



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



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

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie.

Filière : Biotechnologie.

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique.

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

# *Production d'une Laccase fongique par *Pleurotus ostreatus* par fermentation solide sur substrats phénoliques*

---

Présenté par : TEUCHTACHE Meriem

Le : 09/06/2024

KRAITI Lina

### Jury d'évaluation :

**Président :** Mme. ABDELAZIZ Ouided (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrant :** Mme. ALMI Hiba (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Examineur :** Mme. ZAAMOUCI Ahlem (MAB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Année universitaire**  
**2023 - 2024**

# *Remerciements*

*Nos remerciements s'adressent d'abord à **ALLAH** le tout puissant pour les chances qui nous sont offertes pour réaliser ce travail.*

*On tient à remercier sincèrement Mme **Almi Hiba**, Maitre Conférence classe B à UFM 1, pour nous avoir encadrées, guidées, conseillées et qui est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Nous remercions Mme **Abdelaziz Ouided**, Maitre Conférence classe B à UFM 1, qui nous fait l'honneur de présider le jury, qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.*

*Nos sincères remerciements s'adressent à Mme **Zaamouchi Ahlem**, Maitre assistante Classe B à UFM 1, qui nous fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail.*

*Un grand merci à Mme **Zerrouki Laïla**, pour sa patience et toute l'aide qu'elle nous a apporté, sans oublié Mme **Aïade Amel**, **Sedratí Soumia**, **Ferguani Mounia**, **Bouhouch Mouna** et Mr **Chebal Ibrahim elKhalife**, qu'ils trouvent ici l'expression de notre profond respect.*

*Que toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation et à la finalisation de ce mémoire et qui nous ont offert leur soutien moral dans les moments difficiles, trouvent ici l'expression de nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance.*

# *Dédicaces*

*C'est avec une immense joie et un grand honneur que je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers parents : **Bekhouche Nadia** et **Kraïti Ahcen**.*

*Qui ont été toujours à mes côtés et m'ont toujours soutenu toute au long de ces longues années d'études, qui ils n'ont pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. En signe de reconnaissance, qu'ils trouvent ici, l'expression de ma profonde gratitude pour tout ce qu'ils ont consenti d'efforts et de moyens pour me voir réussir dans mes études. Que dieu leur prête bonheur et longue vie.*

*A mon très cher grand père : **Bekhouche Arbi***

*Qui m'aime beaucoup et me préfère à tout le monde, je souhaite une bonne santé.*

*A mes chers adorables frères : **Nacre Eddine**, **Youcef** et **Wassim***

*Pour leurs aides et leurs soutiens Durant toutes mes années d'étude.*

*A tous les membres de ma famille, source d'espoir et de motivation.*

*A tous les cousins et les amis que J'ai connu jusqu'à maintenant chacun avec son nom. Merci pour leurs amours et les beaux souvenirs que nous avons passés ensemble.*

*Sans oublier **Meriem**, chère amie avant d'être binôme et **Malak** ma sœur d'enfance*

*Et à toute personne qui a participé à notre formation.*

*Lina*

# *Dédicaces*

*Je dédie cet humble travail :*

*A mes très chers parents : **Nacereddine** et **Boulezreg Houria***

*Je vous dois ce que je suis aujourd'hui grasse a votre amour, a votre puissance et vos innombrables sacrifices. Que ce modeste travail soit pour vous une petite compensation et reconnaissance envers ce que vous avez fait d'incroyable pour moi. Que Dieu le tout puissant, vous préservé et vous procure santé et longue vie afin que je puisse à mon tour vous comblé.*

*A mes très chers frères : **Zinou** ; **Chawki** et **Abdou***

*Qui m'avaient soutenu et encouragé durant ces année d'études.*

*A mes très chères grandes mères : **Fella** et **Rachida***

*Que dieu vous nous garde.*

*A ma grande belle-famille, qui est toujours fière de me voir réussir*

*Merci à vous tous.*

*Je ne peux oublier de remercier chaleureusement mes très chères amies d'enfance et mes compagnons d'étude **Lina** et **Malak**, que Dieu nous protège les unes pour des autres.*

*Et à toutes mes amies Avec lesquels j'ai partagé mes agréables moments.*

*Ainsi que tous les gens qui m'ont aidé de près ou de loin à l'accomplissement de ce modeste travail.*

*Meriem*

# Table des Matières

Liste des Figures  
Liste des Tableaux  
Liste d'abréviation  
Résumé  
Abstract  
الملخص

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## Synthèse Bibliographique

1. Le Champignon <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	4
1.1. Les champignons comestibles .....	4
1.2. Les Pleurotes .....	4
1.3. L'espèce <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	5
1.4. Description .....	6
1.5. Classification .....	7
1.6. Cycle de vie .....	7
1.7. Intérêt de <i>Pleurotus</i> .....	8
1.7.1. Valeur nutritive .....	8
1.7.2. Propriétés médicales .....	8
2. Les Laccases .....	9
2.1. Généralités .....	9
2.2. Définition .....	9
2.3. Source de laccase .....	9
2.4. Propriétés de laccase .....	10
2.5. Structure de laccase .....	10
2.6. Mécanisme d'action de laccase .....	11
2.7. Applications .....	12
2.7.1. Industrie agroalimentaire .....	12
2.7.2. Industrie pharmaceutique .....	13
2.7.3. Industrie papetière .....	13
2.7.4. Industrie textiles .....	13

3. Fermentation solide .....	14
3.1. Définition .....	14
3.2. Organismes utilisés dans la fermentation .....	15
3.3. Processus de fermentation .....	15
3.4. Substrats de fermentation .....	16
3.4.1. Le son de blé .....	16
➤ Définition .....	16
➤ Composition .....	17
3.4.2. La caroube .....	18
➤ Définition .....	18
➤ Description .....	18
➤ Composition .....	18
3.4.3. La grenade .....	19
➤ Définition .....	19
➤ Composition .....	20

## **Matériel et Méthodes**

1. La souche <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	23
2. Le milieu de culture et substrats .....	23
2.1. Le milieu Sabouraud .....	23
2.2. Les substrats phénoliques .....	23
3. Obtention de spores de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	24
3.1. L'isolement de mycélium .....	24
3.2. Réactivation de la souche .....	24
3.3. Confirmation de l'identification .....	24
4. Test de production de laccase .....	25
5. Fermentation et production de laccase .....	25
5.1. Préparation de la suspension sporale .....	25
5.2. Dénombrement des spores .....	25
5.3. Conduite de fermentation .....	25
6. Extraction d'enzyme .....	26
7. Dosage de l'activité laccasique au gaiacol .....	26

8. Test de décoloration .....	.27
9. Conservation de la souche .....	27

## **Résultats et Discussion**

1. La souche <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	29
2. Test de production de laccase .....	30
3. Fermentation et production de laccase .....	31
3.1. Dénombrement de spores .....	31
3.2. Aspect visuel de fermentation .....	31
4. Evaluation de l'activité laccasique .....	33
5. Test de décoloration .....	34
<b>Conclusion</b> .....	37
<b>Références Bibliographiques</b> .....	39
<b>Annexes</b> .....	47

# Liste des Figures

<b>Figure 1 :</b> Exemples des champignons comestibles .....	4
<b>Figure 2 :</b> Quelques espèces de <i>Pleurotus</i> .....	5
<b>Figure 3 :</b> A) les spores de <i>P. ostreatus</i> ; B) l'espèce <i>Pleurotus ostreatus</i> en touffes sur un tronc d'arbre .....	6
<b>Figure 4 :</b> Le cycle de vie du champignon <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	8
<b>Figure 5 :</b> La structure globale d'une laccase fongique .....	11
<b>Figure 6 :</b> Représentation schématique de la réaction catalysée par laccase .....	12
<b>Figure 7 :</b> Utilisation de laccase pour dégrader et synthétiser des différents colorants .....	14
<b>Figure 8 :</b> Le son de blé.....	16
<b>Figure 9 :</b> La caroube .....	18
<b>Figure 10 :</b> principaux constituants chimique de la pulpe et des graines de caroube aux propriétés nutritionnelles et bénéfique pour la santé .....	19
<b>Figure 11 :</b> Pelures de grenades séchées et réduites en poudre.....	20
<b>Figure 12 :</b> Principaux composés bioactifs des écorces de grenade.....	21
<b>Figure 13 :</b> Isolement du mycélium de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	24
<b>Figure 14 :</b> L'étape d'extraction d'enzyme .....	26
<b>Figure 15 :</b> Aspect macroscopique de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	29
<b>Figure 16 :</b> <i>Pleurotus ostreatus</i> sous microscope .....	30
<b>Figure 17 :</b> Le test de décoloration (A) Avant, (B) après 15 min et (C) après 3 jours d'incubation .....	31
<b>Figure 18 :</b> Activité laccasique à partir du troisième jour d'incubation (S : son de blé ; G : déchets de grenade ; K : caroube) .....	34



## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : La classification du champignon <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	7
<b>Tableau 2</b> : Composition générale du son de blé .....	17
<b>Tableau 3</b> : Aspect visuel de fermentation avant et après incubation .....	32
<b>Tableau 4</b> : Résultats des tests de décolorations après le 3 <sup>ème</sup> , 4 <sup>ème</sup> , 5 <sup>ème</sup> , 6 <sup>ème</sup> et 7 <sup>ème</sup> jour d'incubation .....	35

## Liste d'abréviation

**kDa** : Kilo daltons.

**MCO** : Multi Copper Oxydase.

**ABTS** : acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).

**SSF** : solid-state fermentation.

**U/gfc** : unité enzymatique / gramme de substrat fermentescible sec.

**(g)** : l'accélération centrifuge.

**pH** : le potentiel hydrogène.

**mM** : milli molaire.

**tr/min** : tour/minute.

## Résumé

Le plan de travail a porté sur la production de la laccase par *Pleurotus ostreatus*, un champignon comestible, en utilisant trois substrats phénoliques : le son de blé, les déchets de grenade et la caroube. La réactivation de la souche en question a confirmé les caractères culturels spécifiques à cette espèce fongique. Par ailleurs, le test de production de laccase sur milieu solide (Agar blanc), a montré que *P. ostreatus* est capable de produire cette enzyme, où le résultat a été exprimé sous forme d'un halo. La fermentation solide a révélé que le son de blé était le meilleur substrat pour la production de la laccase, avec une activité laccasique maximale de 0.462 U/ml atteint le cinquième jour de fermentation, par rapport aux déchets de grenade (le maximum de production est 0.349U/ml) et à la caroube (0.062U/ml). Les résultats de décoloration sont positifs et en relation avec ceux de fermentation, où l'enzyme était capable de dévaloriser le colorant "rouge neutre" par la réduction de sa couleur surtout pour le son de blé avec les concentrations 0.3% et 0.4%, confirmant la capacité de dégradation de la laccase.

**Mots clé :** Laccase, *Pleurotus ostreatus*, son de blé, déchets de grenade, caroube, fermentation solide.

## **Abstract**

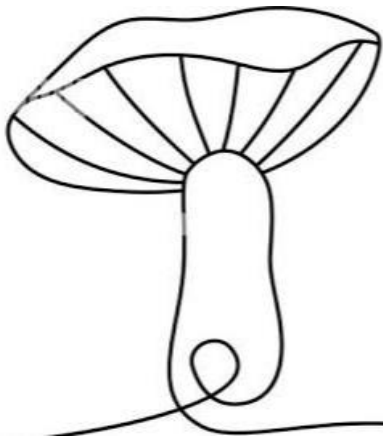
The work plan focused on the production of laccase by *Pleurotus ostreatus*, an edible mushroom, using three phenolic substrates: wheat bran, pomegranate waste and carob. The reactivation of the strain in question confirmed the cultural characteristics specific to this fungal species. Moreover, the test of laccase production on solid medium (Agar white), showed that *P. ostreatus* is able to produce this enzyme, where the result was expressed as a halo. Solid-state fermentation revealed that wheat bran was the best substrate for laccase production, with a maximum laccasic activity of 0.462 U/ml reaches the fifth day of fermentation, compared to pomegranate waste (the maximum production is 0.349U/ml) and carob (0.062U/ml). The discoloration results are positive and in relation to those of fermentation, where the enzyme was able to devalue the dye "neutral red" by reducing its color especially for wheat bran with concentrations 0.3% and 0.4%, confirming the degradation capacity of the laccase.

**Keywords:** Laccase, *Pleurotus ostreatus*, wheat bran, pomegranate waste, carob, solid-state fermentation.

## الملخص

ركزت خطة العمل على إنتاج اللاكاز بواسطة الفطر المحاري *Pleurotus ostreatus*، وهو فطر صالح للأكل، باستخدام ثلاث ركائز فينولية: نخالة القمح وبقايا الرمان والخروب. أكدت إعادة تنشيط السلالة المعنية الخصائص الزراعية المحددة لهذا النوع الفطري. بالإضافة إلى ذلك، أظهر اختبار إنتاج اللاكاز على وسط صلب (أجار أبيض) أن *P. ostreatus* قادر على إنتاج هذا الإنزيم، وتم التعبير عن النتيجة على شكل حيز. وكشفت عملية التخمير في وسط صلب أن نخالة القمح كانت أفضل ركيزة لإنتاج اللاكاز، حيث بلغ الحد الأقصى لنشاط اللاكاز 0.462 وحدة/مل في اليوم الخامس من التخمير، مقارنةً ببقايا الرمان (أقصى إنتاج 0.349 وحدة/مل) والخروب (0.062 وحدة/مل). كانت نتائج إزالة التلوين إيجابية ومرتبطة بنتائج التخمير، حيث تمكن الإنزيم من خفض قيمة الصبغة "الحمراء المحايدة" عن طريق تقليل لونها خاصة بالنسبة لنخالة القمح بتركيزات 0.3% و 0.4%، مما يؤكد قدرة اللاكاز على التحليل.

**الكلمات المفتاحية:** اللاكاز, *Pleurotus ostreatus*, نخالة القمح, بقايا الرمان, الخروب, التخمير في وسط صلب.



# **Introduction**

Dans le monde, les champignons constituent un règne à part "le règne fongique", qui renferme plus de deux millions d'espèces de mycètes différentes. Comme Il existe des mycètes microscopiques (levures et moisissures) qui peuvent être bénéfiques pour l'être humain ou nuisibles pour sa santé et provoquent des maladies ; On trouve aussi environ 50 000 mycètes macroscopiques appelés également "champignons supérieurs". Ils sont des organismes non chlorophylliens hétérotrophes comestibles ou toxiques (Lambrey, 2010).

De nombreux champignons comestibles tels que le shiitake (*Lentinula edodes*), le champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), le champignon noir ou champignon à oreilles de bois (*Auricularia auricula et Auricularia polytricha*) et le pleurote (*Pleurotus spp.*) sont couramment cultivés à travers le monde pour leurs divers intérêts (Lal Dhar, 2017).

Le genre *Pleurotus* est un basidiomycète comprend environ 40 espèces différentes communément appelées " Pleurote en huître ". Parmi les espèces du genre *Pleurotus* les assez facilement cultivable : *Pleurotus ostreatus*. Ce champignon est couramment consommé partout dans le monde en raison de sa saveur, de son goût, de ses valeurs nutritionnelles élevées et ses propriétés médicales (Deepalakshmi et Mirunalini, 2014).

D'autre part, les champignons de ce genre ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leur capacité à minéraliser la lignine en sécrétant des enzymes oxydatives, telles que la peroxydase et la laccase (Elsayed et *al.*, 2012).

La laccase appartient au groupe d'enzyme polyphénol oxydases caractérisés par la présence de plusieurs cuivres. Cette macromolécule réduit l'oxygène en eau et oxyde les substrats (diphénols, monophénols méthoxy-substitués, aromatiques et amines aliphatiques) en radicaux libres (Pundir et *al.*, 2016).

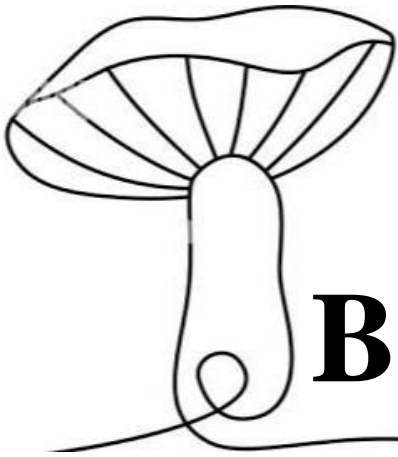
La laccase possède plusieurs applications industrielles, notamment la biopulpage, la détoxification des polluants environnementaux, la teinture textile ou blanchiment des taches et autres (Patrick et *al.*, 2009 ; Elsayed et *al.*, 2012).

De ce fait, l'objectif de notre étude visait à produire l'enzyme Laccase à partir d'un champignon comestible "*Pleurotus ostreatus*", par méthode de fermentation solide "SSF", en utilisant quelques substrats phénoliques.

Le présent manuscrit, est divisé en trois parties :

- ✓ Une synthèse bibliographique portant sur les importantes informations concernant le champignon en question *Pleurotus ostreatus* et ses intérêts ; ainsi que des éclaircissements sur l'enzyme laccase, ses propriétés, ses applications et le mode d'obtention.
- ✓ Le deuxième volet du manuscrit englobe tous ce qui est expérimentale : en allant de la réactivation de la souche passant par les différents tests de production et fermentation jusqu'au dosage de l'activité laccasique.
- ✓ La dernière partie est consacrée à l'analyse des résultats, leurs interprétations et comparaison avec les études antérieures.





# **Synthèse**

# **Bibliographique**

---

## 1. Le Champignon *Pleurotus ostreatus*

### 1.1. Les champignons comestibles

Le vaste monde des champignons est peuplé de plusieurs genres et espèces de diverses formes et couleurs. Parmi eux, des champignons comestibles qui pourront être cuisinés et dégustés par l'homme sans faire des problèmes à la santé, contrairement aux champignons toxiques qui pourront provoquer de violentes réactions s'ils sont ingérés, et pouvant même parfois entraîner la mort.

Dans le monde environ 150 espèces de champignons sont comestibles, dont la trentaine d'espèces étant excellents comestibles, comme : le champignon de Paris, le Shiitake et le Pleurote (Demers, 2015) (**Figure 1**).

Le Pleurote est considéré comme le troisième champignon le plus cultivé au monde et comprend une quarantaine d'espèces présentant une saveur très parfumée, douce rappelant le sous-bois (Tremblais, 2017).



**Figure 1** : Exemples des champignons comestibles : A). champignon de Paris ; B). Shiitake ; C). Pleurote (Sur site [www.alamyimages.fr](http://www.alamyimages.fr)).

### 1.2. Les Pleurotes

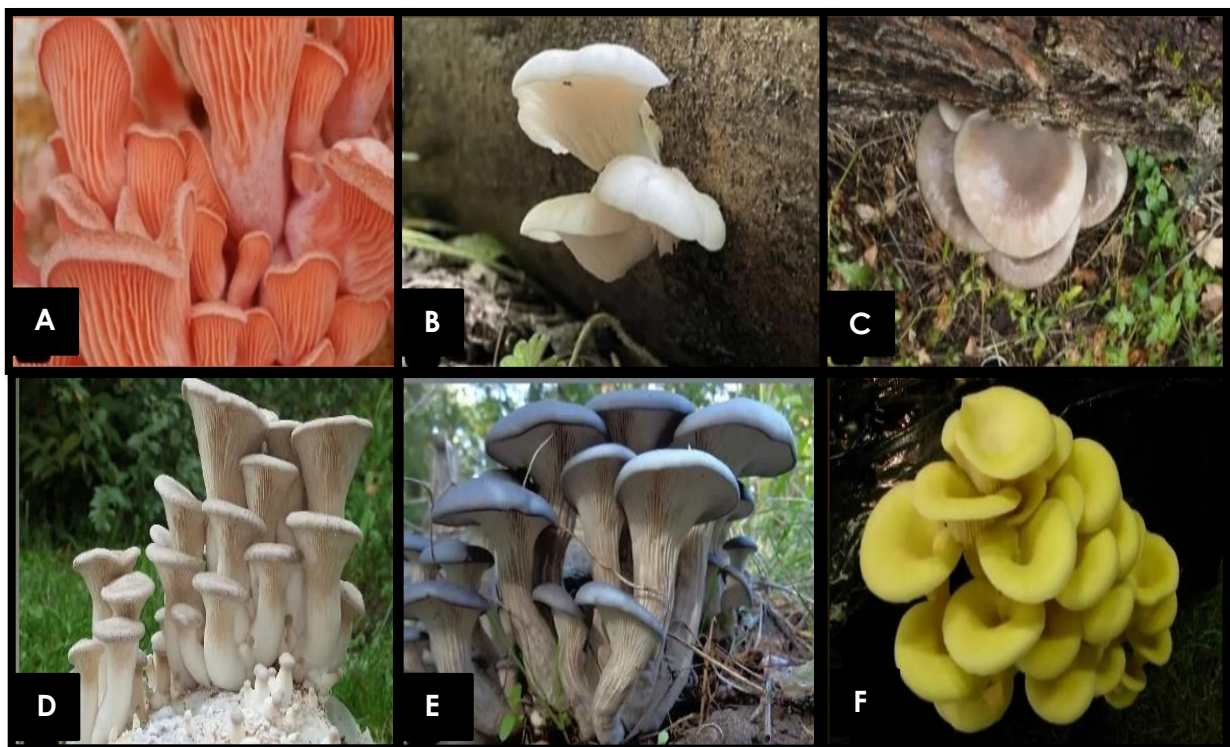
Le nom « Pleurote » est apparu en 1874. Il vient du grec « *Pleuron* » qui veut dire « côté » et « *ôtos* » qui signifie « oreille », par rapport à la forme du champignon et au fait que son pied s'insère sur le côté du chapeau (Zubiria, 2021).

Le Pleurote dont le nom scientifique est « *Pleurotus* » de la classe Basidiomycètes, appartient à un groupe connu sous le nom de « Champignon de pourriture blanche », par rapport à son mycélium de couleur blanche (Bellettini et al., 2019).

Les pleurotes sont des espèces ligninolytiques saprophytes, exploitent la matière organique déjà morte et se poussent sur une grande variété de déchets lignocellulosiques, comme le bois mort ou affaibli, les troncs d'arbres blessés ou déjà morts, branches des feuillus morts (Oei et Nieuwenhijzen, 2005 ; Bellettini et al., 2019).

Ces champignons sont capables de réduire la teneur en lignine lors de processus d'altération du bois. La dégradation de la lignine implique l'activité d'enzymes produites, qui sont appelées ligninases, comprennent la lignine peroxydases, le manganèse peroxydases et la laccase (Metri *et al.*, 2018).

Ce groupe de champignons comprend environ 40 espèces dont la majorité d'entre elles sont comestibles (**Figure 2**), et certaines sont même faciles à cultiver. Notamment : *Pleurotus ostreatus* (Pleurote), *P. eryngii* (Huitre royale ou Cardoncello), *P. pulmonarius* (champignon phénix), *P. djamor* (Pleurote rose), *P. sajor-caju* (Huitre indienne), *P. cystidiosus* (Huitre ormeau), *P. citrinopileatus* (Pleurote doré), *P. cornucopiae* (Deepalakshmi et Mirunalini, 2014 ; Bellettini *et al.*, 2019).



**Figure 2** : Quelques espèces de *Pleurotus* :A) *P. djamor* ;B) *P. pulmonarius* ; C) *P.ostreatus* ; D) *P. eryngii* ; E) *P. columbinus* ; F) *P. citrinopileatus*. (Sur site ultimate-mushroom.com).

### 1.3. L'espèce *Pleurotus ostreatus*

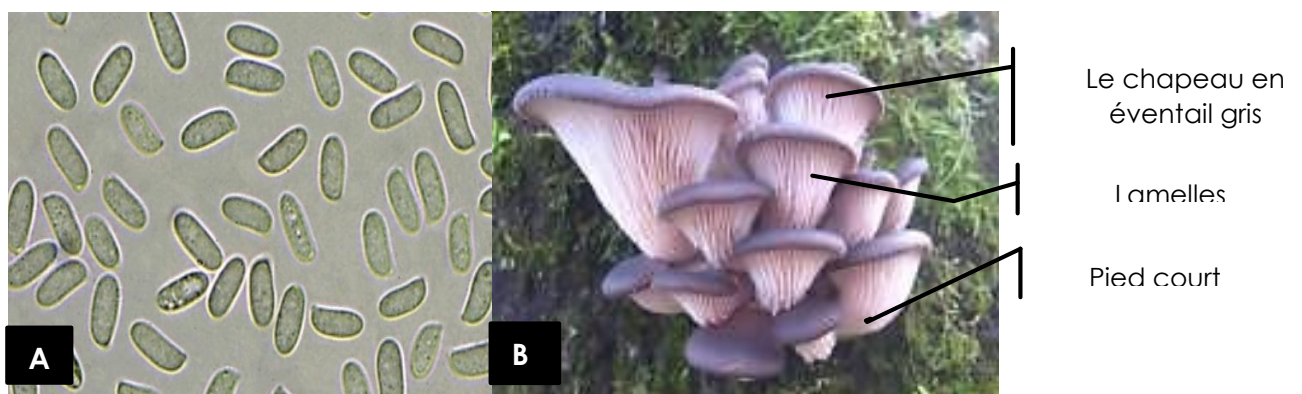
Ce champignon a été nommé scientifiquement *Agaricus ostreatus* pour la première fois en 1774, puis il a été transféré au genre *Pleurotus* nouvellement reconnu en 1871 par le mycologue Paul Kummer (De Mattos-Shipley *et al.*, 2016).

Connu aussi par l'appellation Pleurote en huitre ; Pleurote en coquille ; Noiret ; Bridoulo ; Nouret ; Oreille de noyer ; Negret, parmi les champignons bons comestibles et les plus cultivé dans le monde. Cette espèce est cultivée depuis les années 1970 pour la première fois aux Etats Unis, puis en Europe et en Inde et sa production mondiale est en augmentation rapide (Guzmán, 2000 ; Buyck et Polèse, 2017).

#### 1.4. Description

Le nom scientifique et commun fait référence à la forme du corps fructifère. Le latin *Pleurotus* (de côté) fait référence à la croissance au côté de la tige par rapport au chapeau, tandis que le latin *ostreatus* et le nom commun anglais (Oyster) fait référence à la forme du capuchon (Deepalakshmi et Mirunalini, 2014).

*P. ostreatus* représente une partie reproductive plus visible (le sporophore) ; composée d'un chapeau large en éventail ou en forme d'huitre s'étendant de 2 à 25 cm, de couleur variable blanche passant du beige, brun au gris foncé ou clair. L'humidité lui donnera un aspect brillant et le temps sec lui redeviendra mate et sèche. Le chapeau est convexe avec une marge enroulée lorsqu'elle est jeune et lisse, souvent quelque peu lobée et ondulée, recouvre des lamelles décourbées de couleur blanchâtres descendent longuement sur un pied excentrique, blanc, court et trapu et duveteux à la base. Le Pleurote se trouve sous forme de touffes étagées, installé sur les troncs d'arbres morts. La chair des Pleurotes est ferme, épaisse, élastique et blanche avec une saveur douce et une odeur fongique, agréable et légèrement fruitée (Gévry et *al.*, 2009 ; Deepalakshmi et Mirunalini, 2014). La sporée du champignon est de couleur blanche, mieux visible sur une surface sombre, sous microscope les spores se semblent en masse blanchâtre à gris lilas, de forme cylindrique à oblongue (Kotadiya et *al.*, 2021).



**Figure 3 :** A) Les spores de *P. ostreatus* (De Mattos-Shipley et *al.*, 2016). B) l'espèce *Pleurotus ostreatus* en touffes sur un tronc d'arbre (Voyer, 2007).

### 1.5. Classification

La classification du *Pleurotus ostreatus* selon Saar et Permasto (2014) est montrée dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1** : la classification du champignon *Pleurotus ostreatus* (Saar et Permasto, 2014).

<b>Règne</b>	<i>Fungi</i>
<b>Division</b>	<i>Basidiomycota</i>
<b>Classe</b>	<i>Agaricomycetes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Agaricales</i>
<b>Famille</b>	<i>Pleurotaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Pleurotus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Pleurotus ostreatus</i>

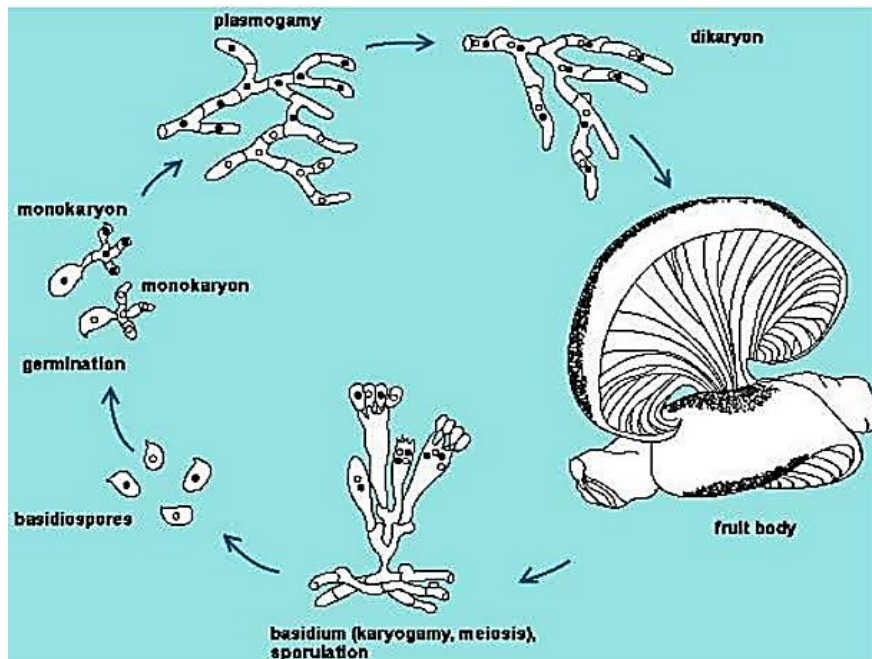
La confusion taxonomique a toujours été associée au genre *Pleurotus*, en particulier les espèces appartenant au complexe *Pleurotus ostreatus* en raison de variation des caractéristiques morphologiques des différents spécimens et similarité des isolats appartenant à différentes espèces (Adebayo et Martinez-Carrera, 2015). *Pleurotus ostreatus* peut être confondu avec *Pleurotus ostreatus* var. *columbinus* ; *Pleurotus pulmonarius* ; *Pleurotus flabellatus* ; *Pleurotus ostreatus* var. *florida* (Mata et Salmones, 2003).

### 1.6. Cycle de vie

Un champignon Pleurote montre le biocycle typique des basidiomycètes. Leur cycle de vie passe par une phase végétative puis une phase fructifère.

Le champignon produit de millions et de millions de spores « basidiospores » qui vont germer et ramifier pour former un mycélium primaire monocaryotique dans des conditions favorables, au cours de la phase végétative. La phase fructifère commence, deux mycéliums primaires sexuels compatibles se rencontrent pour donner un mycélium secondaire dicaryotique par plasmogamie. Ce mycélium binucléé contient deux noyaux différents dans chaque compartiment hyphal. Dans les conditions environnementales favorables le mycélium se différencie en corps fruitier ayant des structures spécialisées appelées carpophores, au sein des quels, dans hymenium, se trouvent les basides. Les basides passent par une caryogamie puis

une méiose et quatre noyaux haploïdes résultants se déplacent vers les stérigmates sur les basides, pour former quatre nouvelles basidiospores qui se détachent et le biocycle reprend lorsque les conditions sont favorables (Adebayo et Martinez-Carrera, 2015 ; Benamar-Mansour, 2016).



**Figure 4 :** Le cycle de vie du champignon *Pleurotus ostreatus* (Adebayo et Martinez-Carrera, 2015).

## 1.7. Intérêt de *Pleurotus*

### 1.7.1. Valeur nutritive

*Pleurotus ostreatus* est le deuxième champignon cultivé le plus important à des fins alimentaires dans le monde entier. Sur le plan nutritionnel, il possède des propriétés gustatives et aromatiques uniques, et il est considéré comme un aliment seins riche en teneur en protéines, fibres, glucides, minéraux et vitamines ainsi que faible en calories et en matière grasse (Patil et al., 2010 ; Deepalakshmi et Mirunalini, 2014 ).

### 1.7.2. Propriétés médicales

En médecine traditionnelle, plusieurs espèces de *Pleurotus* sont largement utilisées pour leur utilité pharmaceutique, pour prévenir ou aider à traité plus de 30 maladies ou troubles (Guzmán, 2000).

Actuellement, dans certaines régions du monde, on assiste à un regain d'intérêt pour les remèdes traditionnels. Une grande quantité de composés comme les lectines, des polysaccharides, des polysaccharides-peptides, un complexe de polysaccharide-protéine ont été isolés de ce champignon. Ceux-ci se sont révélés avoir des propriétés antioxydants ; antimicrobien ; antiviral ; anticancéreuse ; antitumoral ; antidiabétique ; antihypercholestérolémiant et propriétés immunomodulatrices (Guzmán, 2000 ; Deepalakshmi et Mirunalini, 2014).

## 2. Les Laccases

### 2.1. Généralités

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique. Ils permettent d'accélérer une réaction biochimique dans un organisme vivant (van der Kamp and Mulholland, 2013).

Ces macromolécules sont très utilisées en industrie dans des divers secteurs, mais en remarquant que les enzymes d'origine microbienne sont les plus couramment utilisées que les enzymes végétales et animales (Tifrit, 2016).

### 2.2 Définition

Les laccases (EC 1.10.3.2, benzène diol : oxydoréductase) sont des oxydases multi cuivres appartenant au groupe des bleus, capable d'oxyder des composés organiques et inorganiques, notamment : les mono-phénols, les diphénols, les polyphénols, les aminophénols, les méta-phénols, les amines aromatiques et l'acide ascorbique (More et *al.*, 2011 ; Ding et *al.*, 2014).

Ces oxydoréductases sont des enzymes courantes dans la nature, se trouvent dans les bactéries, les insectes, les champignons et les plantes. Parmi les organismes connus, les champignons de la pourriture blanche sont les plus efficace producteurs de la laccase, grâce à leur forte capacité de la dégradation de lignine (Mazumder et *al.*, 2009 ; El-Batal et *al.*, 2015).

### 2.3. Source de laccase

Yoshida a décrit pour la première fois la laccase en 1883 à partir des exsudats d'un arbre japonais des laques, *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883 ; Madhavi et Lele, 2009). Cependant, Bertrand et Laborde démontrent la première laccase d'origine fongique en 1896 (Ben Ali, 2021).

Cette enzyme est présente chez certaines bactéries tel que : *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces cyaneus* et *Marinomonas mediterranea* (Shraddha et al., 2011) et chez différents insectes comme *Bombyx* et *Lucilia* ( Ben Ali, 2021), se trouve aussi dans les champignons en particulier les champignons de la pourritures blanches tel que : les divers espèces du genre *Pleurotus* (Mazumder et al., 2009).

Plus tard d'autres laccases végétales ont été identifiées dans les betteraves, les choux, les poires et les pommes de terre... (Madhavi et Lele, 2009).

Les laccases dans les plantes jouent un rôle dans les lignifications alors que chez les champignons, elles ont été impliquées dans la délignification, la sporulation, la production des pigments et la pathogénèse des plantes (Alcalde, 2007 ; Madhavi et Lele, 2009).

#### **2.4. Propriétés de laccase**

Les laccases sont des protéines complexes composées de plusieurs sous unités (monomériques, dimériques ou tétramériques), leur masse moléculaire oscille entre 50 et 100 kDa. Elles sont caractérisées comme des macromolécules de taille considérable (Claus, 2004).

Les majorités des laccases sont des glycoprotéines, cette partie glucidique joue un rôle curial dans la rétention du cuivre, la stabilité thermique, la sensibilité et la dégradation protéolytique (Madhavi et Lele, 2009).

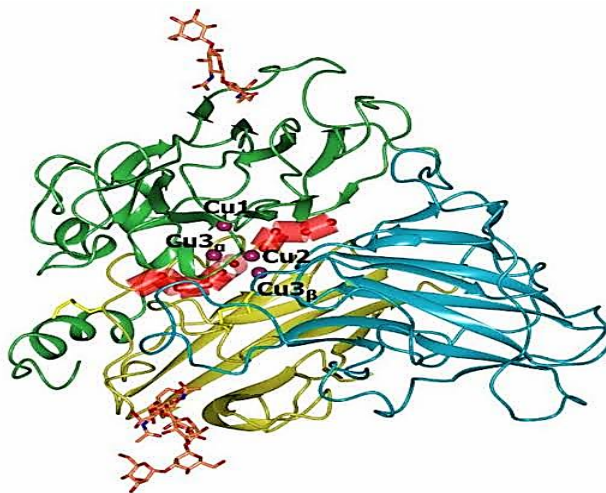
#### **2.5. Structure de laccase**

Les laccases, en tant que MCO, possèdent quatre atomes de cuivre dans des états d'oxydation remarquablement particuliers : un de type 1, un de type 2 et deux de type 3, qui forment tous leur site catalytique (Agrawal et al., 2018) (**Figure 5**).

Les laccases sont membres de la superfamille des cupredoxines, en particulier de la famille des cupredoxines à domaines multiples (Arregui et al., 2019).

Cette famille est caractérisée par le pliage de la cupredoxine, qui consiste en deux feuilles  $\beta$  disposées en un tonneau de type Greek-key (Arregui et al., 2019).





**Figure 5** : La structure globale d'une laccase fongique (Loi et *al.*, 2021).

## 2.6. Mécanisme d'action de laccase

Les réactions de base catalysées par la laccase peuvent être de deux types : l'oxydation directe et l'oxydation indirecte.

L'oxydation directe implique l'oxydation du substrat en radical correspondant suite à l'interaction directe qui se produit avec le cluster de cuivre (Matera et *al.*, 2008) (**Figure 6**).

Cependant, dans certaines réactions, l'oxydation directe n'est pas possible car la laccase ne peut oxyder que les composés dont le potentiel d'ionisation ne dépasse pas le potentiel redox de l'ion cuivre T1, c'est-à-dire est incapable d'oxyder directement les sous-unités non phénoliques de la lignine (Ben Ali, 2021).

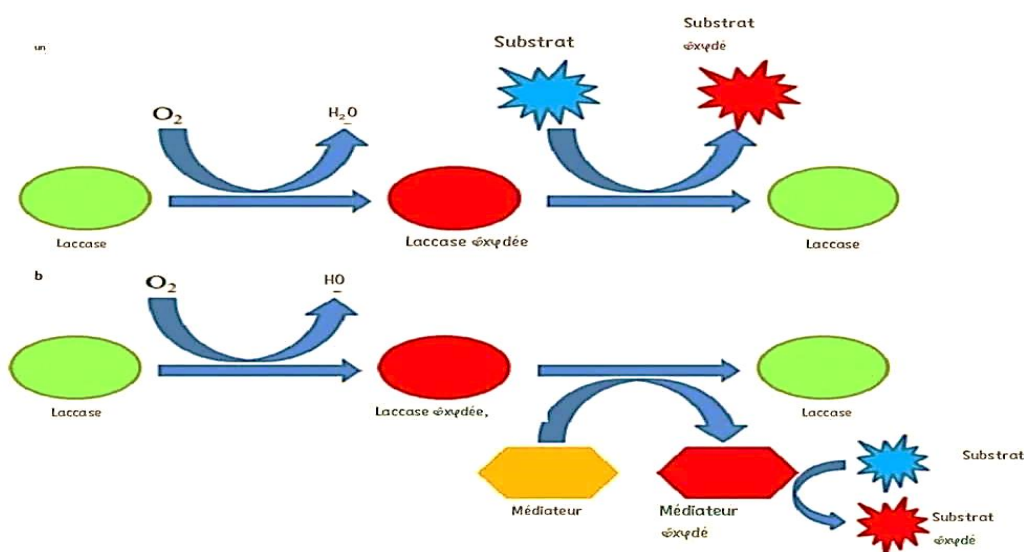
Néanmoins, cette limitation peut être surmontée par l'utilisation d'un médiateur qui est un processus en deux étapes :

La première enzyme catalyse l'oxydation du médiateur et ensuite le médiateur oxydé oxyde le substrat (**Figure 6**).

Toutefois, le médiateur doit présenter certaines caractéristiques : (a) la réaction doit se produire sans entrave, (b) il doit s'agir d'un bon substrat pour la laccase, tant sous sa forme oxydée que sous sa forme réduite, (c) il doit être stable ; il ne doit pas inhiber la réaction enzymatique, et (d) la conversion doit être de nature cyclique (Johannes et Majcherczyk, 2000).

Outre les médiateurs, l'utilisation d'inducteurs pour augmenter la production de laccase a été largement pratiquée chez les champignons, en particulier dans les pourritures blanches où des métaux, des composés aromatiques et des composés phénoliques (Terrón *et al.*, 2004).

Différents types de médiateurs ont été employés : Les médiateurs synthétiques comme L'Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique) (ABTS), les médiateurs dérivés de la lignine tel que : Acétosyringone, Syringaldéhyde et médiateurs synthétiques dérivés de la phényl-méthyl-pyrazolone, de l'acide benzoïque et de la N-hydroxynaphthalimide (Camarero *et al.*, 2005 ; Riva, 2006 ; Shumakovich *et al.*, 2006).



**Figure 6** : Représentation schématique de la réaction catalysée par laccase (Agrawal *et al.*, 2018).  
A) : oxydation directe ; B) : oxydation indirecte (présence d'un médiateur).

## 2.7. Applications

En raison de diverses propriétés enzymatique et catalytique la laccase est utilisée dans large éventail d'applications industrielles tel que : industrie agroalimentaire, papetière, pharmaceutique et traitement des eaux usées (Do Rosàrio *et al.*, 2012).

### 2.7.1 Industrie agroalimentaire

Les laccases interviennent dans l'amélioration de la qualité des aliments et des boissons par l'élimination des composés phénoliques indésirables responsables du brunissement, de la

formation du voile, et de la turbidité du jus de fruits clairs, de la bière et du vin (Dana et *al.*, 2017).

Ont été utilisées ainsi comme un agent améliorant la pâte ou le pain, par l'augmentation de la résistance des structures du gluten dans la pâte (Madhavi et Lele, 2009).

### **2.7.2. Industrie pharmaceutique**

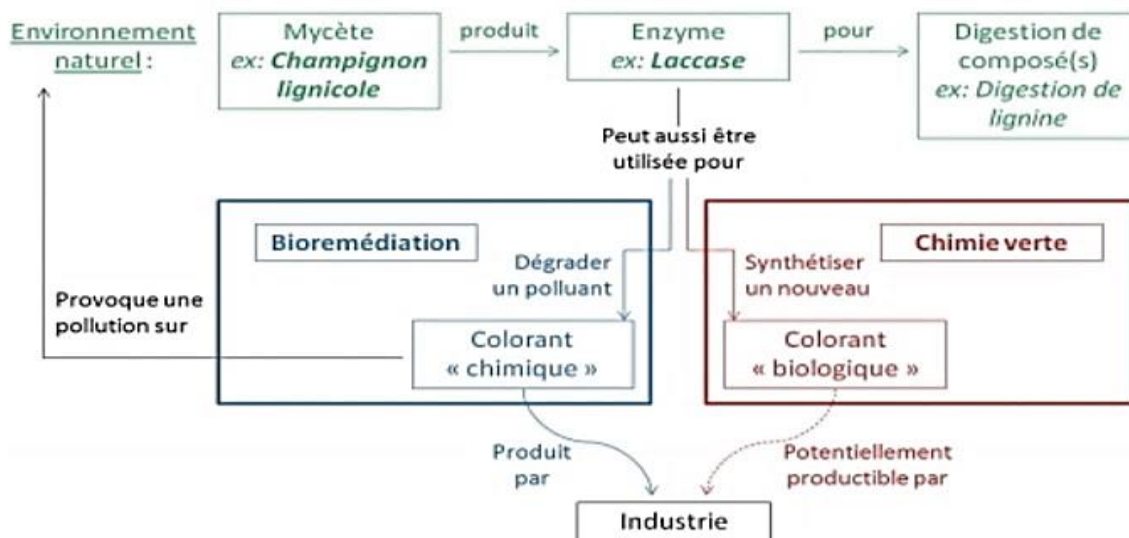
Les laccases s'illustrent dans la synthèse de divers produits thérapeutiques, et sont employées pour la réduction de la toxicité de certains produits cosmétiques (Couto et Herrera, 2006) et l'apparition de nouveaux produits dermatologiques éclaircissants pour la peau à base de la laccase (Ben Ali, 2021).

### **2.7.3. Industrie papetière**

Les laccases jouent un rôle clé dans le blanchiment de la pâte à papiers et la dépolymérisation de la lignine et la délignification de la pulpe par l'utilisation du système médiateur (Dana et *al.*, 2017).

### **2.7.4. Industrie textiles**

La laccase est considérée comme une solution potentielle aux problèmes des effluents textiles en raison de sa capacité à dégrader les colorants actuellement utilisés dans cette industrie, comme l'utilisation de la laccase dans le lavage des pierres avec la cellulose pour confiner les dommages causés aux fibres externes et protéger les fibres internes ( Montazer et Maryan, 2008).



**Figure 7 :** Utilisation de laccase pour dégrader et synthétiser des différents colorants (Bataille et *al.*, 2011).

### 3. Fermentation solide

Les fermentations fongiques dans la production commerciale de métabolites secondaires ont été largement exploitées ces derniers temps. Les champignons sont des organismes morphologiquement complexes qui diffèrent par leur structure à différents moments de leur cycle de vie, diffèrent par leur forme entre la croissance en surface et la croissance submergée, et diffèrent également par la nature du milieu de croissance et les conditions physiques de culture (température, pH, les forces mécaniques, etc.) (Prasad et *al.*, 2005).

#### 3.1. Définition

La fermentation solide (SSF) est un procédé de fabrication de biomolécules utilisés dans les industries alimentaire, pharmaceutiques, cosmétique, pétrolière et textiles. Ces biomolécules sont la pluparts des métabolites générés par des microorganismes cultivés sur des supports solides sélectionnés à cet effet (Singhania et *al.*, 2009 ; Lizardi-Jiménez et Hernández-martinez, 2017).

Cette technologie de culture de microorganisme est une alternative à la fermentation liquide ou submergé pour la production de produits à valeur ajoutée comme les antibiotiques, les protéines unicellulaires, les enzymes et la production d'arômes. Elle est utilisée majoritairement à des fins industrielles (Couto et Sanroman, 2006 ; Thomas et *al.*, 2013).

### 3.2. Organismes utilisés dans la fermentation

Dans la nature, les champignons filamenteux se développent sur le sol, en décomposant des composés végétaux dans des conditions naturellement ventilées. Par conséquent, la fermentation en milieu solide permet le développement optimal des champignons filamenteux contrairement à la fermentation submergée et permettant au mycélium de se répandre à la surface de composés solides entre lesquels l'air peut circuler (Bhargav *et al.*, 2008 ; Thomas *et al.*, 2013).

La fermentation en milieu solide utilise des substrats de culture à faible teneur en eau (activité hydrique réduite), ce qui est particulièrement approprié pour les moisissures. Les méthodes utilisées pour cultiver les champignons filamenteux par fermentation à l'état solide permettent la meilleure reproduction de leur environnement naturel (Gervais et Molin, 2003 ; Bhargav *et al.*, 2008 ).

Cependant, les bactéries et les levures, qui ont besoin d'un taux d'humidité plus élevé pour une fermentation efficace, peuvent également être utilisées pour la fermentation solide, mais avec un rendement plus faible (Aryal, 2022).

### 3.3. Processus de fermentation

Ce procédé consiste à déposer sur des plateaux un substrat de culture solide, après l'avoirensemencé avec des micro-organismes ; le substrat est ensuite laissé dans une salle à température contrôlée pendant plusieurs jours (Raimbault, 1980).

Au début du processus de croissance, les substrats et les composés de culture solides sont des composés non solubles de très grosses molécules biochimiquement complexes que le champignon va couper pour obtenir les nutriments essentiels C et N. Pour développer son substrat naturel, l'organisme fongique met en œuvre tout son potentiel génétique pour produire les métabolites nécessaires à sa croissance (Pandey, 2003).

La composition du milieu de croissance oriente le métabolisme du micro-organisme vers la production d'enzymes qui libèrent des molécules uniques bio disponibles, telles que des sucres ou des acides aminés, en découpant des macromolécules (Singhania *et al.*, 2009).

Par conséquent, en sélectionnant les composants du milieu de croissance, il est possible d'orienter les cellules vers la production du ou des métabolites souhaités, principalement des enzymes qui transforment les polymères (cellulose, hémicellulose, pectines, protéines) en molécules uniques, de manière très efficace et rentable (Biesebeke *et al.*, 2002).

La culture sur des substrats hétérogènes nécessite une expertise pour maintenir des conditions de croissance optimales. La surveillance du flux d'air est essentielle car elle a un impact sur la température, l'apport d'oxygène et l'humidité. Afin de maintenir un taux d'humidité suffisant pour la croissance des champignons filamenteux, on utilise de l'air gorgé d'eau, ce qui peut nécessiter l'ajout d'eau. Dans la plupart des cas, la fermentation en milieu solide ne nécessite pas un environnement totalement stérile, car la stérilisation initiale du substrat de fermentation associée à la colonisation rapide du substrat par le micro-organisme fongique limite le développement de la flore autochtone (Duchiron et copinet, 2011).

### 3.4. Substrats de fermentation

Cette technique concerne les substrats solides et contenant de faible niveau d'humidité. Les substrats les plus couramment utilisées sont les céréales (blé, riz, maïs...), les grains de légumineuses, le son de blé, les matières lignocellulosiques, ainsi une large gamme de matière végétale et animale (Aryal, 2022).

#### 3.4.1. Le son de blé

- **Définition** : le son de blé correspond aux enveloppes végétales qui entourent et protègent les grains de blé. Il s'agit d'un coproduit abondant, issu du procédé de mouture du blé qui permet l'obtention de la farine. Il est riche en fibres, protéines, sels minéraux et vitamines, ce qui est fait un aliment très nutritif pour les animaux et convient pour la plupart des champignons lignicoles tel que : les pleurotes (Leo et *al.*, 2012 ; Onipe et *al.*, 2015).



**Figure 8** : Le son de blé (Devaux, 2024).

- **Composition** : Cette matière première est composée d'environ 53% de fibres alimentaires (xylanes, lignines, celluloses, galactanes et fructanes). Les autres composants comprennent des vitamines et des minéraux (**Tableau 2**) et des composés bioactifs tels que les alkylrésorcinols, l'acide férulique, flavonoïdes, caroténoïdes, lignanes et stérols (Apprich et *al.*, 2013 ; Andersson et *al.*, 2014).

**Tableau 2** : composition générale du son de blé (Onipe *et al.*, 2015).

<b>Composants de son</b>	<b>Plage % dm</b>
Fibres alimentaires	33.4-63.0
Humidité	8.1-12.7
Cendre	3.9_8.10
Protéine	6.6_18.6
Glucide totaux	60.0_75.0
Amidon	9.10_38.9
<b>Produits photochimiques</b>	<b>µg g<sup>-1</sup></b>
Alkylrésorcinol	489_1429
Phytostérols	344_2050
Acide férulique	1376_1918
Composé phénolique lié	4.73_2020
flavonoïdes	3000_4300
<b>Micronutriments</b>	<b>mg par 100 g</b>
Phosphore	900_15000
Magnésium	530_1030
Zinc	8.3_14.0
Fer	1.9_34.0
Manganèse	0.9_10.1
Vitamine E	0.13_9.5
(Tocophérols /tocotriénol)	
Vitamine B	0.51_1.6
Thiamine (B1)	0.20_0.80
Riboflavine (B2)	0.30_1.3

### 3.4.2. La caroube

- **Définition** : La caroube est le fruit d'une plante à feuilles persistantes cultivé dans la zone méditerranéenne, nommée le caroubier (*Ceratonia siliqua*) et appartient à la famille des légumineuses. Ayant la forme d'une gousse et dans l'enveloppe est très dure (Avallone et al., 1997 ; Goulas et al., 2016).
- **Description** : Le fruit est une gousse indéhiscente, allongée, comprimée, droite ou incurvée, épaissie au niveau des sutures, de 10-30 cm de long, 1,5-3,5 cm de large et environ 1 cm d'épaisseur avec un apex émoussé ou subaigu. Les gousses sont brunes avec une surface ridée et sont coriaces à maturité. La pulpe se compose d'une couche externe coriace (péricarpe) et d'une région interne plus tendre (mésocarpe). Les graines se trouvent dans la gousse de manière transversale, séparées par le mésocarpe (Avallone et al., 1997 ; Bastianetto, 2013).

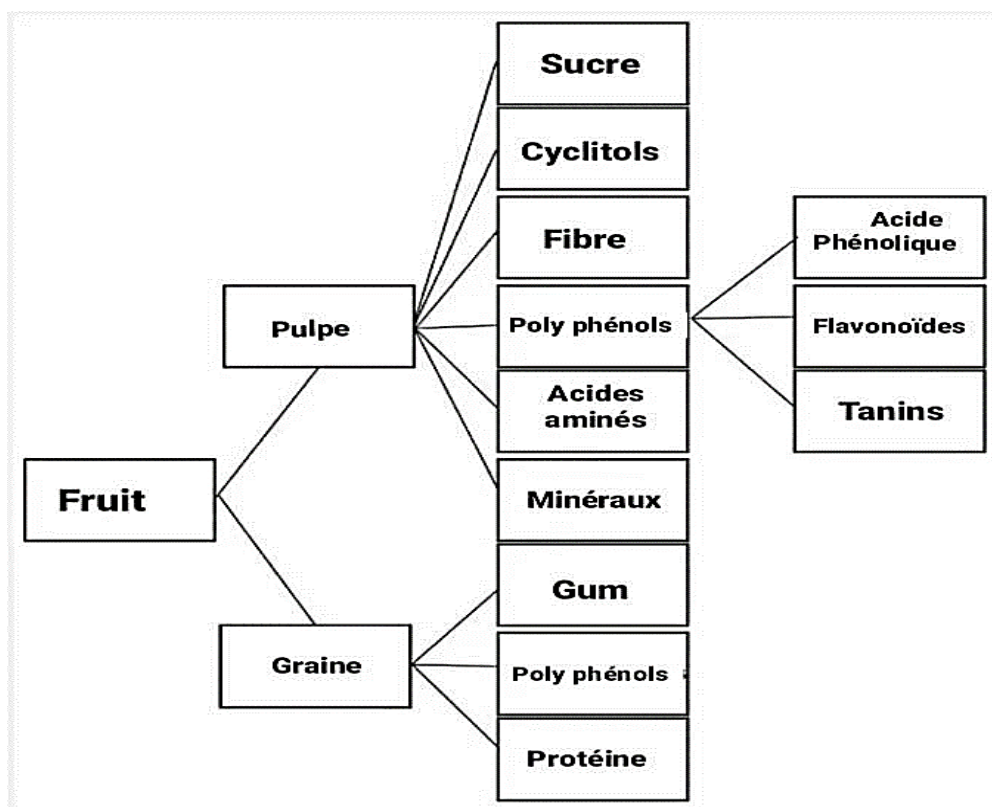


**Figure 9** : La caroube (Bastianetto, 2013).

- **Composition** : La caroube est un mélange complexe de métabolites primaires et secondaires, la présence de sucres et de fibres étant caractéristique de ces fruits, suivie d'une grande diversité de polyphénols. De nombreux minéraux et acides aminés sont également présents dans les fruits de la caroube. La figure 10 résume les principaux constituants de la pulpe et de la graine de caroube.



Les fruits de la caroube se caractérisent par une teneur élevée en sucre (48%-56%) (Principalement du saccharose, du glucose et du fructose), de 3 à 4 % de protéines, d'une faible teneur en gras (0,2 %-0,6 %), une faible teneur en alcaloïdes, et une teneur élevée en fibres alimentaires, en particulier dans les graines. Plus précisément, la pulpe est composée de sucres, de polyphénols (par exemple, tanins, flavonoïdes, acides phénoliques) et de minéraux (par exemple, K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn, Zn), tandis que la graine contient des protéines, des fibres alimentaires, des polyphénols et des minéraux, et ne contient pas de gluten (Papaefstathiou et *al.*, 2018).



**Figure 10 :** principaux constituants chimique de la pulpe et des graines de caroube aux propriétés nutritionnelles et bénéfique pour la santé (Goulas et *al.*, 2016).

### 3.4.3. La grenade

- **Définition :** La grenade est un fruit appartenant au genre *Punica*, d'origine d'Inde de Chine et la région méditerranéenne et il est cultivé en Afrique du nord et tropicale et en Amérique. La Grenade peut être divisée en trois parties : l'écorce qui constitue l'enveloppe extérieure du fruit, le jus et les graines. Lors de la transformation en jus de grenade, une grande quantité de déchets est générée, dans laquelle les pelures

représentent environ 26 à 30 % du poids total. Cependant, les déchets de grenade ont attiré l'attention ces dernières années en raison de leurs nombreuses propriétés bénéfiques et de leurs applications potentielles (Mo et *al.*, 2022 ; Siddiqui et *al.*, 2024).



**Figure 11 :** Pelures de grenades séchées et réduites en poudre (Sutradhar et *al.*, 2020).

- **Composition :** Il convient de noter que l'écorce de grenade regorge de nombreux composants bioactives peuvent être exploités en tant qu'ingrédients fonctionnels pour mieux utiliser les ressources des sous-produits, apportant ainsi une valeur ajoutée à l'industrie de la grenade.

Plusieurs études montrent que Les écorces de grenade contiennent une quantité importante de composés phénoliques se situe entre 18 et 510 mg/g de matière sèche. Parmi eux, les tanins et les flavonoïdes avec un teneur entre 193 et 420, 84 et 134 mg/g de matière sèche dans l'écorce.

Des fibres alimentaires allant de 33 % à 62 % comprennent : la lignine avec une concentration plus élevée, la cellulose et l'acide ironique. Des minéraux tels que K, P, Na, Ca, Mg et N (Mo et *al.*, 2022).

L'humidité (8,1 g/100 g d'écorce sèche), des protéines (3,46 g/100 g), des lipides (3,36 g/100 g), des cendres (6,07 g/100 g), et glucides (59,98 g/100 g de peau sèche) (Hawrez, 2019).

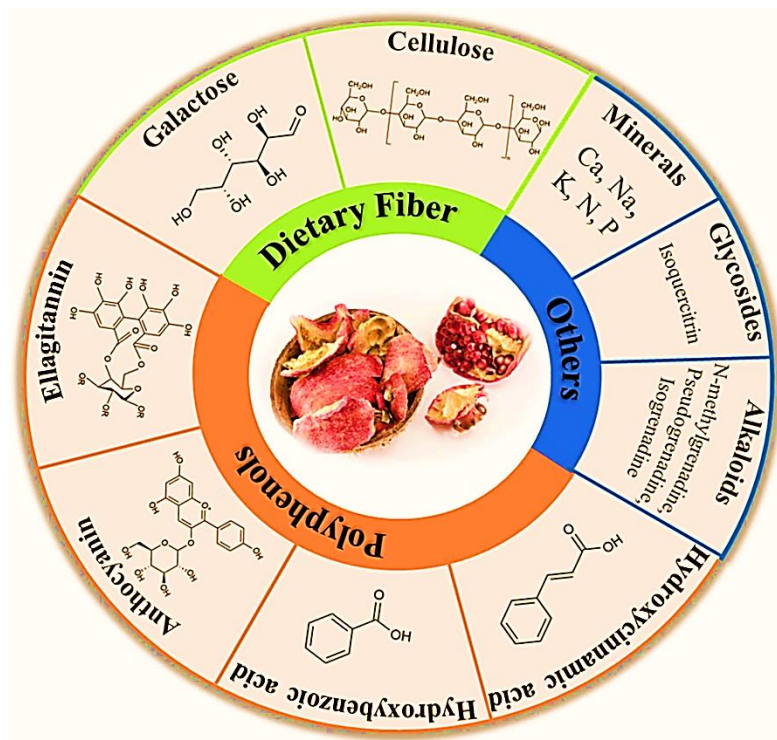
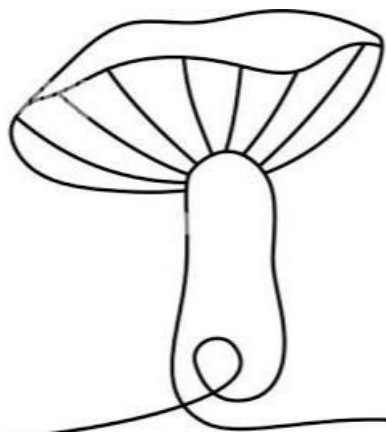


Figure 12 : Principaux composés bioactifs des écorces de grenade (Mo et al., 2022).



# **Matériel et Méthodes**

---

Notre travail porte sur la production de la laccase par « *Pleurotus ostreatus* » sur substrats phénoliques, à savoir : le son de blé, les déchets de grenade et la caroube.

Le travail pratique a été effectué dans le laboratoire pédagogique (Lab 09) appartenant à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

## **1. La souche *Pleurotus ostreatus***

Le champignon comestible utilisé dans les différentes manipulations a été obtenu de deux manières :

- Par Isolement : à partir d'un échantillon commercialisé acheté au niveau de Centre commercial Yes Mall à la nouvelle ville Ali Mendjeli, Constantine.
- Par réactivation : à partir d'une souche fongique conservée sous forme de tube incliné qui nous a été gracieusement fournie par Mme ALMI.

## **2. Le milieu de culture et substrats**

### **2.1. Le milieu Sabouraud**

C'est un milieu d'isolement de référence, il est utilisé de façon courante, contient les nutriments nécessaires pour la poussé de tous les champignons (Mondo et *al.*, 2016). L'acidité du milieu ne suffit pas pour inhiber la croissance des bactéries, pour rendre ce milieu sélectif de champignons on ajoute un antibiotique (Amoxicilline) pour l'empêchement du développement de tous contaminants. La composition exacte de ce milieu de culture est décrite dans l'**Annexe 1**.

### **2.2. Les substrats phénoliques**

Les différents substrats utilisés (son du blé, déchets de grenade et caroube) sont des sous-produits agroalimentaires. Ils ont été achetés dans le même marché citez précédemment.

Les trois substrats ont été bien rincés, égoutté et séchés à température ambiante, puis concassés grossièrement (Yousif et Alghzawi, 2000 ; Sutradhar et *al.*, 2020).

### 3. Obtention de spores de *Pleurotus ostreatus*

#### 3.1. L'isolement de mycélium

Des petits fragments de chair blanche de Pleurote ont été découpés en petits morceaux d'environ 5 mm, désinfectés dans de l'alcool 90 % pendant une minute, rincés à l'eau distillée pour éliminer l'excès d'alcool, séchés sur papier absorbant, puis déposés aseptiquement sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Sabouraud.

Les boîtes de Pétri ainsi préparés, ont été enveloppées dans du papier Aluminium pour assurer l'obscurité nécessaire à la bonne croissance du mycélium. Les boîtes ont été incubées à une température de 29°C jusqu'à sporulation.



**Figure 13 :** Isolement du mycélium de *Pleurotus ostreatus*.

#### 3.2. Réactivation de la souche

La réactivation de la souche a été effectuée sur milieu Sabouraud. Pour ce faire, les tubes ont été décongelés pendant 24h dans une étuve à 29°C. Ensuite, une quantité de 0.1 ml du contenu de tube a été étalé aseptiquement sur la surface de la boîte de Pétri. L'incubation a été réalisée à 29°C pendant 7 jours puis jusqu'à sporulation.

#### 3.3. Confirmation de l'identification

L'identification de la souche *Pleurotus ostreatus* a été effectuée par analyse de l'aspect macroscopique et microscopique.

#### 4. Test de production de laccase

Un test a été réalisé pour mettre en évidence l'activité enzymatique de la laccase produite par *Pleurotus ostreatus*.

L'ensemencement de la souche a été effectué par la méthode des disques sur boîte de Pétri coulée par l'agar blanc (**Annexe 1**), additionnée du gaiacol (0.6%). L'incubation a été effectuée à une température de 29°C pendant trois jours.

#### 5. Fermentation et production de laccase

##### 5.1. Préparation de la suspension sporale

9 ml d'eau physiologique stérile contenant 0.1 ml de Tween 80 ont été versés sur la surface d'une boîte de Pétri contenant une souche de *Pleurotus ostreatus* âgée (plus de sept jours).

A l'aide d'un râteau stérile, la surface de la boîte a été raclée superficiellement, puis le mélange a été remis dans le tube aseptiquement, homogénéisé avec un vortex pour assurer le détachement des spores.

##### 5.2. Dénombrement des spores

Avant l'ensemencement dans les flacons de fermentation, la suspension sporale est estimée par une cellule de comptage (cellule de Malassez). Le nombre des spores nécessaires pour la fermentation doit être de l'ordre de  $10^7$  cellules / ml.

##### 5.3. Conduite de fermentation

La fermentation solide a été effectuée dans des flacons de 250 ml, où 8 ml d'eau distillée ont été ajoutées à 5 g de source de carbone (l'un des trois substrats : le son de blé, les déchets de grenade et de caroube). La concentration choisie de la source d'azote (2 % d'extrait de malt) a ensuite été ajoutée. L'extrait de malt a été choisie en raison de leur rendement en laccase significativement le plus élevé que d'autres sources d'azote synthétique (El-Batal et *al.*, 2015). Les flacons ont été autoclavés à 121 °C pendant 20 min.

2 ml de la suspension sporale ont été ajoutés aux flacons précédemment préparés. L'incubation a été effectuée à 29 °C de manière statique dans l'obscurité totale.

## 6. Extraction d'enzyme

L'extraction a été réalisée les 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours après incubation. En effet, tout le contenu du flacon a été trempé dans 100 ml de tampon citrate phosphate 1 mM (pH 5) pendant 2 h et placé dans un agitateur à 200 tr/min, puis filtré sur papier Watman. Le filtrat a été centrifugé dans une centrifugeuse de refroidissement pendant 10 min à 6°C et 2400(g).



**Figure 14** : L'étape d'extraction d'enzyme.

## 7. Dosage de l'activité Laccasique au gaïacol

La mesure de l'activité de la laccase a été effectuée dès le troisième jour par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm. Le gaïacol a été utilisé comme substrat.

Le milieu réactionnel est composé de : 1 ml de gaïacol, 3 ml de tampon acétate de sodium pH 5 (10 mM) et 1 ml de filtrat de culture. Un blanc a également été préparé contenant 1 ml d'eau distillé au lieu d'enzyme. Le mélange ainsi préparé, a été incubé à 29°C pendant 15 min, et l'absorbance a été lue à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV.

L'activité enzymatique a été exprimée en unités internationales (UI) : où 1 UI correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1  $\mu$ mol de gaïacol par minute.

L'activité laccase en U/ml a été calculée par cette formule :

$$EA = A \times V / t \times e \times v \quad \text{où :}$$



EA : Activité Enzymatique (UI).

A : Absorbance à 450 nm.

V : Volume totale du mélange (ml).

v : Volume d'enzyme (ml).

t : Temps d'incubation (min).

e : Coefficient d'extinction du gaïacol (0.674  $\mu\text{M}/\text{cm}$ )

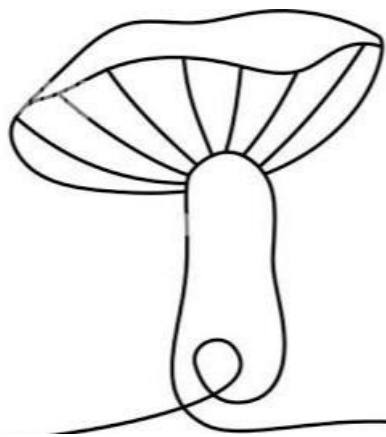
## 8. Test de décoloration

La capacité de la laccase de dégrader les colorants a été analysée en ajoutant différentes concentrations de laccase (1%, 2%, 3%, 4%) de chaque substrat phénolique, dans des tubes contenant 10 ml de rouge neutre (**Annexe 2**). L'incubation est réalisée à 29°C pendant trois jours.

La dégradation du colorant par la laccase a été vérifiée visuellement après incubation en comparaison avec le contrôle (sans laccase).

## 9. Conservation de la souche

Dès la fin de l'ensemble des manipulations, la souche a été conservée dans des tubes contenant le milieu Sabouraud additionnée de 0.1 ml de Tween 80 et 1 ml de glycérol.



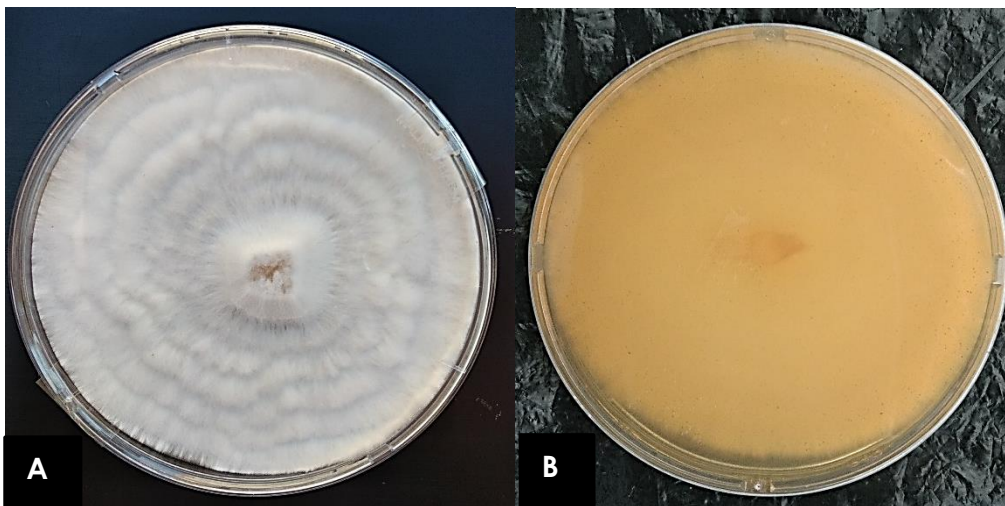
# **Résultats et Discussion**

Le présent travail porte sur la production d'une laccase fongique à partir des substrats phénoliques à savoir : le son de blé, les déchets de grenade et la caroube.

### 1. La souche *Pleurotus ostreatus*

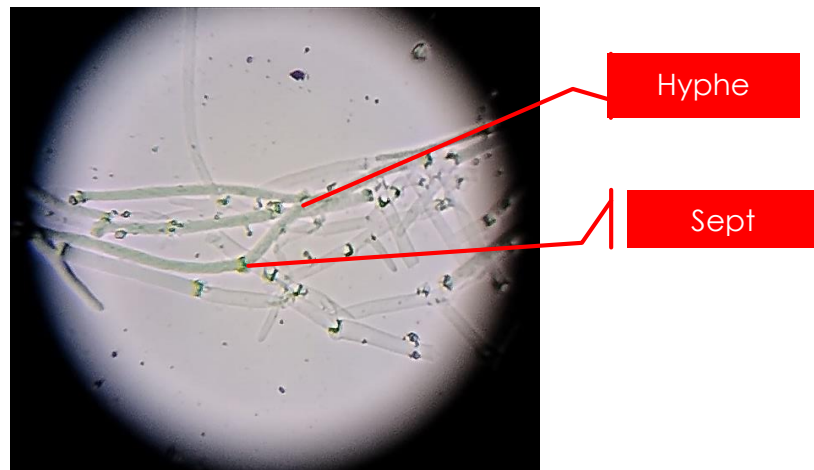
La souche de *Pleurotus ostreatus* a été réactivée sur milieu Sabouraud. En effet, la croissance mycélienne débute dès le premier jour d'incubation. Le développement se poursuit de manière vigoureuse jusqu'à recouvrir entièrement la surface du boîtier au bout du septième jour.

- ❖ L'observation macroscopique à l'œil nu a révélé un mycélium uniforme de couleur blanchâtre et d'aspect cotonneux avec un revers blanc (**Figure 15**).



**Figure 15** : Aspect macroscopique de *Pleurotus ostreatus* : (A) surface, (B) revers.

- ❖ L'observation microscopique à l'aide d'un microscope optique a permis de mettre en évidence un réseau d'hyphes septés et entrelacés, dépourvu de spores.



**Figure 16 :** *Pleurotus ostreatus* sous microscope.

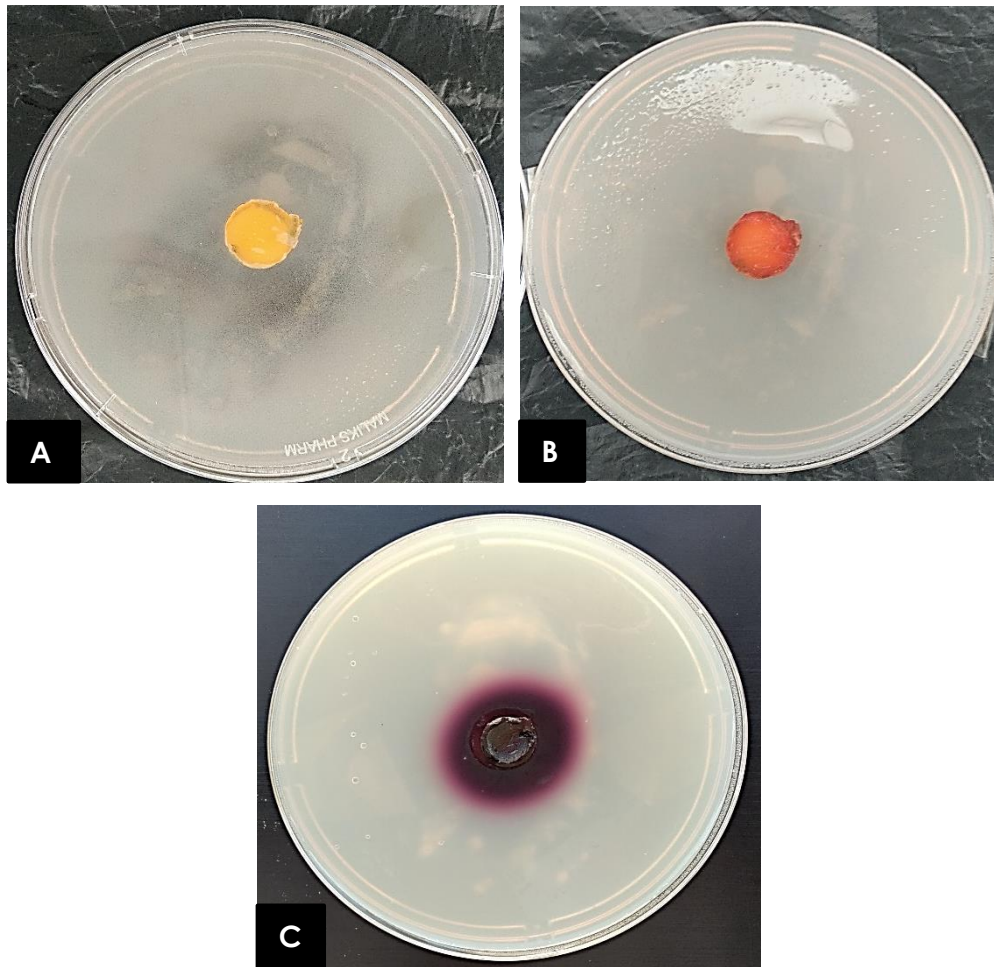
Les résultats de l'observation macroscopique et microscopique sont en parfaite relation avec les travaux d'identification de Almi et *al.*, 2017, de ce fait, les caractères de la souche de *P. ostreatus* a été conservée après réactivation.

Le milieu Sabouraud a été utilisé sous la forme solide à fin d'obtenir une colonie distincte bien visualisée (Davet et Rouxel, 1997). C'est un milieu standard utilisé pour la culture d'un large spectre de mycètes. Il a été décrit par plusieurs auteurs : Samson et *al.*, 2000 ; Leontopoulos et *al.*, 2002 et Lund et *al.*, 2002. La composition de milieu Sabouraud est riche en éléments nutritifs surtout glucidique (Chabasse et *al.*, 1999).

## 2. Test de production de laccase

Le test de production de laccase a été effectué sur agar blanc additionné de gaïacol. Les résultats ont montrés un virage de couleur vers le rose/rouge après 15 min d'incubation seulement ; ceci signifie le début d'activité enzymatique.

Après le 3<sup>ème</sup> jour d'incubation, la souche a développé une zone de lyse circulaire de couleur brun rougeâtre de 16 mm de diamètre sur la surface de milieu de culture. Le résultat obtenu est similaire de celui de Pundir et *al.*, 2016, qui a montré l'apparition d'un halo de couleur brun rougeâtre en raison de la polymérisation oxydative du gaïacol, qui indique la présence de la laccase.



**Figure 17 :** Le test de décoloration (A) Avant, (B) après 15 min et (C) après 3 jours d'incubation.

### 3. Fermentation et production de laccase

#### 3.1. Dénombrement des spores

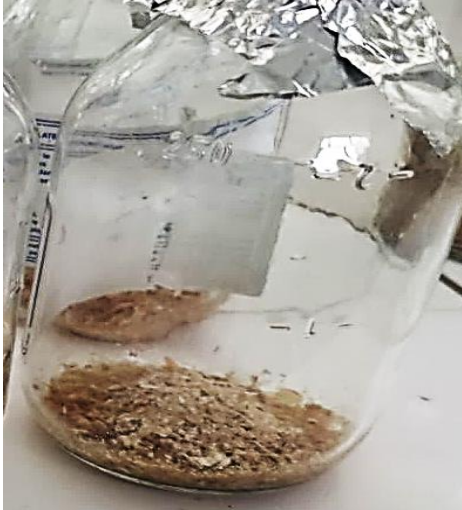

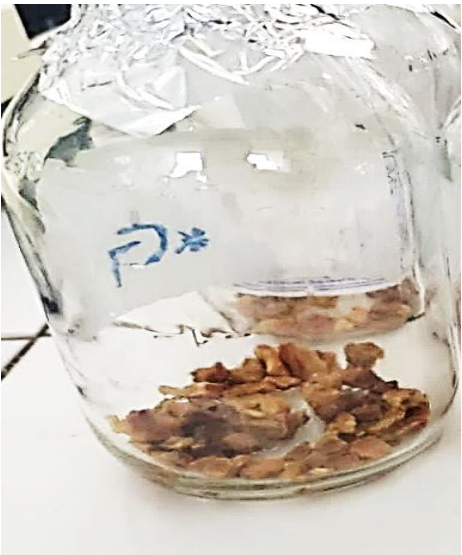

Le comptage des spores à travers la cellule Malassez a été impraticable même après 15 jours d'incubation. En effet, Nakazawa et *al.*, 2024, a rapporté dans ses recherche que la sélection d'une souche de *Pleurotus ostreatus* avec un phénotype sporulant, est une cible impossible depuis une longue date. Cela est dû au fait que *P. ostreatus* produit une énorme quantité de basidiospore.

#### 3.2. Aspect visuel de fermentation

Après quelques jours d'incubation à 29°C, les substrats de fermentation utilisés ont subi des changements remarquables ayant des explications significatives.

Dès le 3<sup>ème</sup> jour, une modification de la couleur vers le rose rougeâtre pour la caroube et les déchets de grenade, noircissement s’observent pour le son de blé. Ce changement de coloration s’intensifie au fil des jours d’incubation, s’accompagnant d’un élargissement de la zone colorée. L’analyse des flacons colorés révèle une coloration homogène sur l’ensemble des substrats à base de son de blé et de déchets de grenade. En revanche, pour la caroube, la coloration se concentre principalement sur les graines (**Tableau 3**).

**Tableau 3** : Aspect visuel de fermentation avant et après incubation.

Avant	Après	Substrats
		<p><b>Le son de blé</b></p>
		<p><b>Les déchets de grenade</b></p>



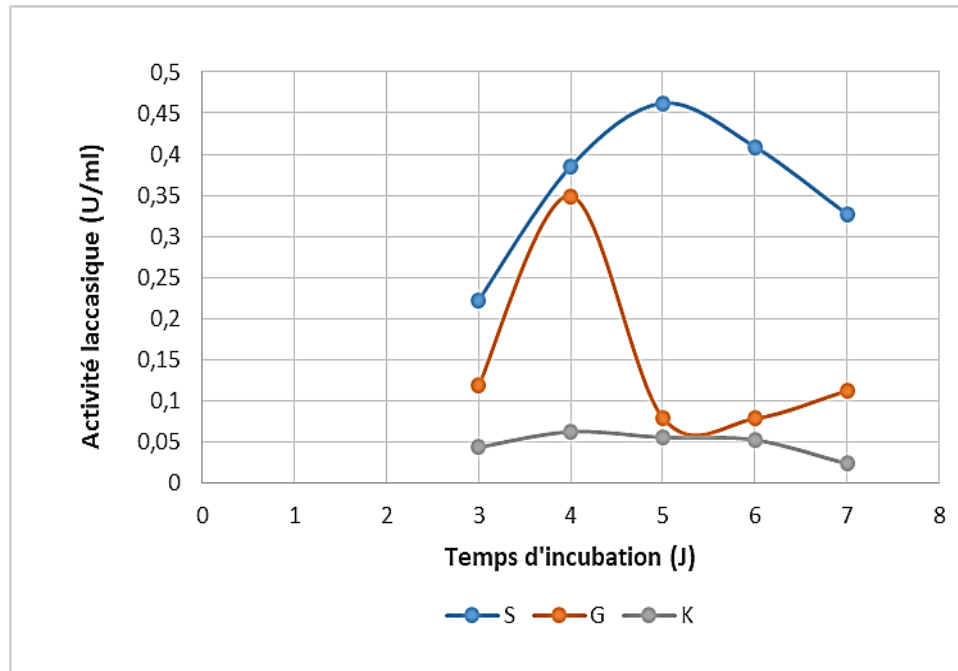
#### 4. Evaluation de l'activité laccasique

Le dosage de l'activité laccasique a été réalisé par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450nm. Les résultats obtenus (**Figure 18**) révèlent une production importante de l'enzyme laccase. En effet, le son de blé a donné une meilleure production (entre 0.222 - 0.462U /ml) par rapport aux déchets de grenade (entre 0.112 - 0.349U /ml) et la caroube (entre 0.023 - 0.062U/ml). Les résultats des travaux de El-Batal et *al.*, 2015 ont montré une bonne production de laccase par le son du blé, ceci confirme les résultats obtenus lors de cette recherche.

Aussi, l'analyse des graphes montre que le maximum d'activités est atteint le 4ème et le 5ème jour. Ensuite, l'activité commence à diminuer vu l'épuisement du substrat.

#### Remarque

L'activité laccasique a augmenté les derniers jours dans le flacon des déchets de grenade en raison d'une contamination fongique.



**Figure 18 :** Activité laccasique à partir du troisième jour d’incubation (S : son de blé ; G : déchets de grenade ; K : caroube).

## 5. Test de décoloration

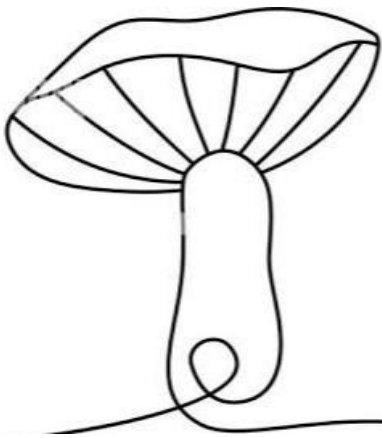
Le test de décoloration a été réalisé à l’aide de colorant rouge neutre. Le suivi des résultats a été effectué dès le 3<sup>ème</sup> jour de fermentation pour les trois substrats testés.

En effet, la lecture a été réalisée après trois jours d’incubation des tubes à 29°C. Les résultats ont montré un éclaircissement du colorant. Les résultats positifs les plus significatifs ont été obtenus avec les concentrations 0.3% et 0.4% de filtrat pour tous les substrats phénoliques. Par contre, on note que les résultats de décoloration avec la concentration de 0.1 % et 0.2% ont été médiocres. On note aussi que le degré de décoloration est supérieur pour le substrat son de blé en comparaison avec les autres substrats à savoir la caroube et les déchets de grenade (**Tableau 4**). D’après les recherches de Palaskar et *al.*, 2022, l’enzyme laccase est capable de décoloré un certain nombre de colorants tels que : le rouge neutre, cristal violet, l’orange de méthyle...etc.



**Tableau 4 :** Résultats des tests de décolorations après le 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour d'incubation des flacons de fermentation.

S	[E]%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%
	Le son de blé	J 3	-	+	+
J 4		+	+	++	++
J 5		+	+	++	++
J 6		-	+	+	+
J 7		-	+	+	+
Les déchets de grenade	J 3	-	+	+	+
	J 4	+	+	+	++
	J 5	+	+	+	+
	J 6	-	-	+	+
	J 7	-	-	+	+
La caroube	J 3	-	-	+	+
	J 4	+	+	+	+
	J 5	-	+	+	+
	J 6	-	-	+	+
	J 7	-	-	+	+



# **Conclusion**

## Conclusion générale

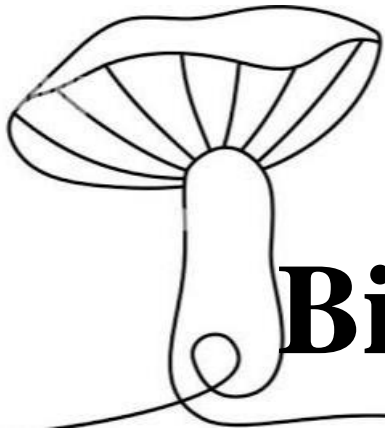
Le *Pleurotus ostreatus* est un champignon comestible apprécié pour sa saveur et son goût agréable. Ce basidiomycète attire de plus en plus l'attention. Des recherches scientifiques ont démontré que cette espèce produit un complexe enzymatique ligninolytiques composé de divers types d'enzyme, notamment la laccase. Cette macromolécule a la capacité à dégrader des composés phénoliques et capable de décolorer différentes classes de colorants industriels.

À ce fait, Le présent travail a porté sur la production de la laccase à partir de *Pleurotus ostreatus* par fermentation solide, sur des substrats phénoliques à savoir : le son de blé, les déchets de grenade et la caroube. En effet, Le résultat de test de production de laccase sur milieu gélosé montre une zone de lyse de 16 mm de diamètre de couleur brun rougeâtre illustrative de la présence de la laccase.

Par ailleurs, La fermentation a été effectuée sur les trois substrats cités précédemment, on note qu'y a eu une production par rapport aux modifications observées sur les milieux. L'activité laccasique a été maximale pour le son de blé (0.462 U/ml), suivi des déchets de grenade (0.349 U/ml) et une faible activité pour la caroube (l'activité est particulièrement dans les graines) (0.062 U/ml).

En fin, Le test de décoloration a montré des résultats positifs concernant les concentrations 0.3% et 0.4%. Ceci n'est pas un travail finalisé, il doit être complété par d'autres recherches supplémentaires. Pour cela, plusieurs perspectives sont préconisés notamment :

- ✓ La sélection d'autres souches fongiques productrices de laccase plus performantes ;
- ✓ L'utilisation d'autres substrats phénoliques et capables de fournir un bon rendement de la laccase ;
- ✓ Expérimentation de la fermentation liquide ;
- ✓ L'optimisation des conditions de fermentation (pH, température, composition du milieu...etc.) ;
- ✓ Purification et caractérisation de la laccase produite ;
- ✓ Exploitation de la laccase dans des différentes applications industrielles.



# **Références Bibliographiques**

A

**Adebayo E.A.** et **Martinez-Carrera D.** (2015). Oyster mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. *African Journal of Biotechnology*, vol.14(1), p : 52-67.

**Agrawal K., Chaturvedi V., Verma P.** (2018). Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(4).

**Alcalde M.** (2007). Industrial enzymes ; structure, function and applications : Laccase ; Biological functions, molecular structure and industrial applications. New York : J.Polaina J. and A.P. MacCabe., p : 459-474.

**Almi H., Laoufi O., Boulmarka A., Oufroukh A., Kacem chaouch N., Dehimat L.** (2017). Multiplication and production of mushroom on laboratory scale on different substrates. *European Journal of Physical and Agricultural Sciences*.

**Andersson A.A.M., Dimberg L., Aman P., Landberg D.** (2014). Recent findings on certain bioactive components in whole grain wheat and rye. *Journal Cereal Science*, 59, p : 294 - 311.

**Arregui L., Ayala M., Gil X.G., Soto S.S., Luna C.E.H., de los Santos M.H., Levin L., Dominguez A.R., Martinez D.R., Saparrat M.C.N., Roldàn M.A.T., Crus N.A.V.** (2019). Laccases : Structure, function and potential application in water bioremediation. *Microbiol Cell Factories*, Vol.18.

**Aryal S.** (2022). Solid state fermentation [en ligne]. (Page consultée le 28 avril 2024). <https://www.microbenotes.com/solid-state-fermentation-ssf/>

**Apprich, S., Tirpanalan O., Hell J. € et al.** (2013). Wheat bran-based biorefinery 2: valorisation of products. *LWT-Food Science and Technology*, 56, p : 222–231.

**Avallone R., Plessi M., Baraldi M., Monzani A.** (1997). Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, p : 166-172.

B

**Bastianetto Ph. D. S.** (2013). Caroube [en ligne]. (Page consultée le 29 avril 2024). <https://www.passeportsante.net/fr/Solutions/PlantesSupplements/Fiche.aspx?doc=caroube>

**Bataille G., Coster Q., Gilet M., Robise, Aurelie** (2011). La chimie du vert : ou comment allier industrie des couleurs et écologie ?. *Maison des sciences*.

**Bellettini M. B., Fiorda F.A.P., Maieves H. A., Teixeira G. L., Avila S., Hornung P. S., Junior A. M., Ribani R. H.** (2019). Factors affecting mushroom *Pleurotus spp.* *Saudi Journal of Biological sciences*, V. 26, p : 633-646.

- Ben Ali W.** (2021). Criblage de la diversité fongique marine visant à identifier des nouvelles oxydases pour les biotechnologies et le développement durable. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Université d'Aix-Marseille et Université de Sfax, Tunisie.
- Benamar-Mansour M.** (2016). Valorisation de résidus agricoles par la culture de deux souches de champignons comestibles du genre *Pleurotus*. Thèse de Doctorat en sciences biologiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 232 pages.
- Bhargav S., Panda B.P., Ali M., Javed S.** (2008). Solid state fermentation. An Overview. *Chem. Biochem. Eng. Q*, 22(1), p : 49-70.
- Biesebeke R., Ruijter G., Rahardjo Y.S.P., Hoogschagen M.J., Heerikhuisen M., Levin A., van Driel K.G.A., Schutyser M.A.I.; Dijksterhuis J., Zhu Y., Weber F.J. de Vos W.M., van den Hondel K.A.M.J.J., Rinzema A., Punt P.J.** (2002). *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS Yeast Research*, 2 (2), p : 245–248.
- Buyck B. et Polèse J.M.** (2017). Pleurote en forme d'huitre (*Pleurotus ostreatus*) [en ligne]. (Page consultée le 20 mars 2024). <https://www.rustica.fr/champignons/pleurote-forme-d-huitre-pleurotus-ostreatus,13897.html>.

### \_C\_

- Camarero S., Ibarra D., Martinez M.J., Martinez A.T.** (2005). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl Environ Microb*, 71, p : 1775-7784.
- Chabasse D., Guiguen C., Contet-Audonneau N.** (1999). Mycologie médicale. Masson. Paris.
- Claus H.** (2004). Laccases : Structure, reations, distribution. *Micron*. 35, p : 93-96.
- Couto S.R. et Herrera J.L.T.** (2006). Industrial and biotechnological applications of laccase : A review. *Biotechnol Advences*, 24, p : 500-513.
- Couto S. R. et Sanroman M.** (2006). Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *Journal of Food Engineering*, 76, p : 291-302.

### \_D\_

- Dana M., Khaniki G.B., Mokhtarieh A.A., Davarpanah S.J.** (2017). Biotechnological and Industrial Applications of Laccase : A review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 4(4). P : 675-679.
- Davet P. et Rouxel F.** (1997). Vie Microbienne Du Sol Et Production Végétales, (Edn) Inra.Paris.

**De Mattos-Shipley K.M.J., Ford K.L., Alberti F., Banks A.M., Bailey A.M., Foster G.D.** (2016). The good, the bad and the tasty : The many roles of mushrooms. *Studies in Mycology*, 85, p : 125-157.

**Deepalakshmi K. et Mirunalini S.** (2014). *Pleurotus ostreatus* : an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal Biochem Tech*, 5(2), p : 718-726.

**Demers S.** (2015). Champignons : les techniques de production en forêt [en ligne]. (Page consultée le 2 avril 2024). <https://www.culturinnov.qc.ca/>

**Devaux G.** (2024). Bienfaits du son de blé prouvés par la science. *Au Paradis du Thé* [en ligne]

**Ding Z., Chen Y., Xu Z., Peng L., Xu G., Gu Z., Zhang L., Shi G., Zhang K.** (2014). Production and characterization of laccase from *Pleurotus ferulae* in submerged fermentation. *Ann Microbiol*, 64, p : 121-129.

**Do Rosário F.M., Karmali A., Arteiro J.M.** (2012). Production, purification and characterization of Laccase from *Pleurotus ostreatus* grown on tomato pomace. *World J Microbiol Biotechnol*, 28, p : 245-254.

**Duchiron F. et Copinet E.** (2011). Fermentation en milieu solide (FMS). *Technique de l'ingénieur*. <https://www.techniques-ingenieur.fr/>

#### \_E\_

**El-Batal A., Elkenawy N.M., Yassin A.S., Magdy A.A.** (2015). Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. *Biotechnology reports*, 5, p : 31-39.

**Elsayed M.A., Hassan M.M., Elshafei A.M., Haroun B.M., Othman A.M.** (2012). Optimization of Cultural and Nutritional Parameters for the Production of Laccase by *Pleurotus ostreatus* ARC280. *British Biotechnology Journal*, 2(3), p : 115-132.

#### \_G\_

**Gervais P. et Molin P.** (2003). The role of water in solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, p : 85-101.

**Gèvry M.F., Simard D., Roy G.** (2009). Champignons comestibles du lac Saint-Jean. *Forêt modèle du lac Saint-Jean*. France, 67 pages.

**Goulas V., Stylos E., Chatziathanasiadou M.V., Mavromoustakos T., Tzakos A.G.** (2016). Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. *Int J Mol Sci*, 17(11).

**Guzmán G.** (2000). Genus *Pleurotus* (Jack. : FR) P.Kumm. (*Agaricomycetideae*) : Diversity, Taxonomic problems, and Cultural and Traditional Medicinal Uses. *International Journal of Medicinal Mushroom*, Vol. 2, p : 95-123.

### \_H\_

**Hawrez A.N.** (2019). Use of pomegranate peel mixed with wheat straw as the substrate to cultivation of two *Pleurotus* species. *MANTAR DERGİSİ/The Journal of Fungus*, 10(Özel Sayı) 186-192.

### \_J\_

**Johannes C. et Majcherczyk A.** (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl Environ Microbiol*, 66(2), p : 524-528.

### \_K\_

**Kotadiya U., Talaviya J., Shah K., Lathiya S.** (2021). Morphological and Molecular Identification of Oyster Mushroom [*Pleurotus ostreatus* (Jacq.)P.Kumm]. Reseach Square.

### \_L\_

**Lambrey O.** (2010). Le monde des champignons [en ligne]. (Page consultée le 20 mars 2024]. <https://www.kloranebotanical.foundation/la-botanique/dossiers/champignons-et-lichens/le-monde-des-champignons>.

**Lal Dhar B.** (2017). Mushrooms and human civilization: Edible and medicinal mushrooms: Technology and applications. First edition. John Wiley and sons Ltd. 592 pages.

**Leo S., Phillips F., O'sullivan K., Walton J.** (2012). Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective. *International Journal of Food Sciences and Nutrizion*, 63(8), p : 1001-1013.

**Leontopoulos D., Sifaka A., Markaki P.** (2002). Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production. *Food Microbiol.* 20, 119-126.

**Lizardi-Jiménez M. et Hernández-Martinez R.** (2017). Solid State Fermentation (SSF) : diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech*, Vol.7(44).

**Loi M., Glazunova O., Fedorova T., Logrieco A.F., Mulè G.** (2021). Fungal laccases : The Forfront of Enzymes for Sustainability. *Journal of Fungi*, 7, 1048.

**Lund F., Nielsen A.B., Skouboe P.** (2002). Distribution of *Penicillium commune* isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolite profiles, morphotypes, RAPD and AFLP fingerprinting. *Food Microbiol.* 20, 725-734.



M

- Madhavi V. et Lele S.S.** (2009). Laccase : properties and applications. *BioResources*, 4(4), p : 1694-1717.
- Mata G. et Salmones D.** (2003). Edible Mushroom Cultivation at the Institute of Ecology in Mexico. *Micologia Aplicada International*, Vol.15 (1), p : 23-29.
- Matera I., Gullotto A., Tilli S., Ferraroni M., Scozzafava A., Briganti F.** (2008). Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with *P-toluate*. *Inorg Chim Acta*, 361(14-15), p : 4129-4137.
- Mazumder S., Basu S.K., Mina M.** (2009). Laccase production in solid-state and submerged fermentation by *Pleurotus ostreatus*. *Eng Life Sci*, 9(1), p : 45-52.
- Metri Y., Warly L., Suyitman** (2018). Biodegradation of Lignin by White Rote Fungi (*Pleurotus ostreatus*) to Decrease the Fibre Components in the Palm Midrib. Pakistan. *Journal of Nutrition*, 17, p : 71-75.
- Mo Y., Ma J., Gao W., Zhang L., Li Jianguai., Li Jinging, Zang J.** (2022). Pomegranate peel as a source of bioactive compounds: a mini review on their physiological functions. *Sec. Nutrition and food science technology*, Vol. 9.
- Mondo J., Balezi A., Mugomoka V., Zigashane L., Bagula E., Kashosi T., Mputu J. N., Mushagalusa G.** (2016). Effets des milieux de culture (PDA, SDA, SPDA, blé et maïs) sur la productivité In Vitro de la souche P969 du *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. kumm. *Afrique SCIENCE*, 12(4), p : 374- 381.
- Montazer M. et Maryan A.S.** (2008). Application of laccases with cellulases on denim for clean effluent and repeatable biowashing. *J Appl Polym Sci*, Vol.110, p : 3121-3129.
- More S.S., Renuka P.S., Pruthvi K., Swetha M., Malini S., Veena S.M.** (2011). Isolation, Purification and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus sp.* *SAGE-Hindawi Access Research. Enzyme Research*, Vol.10.

N

- Nakazawa T., Kawauchi M., Otsuka Y., Han J., Koshi D., Schiphof K., Ramirez L., Pisabarro A. G., Honda Y.** (2024). *Pleurotus ostreatus* as a model mushroom in genetics, cell biology, and material sciences. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108: 217.

**\_O\_**

**Oei P., avec la contribution de Nieuwenhijzen B.V.** (2005). Agrodok (40) : La culture des champignons à petite échelle : Pleurotes, Siitakes et Auriculaires. Wageningen, Pays-Bas : Janna de Fiejter, 86 pages.

**Onipe O., Jideani A., Beswa D.** (2015). Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, p : 2509-2518.

**\_P\_**

**Palaskar R. S., Kate S. A., Khandagale M. S., Namekar S. B., Aher S. B., Nale A. R., Tandale A. J.** (2022). Screening of Laccase producer from soil and its applications. *Journal of Advanced Scientific Research*, 13(1), p : 311-318.

**Pandey, A.** (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13 (2–3), p : 81–84.

**Papaefstathiou E., Agapiou A., Giannopoulos S., Kokkinofta R.** (2018). Nutritional characterization of carobs and traditional carob products. *WILEY food science and nutrition*.

**Patil S. S., Ahmed Syed A., Telang S. M., Baig M. M.V.** (2010). The Nutritional Value of *Pleurotus ostreatus* (Jacq., Fr.) Kum. Cultivated and Different Lignocellulosic Agro-Wastes. « *Dunàrea de Jos* » University\_ Galati. *Innovative Romanian Food Biotechnology*.

**Patrick F., Mtui G., Mshandete A.M., Johansson G., Kivaisi A.** (2009). Purification and characterization of a laccase from the basidiomycete *Funalia trogii* (Berk.) isolated in Tanzania. *African Journal of Biochemistry Research*, Vol.3 (5), p : 250-258.

**Prasad K. K., Mohan S. V., Bhaskar Y. V., Ramanaiah S.V., Babu V. L., Pati B. R., Sarma P.N.** (2005). Laccase Production Using *Pleurotus ostreatus* 1804 Immobilized in PUF Cubes in Batch and Packed Bed Reactors : Influence of Culture Conditions. *The Journal of Microbiology*, p : 301-307.

**Pundir R.K., Krishna M.V., Satish R., Megha L.** (2016). Screening of Laccase producing fungi from soil samples - An In Vitro Study. *Electronic Journal of Biology*, Vol.12(3): 254-257.

**\_R\_**

**Raimbault, M.** (1980). Fermentation en milieu solide: croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. *These ORSTOM (in French)*, p : 1–287.

**Riva S.** (2006). Laccases : Blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol*, 24, p : 219-226.

\_S\_

**Saar M.** et **Permasto E.** (2014). Primury Basidiospore Charge and Taxonomy of *Agaricomycetes*. *Central European Journal of Biology*, 9(9), p : 874-887.

**Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O.** (2000). Introduction of food and airborne fungi. 6th edition. Centraal bureau voor schimmelcultures. Utrecht.

**Shraddha, Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A.** (2011). Laccase : Microbiol sources, Production, Purification and Potential Biotechnological Applications [en ligne]. (Page consultée le 28 mars 2024). <https://www.hindawi.com/journals/er/2011/217861>

**Shumakovich G.P., Shleev S.V., Morozova O.V., Khohlov P.S., Gazaryan I.G., Yaropolov A.I.** (2006). Electrochemistry and kinetics of fungal laccase mediators. *Bioelectrochemistry*, 69, p : 16-24.

**Siddiqui S.A., Singh S., Nayik A.G.** (2024). Bioactive compound from pomegranate peels – Biological properties, structure–function relationships, health benefits and food applications – A comprehensive review. *Journal of Functional foods*.

**Singhania R.R., Patel A.K., Soccol C.R., Pandey A.** (2009). Recent Advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44 (1), p : 13–18.

**Sutradhar P., Saha I., Chakravarty A.** (2020). Évaluation of pomegranate peel as a substrate for citric acid production by *Aspergillus niger*. *Int J Curr Pharm Res*, Vol.12(3), p : 61-65.

\_T\_

**Terron M.C., Gonzàlez T., Carbajo J.M., Yague S., Arana-Cuenca A., Téllez A., Dobson A.D., Gonzàlez A.E.** (2004). Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccasse activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genet Biol*, 41(10), p : 954-962.

**Thomas L., Larroche C., Pandey A.** (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J*, 81, p : 146–161.

**Tifrit A.** (2016). Isolement et caractérisation des bactéries à intérêts biotechnologiques à partir de niches écologiques Algériennes. Thèse de Doctorat en Biologie Moléculaire et Génomique, Université Hassiba Benbouali, Chlef, 102 pages.

**Tremblais P.** (2017). Les Différentes Variétés des Champignons Cultivés [en ligne]. (Page consultée le 20 mars 2024). <https://www.lanutrition.fr>

**\_V\_**

**Van der Kamp M.W.** et **Mulholland A.J.** (2013). Combined quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods in computational enzymology. *Biochemistry*, 52 (16).

**Voyer O.** (2007). *Pleurotus ostreatus* (Jacquin) P.Kummer (1871) [en ligne]. (Page consultée le 10 mars 2024). <https://www.mycodb.fr/fiche.php?genre=pleurotus>

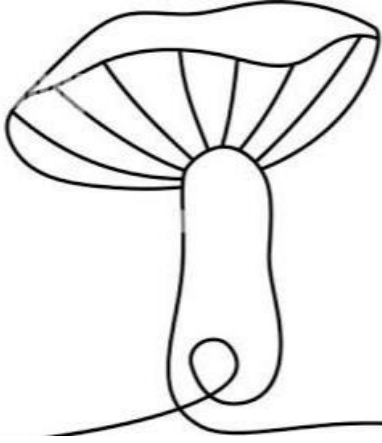
**\_Y\_**

**Yoshida H.** (1883). Chemistry of lacquer (Urushi) Part 1 Communication from the chemical society of Tokio. *J Chem Soc*, 43, p : 472-486.

**Yousif A.K.** et **Alghzawi H.M.** (2000). Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry*, 69, p : 283-287.

**\_Z\_**

**Zubiria L.** (2021). Pleurote. *Passeport Santé. Nutrition* [en ligne], (page consultée le 20 mars 2024) <https://www.paseporsante.net/portail/nutrition>.



# **Annexes**

**Annexe 1 : Les milieux de cultures**

➤ Composition du milieu Sabouraud :

Peptones	10 g
Dextrose	40 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 L
pH	5.6

➤ Composition d'agar blanc :

Agar	10 g
Eau distillée	180 ml

**Annexe 2 : préparation de solution de rouge neutre**

Sur une balance, 0.1 g de poudre de rouge neutre a été pesé. Ensuite, la poudre a été versée dans un bécher, et l'eau distillée a été ajoutée petit à petit avec l'agitation jusqu'à l'obtention d'un volume final de 100 ml. Le pH de la solution a été ajusté à (pH=7) en ajoutant un volume précis d'acide citrique.

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : TEUCHTACHE Meriem  
KRAITI Lina

*Production d'une Laccase fongique par *Pleurotus ostreatus* par fermentation solide sur substrats phénoliques*

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

Le plan de travail a porté sur la production de la laccase par *Pleurotus ostreatus*, un champignon comestible, en utilisant trois substrats phénoliques : le son de blé, les déchets de grenade et la caroube. La réactivation de la souche en question a confirmé les caractères culturels spécifiques à cette espèce fongique. Par ailleurs, le test de production de laccase sur milieu solide (Agar blanc), a montré que *P. ostreatus* est capable de produire cette enzyme, où le résultat a été exprimé sous forme d'un halo. La fermentation solide a révélé que le son de blé était le meilleur substrat pour la production de la laccase, avec une activité laccasique maximale de 0.462 U/ml atteint le cinquième jour de fermentation, par rapport aux déchets de grenade (le maximum de production est 0.349U/ml) et à la caroube (0.062U/ml). Les résultats de décoloration sont positifs et en relation avec ceux de fermentation, où l'enzyme était capable de dévaloriser le colorant "rouge neutre" par la réduction de sa couleur surtout pour le son de blé avec les concentrations 0.3% et 0.4%, confirmant la capacité de dégradation de la laccase.

**Mots-clefs :** Laccase, *Pleurotus ostreatus*, son de blé, déchets de grenade, caroube, fermentation solide.

**Laboratoires de recherche :** Laboratoire pédagogique de la Microbiologie (Lab 9) de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à U Constantine 1 Frères Mentouri.

**Président du jury :** Dr ABDELAZIZ Ouided (MC(B) - U Constantine 1 Frères Mentouri).  
**Encadrant :** Dr ALMI Hiba (MC(B) - U Constantine 1 Frères Mentouri).  
**Examineur :** Dr ZAAMOUCI Ahlem (MA(B) - U Constantine 1 Frères Mentouri).