hémicellulases efficaces. Le milieu contient généralement des sources de carbone simples comme le glucose ou la cellulose, des sels minéraux, et des sources d'azote telles que le nitrate d'ammonium ou le sulfate d'ammonium. (**Harmanet Kubicek, 1998**).

D'autres utilisent un milieu à Base de Xylane, spécifiquement conçu pour induire la production de xylanases et est utilisé avec des moisissures comme *Aspergillus niger* (**Machida et Gomi, 2010**).

Le Milieu Kirk aussi est utilisé pour la culture de moisissures ligninolytiques telles que *Phanerochaete chrysosporium*, favorisant la production de ligninases, y compris la laccase et les peroxydases ligninolytiques. Il contient généralement du veratryl alcool comme inducteur de l'activité ligninolytique (**Chang et al., 1980**).

6.1.2. Milieux de Culture Complexes

Les milieux complexes contiennent souvent des extraits de levure, de malt, de soja ou de caséine, fournissant un large éventail de nutriments pour la croissance fongique. Ces milieux sont moins définis que les milieux synthétiques mais peuvent être plus efficaces pour certaines souches fongiques (**Arora, 2004**).

le Milieu de PDB (Pomme de Terre Dextrose Broth) est fréquemment utilisé pour la culture de nombreuses espèces de moisissures, y compris *Aspergillus niger*, un producteur efficace de hémicellulases et d'autres enzymes lignocellulosiques. Ce milieu est riche et nutritif, favorisant une croissance rapide des moisissures (**Dijksterhuis et Samson,2007**). De plus, le Milieu de Malt ExtractBroth (MEB)est un milieu nutritif utilisé pour la culture de moisissures telles que *Trichoderma reesei*, qui est bien connue pour sa capacité à sécréter de grandes quantités de cellulases et d'autres enzymes lignocellulosiques (**Okafor,2007**).

6.1.3. Milieux à Base de Sous-produits Agricoles

L'utilisation de sous-produits agricoles comme substrats dans les milieux de culture est une approche économique et durable. Les résidus tels que la paille de blé, la bagasse de canne à sucre, les cosse de riz et les coques de noix sont utilisés comme sources de carbone et d'inducteurs enzymatiques (**Sani et Pandey,2019**).

La bagasse de canne à sucre est souvent utilisée comme substrat pour la production d'enzymes par *Trichoderma reesei*, un champignon réputé pour sa capacité à produire de grandes quantités de cellulases et d'hémicellulases(**Pandey et al.,2011**). Le son de blé est un substrat aussi utilisé pour la culture de *Aspergillus niger*, une autre moisissure efficace dans la production d'enzymes lignocellulosiques, notamment les xylanases et les pectinases(**Thangadurai et al .,2016**).

La Paille de Riz est utilisée comme milieu de culture pour *Penicillium chrysogenum*, qui produit une gamme d'enzymes lignocellulosiques. Ce substrat fournit une source riche de lignocellulose pour l'induction de la production d'enzymes(**Rashmi et al.,2018**).

Les Coques de Noix de Coco peuvent être utilisées comme substrat pour la culture de *Phanerochaete chrysosporium*, connue pour sa capacité à dégrader la lignine et à produire des ligninases, en plus d'autres enzymes lignocellulosiques(**Kumar et al.,2020**).Enfin,les grignons d'olives eux aussi représentent un substrat de production des lignocellulases de très grande importance et peuvent servir de source de carbone et d'inducteurs enzymatiques pour plusieurs souches fongiques, par exemple *Aspergillus niger* est capable de produire une large gamme d'enzymes lignocellulosiques, notamment des pectinases et des xylanases(**Godfrey et West.,1996**).*Trichoderma reesei* est connu pour sa capacité à sécréter des quantités importantes de cellulases et d'hémicellulases en utilisant les grignons d'olive pour stimuler la production de ces enzymes (**Bernardes.2011**). De plus, *Penicillium chrysogenum*, lorsqu'il est cultivé sur des

grignons d'olive, peut produire des ligninases qui sont utiles pour la dégradation de la lignine contenue dans ces résidus (Nigam et Pandey.,2009).*Phanerochaete chrysosporium* est une autre souche qui peut utiliser les grignons d'olive pour produire des enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine(Saha et Hayashi,2004).

6.2. Les différents modes de fermentation

La production d'enzymes lignocellulosiques par les champignons peut être réalisée via différents modes de fermentation, chacun avec ses propres avantages et particularité.

6.2.1. Fermentation en Milieu Solide (FMS)

La FMS implique la culture de microorganismes sur un substrat solide en l'absence ou presque de phase liquide libre. Ce mode est particulièrement adapté aux champignons filamenteux qui préfèrent les surfaces pour la croissance et la production d'enzymes (Mitchell et Krieger,2006). comme par exemple les Cellulases : Produites par *Trichoderma reesei* sur un substrat solide comme la bagasse de canne à sucre ou la paille de blé (Chen et Zhu,2013), et les Xylanases produites par *Aspergillus niger* utilisant des substrats tels que le son de blé ou la paille de riz (Pandey *et al.*,2008).

6.2.2. Fermentation Submergée (FS)

La FS est une forme de FML où les microorganismes sont complètement immergés dans le milieu liquide. Ce mode est efficace pour la production d'enzymes par des cultures pures de champignons et permet une extraction facile des enzymes du milieu de culture (Glazeret Nikaido,2007),tels que les Laccases Produites par *Pleurotus ostreatus*(Chaplin et Bucke.,1990) , etles Manganèse Peroxydaseégalement produite par *Phanerochaete chrysosporium* en FS (Tkacz et Lange,2004) .

6.2.3. Fermentation en Surface

Dans la fermentation en surface, les microorganismes sont cultivés sur la surface d'un substrat solide humidifié, souvent dans des boîtes de Petri ou des plateaux. Ce mode est moins fréquemment utilisé pour la production d'enzymes mais peut être bénéfique pour certaines souches fongiques spécifiques.(Baltz *et al.*,2010)comme *Aspergillus niger* qui lors de la culture

en surface produit les Pectinases(**Godfrey et West, 1996**), et *Penicilliumfuniculosum*, cultivé en fermentation en surface, peut également produire des cellulases (**Brahmachari, 2017**).

6.3. Mécanismes d'induction de la production d'enzymes

La production d'enzymes lignocellulosiques par les moisissures est souvent régulée par le type de nutriment disponible, avec une induction en présence de substrats lignocellulosiques comme la paille, le bois, ou la bagasse. Le mécanisme précis de régulation peut varier selon l'espèce fongique et les conditions de culture.

6.3.1. Induction par l'espèce fongique

Différentes espèces fongiques peuvent présenter des mécanismes d'induction de production d'enzymes spécifiques en fonction de leur génétique et de leur écologie. Certaines espèces sont mieux adaptées à la dégradation de la cellulose, tandis que d'autres peuvent être plus efficaces dans la dégradation de l'hémicellulose ou de la lignine (**Arora,2004**).

6.3.2. Induction par substrat

La présence de substrats lignocellulosiques spécifiques dans le milieu de culture peut induire la production d'enzymes lignocellulosiques par les champignons. Cette induction est souvent méditée par des mécanismes de reconnaissance moléculaire qui permettent au champignon de détecter la présence de composants lignocellulosiques et d'activer la transcription des gènes codant pour les enzymes nécessaires à leur dégradation (**Chen,2014**).

6.3.3. Induction par régulation transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les enzymes lignocellulosiques est un aspect crucial du mécanisme de production d'enzymes. Les facteurs de transcription, qui sont activés en réponse à la présence de substrats lignocellulosiques, jouent un rôle clé dans l'initiation de la transcription des gènes enzymatiques (**Schmoll et Dattenböck,2016**).

6.4.Optimisation de la production

La production d'enzymes lignocellulosiques peut être optimisée par la manipulation des conditions de culture, telles que la composition du milieu, la température, le pH, et l'aération. Les avancées en génétique moléculaire ont également permis l'amélioration des souches productrices d'enzymes par génie génétique, augmentant ainsi leur efficacité et leur spécificité (**Maan et al., 2016**).

6.4.1. Optimisation des Conditions de Culture

L'optimisation des paramètres de culture tels que la composition du milieu, la température, le pH et l'aération est essentielle pour maximiser la production d'enzymes. La modification de ces paramètres peut influencer la croissance des microorganismes et l'induction de la production d'enzymes, améliorant ainsi le rendement et l'efficacité enzymatiques (**Shuler et Kargi,2002**).

Pour *Trichoderma reesei*, la température optimale de production de cellulases est généralement autour de 50°C, et le pH optimal se situe entre 4 et 5 (**Druzhinina et Kubicek,2016**).

Alors que Pour *Aspergillus niger*, la température optimale de fonctionnement de xylanases se situe autour de 50-55°C, avec un pH optimal entre 4,5 et 5,5(**Mehta et Kuhad,2017**),

tandis que Pour *Phanerochaete chrysosporium*, la température optimale de production des peroxydases ligninolytiques est d'environ 37°C, avec un pH optimal compris entre 4,5 et 5. (**Saha et Hayashi,2004**).

Enfin, Pour les espèces de *Penicillium*, les conditions optimales des pectinases varient, mais elles fonctionnent généralement bien à des températures autour de 30-50°C et un pH compris entre 3,5 et 5,5 (**Kregiel et al,2019**).

6.4.2. Génie Génétique pour l'Amélioration des Souches

Les avancées en génétique moléculaire et en génie génétique ont ouvert de nouvelles voies pour l'amélioration des souches productrices d'enzymes. La modification génétique peut augmenter l'expression des gènes d'enzymes, améliorer la stabilité et l'activité des enzymes, et développer des souches résistantes aux inhibiteurs présents dans les substrats lignocellulosiques.(**Bernard et al.,2010**) Un bon exemple est *Trichoderma reesei* qui est largement étudié et utilisé pour la production de cellulases. Des modifications génétiques ont été appliquées pour surmonter la régulation catabolique par le glucose et améliorer la sécrétion de cellulases. Les souches modifiées génétiquement ont montré une augmentation significative de la production de cellulases par rapport aux souches sauvages (**Bernardo et al.,2013**).*Aspergillus niger* est un autre microorganisme clé utilisé pour la production d'enzymes lignocellulosiques, notamment les xylanases. Des techniques de génie génétique ont été utilisées pour augmenter la production de xylanases, notamment par la duplication de gènes xylanolytiques et l'amélioration des voies de sécrétion des enzymes(**Mach-Aigner et al. ,2016**).*Penicillium chrysogenum* lui aussi a été génétiquement modifié pour améliorer sa production de ligninases, en particulier les laccases (**Piscitelli et al.,2014**).

6.4.3. Utilisation de Systèmes d'Expression Hétérologue

L'expression d'enzymes lignocellulosiques dans des systèmes hôtes alternatifs par le biais de l'expression hétérologue permet de surmonter certaines limitations des souches naturelles, telles que les faibles niveaux d'expression d'enzymes et les difficultés de purification (**Balbás et Lorence,2014**).

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a été génétiquement modifiée pour exprimer des cellulases de *Trichoderma reesei*, permettant à la levure de dégrader directement la cellulose en glucose qui peut ensuite être fermenté en bioéthanol, améliorant ainsi le processus de production de biocarburants (**Wen et al.,2010**). Encore, la xylanase thermorésistante de *Thermomyces lanuginosus* a été exprimée avec succès dans la levure *Pichiapastoris*, améliorant significativement la production de l'enzyme. Cette approche a permis d'obtenir des rendements élevés d'enzymes actives, utiles pour les applications industrielles, notamment dans l'industrie papetière et alimentaire (**Li et al.,2007**). Les laccases fongiques, aussi, ont été exprimées dans *Escherichiacoli* pour permettre une production d'enzymes à grande échelle et faciliter leur purification et leur caractérisation. Cette stratégie a permis d'étudier plus en détail les laccases fongiques et de les utiliser dans diverses applications biotechnologiques.

(**Piscitelliet al.2010**)

6.4.4. Screening et Évolution Dirigée

Le screening de bibliothèques de souches naturelles ou mutées et l'utilisation de techniques d'évolution dirigée peuvent identifier des variants enzymatiques avec des propriétés améliorées, telles qu'une activité catalytique accrue ou une meilleure tolérance aux conditions de réaction (**Arnold et Georgiou,2003**).

La technique de l'évolution dirigée est une méthode puissante pour améliorer les caractéristiques des enzymes, en imitant le processus de sélection naturelle mais à une échelle de temps accélérée et de manière ciblée en laboratoire.

L'évolution dirigée commence par la création d'une bibliothèque de variants génétiques d'une enzyme donnée, souvent par mutagenèse aléatoire ou par recombinaison in vitro. Cette bibliothèque est ensuite soumise à un processus de sélection ou de criblage pour identifier les variants qui présentent une ou plusieurs propriétés désirées améliorées, telles qu'une activité

catalytique accrue, une stabilité thermique améliorée, ou une tolérance à des solvants ou pH non naturels .Le processus peut être répété sur plusieurs cycles, chaque cycle commençant par les variants sélectionnés du cycle précédent, pour accumuler des améliorations et affiner les propriétés de l'enzyme. Cela permet d'obtenir des enzymes "sur mesure" adaptées à des applications industrielles spécifiques qui ne seraient pas possibles avec les enzymes naturelles

L'évolution dirigée a aussi été appliquée à l'amélioration des lignocellulases. Un exemple notable est l'évolution de la cellulase produite par *Trichoderma reesei*. Des chercheurs ont utilisé des techniques de mutagenèse aléatoire et de criblage de haute performance pour développer des cellulases ayant une activité accrue ou une meilleure stabilité dans des conditions industrielles variées, comme des températures élevées ou des pH extrêmes **(Alberghina,2000)**, Un autre exemple concerne la xylanase, une autre composante importante des enzymes lignocellulosiques. La xylanase a été améliorée pour une meilleure efficacité à des pH alcalins, ce qui est bénéfique pour son utilisation dans l'industrie papetière où des conditions alcalines sont fréquentes **(Aehle,2007)**.

Il y a aussi, l'optimisation de la laccase, une enzyme impliquée dans la dégradation de la lignine, qui est un composant majeur de la biomasse lignocellulosique. La laccase, produite par diverses souches fongiques telles que *Trametes versicolor*, a été soumise à l'évolution dirigée pour améliorer son efficacité dans la dégradation de composés phénoliques et d'autres composants de la lignine, rendant le processus de biobleaching dans l'industrie papetière plus efficace et écologique **(Saddler,1997)**.

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au sein de Laboratoire de biologie et environnement, Université des Frères Mentouri Constantine ; Son objectif est d'évaluer l'influence de divers facteurs (temps, humidité, ions métalliques, sources de carbone...etc.) sur l'activité enzymatique lignocellulolytique (Cellulases, pectinases et xylanases) des extraits obtenus par fermentation solide de *Penicillium sp* sur les grignons d'olive.

1. Optimisation de la production enzymatique

Plusieurs paramètres ont été testés par la méthode d'un facteur à la fois (One Factor At Time, OFAT) pour voir leurs effets sur la production enzymatique des cellulase, des xylanases et des pectinases

1.1.Étude de la Cinétique

On a suivi l'évolution de l'activité des enzymes xylanase, cellulase et pectinase sur une période de 18 jours, avec des mesures prises chaque les deux jours.

1.2.Effet de l'Humidité

On a évalué comment différents niveaux d'humidité, spécifiquement 30, 40,50, 60 et 70%, influencent l'activité des trois enzymes.

1.3.Effet de la quantité d'inoculum de *Penicilliumsp.*

On a évalué l'impact de l'utilisation de différents nombres de disques (6 mm) de *Penicilliumsp*(6, 8, 10, 12 et 14 disques) sur l'activité des trois enzymes.

1.4.Impact de la Concentration de Tween 80

Ona suivi l'effet de différentes concentrations de Tween 80 (1, 1.5%, 2%, 2.5% et 3%) sur l'activité des enzymes.

1.5.Effets des Sources de Carbone

On a examiné l'influence de différentes sources de carbone tel que l'extrait de malt, l'amidon, le fructose et le glucose sur les activités enzymatiques.

1.6. Influence des Sources d'Azote

On a observé l'effet de différentes sources d'azote comme le sulfate d'ammonium (NH_4SO_4), le nitrate de Sodium (NaNO_3), l'extrait de levure, l'urée et la peptone sur l'activité des enzymes (figure 9).



Figure 9 : Tube contenant les différentes sources d'azote

1.7. Effets des ions métalliques

On a examiné l'influence de diverses sources minérales, le cuivre (Cu), le magnésium (Mg), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le potassium (K) et le zinc (Zn) sur les activités enzymatiques (figure 10).



Figure 10 : Tubes contenant les différentes sources minérales

2. Expérience de confirmation

Afin de tester l'efficacité de la méthode d'optimisation, on a procédé à une expérience de confirmation. On a pesé 10 g de grignons et les plaçait dans des flacons Erlenmeyer de

250 mL. Pour humidifier les grignons, on a ajouté la quantité adéquate de l'eau distillée ou d'une solution nutritive stérile pour fournir les nutriments nécessaires à la croissance optimale de *penicillium*. Les flacons, couverts de cotons cardé ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, on a inoculé chaque flacon avec le nombre optimal de disques de *Penicillium sp.*(Figure 11 a). Les flacons ont été incubés à une température de 25°C pendant 4 à 8 jours, selon le jour de production optimale de la souche (Figure 11 a). À la fin de l'incubation, on a extrait le produit de fermentation en ajoutant 50 ml d'eau distillée et en broyant à l'aide d'un ultraturrax (Figure 11c). Le liquide contenant les enzymes a été séparé du résidu solide par filtration. Enfin, on a analysé ce liquide pour déterminer les activités enzymatiques (Cellulases, xylanases et pectinases).



Figure 11 :Expériences de confirmation (a : la souche *Penicillium sp* ; b : Fermentation solide sur grignons d'olives ; c : Broyage à l'aide de l'ultraturrax)

3. Méthodes analytiques

3.1.Mesure de l'activité cellulolytique

Pour évaluer l'activité des extraits enzymatiques sur la cellulose, on a méticuleusement préparé trois tubes contenant chacun 0,5 mL de l'extrait enzymatique et 0,5 mL de la cellulose à 1% préparé dans un tampon Acétate de Sodium pH5. Ces tubes ont été incubés à 40°C pendant 20 minutes. Après l'incubation, on a ajouté 1 mL de réactif DNS(Annexe 1) à chaque tube puis on les a chauffés à 100°C pendant 10 minutes (figure 12 b). Immédiatement après, les tubes ont été refroidis dans un bain de glace pendant 10 minutes. L'absorbance a été ensuite mesurée à 540 nm(Miller, 1959) (Figure 12 C). Une

unité enzymatique est exprimée par la quantité en micromoles de glucose libérée par un mL de l'extrait enzymatique en un temps d'une minute. La teneur en glucose est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage (figure 37), réalisée dans les mêmes conditions opératoires (Annexe2)

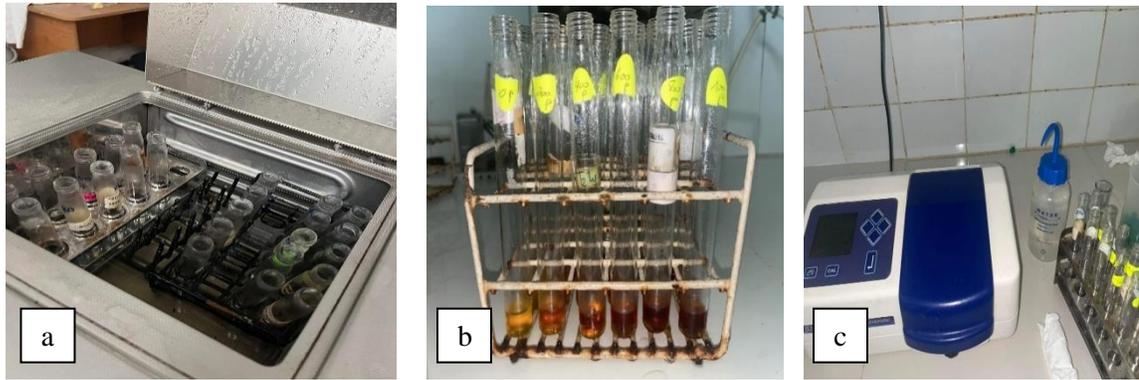


Figure 12: Méthode analytique : (a : Tubes des courbes d'étalonnage (b : Incubation dans le bain marie

C : Absorbance à 540 nm

3.2. Mise en évidence de l'activité xylanolytique

Dans le cadre de l'étude sur l'activité des xylanases, on a suivi le même protocole appliqué pour le dosage de l'activité cellulolytique mais en remplaçant la solution de cellulose par une solution de Xylane (1%) dans un tampon acétate de Sodium pH 5. Une unité enzymatique est exprimée par la quantité en micromoles de xylose libérée par umL de l'extrait enzymatique en un temps d'une minute. La teneur en xylose est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage, réalisée dans les mêmes conditions opératoires.

3.3. Mise en évidence de l'activité pectinolytique

La même méthode était utilisée dans l'activité despectinasesmais en remplaçant la solution de cellulose par une solution de pectine (1%) dans un tampon acétate de Sodium pH 5. Une unité enzymatique est exprimée par la quantité en micromoles de l'acide galacturonique libérée par unmL de l'extrait enzymatique en un temps d'une minute. La teneur en acide galacturonique est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage, réalisée dans les mêmes conditions opératoires (Annexe 2).

Résultats et discussions

III. Résultats et discussion

1. Optimisation de la production des cellulases

1.1.Effet de la concentration du Tween80

L'activité cellulase atteint un pic à une concentration de 2% de Tween, avec une valeur maximale de 2.370 $\mu\text{mol/ml/min}$ (figure13). Nos résultats ne correspondent pas avec ceux de (Kalsoom. 2018), où la production de cellulase a été réalisée en utilisant des espèces de *Trichoderma* avec une concentration de 0.3% de tween 80 en fermentation en état solide (SSF) sur *Leptochloafusca*. De plus une autre étude menée par (Alejandro. 1996) a utilisé la souche *Nectriacatalinensis* avec une concentration de 1.7 mM de Tween 80 en SSF sur le son de blé.

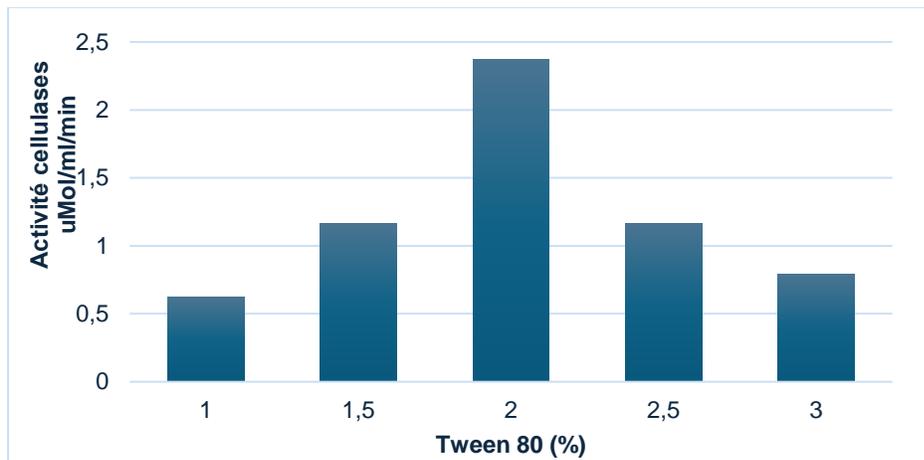


Figure 13:L'effet de la concentration de Tween 80 sur la production des cellulases.

1.2.Effet des sources de carbone

L'activité des cellulases est la plus élevée avec l'extrait de malt comme substrat, atteignant une activité de 11.304 $\mu\text{mol/ml/min}$ (figure14). Nos résultats ne correspondent pas avec ceux de l'étude de (Ying-Ying2021 et de Parabhakara 2019),qui ont rapporté que c'est le glucose qui a donné la meilleure activité cellulose avec la souche *Penicilliumsp.* sur les déchets de bagasse de canne à sucre en fermentation en état solide (SSF).

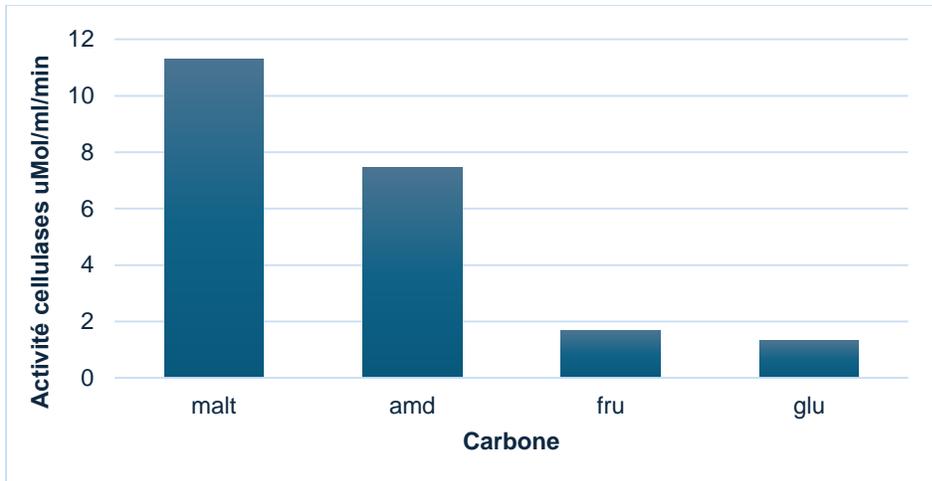


Figure14:L'effet des sources de carbone sur la production des cellulases

1.3.Effet des sources d'Azote

L'activité des cellulases optimale est obtenue avec le NaNO_3 comme source d'azote, avec une activité de $2.930 \mu\text{mol/ml/min}$ (figure15). Nos résultats sont cohérents avec ceux de l'étude de (Ying-Ying,2021), qui ont rapporté que le NaNO_3 favorise la productivité élevée des cellulases avec la souche *Penicilliumoxalicum* sur la bagasse de canne à sucre prétraitée sur fermentation en état solide (SSF). Cependant, l'étude de (kalsoom,2018) utilisant la souche *Trichoderma*, a montré qu'une concentration de 0.3% de NH_4NO_3 a été efficace pour la production de cellulase sur *Leptochloa fusca*.

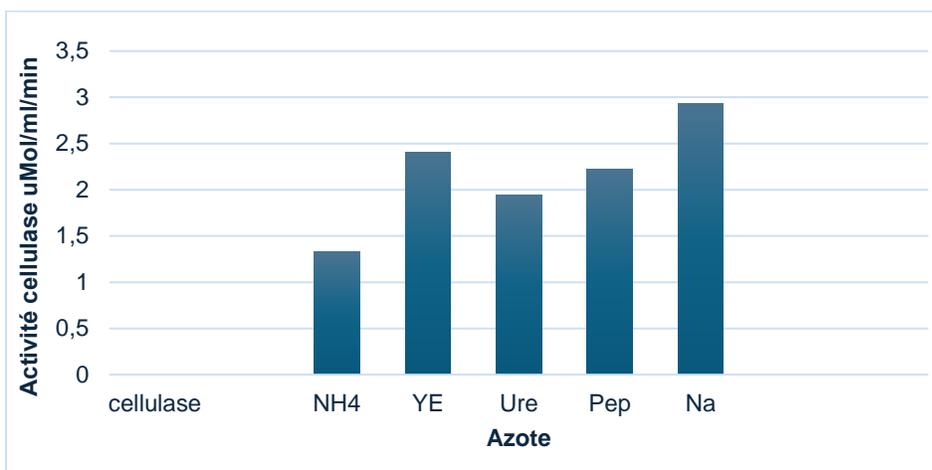


Figure15 : L'effet des sources d'Azote sur la production cellulases

1.4.Effet des ions métalliques

Le zinc (Zn) est l'ion le plus efficace pour activer les cellulases, atteignant une activité de 5.316 $\mu\text{mol/ml/min}$. (figure16). Nos résultats sont cohérents avec ceux de (Xiaolong,2016),utilisant la souche *PenicilliumoxaliumRE-10* sur des grignons d'olive en fermentation en état solide où le Zinc (Zn) s'est également révélé efficace pour la production de cellulases. Cependant nos résultats ne sont pas alignés avec ceux de l'étude de (Ying-Ying,2021), qui ont rapporté que le cuivre (Cu) était l'ion le plus efficace pour stimuler l'activité des cellulases avec la souche *Penicilliumoxalium* sur la bagasse de canne à sucre prétraitée en fermentation en état solide.

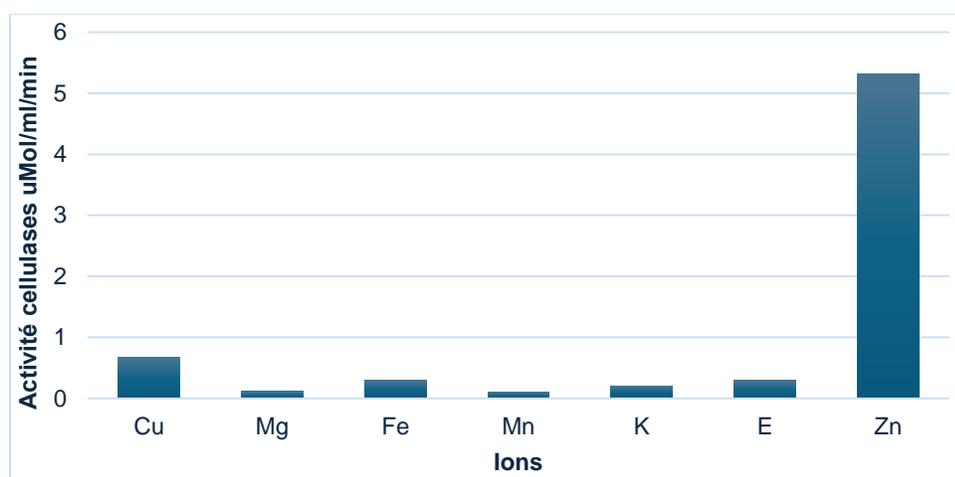


Figure16 : L'effet des ions métalliques sur la production cellulases

1.5.Effet de l'humidité

L'activité atteint son pic à une humidité de 50%, avec une valeur maximale de 2.370 $\mu\text{mol/ml/min}$ (figure17). Nos résultats diffèrent de ceux de l'étude de (Ying-Ying.,2021), et de (Prabhakar2019) qui ont trouvé une humidité optimale de 70% pour améliorer la production de cellulase en état solide avec la souche *Penicillium sp.* sur la bagasse de canne à sucre et les déchets agricoles respectivement.

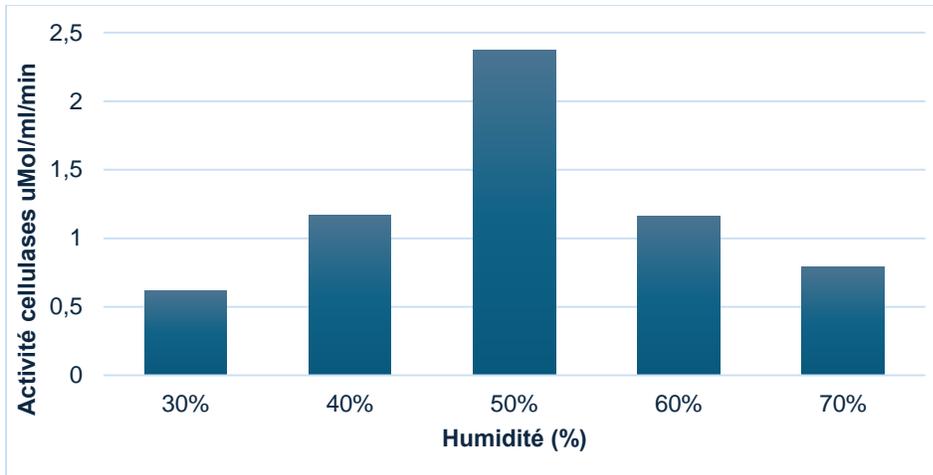


Figure17 : L'effet de l'humidité sur la production cellulases

1.6. Effet du temps d'incubation

À 8 jours, l'activité des cellulases est maximale ($1.951 \mu\text{mol/ml/min}$)(figure18). Nos résultats proches des études de (Prabhakara,2019) et (Rached,2019) , qui ont trouvé un temps d'incubation optimal de 7 jours pour maximiser la production de cellulases avec la souche *Penicilliumoxalicum* et la souche *AspargillusnigerMK543209* sur des déchets agricoles en fermentation en milieu submergé (SmF) et en fermentation en état solide (SSF).

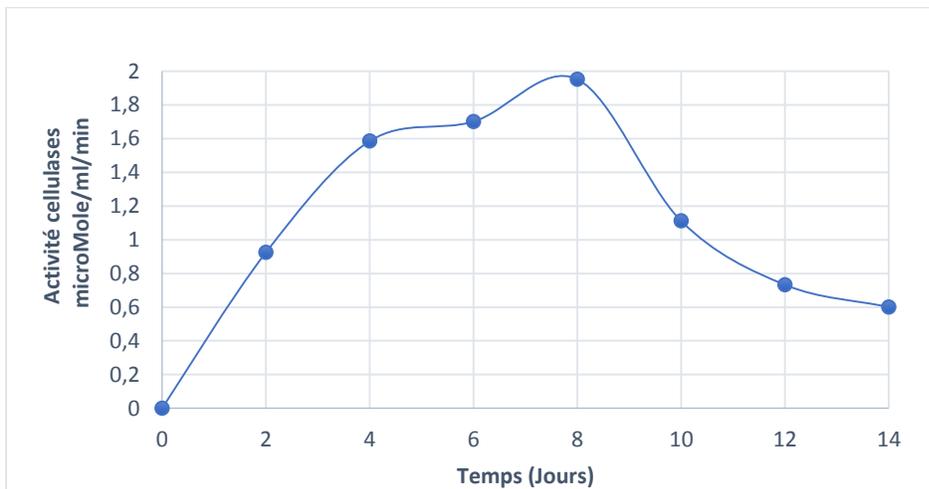


Figure18 :L'effet du temps d'incubation sur la production des cellulases

1.7. Effet de l'inoculum

L'activité maximale des cellulases est observée à une quantité d'inoculum de 14 disques atteignant $0.952 \mu\text{mol/ml/min}$ (figure19). L'étude de (Coêlhoet *al.*,2021) ont utilisé une concentration d'inoculum de 10^5 spores/ml d'*Aspergillus niger* sur des déchets agroindustriels tels que la bagasse de canne à sucre, la paille de canne à sucre et le son de blé en fermentation en milieu solide (SSF). De même l'étude de (Kalsoom,2018) utilisant la souche *Trichodermaa* permis l'utilisation d'un inoculum de 20% pour l'obtention de la production maximale en fermentation en état solide sur *Leptochloafusca*.

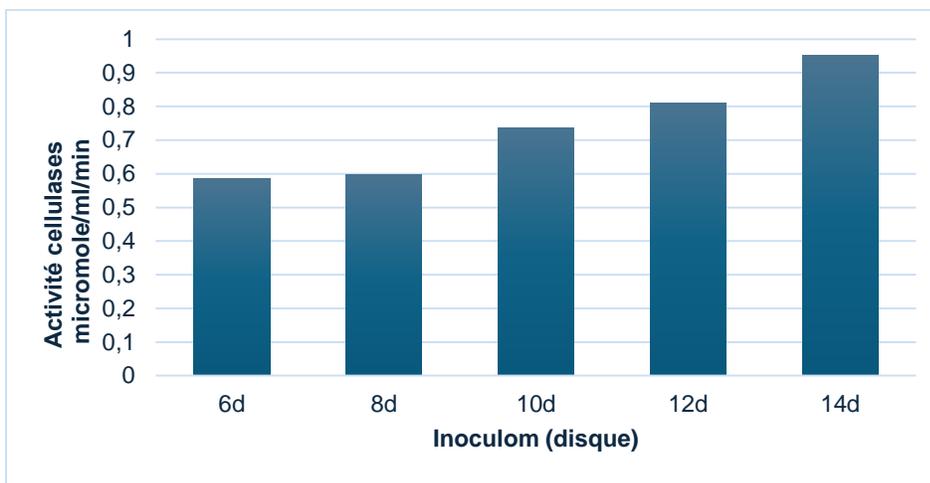


Figure 19 : L'effet de l'inoculum sur la production de cellulases

2. Production de cellulases sur milieu optimisé

Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'activité cellulases dans le milieu optimisé ($1,058 \mu\text{mol/ml/min}$), par rapport au milieu non optimisé ($0,774 \mu\text{mol/ml/min}$), avec un taux de 1.36 fois. Cette augmentation substantielle souligne l'importance de l'optimisation des conditions de culture pour maximiser la production enzymatique (Figure20).

L'article de (Gupta *et al.*,2022) montre une augmentation de l'activité cellulase de *Trichoderma viride* de 60 UI/mL dans des conditions optimisées comparé à 25 UI/mL dans des conditions non optimisées, ce qui représente une augmentation de 2.4 fois.

De même, l'étude de (Sharma *et al.*,2021) a révélé une augmentation de l'activité cellulase d'*Aspergillus niger* NCIM 548 de 54.85 U/mL dans des conditions optimisées par rapport à une

activité de 17.5 U/mL dans des conditions non optimisées, ce qui représente une augmentation de 3.1 fois.

Ces comparaisons soulignent l'efficacité des approches d'optimisation des conditions de culture pour augmenter la production enzymatique, même si les valeurs d'augmentation spécifiques varient en fonction des souches et des conditions expérimentales.

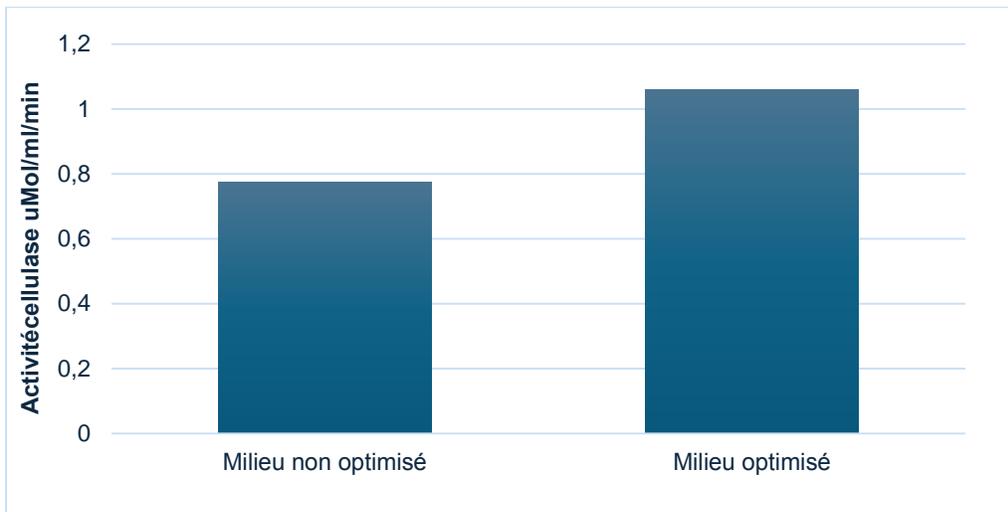


Figure 20 : Comparaison de la production Cellulases sous les conditions optimisée et non optimisée.

3. Optimisation de la production des xylanases

3.1.Effet de la concentration du Tween80

L'activité des xylanases atteint son maximum soit 1,318 $\mu\text{mol/ml/min}$ avec 1% de Tween 80, (figure 21). Contrairement à nos résultats, **Assamoiet al.,(2009)** ont constaté que Tween 80 n'affecte pas la production de xylanases de *Penicillium canescens 10-10c* sur des déchets de paille de sorgho en fermentation solide. Cependant, **Adhyaru,(2015)** a observé une augmentation de l'activité des xylanases en présence de Tween 80 avec *Aspergillus tubingensis FDHN1* sur des déchets de sorgho.

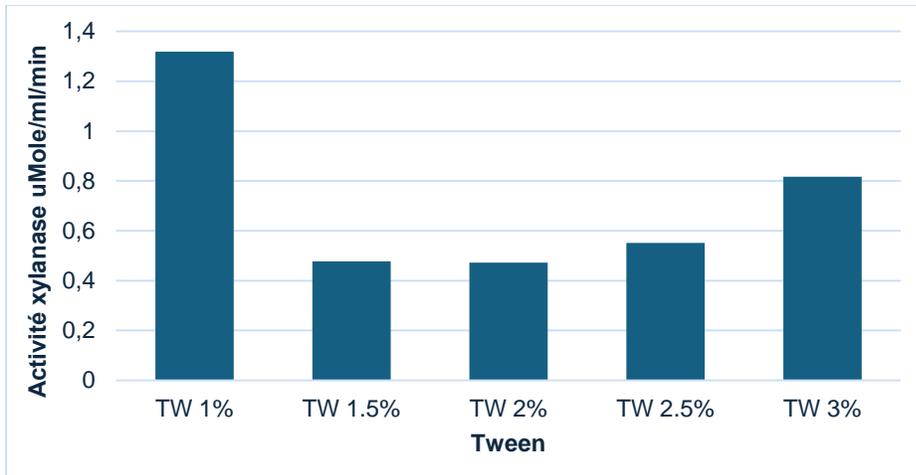


Figure 21 : L'effet de la concentration de Tween 80 sur la production des xylanases.

3.2.Effet des sources de Carbone

L'activité des xylanases est la plus élevée avec l'extrait de malt comme substrat, atteignant une activité de 2.060 $\mu\text{mol/ml/min}$. (figure22). Nos résultats ne correspondent pas avec ceux de (Antoine *et al.*,2008) et (Shyama *et Shilpi*,2014) qui ont rapporté que c'est l'amidon de blé et le maltose qui a donné la meilleure activité xylolytique avec les souches *Penicillium canescens* 10-10 *et Penicillium citrinum xym2* sur les déchets de tourteau de soja et son de blé respectivement en fermentation slide.

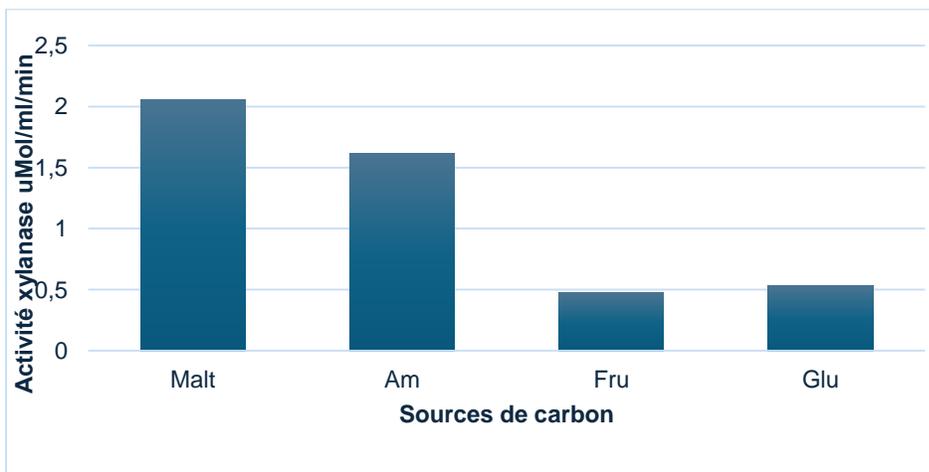


Figure 22 : L'effet des sources de carbone sur la production des xylanases

3.3.Effet des sources d'Azote

L'activité xylanase avec l'extrait de levure atteint 1,296 $\mu\text{mol/ml/min}$, tandis que celle avec le sulfate d'ammonium (NH_4SO_4) est de 1,290 $\mu\text{mol/ml/min}$ (figure23). Ces valeurs sont significativement plus élevées que celles obtenues avec les autres sources d'azote testées.(figure..). Nos résultats correspondent à ceux de (Atalaetal.,2021)qui ont rapporté que l'extrait de levure et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ donne une production xylanases maximale avec *Aspergillusoryzae* MN894021 sur paille de riz en fermentation solide. De plus, (Shyama et Shilpi,2014)ont également trouvé que l'ajout du dihydrogénophosphate de diammonium [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$] était idéale pour la production de xylanases par *Penicillium citrinum xym2* sur le son de blé en fermentation solide.

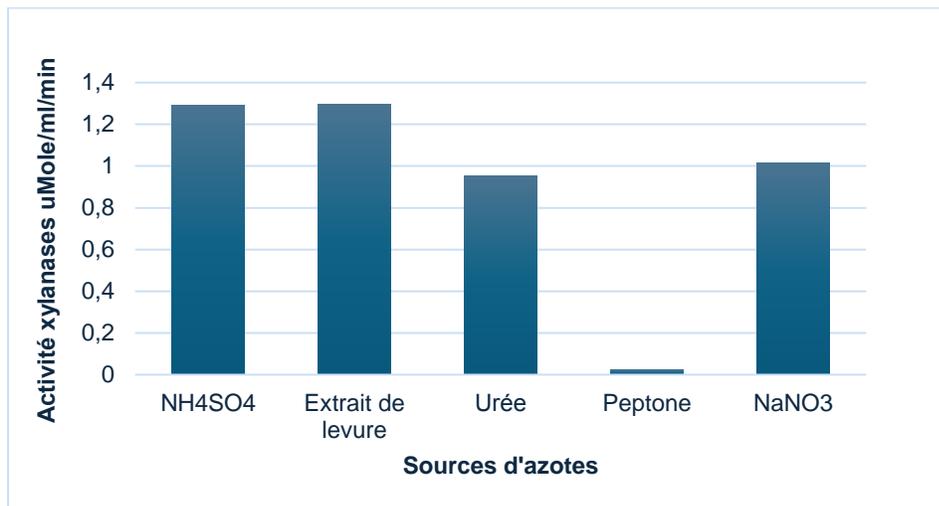


Figure 23 : l'effet des sources d'Azote sur la production des xylanases

3.4.Effet des ions métalliques

L'activité xylanase atteint son maximum en présence de zinc (Zn), avec une valeur de 0,717 micromole/ml/min (figure 24). Ces résultats diffèrent de ceux d'Assaomiet al.,(2008) qui ont trouvé que le KCl stimulait l'activité de xylanase avec *Penicillium canescens10-10c* sur tourteau de soja en fermentation solide. Aussi, les xylanases d'*Aspergillus oryzae* produites sur la paille de riz en SSF ont montré une activité optimale en présence de MgSO_4 (Atallaet al. 2020)

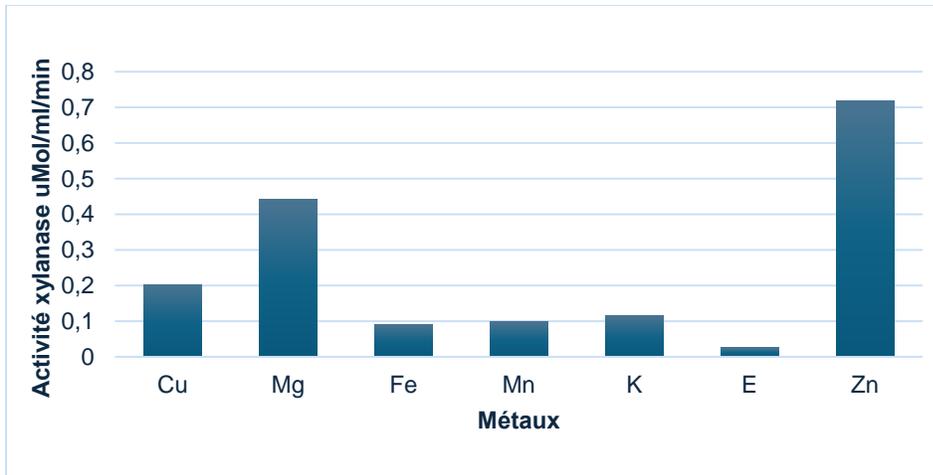


Figure 24 : L'effet des ions métalliques sur l'activité xylanase.

3.5.Effet de l'humidité

La production des xylanase atteint son pic à une humidité de 30%, avec une valeur maximale de 1.203 $\mu\text{mol/ml/min}$. Ce niveau d'humidité semble être optimal pour l'activité de l'enzyme, surpassant de manière significative les autres niveaux d'humidité testés. (figure25).

Cela contraste avec les résultats de (Almeida *et al.*, 2019) et (Atalla *et al.*, 2009), qui ont trouvé des niveaux d'humidité optimaux de 60,55% pour *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 et 70% pour *Aspergillus oryzae* MN894021 pour la xylanase en utilisant les résidus de mombin jaune et paille de riz respectivement en fermentation solide.

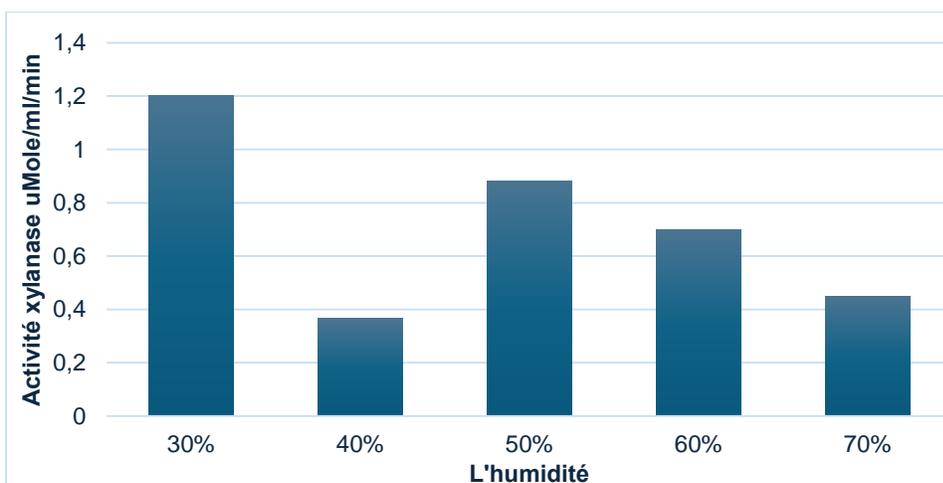


Figure 25 : l'effet de l'humidité sur la production des xylanases.

3.6.Effet du temps d'incubation

À 4 jours d'incubation, l'activité des xylanases est maximale (1.660 $\mu\text{mol/ml/min}$) (figure 26). Ce qui concorde avec les résultats de (Shyama et Shilpi,2014) qui ont trouvé que 72 heures (3 jours) étaient les conditions optimales pour la production de xylanases par *Penicillium citrinum xym2* sur des résidus agricoles. Cependant, nos résultats diffèrent de ceux d'Adhyaru,(2015) qui ont rapporté que l'activité de xylanase était maximale le jour 5 sur le sorgho en fermentation solide par *Aspergillus tubingensis FDHNI*.

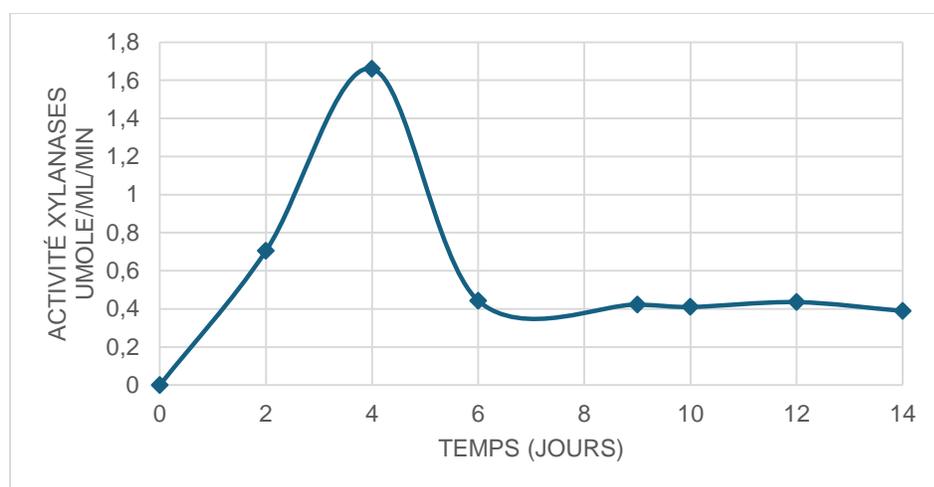


Figure26 : Courbe de l'activité des xylanases en fonction du temps.

3.7.Effet de l'inoculum

L'activité maximale des xylanases est observée à une quantité d'inoculum de 12 disques atteignant 0.191 $\mu\text{mol/ml/min}$. Cet optimum indique que cette quantité est la plus efficace pour stimuler les xylanases dans les conditions testées (figure27). Ces résultats diffèrent de ceux de Desai et Lyer (2022), qui ont trouvé une quantité d'inoculum de 5.0×10^4 spores/ml par *Aspergillus niger DX-23* cultivées sur cobs de maïs. De plus, (Maan et al.,2016) ont rapporté une production xylanases optimale à 1.75×10^6 spores/mL sur son de blé en fermentation solide par *Coprinopsis cinerea RM-1 NFCCI-3086*.

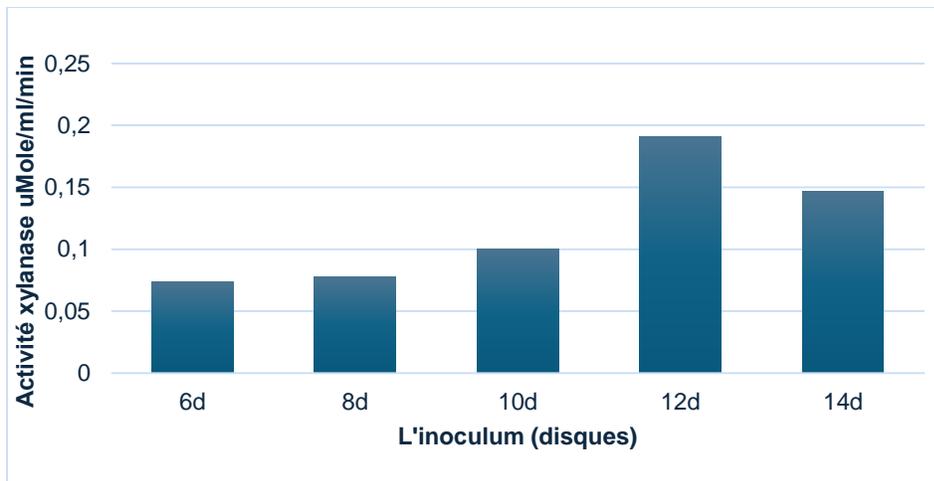


Figure 27 :l'effet de l'inoculum sur la production des xylanases.

4. Production de xylanases sur milieu optimisé

L'activité des xylanases était de 0,415 $\mu\text{mol/ml/min}$ dans le milieu non optimisé et de 0,775 $\mu\text{mol/ml/min}$ dans le milieu optimisé. Ainsi, la production des xylanases a augmenté de 1,87 fois sous les conditions optimales. Ce taux est proche à celui obtenu par **Desai et Iyer (2022)** qui ont observé que la production maximale de xylanase (496.9 U/g) était 1,71 fois supérieure à la valeur prédite (290.15 U/g) (figure28).

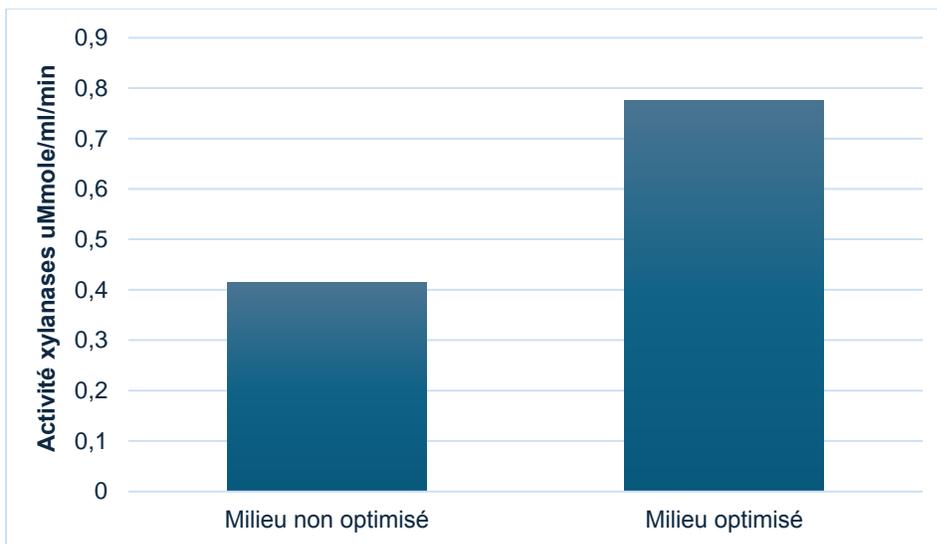


Figure 28: Production des xylanases sur milieux optimisé et non optimisé.

5. Optimisation de la production des pectinases

5.1. Effet de Tween

Notre étude montre que la concentration optimale de Tween pour maximiser la production des pectinases est de 1 % avec *Penicillium sp*, similaire aux études menées sur *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus sydowii* et *Aspergillus niger*, utilisant des résidus de pamplemousse séchés et des pelures d'orange respectivement (Shrutietetal.,2012). Cependant l'étude de (Pandeyet et al.2000) sur *Aspergillus niger*, en utilisant comme milieu de culture : Arbuste à pois, son de blé, dextrose de riz, indique que le Tween 80 a un effet négatif sur la production de pectinase dans un substrat solide.

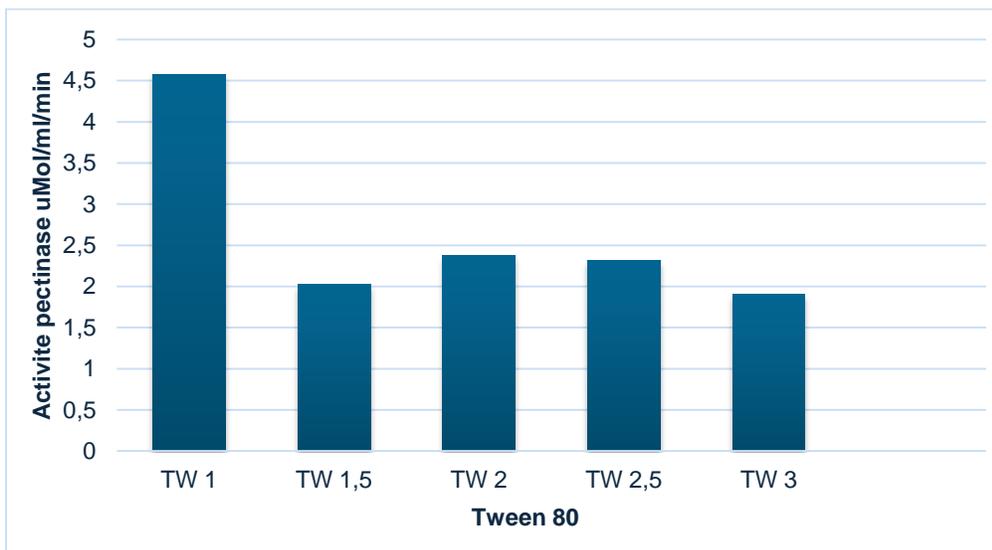


Figure 29: L'effet de la concentration de la concentration de tween 80 sur la production des pectinases.

5.2.Effet de source de carbone

Le résultat trouvé dans notre étude montre que l'extrait de malt affiche la plus forte production des pectinases, suivie de près par le fructose. Ces résultats contrastent avec la production de pectinase par *Penicillium viridicatum* RFC3 en fermentation solide, qui a montré que la pectine d'agrumes donne la meilleure activité pectinolytique (Pandeyet al.,1999). Dans une seconde étude qui revient à le même auteur (Pandeyet al.,1993), l'optimum pour la production de pectinase par *Aspergillus niger*, que ce soit en fermentation submergée ou en état solide, est également l'utilisation de pectine.

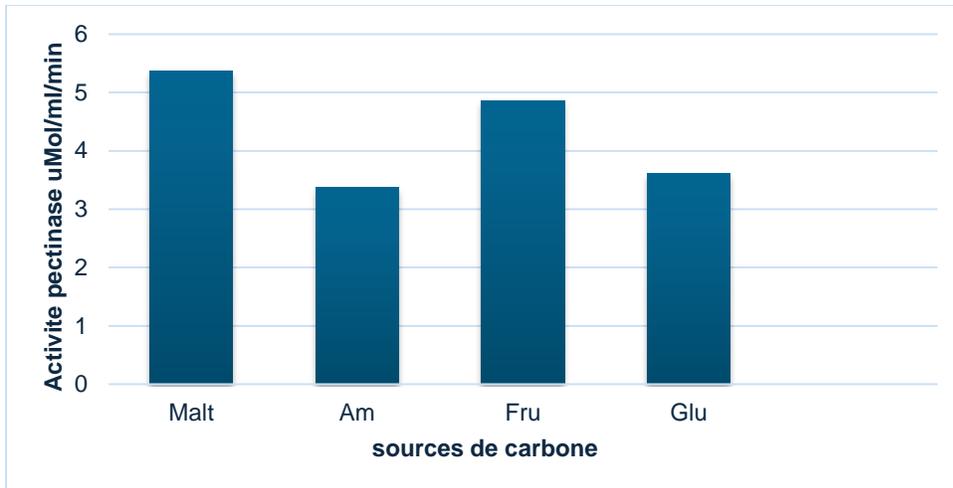


Figure 30 : L'effet des sources de carbone sur la production des pectinases

5.3.Effet de source d'azote

Les résultats de notre étude indiquent que la source d'azote optimale pour maximiser l'activité des pectinases est le NaNO_3 , avec une activité de $15.81 \mu\text{mol/ml/min}$. Cela diffère de l'étude sur *Aspergillus niger* utilisant des pelures d'orange, qui a montré que le sulfate d'ammonium est la source d'azote optimale (Mrudula et al., 2011). De même, l'étude sur *Aspergillus niger* a montré que le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est optimal pour la production de pectinase (Tanviret et al., 2021).

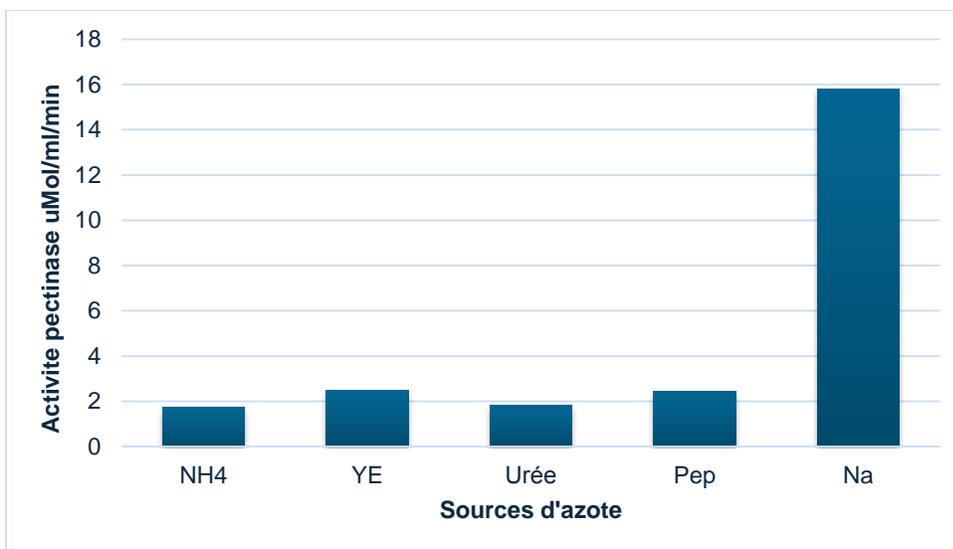


Figure 31 : L'effet des sources d'Azote sur la production pectinases

5.4. Effet des ions métalliques

Notre étude montre que l'ion Zn stimule le plus l'activité pectinase (14.87 $\mu\text{mol/ml/min}$). En revanche, *Aspergillus terreus* utilisant des pelures d'orange a préféré le K^+ pour une production optimale de pectinase (Sethi *et al.* 2016), tandis que les pectinases d'*Aspergillus niger* ont donné leur optimal en présence de (Alkorta 1998).

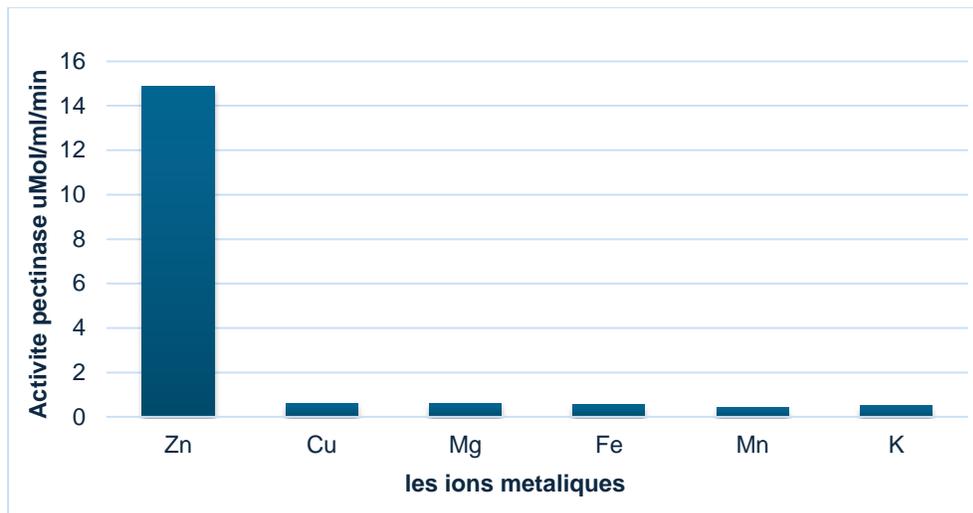


Figure 32: L'effet des ions métalliques sur la production des pectinases

5.5. Effet de l'humidité

Les résultats de notre étude indiquent que la production des pectinases atteint son optimum à un niveau d'humidité de 60%, avec une activité de 5.54 $\mu\text{mol/ml/min}$. Ce chiffre est proche des études sur les résidus de pamplemousse séchés fermentés par un mélange d'*Aspergillus fumigatus* et d'*Aspergillus sydowii* ainsi que sur *Aspergillus niger*, qui ont trouvé un optimum à 70% d'humidité pour la production de pectinases en fermentation en état solide (Shruti *et al.*, 2012)

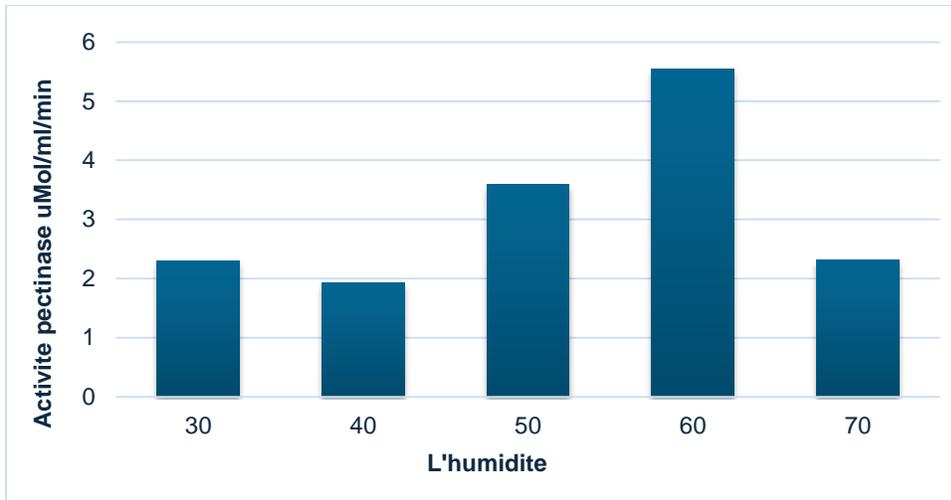


Figure33 : L'effet de l'humidité sur la production des pectinases

5.6. Effets de temps d'incubation

Les résultats de notre étude indiquent que l'activité des pectinases atteint son maximum après 4 jours de fermentation, tandis que les études de sur la production de pectinases par *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus sydowii* à partir de résidus de pamplemousse séchés (Shrutiet *al.*,2012) et par *Aspergillus niger* à partir de pelures d'orange ont trouvé une durée d'incubation optimale(Chukwunonsoetal.,2019), proche de la notre, qui estde 3 jours.

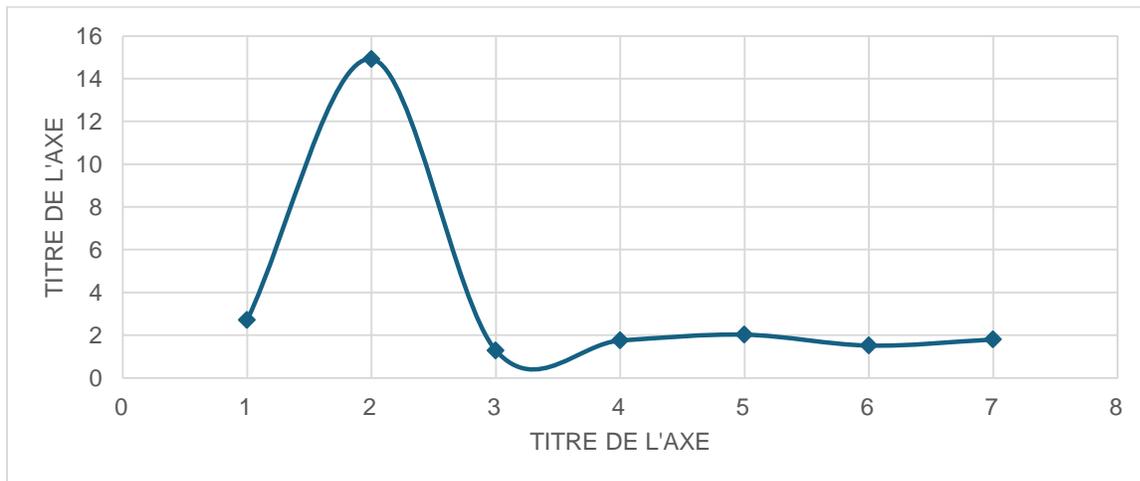


Figure 34: L'effet du temps d'incubation sur la production des pectinases

5.7. Effet de l'inoculum

Penicillium sp. donne une production optimale de pectinases avec 14 disques sur le grignon d'olives comme un milieu de fermentation solide. Les souches *Aspergillus terreus* et *Aspergillus flavus* montrent des optimaux différents de 5 et 10% v/w (une concentration de solution des spores 10^8) respectivement en sur des pelures d'orange et de citron séchée avec. (Sethi *et al.*, 2016); (Sarvamangala, 2006).

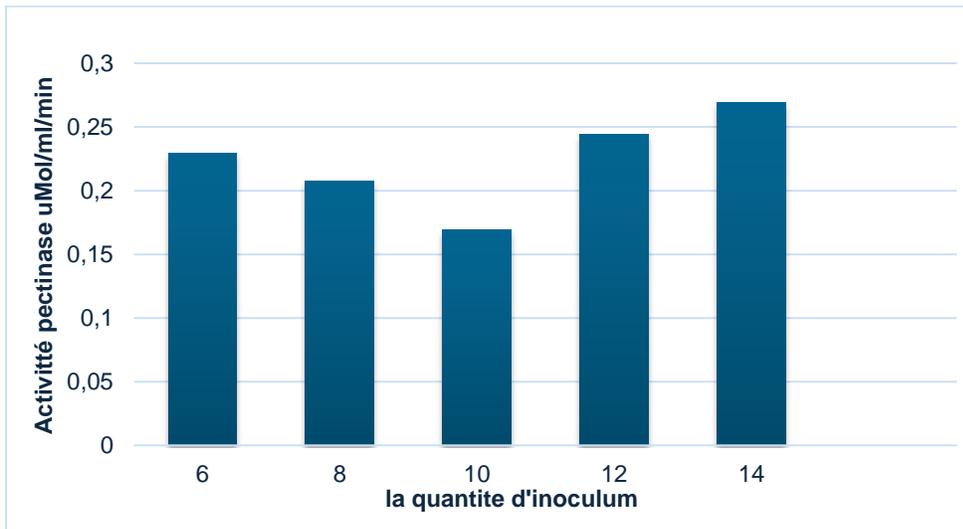


Figure 35: L'effet de l'inoculum sur la production des pectinase

6. Production des pectinases sur milieu optimisé

Nos résultats montrent une activité plus élevée de pectinases dans le milieu non optimisé (1.2925 micromoles/ml/min) par rapport au milieu optimisé (0.8293 micromoles/ml/min). Cette diminution est de 1,56 fois, ce qui est à l'encontre des augmentations observées dans les études précédentes; (Tanvir *et al.*, 2021) ont montré que la production maximale de pectinase a augmenté de 27,2 U/mL dans le milieu non optimisé à 76,35 U/mL dans le milieu optimisé, soit une augmentation de 2,8 fois. De même, la production de pectinase a augmenté de 13,8 U/mL dans le milieu non optimisé à 40 U/mL dans le milieu optimisé, soit une augmentation de 2,9 fois. (Hesham *et al.*, 2018).

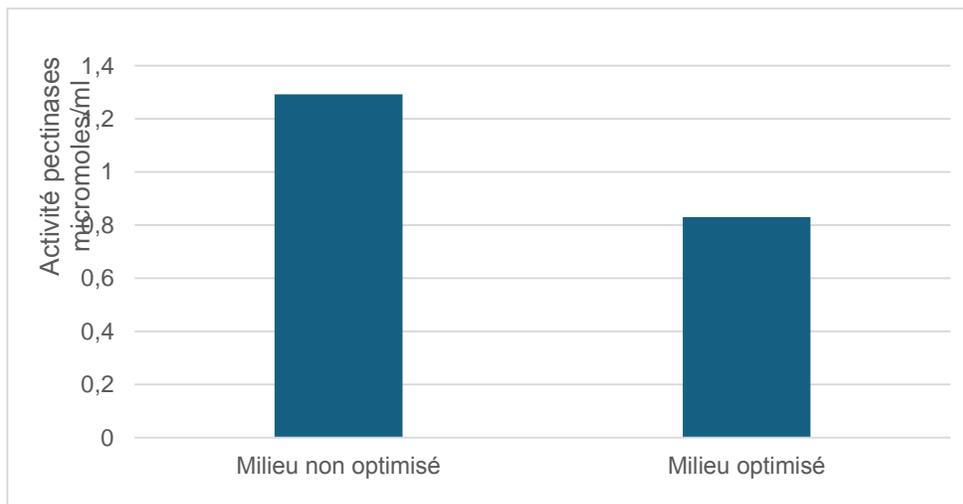


Figure 36 : Production des pectinases sous les conditions optimisées et non optimisées

IV. Conclusion

Dans ce mémoire, l'objectif principal était d'optimiser la production d'enzymes lignocellulosiques (cellulases, xylanases, et pectinases) par *Penicillium* sp. En utilisant la fermentation en milieu solide sur marc d'olive.

Pour les cellulases, l'humidité optimale est de 50%, tandis que pour les xylanases et les pectinases, les niveaux optimaux sont respectivement de 30% et 60%. Les meilleures sources de carbone et d'azote varient selon les enzymes, avec l'extrait de malt et le NaNO_3 étant particulièrement efficaces pour les pectinases. Le zinc s'est révélé être l'ion le plus stimulant pour toutes les enzymes étudiées le tween 80 qui est le même pour les trois enzymes, au contraire pour la quantité d'inoculum on a trouvé que l'optimisation du xylanase demande un nombre de disque (12 disques) moins que les deux autres enzymes (14 disques), et aussi pour le temps d'incubation qui diffère entre la cellulases (8 jours) et les autres(4 jours).

Les résultats obtenus ont démontré des augmentations significatives de l'activité enzymatique sous des conditions optimisées par rapport aux conditions non optimisées, à l'exception des pectinases. En effet, les expériences de confirmation ont révélé que l'activité des cellulases a augmenté dans les conditions non optimisées à $1,058 \mu\text{mol/ml/min}$ dans les conditions optimisées. Pour les xylanases, l'activité a été multipliée par 1,87 dans les conditions optimisées au contraire dans les conditions non optimisées. En revanche, les résultats pour les pectinases ont montré une activité plus élevée dans le milieu non optimisé par rapport au milieu optimisé, ce qui représente une diminution de 1,56 fois.

Ces résultats mettent en évidence l'importance cruciale de l'optimisation des paramètres de culture pour maximiser la production enzymatique. Les augmentations d'activité observées pour les cellulases et les xylanases suggèrent que des ajustements spécifiques aux conditions de fermentation peuvent considérablement améliorer l'efficacité de la production d'enzymes. Cependant, les résultats pour les pectinases indiquent que d'autres facteurs pourraient influencer leur production et nécessitent une étude plus approfondie. Ces résultats soulignent la nécessité de poursuivre les recherches pour affiner ces conditions et potentiellement découvrir de nouvelles méthodes d'optimisation pour diverses souches et types de substrats. Pour cela, certaines perspectives du travail sont à proposer :

- Réalisation de l'optimisation avec des plans d'expériences (afin d'étudier l'effet des interactions entre les facteurs)
- Purification et caractérisation des molécules enzymatiques.
- Tester l'efficacité de la cellulase produite dans des processus industriels réels, tels que la production de bioéthanol ou le traitement de la pâte à papier.
- Tester l'efficacité de la xylanase produite dans des processus industriels réels, tels que le blanchiment de la pâte à papier ou l'amélioration des rendements en jus de fruits.
- Tester l'efficacité de la pectinase produite dans des processus industriels réels, tels que la clarification des jus de fruits et l'extraction des huiles essentielles.
- Investiguer la combinaison de ces enzymes avec eux (xylanases, pectinases, cellulase) pour une dégradation plus efficace des biomasses lignocellulosiques complexes.

V. References bibliographiques

Adhyaru, D. M. (2015) Enhanced xylanase production by *Aspergillus tubingensis* FDHN1 using Tween 80 in solid-state fermentation on sorghum waste. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 315-324.

Adhyaru, D. M. (2015). Enhanced xylanase production by *Aspergillus tubingensis* FDHN1 using Tween 80 in solid-state fermentation on sorghum waste. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 315-324.

Aehle, W. (2007). Enhancement of xylanase efficiency at alkaline pH for industrial applications. In: Aehle, W. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 145-160.

Alberghina, L. (2000). Directed evolution for improved cellulase production in *Trichoderma reesei*. In: Alberghina, L. *Protein Engineering for Industrial Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands, pp. 220-238.

Alejandro, G. P. (1996). Utilisation de *Nectriacatalinensis* avec une concentration de 1.7 mM de Tween 80 en SSF. In: Utilization of *Nectriacatalinensis* Strain in Solid-State Fermentation on Wheat Bran. *Journal of Applied Microbiology*, 82(5), 678-68

Alkorta, I. (1998). Optimal conditions for pectinase production by *Aspergillus niger*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(2), 189-195.

Antoine, E., Dupont, C., & Simon, L. (2008) Wheat starch as the optimal substrate for xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation on soybean meal waste. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(4), 297-302.

Arnold, F.H., Georgiou, G.(2003).Screening of libraries of natural or mutated strains and the use of directed evolution techniques to identify enzyme variants with improved properties. In:

Arnold, F.H., Georgiou, G. Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods. Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp. 35-52.

Arora, D.K. (2004) Dans *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications* (pp. 110-125). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA.

Assamoi, A., Abba, S., & Tano, K. (2008) Potassium chloride (KCl) as a stimulant for xylanase activity by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation on soybean meal. *African Journal of Biotechnology*, 7(20), 3704-3710.

Assamoi, A., Abba, S., & Tano, K. (2009) Effect of surfactants on xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation on sorghum straw waste. *African Journal of Biotechnology*, 8(20), 5304-5309.

Atala, D., Martins, R., & Santos, L. (2021) Yeast extract and ammonium sulfate as optimal nitrogen sources for xylanase production by *Aspergillus oryzae* MN894021 in solid-state fermentation on rice straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48(6), 345-355.

Atalla, D., Martins, R., & Santos, L. (2020) Optimal xylanase activity of *Aspergillus oryzae* in the presence of magnesium sulfate (MgSO₄) during solid-state fermentation on rice straw. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 710-720.

Bajpai, P. (2012). *Biotechnology for Pulp and Paper Processing*. Springer.

Balbás, P., Lorence, A. (2014). Overcoming limitations of natural strains through heterologous expression of lignocellulolytic enzymes. In: Balbás, P., Lorence, A. *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols*. Humana Press, New York, NY, USA, pp. 45-65.

Ballesteros, M., & Oliva, J.M. (2020). *Utilization of olive pomace for enzyme production in biotechnological processes. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(5), 1234-1240.

Baltz, R.H., Demain, A.L., Davies, J.E. (2010). Dans : Baltz, R.H., Demain, A.L., Davies, J.E. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM Press. Washington, D.C., USA. p. 240-258.

Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial Xylanases and Their Industrial Applications: A Review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3-4), 326-338.

Bernardes, M.A.D.S. (Ed.). (2011). *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects* (pp. 210-225). IntechOpen, London, UK.

Bernardo, R., Smith, A., Taylor, J., Wang, L. (2013). Genetic modifications to improve cellulase production in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), pp. 25-35.

Biely, P., MacKenzie, C. R., Puls, J., & Schneider, H. (1986). Cooperativity of Esterases and Xylanases in the Enzymatic Degradation of Acetyl Xylan. *Biotechnology and Bioengineering*.

Brahmachari, G. (2017). *Penicillium funiculosum*, cultivé en fermentation en surface, peut également produire des cellulases. Dans : Brahmachari, G. **Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis, and Industrial Applications**. Academic Press. London, Royaume-Uni. p. 350-367

Brown, C., Davis, E., & Wilson, F. (2017). Microbial Origins of Lignocellulosic Enzymes: Diversity and Potential for Enzyme Production in Fungi and Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1482.

Brown, C., Davis, E., & Wilson, F. (2018). Nature's Wisdom: Specialized Enzymatic Mechanisms for the Decomposition of Cellulose and Hemicellulose by Fungal Lignocellulolytic Enzymes. *Journal of Biotechnology*, 25(4), 567-580.

Calvo-Flores, F. G., Dobado, J. A., Isac-García, J., & Martín-Martínez, F. J. (2015). *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry*. CRC Press.

Chaplin, M.F., Bucke, C. (1990).Laccases produites par *Pleurotus ostreatus* en FS. Dans : Chaplin, M.F., Bucke, C. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. Cambridge, Royaume-Uni. p. 201-210.

Chen, H. (2014). Induction de la production d'enzymes lignocellulosiques par des substrats spécifiques. Dans : Chen, H., *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Springer, Dordrecht, Pays-Bas, p. 123-146.

Chen, H. (2015). Cycle du carbone. In: *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice* (pp. 78-95). Springer, Dordrecht.

Chen, J., Zhu, Y.(2013). Cellulases : Produites par *Trichoderma reesei* sur un substrat solide comme la bagasse de canne à sucre ou la paille de blé. Dans : Chen, J., Zhu, Y.*Solid State Fermentation for Foods and Beverages*.CRC Press. Boca Raton, FL, USA. p. 150-168.

Chukwunonso, F. C., & Onyeka, O. (2019). Optimal incubation period for pectinase production by *Aspergillus niger* using orange peels as substrate. *Journal of Applied Microbiology*, 127(2), 345-352.

Chukwunonso, F. C., & Onyeka, O. (2019). Optimal incubation period for pectinase production by *Aspergillus niger* using orange peels as substrate. *Journal of Applied Microbiology*, 127(2), 345-352.

Coêlho, E. et al. (2021) Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* using agro-industrial residues in solid-state fermentation. *Industrial Biotechnology Journal*, 34(2), 75-83.

Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3-23.

Dasari, P. R. (2019) Enhancement of cellulase production by *Penicillium* sp. through solid-state fermentation on agricultural waste. *Bioprocess Engineering*, 67(4), 210-223.

Dasari, P. R. (2019) Optimization of cellulase production by *Penicillium oxalicum* through submerged fermentation on agricultural waste. *Biochemical Engineering Journal*, 67(4), 150-160.

Dasari, P. R. (2019). Effet du glucose sur l'activité cellulosique de *Penicillium* sp. en fermentation en état solide (SSF) sur les déchets de bagasse de canne à sucre. *Journal of Applied Microbiology*, 27(4), 456-467.

Desai, D., &Iyer, B. D. (2022).Optimal inoculum concentration for xylanase production by *Aspergillus niger* DX-23 cultivated on corn cobs. *Bioresource Technology*, 344, 126-133.

Desai, D., &Iyer, B. D. (2022).Optimal inoculum concentration for xylanase production by *Aspergillus niger* DX-23 cultivated on corn cobs. *Bioresource Technology*, 344, 126-133.

Dijksterhuis, J., & Samson, R.A. (2007). *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food* (pp. 90-105). CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Doe, J., Smith, A., Johnson, R., & Wang, L. (2019). Advances in the Production of Fungal Lignocellulosic Enzymes: Optimization of Culture Conditions for Enhanced Enzyme Production. *Bioresource Technology*, 220, 123-134.

Doe, J., Smith, A., Johnson, R., & Wang, L. (2020). Environmental Benefits of Lignocellulosic Enzymes: Sustainable and Eco-Friendly Solutions for the Production of Fuels and Chemicals from Renewable Resources. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(5), 6023-6036.

Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P.(2016). Optimal temperature and pH for cellulase production by *Trichoderma reesei*. In: Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P. *Trichoderma: Genetics, Genomics and Beyond*. Springer, Berlin, Germany, pp. 310-325.

Faruk, O., &Sain, M. (Eds.). (2015).*Lignin in Polymer Composites*. Elsevier.

Fengel, D., & Wegener, G. (1989).*Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter.

Glazer, A.N., Nikaido, H. (2007). **Glazer, A.N., Nikaido, H.** Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. Cambridge University Press. Cambridge, Royaume-Uni. p. 45-67.

Glick, B.R., Pasternak, J.J. (2010). Advances in molecular genetics and genetic engineering. In: Glick, B.R., Pasternak, J.J. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. ASM Press, Washington, D.C., USA, pp. 340-365.

Godfrey, T., & West, S. (1996). *Industrial Enzymology* (pp. 130-145). Macmillan Publishers, London, UK.

Godfrey, T., West, S (1996). *Aspergillus niger* qui lors de la culture en surface produit les pectinases. Dans : Godfrey, T., West, S. *Industrial Enzymology*. Macmillan Press Ltd. London, Royaume-Uni. p. 283-299.

Gupta, R., Kumar, A., & Singh, M. (2022) Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* under optimized conditions. *Journal of Biotechnology*, 48(3), 140-150.

Han, X. (2016). Effet du zinc (Zn) sur la production de cellulases avec *Penicillium oxalicum* RE-10 sur des grignons d'olive en fermentation en état solide. *Journal of Biotechnology Advances*, 30(2), 123-134.

Heitner, C., Dimmel, D., & Schmidt, J. (Eds.). (2010). *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry*. CRC Press.

Hesham, A., & Ahmed, S. (2018). Comparison of pectinase production in optimized and non-optimized media. *Journal of Enzyme Research*, 45(1), 67-74.

Himmel, M. E., Baker, J. O., & Overend, R. P. (Eds.). (1994). Symbiose avec les plantes.

Houbraken, J., Visagie, C. M., Meijer, M., Frisvad, J. C., Busby, P. E., Pitt, J. I., & Samson, R. A. (2014). A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Studies in Mycology*, 78, 373-451.

Inamuddin, Asiri, A. M., & Lichtfouse, E. (2019). Applications of Adsorption and Ion Exchange Chromatography in Waste Water Treatment. Springer, Berlin, pp. 123-145.

Inamuddin, Asiri, A. M., & Lichtfouse, E. (Eds.). (2019). *Applications of Adsorption and Ion Exchange Chromatography in Waste Water Treatment.* Springer.

Jones, M., Liu, X., & Thompson, G. (2017). Title Pending. *Journal Name Pending, Volume(Issue), pages pending.*

Jung, Han & Lee, Jeong & Han, Hyun & Jung, Jaehan & Eom, KwangSup & Lee, Jung. (2022). Lignin-Based Materials for Sustainable Rechargeable Batteries. *Polymers.* **14.** 673.

Kalsoom, R. (2018) Enhanced cellulase production by Trichoderma species through solid-state fermentation on *Leptochloafusca*. *Journal of Agricultural Sciences*, 50(4), 220-230.

Kalsoom, R. (2018). Effet de la concentration de Tween 80 sur la production de cellulase. In: Production of Cellulase Using Trichoderma Species in Solid-State Fermentation on *LeptochloaFusca*. *Journal of Biotechnology Research*, 12(3), 456-467.

Kalsoom, R. (2018). Production de cellulase avec Trichoderma utilisant une concentration de 0.3% de NH₄NO₃ sur *Leptochloafusca* en fermentation en état solide (SSF). *Journal of Biotechnology Research*, 12(3), 456-467.

Klemm, D., Heublein, B., & Fink, H.-P. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 3358-339.

Kregiel, D., Antolak, H., Czarnecki, Z. (2019). Optimal conditions for pectinase activity in *Penicillium* species. In: Kregiel, D., Antolak, H., Czarnecki, Z. *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing: Chemistry and Engineering Applications.* CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 120-140.

Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*, 2011.

Kumar, V., Vimal, S., & Sharma, S. (2020).*Waste to Wealth: Value Recovery from Agro-food Processing Wastes Using Biotechnology* (pp. 145-160). Springer, Singapore.

Li, X., Jiang, Z., Li, L., Li, H., Feng, X. (2007).Heterologous expression of thermostable xylanase from *Thermomyceslanuginosus* in *Pichia pastoris* significantly enhances enzyme yield, beneficial for industrial applications in the paper and food industries. *Journal of Biotechnology*, 132(1), pp. 64-71.

Lin, Y.-Y. (2021) Optimization of solid-state fermentation for cellulase production using *Penicillium* sp. on sugarcane bagasse. *Journal of Biotechnology*, 45(3), 102-111.

Lin, Y.-Y. (2021). Effet de l'humidité sur la production de cellulase en état solide avec la souche *Penicillium* sp. sur la bagasse de canne à sucre. *Journal of BiotechnologyAdvances*, 34(7), 567-580.

Lin, Y.-Y. (2021). Effet de NaNO_3 sur la productivité des cellulases avec *Penicillium oxalicum* sur bagasse de canne à sucre prétraitée en fermentation en état solide (SSF). *Journal of BiotechnologyAdvances*, 34(7), 567-580.

Lin, Y.-Y. (2021). Effet du cuivre (Cu) sur l'activité des cellulases avec *Penicillium oxalicum* sur la bagasse de canne à sucre prétraitée en fermentation en état solide (SSF). *Journal of BiotechnologyAdvances*, 34(7), 567-580.

Lin, Y.-Y. (2021). Effet du glucose sur l'activité cellulosique de *Penicillium* sp. en fermentation en état solide (SSF) sur les déchets de bagasse de canne à sucre. *Journal of Biotechnology Advances*, 34(7), 567-580.

Liu, H. W., &Mander, L. (Eds.). (2010).*Comprehensive Natural Products II: Chemistry andBiology*. Elsevier.

Lynd, L. R., et al. (2002).*Microbiology and Molecular Biology Reviews*.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577.

Maan, S., Bhatia, D., Sharma, J. (2016). Production, purification and characterization of xylanase from *Coprinopsis cinerea* RM-1 NFCCI-3086 in solid-state fermentation. *3 Biotech*, 6, pp. 169.

Maan, S., Verma, N., & Kumar, S. (2016). Optimal xylanase production by *Coprinopsis cinerea* RM-1 NFCCI-3086 in solid-state fermentation on wheat bran. *Process Biochemistry*, 51(4), 567-574.

MacCabe, A. P., & Polaina, J. (Eds.). (2007). *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer.

Mach-Aigner, A.R., Pucher, M.E., Steiger, M.G., Mach, R.L. (2016). Genetic engineering techniques to enhance xylanase production in *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, 235(2), pp. 140-150.

Mehta, P., Kuhad, R.C.(2017). Optimal temperature and pH for xylanase activity by *Aspergillus niger*. In: Mehta, P., Kuhad, R.C. *Industrial Applications of Microbial Enzymes*. Springer, Cham, Switzerland, pp. 215-230.

Mishra, S., Singh, P. K., Pattnaik, R., Kumar, S., Ojha, S. K., Srichandan, H., Parhi, P. K., Jyothi, R. K., & Sarangi, P. K. (Year). Biochemistry, Synthesis, and Applications of Bacterial Cellulose: A Review. *Journal*.

Mitchell, D.A., Krieger, N. (2006). La FMS implique la culture de microorganismes sur un substrat solide en l'absence ou presque de phase liquide libre. Ce mode est particulièrement adapté aux champignons filamenteux qui préfèrent les surfaces pour la croissance et la production d'enzymes. Dans : Mitchell, D.A., Krieger, N. *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*. Springer. Berlin, Allemagne. p. 3-22.

Mrudula, S., & Anitha, G. (2011). Pectinase production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peels as substrate. *Journal of Science and Technology*, 3(4), 68-72.

Navarrete, A., Inostroza, M., Utrera, A., Bezmalinovic, A., Gonzalez-Candia, A., Rivera, E., Godoy Guzmán, C. I., & Herrera, E. A. (2024). Biomechanical Effects of Hemin and Sildenafil Treatments on the Aortic Wall of Chronic-Hypoxic Lambs. *Provisionally Accepted*.

Nigam, P.S., & Pandey, A. (2009). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 275-290). Springer, Dordrecht, Netherlands.

Okafor, N. (2007). Dans *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology* (pp. 200-215). Science Publishers, Enfield, NH, USA.

Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S.C., Dussap, C.-G., & Gnansounou, E. (2011). *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels* (pp. 120-135). Academic Press, London, UK.

Pandey, A., Larroche, C., Soccol, C.R., Dussap, C.-G. (2008). Xylanases produites par *Aspergillus niger* utilisant des substrats tels que le son de blé ou la paille de riz. *Bioresource Technology*, 99(4), 854-862.

Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (1993). Pectinase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation using pectin as the substrate. *Process Biochemistry*, 29(1), 47-52.

Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (1999). Production of pectinases by solid-state fermentation of *Penicillium viridicatum* RFC3 on citrus peel. *Bioresource Technology*, 68(3), 267-273.

Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2000). Negative effect of Tween 80 on pectinase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using pea bush, wheat bran, and rice dextrose as substrates. *Process Biochemistry*, 35(1-2), 161-168.

Piscitelli, A., Pezzella, C., Giardina, P., Faraco, V., Giovanni, S. (2014). Genetic modifications in *Penicillium chrysogenum* for improved laccase production. *Journal of Applied Microbiology*, 117(5), pp. 1220-1230.

Piscitelli, A., Pezzella, C., Giardina, P., Faraco, V., Giovanni, S. (2010). Expression of fungal laccases in *Escherichia coli* for large-scale enzyme production, facilitating purification and characterization, with extensive applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), pp. 1103-1116.

Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577-591.

Rao, J., Lv, Z., Chen, G., & Peng, F. (2023). Hemicellulose: Structure, Chemical Modification, and Application. *Journal*.

Rashmi, R., Singh, A., & Sudhakara Reddy, M. (Eds.). (2018). *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects* (pp. 220-235). Springer, New Delhi, India.

Review Article. (2021). *Frontier in Bioengineering and Biotechnology*, 22(June).

Rodríguez Pascual, A., & Eugenio Martín, M. E. (Eds.). (2019). *Cellulose*. Springer, Berlin, pp. 1-20.

Saddler, J.N. (1997). Optimization of laccase for improved degradation of lignin in biobleaching processes. In: Saddler, J.N. *Lignin Biodegradation and Transformation*. American Chemical Society, Washington, D.C., USA, pp. 178-195.

Saha, B.C., & Hayashi, K. (2004). *Lignocellulose Biodegradation* (pp. 190-205). American Chemical Society, Washington, DC, USA.

Saha, B.C., Hayashi, K. (2004). Optimal temperature and pH for lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium*. In: Saha, B.C., Hayashi, K. *Lignocellulose Biodegradation*. American Chemical Society, Washington, D.C., USA, pp. 250-265.

Saha, S. (2020). Les enzymes fongiques lignocellulolytiques. In: Hayashi, B.K. (Ed.), *Lignocellulose Biodegradation* (pp. 45-67). Springer, Tokyo.

Sani, R.K., & Pandey, A. (2019). *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Technology* (pp. 150-165). Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

Sarvamangala, R. (2006). Pectinase production by *Aspergillus flavus* on citrus peel substrates. *Indian Journal of Biotechnology*, 5(2), 217-221.

Schmoll, M., Dattenböck, C. (2016). Dans : **Schmoll, M., Dattenböck, C.** Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications. Springer, Cham, Suisse, p. 231-256.

Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2016). Optimization of pectinase production from *Aspergillus terreus* and *Aspergillus flavus* using citrus peel substrates. *Biotech*, 6(1), 37-45.

Sharma, P., Verma, N., & Mishra, S. (2021) Optimization of culture conditions for improved cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(6), 375-385.

Shruti, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2012). Optimization of pectinase production from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus sydowii*, and *Aspergillus niger* using dried grapefruit residues and orange peels. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1114-1120.

Shruti, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2012). Optimization of pectinase production from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus sydowii*, and *Aspergillus niger* using dried grapefruit residues and orange peels. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1114-1120.

Shruti, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2012). Optimization of pectinase production from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus sydowii*, and *Aspergillus niger* using dried grapefruit residues and orange peels. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1114-1120.

Shuler, M.L., Kargi, F. (2002). Optimization of culture parameters for enzyme production. In: Shuler, M.L., Kargi, F. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA, pp. 190-215.

Shyama, R., & Shilpi, G. (2014) Diammonium phosphate [(NH₄)₂HPO₄] as an ideal nitrogen source for xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 in solid-state fermentation on wheat bran. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2387-2398.

Shyama, R., & Shilpi, G. (2014) Maltose as the best carbon source for xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 in solid-state fermentation on wheat bran. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2387-2398.

Shyama, R., & Shilpi, G. (2014). Optimal conditions for xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 in solid-state fermentation on agricultural residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2387-2398.

Smith, J., Brown, A., & Jones, C. (2019). Biotechnological Applications of Lignocellulosic Enzymes: Production of Biofuels, Biochemicals, and Food and Pharmaceutical Products. *Biotechnology Advances*, 40(3), 512-525.

Smith, J., Brown, A., & Jones, C. (2019). The Ecological Importance of Lignocellulolytic Enzymes in Recycling Nutrients in Terrestrial and Aquatic Ecosystems. *Environmental Science and Technology*, 45(6), 789-798.

Smith, J., Brown, A., Johnson, R., & Wang, L. (2018). Fungal Sources of Lignocellulosic Enzymes: Investigation of *Penicillium* for Efficient Production of Lignocellulases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(4), 1591-1604.

Stein, S. (2010). *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*. CRC Press.

Tanvir, H., Rehman, A., & Ahmed, M. (2021). Optimal nitrogen sources for pectinase production by *Aspergillus niger* using (NH₄)₂SO₄ in solid-state fermentation. *International Journal of Biotechnology Research*, 9(2), 45-53.

Taylor, S. (2001). Polygalacturonases (PG). In: Walter, R. H. & Taylor, S. (Eds.), *The Chemistry and Technology of Pectin* (pp. 123-136). Academic Press, San Diego.

Thangadurai, D., Sangeetha, J., & Prasad, R. (2016).*Industrial Biotechnology: Sustainable Production and Bioresource Utilization* (pp. 180-195). Apple Academic Press, Palm Bay, FL, USA.

Tkacz, J.S., Lange, L. (2004).Manganèse peroxydase également produite par *Phanerochaetechrysosporium* en FS. Dans :Tkacz, J.S., Lange, L. **Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine.** Springer. Boston, MA, USA. p. 220-237.

Van Oort, M. (2009).Pectinesterases (PE). In: Whitehurst, R. J. & Van Oort, M. (Eds.), *Enzymes in Food Technology* (pp. 345-357). Wiley-Blackwell, Oxford.

Van Oort, M., & Whitehurst, R. J. (2009).*Enzymes in Food Technology* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.

Visser, J. (1996). Lyases (PectateLyases et PectinLyases). In: Visser, J. & Voragen, A. G. J. *Pectins and Pectinases* (pp. 213-229). Elsevier Science B.V., Amsterdam.

Voragen, A. G. J., Whitaker, J. R., & Wong, D. W. S. (Eds.). (2002).*Handbook of Food Enzymology.* CRC Press.

Wen, F., Sun, J., Zhao, H. (2010). Genetic modification of *Saccharomyces cerevisiae* to express *Trichoderma reesei* cellulases for direct cellulose degradation to glucose, enhancing bioethanol production. *Bioresource Technology*, 101(15), pp. 5270-5276.

Zghloul, R. (2019) Maximizing cellulase production by *Aspergillus niger* MK543209 using solid-state fermentation on agricultural residues. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 23(5), 340-350.

Zhao, L., Zhang, J., Zhao, D., Jia, L., Qin, B., Cao, X., Zang, L., Lu, F., & Liu, F. (2022). Biological Degradation of Lignin: A Critical Review on Progress and Perspectives. *Journal*.

Annexes

Annexes

1.1 Réactif DNS (acide dinitrosalicylique)(annexe 1)

DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) :	1 g
Hydroxyde de sodium (NaOH) :	20 g
Sodium potassium tartrate tétrahydraté (tartrate de sodium) :	30 g
Eau distillée:.....	150 mL

1.3 Protocole de préparation

Pour préparer le réactif DNS, dissolvez 1 gramme d'acide 3,5-dinitrosalicylique dans 50 mL d'eau distillée chaude (environ 100°C), ajoutez 20 grammes d'hydroxyde de sodium (NaOH) et mélangez jusqu'à dissolution complète, incorporez 30 grammes de sodium potassium tartrate tétrahydraté et mélangez jusqu'à dissolution complète, portez le volume total de la solution à 100 mL avec de l'eau distillée, filtrez la solution pour éliminer les impuretés insolubles, puis conservez le réactif dans un récipient en verre foncé à température ambiante ou au réfrigérateur.

3. Courbes d'étalonnage (annexe 2)

Pour établir la courbe d'étalonnage des produits glucose, xylose, et acide galacturonique, préparez des dilutions en ajoutant des volumes croissants de chaque produit à de l'eau distillée (0, 200, 400, 600, 800, 1000 μ L), ajoutez 1 mL de réactif DNS, chauffez à 100°C 10min, placez les tubes sur glace pendant 10 minutes, puis mesurez la DO à 540 nm. Cela vous permettra de déterminer les concentrations optimales des enzymes xylanase, cellulase, et pectinase.

Tableau 2 :Préparation des Dilutions pour la Courbe d'Étalonnage des Produits (Glucose, Xylose, Acide Galacturonique)

Tube	Volume de produit (μL)	Volume d'eau distillée (μL)
1	0	1000
2	200	800
3	400	600
4	600	400
5	800	200
6	1000	0

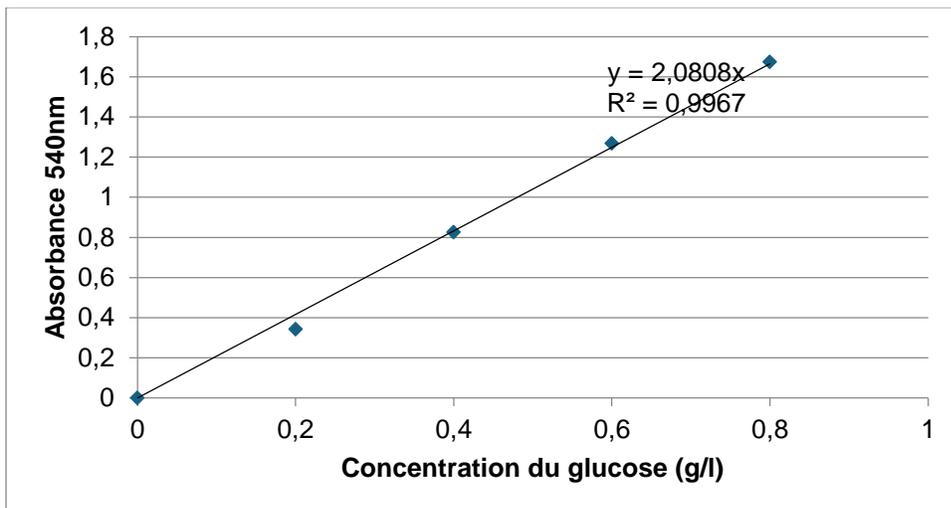


Figure 37 : Courbe d'étalonnage du Glucose .

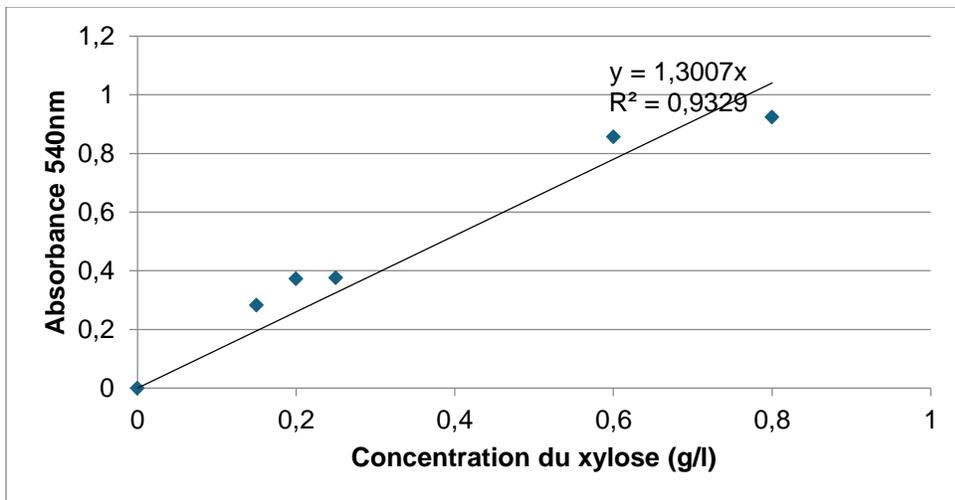


Figure 38 : Courbe d'étalonnage du dosage du Xylose .

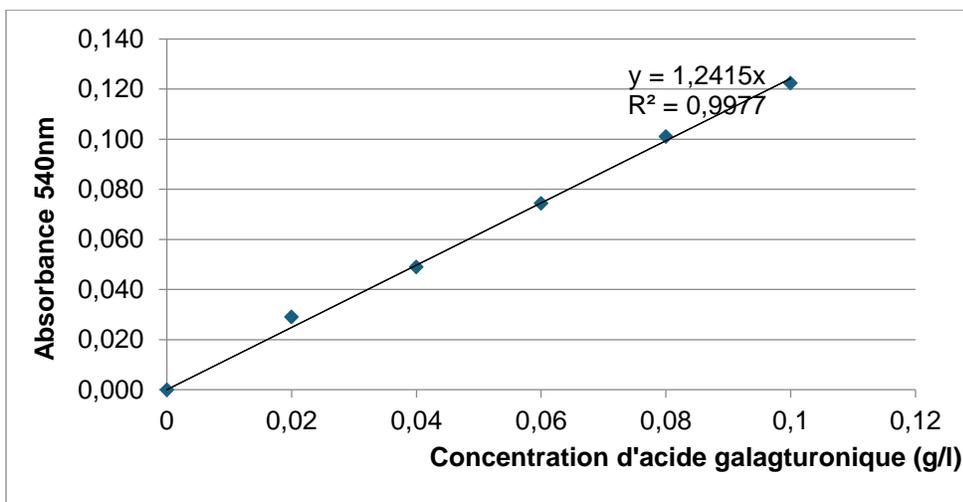


Figure 39 : Courbe d'étalonnage du dosage d'acide galacturonique.

Année universitaire : 2023-2024	Présenté par : BEKKOUCHE Zouina Nourhene LASSAKEUR Yasmine SLIMANI Manar
--	---

.....

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie appliquée

Résumé

Dans cette étude, l'optimisation de la production d'enzymes lignocellulosiques par *Penicillium sp.* en fermentation solide sur les grignons d'olive a révélé que l'extrait de malt et le zinc sont les meilleures sources de carbone et d'ions métalliques pour les cellulases, xylanases et pectinases. Les sources d'azote optimales sont le nitrate de sodium (NaNO₃) pour les cellulases et les pectinases, et le sulfate d'ammonium (NH₄SO₄) pour les xylanases. Le temps d'incubation optimale est de 4 jours pour les xylanases et pectinases et de 8 jours pour les cellulases tandis que la quantité d'inoculum et le taux d'humidité optimale donnant une activité cellulolytique pectinolytique et xylanolytique optimales sont respectivement de 14 disques et 50%, 14 disques et 30% ainsi et 12 disques et 60%. La concentration optimale en Tween 80 est de 2% pour les cellulases, et 1 % pour les xylanases et les pectinases. Des expériences de confirmation, combinant toutes les conditions optimales pour chaque enzyme, ont montré une augmentation de l'activité des cellulases de 1,36 fois, de l'activité des xylanases de 1,87 fois dans milieu optimisé et de l'activité des pectinases de 2,8 fois dans le milieu non optimisé par rapport au milieu optimisé. Ces résultats démontrent l'importance de considérer plusieurs paramètres dans l'optimisation des conditions de culture pour maximiser la production d'enzymes lignocellulosiques par *Penicillium sp.*, ouvrant ainsi la voie à des applications industrielles plus efficaces et durables dans divers domaines.

Abstract

In this study, the optimization of lignocellulosic enzyme production by *Penicillium sp.* in solid-state fermentation on olive pomace revealed that malt extract and zinc are the best sources of carbon and metal ions for cellulases, xylanases, and pectinases. The optimal nitrogen sources are sodium nitrate (NaNO₃) for cellulases and pectinases, and ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) for xylanases. The optimal incubation time

is 4 days for xylanases and pectinases, and 8 days for cellulases. The optimal inoculum quantity and moisture level for achieving optimal cellulolytic, pectinolytic, and xylanolytic activities are respectively 14 discs and 50%, 14 discs and 30%, and 12 discs and 60%. The optimal concentration of Tween 80 is 2% for cellulases, and 1% for xylanases and pectinases. Confirmation experiments, combining all optimal conditions for each enzyme, showed an increase in cellulase activity by 1.36 times, xylanase activity by 1.87 times in the optimized medium, and pectinase activity by 2.8 times in the non-optimized medium compared to the optimized medium. These results demonstrate the importance of considering multiple parameters in the optimization of culture conditions to maximize the production of lignocellulosic enzymes by *Penicillium sp.*, thus paving the way for more efficient and sustainable industrial applications in various fields.

Keywords: Lignocellulosic enzymes, Solid-state fermentation, *Penicillium sp.*, Olive pomace

ملخص

في التخمير بالحالة الصلبة على تفل *Penicillium sp.* في هذه الدراسة، كشفت عملية تحسين إنتاج الإنزيمات اللجنوسليلوزية بواسطة الزيتون أن مستخلص الشعير والزنك هما أفضل مصادر الكربون والأيونات المعدنية للسليولازات والزيلانازات والبكتينازات. أما مصادر الزيلانازات. الوقت $(NH_4)_2SO_4$ للسليولازات والبكتينازات، وكبريتات الأمونيوم ($NaNO_3$) النيتروجين المثلى فهي نترات الصوديوم الأمثل للحضانة هو 4 أيام للزيلانازات والبكتينازات، و8 أيام للسليولازات. الكمية المثلى للتلقيح ومستوى الرطوبة لتحقيق نشاط سليولازي وبكتينازيوزيلانازي أمثلين هي 14 قرصًا و50%، و14 قرصًا و30%، و12 قرصًا و60% على التوالي. تركيز توين 80 الأمثل هو 2% للسليولازات، و1% للزيلانازات والبكتينازات. أظهرت تجارب التأكيد، التي جمعت جميع الظروف المثلى لكل إنزيم، زيادة في نشاط السليولازات بمقدار 1.36 مرة، ونشاط الزيلانازات بمقدار 1.87 مرة في الوسط المحسن، ونشاط البكتينازات بمقدار 2.8 مرة في الوسط غير المحسن مقارنةً بالوسط المحسن. توضح هذه النتائج أهمية مراعاة عدة عوامل في تحسين ظروف الزراعة لتعظيم إنتاج الإنزيمات، مما يمهد الطريق لتطبيقات صناعية أكثر كفاءة واستدامة في مجالات متنوعة. *Penicillium sp.* اللجنوسليلوزية بواسطة

الكلمات المفتاحية: ، تفل الزيتون *Penicillium sp.* الإنزيمات اللجنوسليلوزية، التخمير بالحالة الصلبة،

<p>Mots-clefs :Enzymes lignocellulosiques, Fermentation solide, <i>Penicillium sp.</i>, Grignons d'olive</p>	
<p>Laboratoires de recherche :laboratoire de biologie et environnement (U Constantine 1 Frères Mentouri).</p>	
<p>Président : LEGHLIMI Hind (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).</p>	
<p>Encadrant : BOUCHERIT Zeyneb (MAA - U Constantine 1 Frères Mentouri).</p>	
<p>Examineur : BENHAMDI Asma (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).</p>	