

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCE AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie
Option : Biochimie Appliquée

Thème

*Mise en évidence des activités cellulolytiques, xylanolytiques
et amylolytiques issues de différentes souches fongiques*

Présenté par :

Melle : ATEK Yasmine

Melle : BENOUALI Yasmine

Devant le jury composé de :

Mme ABDOUNE Samia	Maitre-assistante Classe A	UMMTO	Présidente
Melle DERMECHE Samia	Maitre-assistante Classe A	UMMTO	Promotrice
Melle ISSELNANE Souad	Maitre-assistante Classe B	UMMTO	Co- promotrice
Mme SENOUSI Chahra	Maitre-assistante Classe A	UMMTO	Examinatrice
Mr TITOUCHE Yacine	Maitre-assistant Classe A	UMMTO	Examineur

2015-2016

Remerciements

Nos remerciements vont en premier lieu à Dieu le tout puissant qui nous a donné le courage, la force et la santé pour réaliser ce travail.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et à remercier toutes personnes, qui grâce à leur aide, notre travail a vu le jour :

*Notre promotrice **Mlle DERMECHE S**, Maitre-assistante Classe A à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour son suivi, sa patience, sa rigueur et ses précieux conseils qui nous ont aidés dans la réalisation de ce travail.*

*Notre Co-promotrice **Mlle ISSELNANE S**, Maitre-assistante Classe B à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour son suivi, sa patience, sa rigueur et ses précieux conseils qui nous ont aidés dans la réalisation de ce travail.*

*Nous adressons notre reconnaissance à **Mme ABDOUNE S**, Maitre-assistante Classe A à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous tenons à remercier également Mr **TITOUCHE Y** et **Mme SENOUSI C** qui nous font l'honneur d'être les examinateurs de ce mémoire.*

Dédicaces

Nous dédions ce modeste travail

*A ceux qui nous ont donné sans rien en retour,
A ceux qui nous ont encouragés et soutenus durant notre vie,
Et ceux à qui nous devons tant.*

*A nos parents, que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux
de nos profondes reconnaissances pour tout ce que vous avez fait.*

*A nos frères et sœurs, qui nous ont soutenu et encouragé (Aghiles,
Sofiane, Ryma, Maya)*

A nos chères familles

A tous nos ami(e)s

*Nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin
à la réalisation de ce travail.*

Résumé

Les enzymes peuvent être produites par divers micro-organismes tels que les bactéries, les champignons et les levures. L'avantage d'utiliser ces derniers est que la production de biomasse est économique et les microbes sont faciles à manipuler pour la production d'enzymes présentant des caractéristiques souhaitées.

Les caractères biochimiques et nutritionnels des champignons filamenteux peuvent être un outil de travail appréciable pour caractériser les souches étudiées par le taux de production de protéines (enzymes) qui peuvent être produites à grande échelle sur des déchets agricoles et/ou utilisée dans le domaine des bioconversions et la valorisation des déchets agricoles.

Le but de la présente étude était la production et la mise en évidence des activités d'enzymes de type cellulases, xylanases et amylases issus de champignons filamenteux, *Trichoderma reesei*, *Penicillium sp*, *Penicillium camemberti*, *Aspergillus niger* sur milieu solide et liquide. Pour cela, les dérivés de cellulose, xylane et l'amidon sont utilisés comme substrats et la détermination de leur PM en réalisant une électrophorèse PAGE-SDS et un zymogramme.

De nombreux essais de fermentation sont menés sur milieu solide ainsi que sur milieu liquide afin de déterminer si les genres de champignons testés présentent la capacité de dégrader ou pas les substrats testés. Les meilleures activités sont obtenues avec la souche d'*Aspergillus niger* quelque soit le substrat utilisé. Les pourcentages de dégradation sont de l'ordre de 35.5%, 29.3%, 39% pour le xylane, cellulose et amidon, respectivement.

Lors de l'analyse du zymogramme des extraits de culture sur du xylane, une activité xylanolytique a été détectée avec une protéine de masse moléculaire d'environ 31,6 kDa chez *Aspergillus niger*. Cette dernière souche présente aussi probablement des activités amylolytiques de masse moléculaire d'environ 39,8 et 90, ainsi que des activités cellulolytiques de PM 39.8 et 36.5 déterminées sur un profil électrophoretique des extraits de culture sur l'avicel. Sur ce même profil des activités cellulolytiques concernant la souche *Penicillium sp* ont été obtenues avec des masses moléculaires de 48.5 kDa et 39.8 kDa.

Ces résultats ouvrent d'autres perspectives qui consistent en l'optimisation des milieux de production pour de meilleurs rendements et visualisations des activités enzymatiques avec les deux méthodes employées.

Mots clés : amylase / cellulase / xylanase / champignons filamenteux / bioconversion / fermentation solide et liquide / électrophorèse / zymogramme.

Abstract

The enzymes can be produced by various microorganisms such as bacteria, fungi and yeasts. The advantage of using these enzymes is that the biomass production is economical and microbes are easy to manipulate to enzymes production with desired characteristics.

Biochemical and nutritional characteristics of the filamentous fungi can be an important new tool to characterize the strains studied by the protein production rate (enzymes) that can be produced on a large scale agricultural waste and / or used in the field bioconversions and the development of agricultural waste.

Many fermentation trials have been performed on solid medium as well as liquid medium in order to screen which fungi genera have the ability to degrade or not the substrate. The best activities are obtained with the strain of *Aspergillus Niger* whatever the substrate used. degradation percentages are of the order of 35.5%, 29.3%, 39% xylan, cellulose and starch respectively.

When zymogram analysis of culture extracts of xylan, a xylanolytic activity was detected with a molecular weight of about 31.6 kDa protein in *Aspergillus Niger*. The latter strain has also probably amylolytic activities of molecular weight of about 39.8 kDa and 90 kDa, and cellulolytic activities of PM 39.8 and 36.5 determined on an electrophoretic profile of culture extracts of avicel. On the same profile cellulolytic activities on *Penicillium sp* were obtained with molecular weight of 48.5 kDa and 39.8 kDa.

These results open new perspectives that involve the optimization of production environments for better yields and visualizations of enzyme activities with both méthode.

Key words: amylase / cellulase / xylanase / filamentous fungi / bioconversion / solid and liquid fermentation / electrophoresis / zymogram.

Table des matières

Table des matières

Introduction générale.....	01
1. Revue bibliographique sur les enzymes utilisées	
1.1. Les enzymes cellulolytiques.....	02
1.1.1. Cellulose.....	02
1.1.1.1. Structure.....	03
1.1.1.2. Dérivés de cellulose.....	03
1.1.1.2.1. L'avicel.....	03
1.1.1.2.2. Acétate de cellulose(C100).....	04
1.1.1.2.3. La Carboxyméthylcellulose (CMC).....	04
1.1.2. Les Cellulases.....	05
1.1.2.1. Structure de la cellulase.....	06
1.1.2.2. Mécanisme d'action	08
1.1.2.3. Les différentes origines de la cellulase.....	08
1.1.2.4. Production de cellulases.....	09
1.1.2.5. Applications.....	11
1.2. Les enzymes xylanolytiques.....	12
1.2.1. Xylane.....	12
1.2.1.1. Structure	12
1.2.2. Les Xylanases.....	13
1.2.2.1. Structure des xylanases.....	14
1.2.2.2. Mécanisme d'action.....	15
1.2.2.3. Production de xylanases.....	16
1.2.2.4. Applications.....	18
1.3. Les enzymes amylolytiques.....	18
1.3.1. Amidon.....	18
1.3.1.1. Structure	19
1.3.2. Les amylases.....	20
1.3.2.1. Structure et mécanisme d'action	22
1.3.2.2. Origine des enzymes amylolytiques	23
1.3.2.3. Production d'amylases.....	24
1.3.2.3.1. La fermentation	24
1.3.2.3.2. Le maltage des céréales.....	25

1.3.2.4. Applications	26
1.4. Valorisation de la biomasse lignocellulosique	26
1.4.1. La biomasse lignocellulosique	26
1.4.2. Bioconversion.....	27
1.4.3. Production d'enzymes hydrolytiques.....	27
1.4.4. Bioénergies issues par fermentation d'hydrolysats de cellulose	28
1.4.5. Autres biomolécules	29
2. Matériel et méthodes.....	30
2.1. Matériel.....	31
2.2. Souches fongiques utilisées	31
2.3. Substrats et Milieux de culture	33
2.4. Inoculation des cultures	33
2.4.1. Milieu solide.....	33
2.4.2. Milieu liquide.....	33
2.5. Mesure de la matière sèche produite.....	34
2.6. Détermination de la teneur en protéines.....	34
2.6.1. Méthode de Lowry <i>et al.</i> (1951).....	34
2.6.2. Méthode de Bradford (1976).....	35
2.7. Mesure de l'activité enzymatique des enzymes utilisées.....	35
2.8. Méthodes électrophorétiques.....	37
2.8.1. La séparation sur gel de polyacrylamide.....	37
2.8.2. Conditions générale et conduite d'électrophorèse.....	37
2.8.2.1. Préparation des échantillons destinés à l'analyse électrophorétique.....	37
2.8.2.2. Dépôt de l'échantillon dans le gel et mise sous tension.....	38
2.8.2.3. Révélation des bandes de migration électrophorétique.....	38
2.8.2.4. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes (PAGE SDS).....	38
2.9. Zymogramme des enzymes xylanolytiques, cellulolytiques et amylolytiques.....	39
3. Résultats et discussions.....	40
3.1. Développement des souches sur milieu solide.....	40
3.2. Développement des souches sur milieu liquide.....	43
3.2.1. Hydrolyse de la cellulose en milieu liquide.....	43
3.2.2. Hydrolyse du xylane en milieu liquide.....	44
3.2.3. Hydrolyse de l'amidon en milieu liquide.....	45
3.3. Dosage de l'activité enzymatique	46

3.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en PAGE-SDS des extraits de culture de différentes souches et leur zymogramme.....	48
3.4.1. Recherche d'activité xylanolytique.....	49
3.4.2. Recherche d'activité cellulolytique.....	50
3.4.3. Recherche d'activité amylolytique.....	52
Conclusion générale.....	54
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

Abréviation	Désignation
AGX	Arabino-glucuronoxylanes
AX	Arabinoxylanes
BSA	Bovine Serum Albumin
C100	Acétate de cellulose
CBD	Cellulose binding domain
DNS	Acide 3,5 dinitrosalicylique
DO	Densité Optique
GH	Glycoside hydrolase
MW	Mendel et Weber
Nm	Nanomètre
PAGE	PolyAcrylamid Gel Electrophoresis
PDA	Potato Dextrose Agar
PM	Poids moléculaire
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
FML	Fermentation milieu liquide
FMS	Fermentation milieu solide
TEMED	N,N,N'N' –Tetraméthyl- éthylène diamine

Liste des figures

<i>Figures</i>	<i>Titre</i>	<i>Pages</i>
Figure 01	Microfibrilles de cellulose (COSGROVE, 2005).....	02
Figure 02	Structure de base de la cellulose (JASPARD, 2012)	03
Figure 03	Structure chimique de l'avicel (JAWID <i>et al</i> , 2011).....	04
Figure 04	Structure chimique de C100 (KUMAR <i>et al</i> , 2016).....	04
Figure 05	Structure chimique de CMC (HARIJANTO <i>et al</i> , 1991).....	05
Figure 06	Structure tridimensionnelle d'une endo-cellulase de <i>Trichoderma reesei</i> (SANDGREN <i>et al</i> ,2003).....	07
Figure 07	Représentation schématique du site actif de la cellulase (BECKHAM <i>et al</i> , 2010).....	07
Figure 08	Schéma présentatif du mode d'action synergique des cellulases (GUSAKOV, 2011)	08
Figure 09	Structures chimiques d'une chaîne de xylane (SCHELLER et ULVSKOV, 2010).....	12
Figure 10	Structure tridimensionnelle d'une endo-xylanase de <i>Trichoderma reesei</i> (SAVCHENKO <i>et al</i> , 2015).....	15
Figure 11	Mode d'action des enzymes xylanolytiques sur la chaîne principale et les ramifications du xylane (BEG <i>et al</i> , 2001).....	16
Figure 12	Photo de grains d'amidon sous microscope électronique au grossissement Moyen 100 (MANUMANU, 2010.....	19
Figure 13	Structure chimique des composants de l'amidon (l'amylose et l'amylopectine) (BULEON <i>et al</i> , 1998).....	20
Figure 14	Structure tridimensionnelle des enzymes amylolytiques (A= α -amylase, B= β -amylase, C= γ -amylase) (STEVENSON <i>et al</i> , 2010 ; SAGAHARA <i>et al</i> , 2013).....	23
Figure 15	Diagramme récapitulatif de méthode de travail.....	30
Figure 16	Aspect des pré-cultures des souches étudiées sur les deux milieux PDA et OGA.....	32
Figure 17	Courbe d'étalonnage du dosage des protéines par la méthode de LOWRY <i>et al</i> (1951).....	34
Figure 18	Courbe d'étalonnage du dosage des protéines par la méthode de Bradford	

	(1976).....	35
Figure 19	Courbe d'étalonnage pour le dosage colorimétrique du maltose	36
Figure 20	Courbe d'étalonnage pour le dosage colorimétrique du xylose.....	36
Figure 21	Courbe d'étalonnage pour le dosage colorimétrique du glucose	36
Figure 22	Photographies des cultures d' <i>Aspergillus niger</i> et de <i>Penicillium.sp</i> sur milieu solide MW.....	41
Figure 23	Photographies des cultures de <i>Penicillium camemberti</i> et de <i>Trichoderma reesei</i> sur milieu solide MW.....	42
Figure 24	Photographie d'une monoculture en batch des champignons sur le milieu liquide MW contenant l'un des dérivés de cellulose.....	44
Figure 25	Photographie d'une monoculture en batch des champignons sur le milieu liquide MW à base de xylane.....	46
Figure 26	Photographie d'une monoculture en batch des champignons sur le milieu liquide MW à base d'amidon.....	46
Figure 27	Mesure de la matière sèche des culots après cultures des quatre genres de champignons.....	46
Figure 28	Activité cellulolytique, xylanolytique et amylolytique sur trois substrats témoins Xylane, Avicel et CMC. (A) <i>Penicillium sp</i> ; (B) <i>Penicillium camemberti</i> ; (C) <i>Trichoderma reesei</i> ; et (D) d' <i>Aspergillus niger</i>	48
Figure 29	Profil électrophorétique en SDS-PAGE avec β -ME des protéines du surnageant obtenu après culture sur du xylane.....	49
Figure 30	Zymogramme de xylanase en conditions dénaturantes (SDS).....	50
Figure 31	Profil électrophorétique en SDS-PAGE avec β -ME des protéines du surnageant obtenu après culture sur l'avicel.....	51
Figure 32	Profil électrophorétique en PAGE-SDS avec β -ME des protéines du surnageant obtenu après culture sur l'amidon.....	53

Liste des tableaux

<i>Tableaux</i>	<i>Titre</i>	<i>Pages</i>
Tableau I	Teneur en cellulose de différentes espèces végétales (SHIRAISHI, 2000)....	02
Tableau II	Caractéristiques des enzymes cellulolytiques (HOFER <i>et al</i> , 1989 ; DAN <i>et al</i> , 2000 ; ANDO <i>et al</i> , 2002 ; LEE <i>et al</i> , 2010 ; SHARADA <i>et al</i> , 2014 ; RAGHUWANSHI <i>et al</i> , 2014).....	06
Tableau III	Quelques microorganismes producteurs des enzymes cellulolytiques.....	10
Tableau IV	Applications de la cellulase dans différentes industries (ODIER et ROUAU, 1985 ; GUSAKOV <i>et al</i> , 2000 ; CHANDER KUHAD <i>et al</i> , 2011).....	11
Tableau V	Caractéristiques des xylanases (BAKRI, 2003).....	13
Tableau VI	Propriétés des endo-xylanases des familles 10 et 11 (BAKRI, 2003 ; BIELY, 2003).....	14
Tableau VII	Quelques microorganismes producteurs de xylanase.....	17
Tableau VIII	Applications de xylanases dans les différentes industries (COLLINS <i>et al</i> , 2005 ; GABRIEL, 2005).....	18
Tableau IX	Caractéristiques des amylases (FRENCH, 1960 ; OHBA <i>et al</i> , 1979).....	22
Tableau X	Production d'enzymes amylolytiques par certains microorganismes.....	25
Tableau XI	Applications d'alpha amylase dans les différentes industries. (AEHLE et MISSET, 1999 ; AIYER, 2005 ; SOUZA <i>et al</i> , 2010 ; ALAM et KUMAR, 2011 ; HASHEMI <i>et al</i> , 2014).....	26
Tableau XII	Les différents appareillages, verreries et autres matériel utilisés.....	31

Introduction générale

Les enzymes sont des protéines lesquelles, en raison de leurs propriétés spécifiques, participent à la synthèse de molécules, elles peuvent accélérer certaines réactions chimiques par divers facteurs. Ce sont les outils-clés des biotechnologies car elles offrent de nombreuses possibilités d'applications dans différents domaines : en industries agroalimentaires (industries laitières, brasseries, biscuiteries, panification...), en industries chimiques (détergents, textiles et tannerie), en clinique (enzymes réactifs, enzymes de diagnostic, enzymothérapie par des protéines recombinantes) en recherches (Protéomique et en Génomique) et autres.

Dans la plupart des cas, la production d'enzymes hydrolytiques (les cellulases, les xylanases et les amylases) se fait par divers micro-organismes tels que les bactéries, les champignons et les levures. La culture de ces derniers s'effectue soit par fermentation solide ou submergée comme c'est le cas pour la production de la plupart des métabolites d'origine microbienne.

Ces enzymes sont considérés comme des produits importants obtenus pour les besoins humains par le biais de sources microbiennes. L'avantage d'utiliser des micro-organismes pour leur production est que la synthèse de masse est économique et sont faciles à manipuler pour obtenir des catalyseurs ayant des caractéristiques souhaitées. Les enzymes fongiques sont préférées par rapport aux autres sources microbiennes en raison de leur grand potentiel industriel.

Parmi Les champignons filamenteux producteurs de ces enzymes on peut citer *Trichoderma reesei*, *Penicillium sp*, *Penicillium camemberti*, *Aspergillus niger* en raison de leur facilité de culture et leur utilisation dans le domaine des bioconversions et la valorisation des déchets agricoles.

La valorisation du produit agricole doit nécessairement passer par la transformation et/ou la séparation de ses constituants. Dans le processus de transformation de la matière première, des enzymes sont souvent employées. L'utilisation de ces enzymes a principalement comme objectif de faciliter le procédé, d'améliorer la conservation et/ou les caractéristiques organoleptiques ou nutritionnelles et de corriger des déficiences naturelles ou de permettre la valorisation de certains sous-produits.

Le but de notre travail est d'étudier la production des enzymes hydrolytiques par des champignons filamenteux et leur intérêt biotechnologique. Les enzymes recherchées sont les cellulases, xylanases et amylases. Le premier volet de ce mémoire est consacré pour une revue bibliographique sur les propriétés, structures, fonctions et applications des enzymes en question suivie de la partie expérimentale où sont exposés le matériel et méthodes ainsi que les résultats obtenus.

Revue bibliographique sur les enzymes recherchées

1. Revue bibliographique sur les enzymes recherchées

1. 1. Les enzymes cellulolytiques

1. 1. 1. Cellulose

La cellulose naturelle est un glucide indigestible pour l'homme, c'est le principal constituant des végétaux et en particulier des parois de leurs cellules (GIEKENS *et al*, 1999 ; BROWN et SAXENA, 2007). On la retrouve dans le papier, le carton et les textiles fabriqués à partir de coton, lin et autres fibres végétales (Tableau 1).

Les fibres de cellulose sont la plupart du temps entourées d'une matrice d'autres biopolymères structuraux, les hémicelluloses et la lignine (WEI *et al*, 2009) (Figure 01). La cellulose est inodore, n'a pas de goût, et insoluble dans l'eau mais la présence des fonctions hydroxylées lui donne un caractère hydrophile ce qui lui permet de fixer un grand nombre de molécules d'eau et entraîne son gonflement (CLAISSE, 2013).

En raison de sa structure hautement ordonnée, la cellulose est très difficile à se dégrader (DEVI et KUMAR, 2012). Elle est généralement dégradée par une enzyme appelée cellulase. Cette enzyme est produite par plusieurs micro-organismes, généralement par des bactéries et des champignons (SREEDEVI *et al*, 2013).

La cellulose peut être solubilisée dans les acides, les bases ou les complexes inorganiques. Sa solubilisation est possible par conversion de cette dernière sous forme de dérivés esters ou éthers.

Tableau I : Teneur en cellulose de différentes espèces végétales (SHIRAISHI, 2000)

Espèces végétales	Teneur en cellulose (%)
Coton	95-99
Bois	40-50
Son de maïs	17-20
Paille	50-60

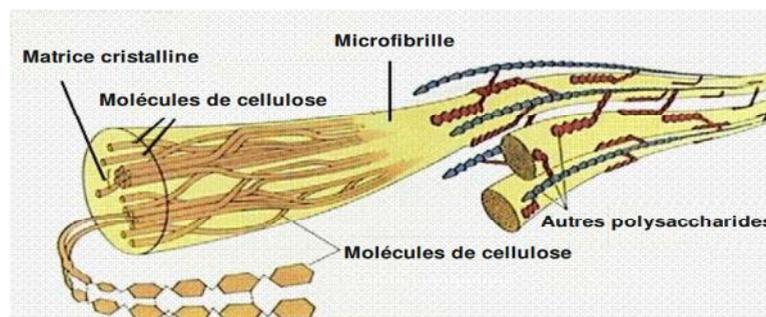


Figure 01 : Microfibrilles de cellulose (COSGROVE, 2005).

1.1.1.1. Structure de la cellulose

La cellulose est un homopolymère exclusivement linéaire du D-glucose en conformation 4C_1 dont la masse moléculaire varie entre 50 000 Da et $2,5 \cdot 10^6$ Da (500 à 14000 résidus de glucose). Les résidus glucose sont liés par des liaisons osidiques β (1 \rightarrow 4) (SOMERVILLE, 2006). Chaque unité glucose est liée à la suivante par une rotation de 180° (STICKLEN, 2008) et l'atome d'oxygène du cycle de l'une est uni par une liaison hydrogène au groupement hydroxyle en C-3 de la suivante. Son motif de répétition est le dimère cellobiose (Figure 02).

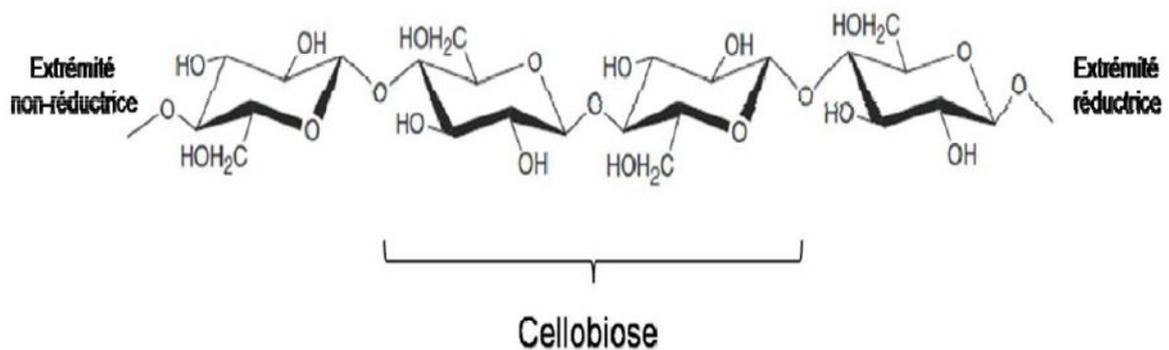


Figure 02 : Structure de base de la cellulose (JASPARD, 2012).

1.1.1.2. Dérivés de cellulose

Les dérivés cellulosiques sont classés en fonction du type de traitement chimique. Ils ont montré des propriétés spécifiques intéressantes pour de nombreuses industries. Parmi ces dérivés, on peut citer :

1.1.1.2.1. L'avicel

L'avicel ou la cellulose microcristalline, est un dérivé de cellulose présent sous forme de poudre fine ou de gel. Il est isolé à partir des fibres végétales, d'abord en le séparant de la lignine et de l'hémicellulose, puis en le purifiant par hydrolyse acide de manière à éliminer la partie de cellulose amorphe (BATTISTA et SMITH, 1962).

Découvert il y a plus de deux décennies, l'avicel a continué d'être une aubaine dans l'industrie alimentaire. Les deux produits humides et secs peuvent être produits avec moins de calories, sans sacrifier le goût et la texture (VEHOVEC *et al*, 2012).

La structure de l'avicel est représentée dans la figure 03.

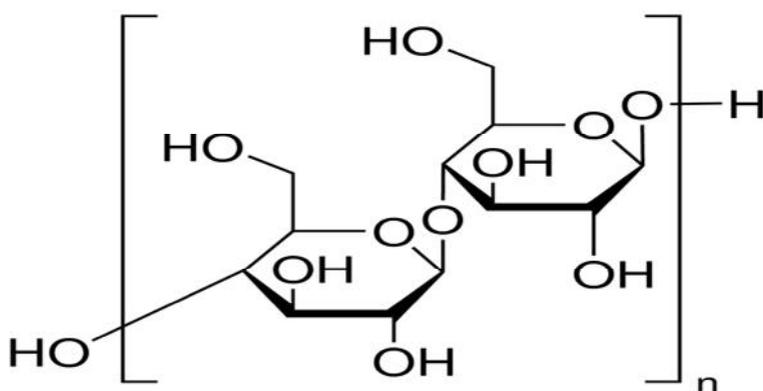


Figure 03 : Structure chimique de l'avicel (JAWAID *et al*, 2011).

1.1.1.2.2. Acétate de cellulose (C100)

Les acétates de cellulose sont des esters organiques de cellulose. La figure 04 montre que leur structure chimique dérive de celle de la cellulose, les groupements hydroxyles ayant été substitués (en totalité ou en partie) par des groupements acétates (LAPOINTE, 2000).

L'acétate de cellulose se remarque également pour ses propriétés avantageuses, cette matière est biodégradable et possède une bonne compatibilité avec d'autres produits plastifiants.

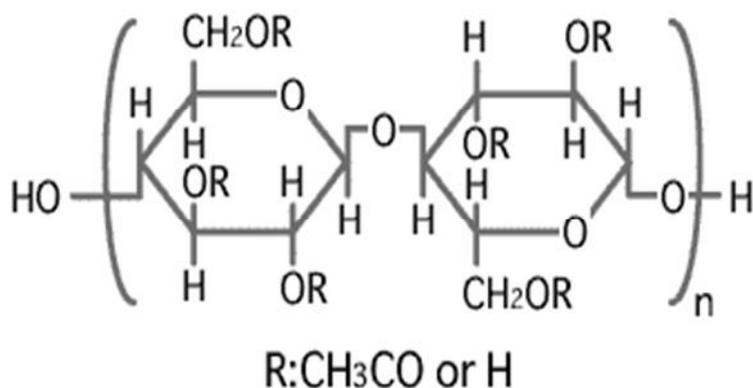


Figure 04 : Structure chimique de C100 (KUMAR *et al*, 2016).

1.1.1.2.3. La carboxyméthylcellulose (CMC)

La carboxyméthylcellulose (figure 05) est un dérivé de cellulose très hygroscopique. C'est une poudre blanche, inodore, soluble dans l'eau, elle est destinée à l'alimentation humaine présentant un haut degré de pureté et souvent utilisée sous la forme de son sel de sodium (JEROME, 2013).

C'est un produit naturel faiblement modifié qui ne contient pas d'impuretés solubles ou insolubles, se dissout aisément dans l'eau froide et dans l'eau chaude. La CMC n'est pas considérée comme un conservateur, ni un colorant, elle ne permet donc pas de conférer à des aliments traités un état de fraîcheur artificiel (CAPITANT, 1968).

L'incorporation de CMC conduit, dans tous les cas, à des produits :

- De plus grande appétence (exemple des poissons et viandes qui conservent un bel aspect turgescent sans exsudation d'eau surabondante).
- De texture améliorée : plus fine (crèmes glacées), plus onctueuse (sauces, crèmes, etc...), plus croquantes (gâteaux secs).
- De meilleure présentation : sauces présentant une phase régulière, boissons ne présentant pas de dépôt.
- Plus faciles à utiliser : fromage à tartiner par exemple.

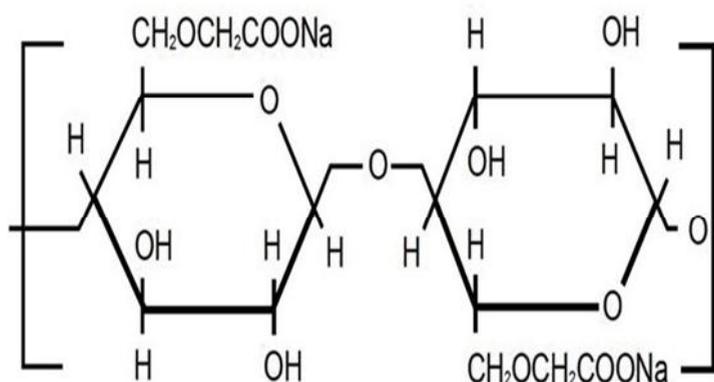


Figure 05 : Structure chimique de CMC (HARIJANTO *et al*, 1991).

1.1.2. Les cellulases

Les cellulases se réfèrent à un groupe d'enzymes qui agissent ensemble pour hydrolyser les liaisons β -1,4 dans les chaînes de la cellulose en sucres solubles (NISHIDA, 2007). Elles sont produites dans la nature par les champignons, les bactéries, les plantes, les animaux et même certains protozoaires (WATANABE et TOKUDA, 2001).

Elles sont classées en plusieurs familles en fonction de leurs séquences en acides aminés, de leur domaine catalytique et des structures cristallines (HENRISSAT, 1991). Les caractéristiques physicochimiques de la cellulase sont représentées dans le tableau II.

Toutes les cellulases ont les mêmes spécificités chimiques vis-à-vis des liaisons glycosidiques β -1-4, mais elles diffèrent en termes de site d'attaque du substrat solide. Elles

Revue bibliographique sur les enzymes recherchées

possèdent un système enzymatique multicomposants et se composent de trois éléments principaux : exo- β (1-4)-glucanase ou les cellobiohydrolases (CBH) (EC 3.2.1.91), endo- β (1-4)-glucanase (EC 3.2.1.4), et β -glucosidase ou cellobiase (CE 3.2.1.21) (WEBER *et al*, 1980 ; TEERI, 1997)

Tableau II : Caractéristiques des enzymes cellulolytiques (HOFER *et al*, 1989 ; DAN *et al*, 2000 ; ANDO *et al*, 2002 ; LEE *et al*, 2010 ; RAGHUWANSHI *et al*, 2014 ; SHARADA *et al*, 2014)

Caractéristiques Enzyme	Endo β -(1-4)-D- glucanase	Exo- β -(1-4)-D- glucanase	β -D-glucoside glucohydrolase
Code chiffré	EC 3.2.1.4	EC 3.2.1.91	EC.3.2.1.21
masse moléculaire	50 kDa ¹ 35 kDa ²	76kDa ³	98 kDa ⁴ 124 kDa ¹
Aspect	Poudre soluble dans l'eau jaune clair		
Humidité	10% ou moins		
Température optimum	40 °C à 70 °C (cellulases fongiques) 50 °C à 100 °C (cellulases bactériennes)		
pH optimum	4 à 5 (cellulases fongiques) Proche de la neutralité (cellulase bactériennes)		
Site de coupure	les liaisons internes de la chaîne cellulosique	agit sur les extrémités des chaînes de cellulose	hydrolyse la liaison β glucosidique du cellobiose
Produit final	cellodextrines, cellobiose, glucose.	Cellobiose	deux molécules de glucose

¹: *Aspergillus niger* ; ²: *Penicillium sp* ; ³:*Trichoderma viride* ; ⁴: *Trichoderma reesei*.

1.1.2.1. Structure de la cellulase

La majorité des cellulases sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés acides (BELDMAN *et al*, 1985) (Figure 06). Elles ont généralement une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels distincts : Le site catalytique (CD) et le site de fixation du substrat (CBM), habituellement reliés entre eux par un peptide glycosylé flexible riche en Serine, Proline et Thréonine appelé « linker » (LINKER et TEERI, 1996) (Figure 07).

Revue bibliographique sur les enzymes recherchées

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

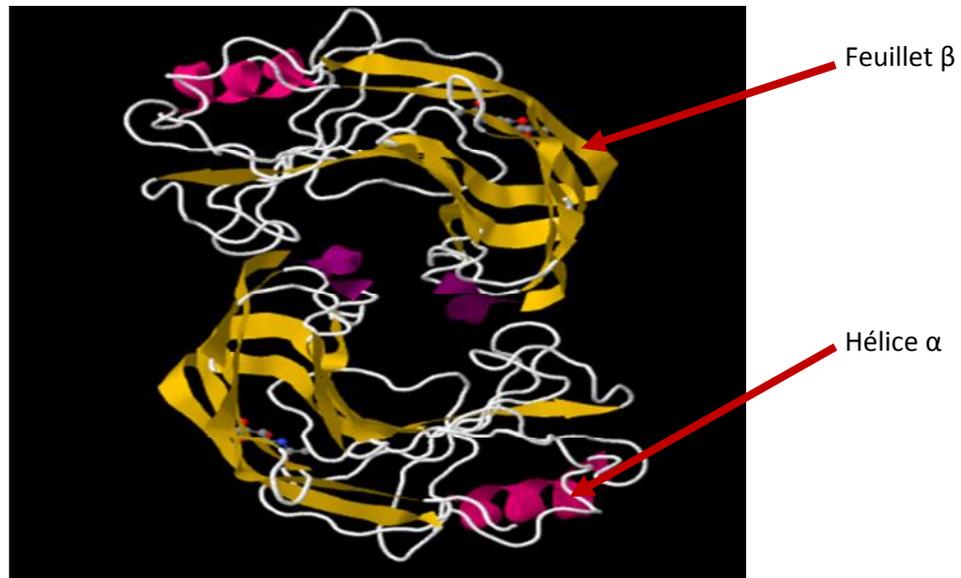


Figure 06 : Structure tridimensionnelle d'une endo-cellulase de *Trichoderma reesei* (SANDGREN *et al*, 2003) .

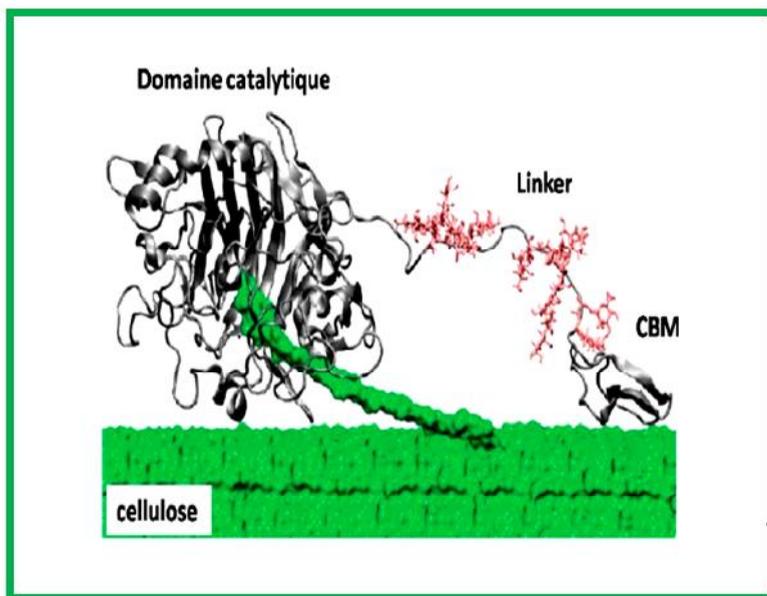


Figure 07 : Représentation schématique du site actif de la cellulase (BECKHAM *et al*, 2010).

1.1.2.2. Mécanisme d'action

L'hydrolyse enzymatique des liaisons glycosidiques s'effectue par un mécanisme acide-base, constitué d'un donneur de proton et d'une base nucléophile (SINNOTT, 1990). Ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Généralement, l'hydrolyse des liaisons glycosidiques β (1-4) de la cellulose se fait avec rétention de la configuration du carbone anomérique (GEBLER *et al*, 1992). Les produits d'hydrolyse peuvent avoir comme conséquence l'inversion ou la conservation (double mécanisme de rechange) de la configuration anomérique du carbone-1 à l'extrémité réductrice (BIRSAN *et al*, 1998 ; OOSHIMA *et al*, 1990 ; WITHERS, 2001) (Figure 08).

La nature insoluble de la cellulose représente un défi pour les systèmes cellulases. Pour s'y adapter la plupart des cellulases ont une structure modulaire facilitant la fixation de l'enzyme à la surface de la cellulose, pour amorcer l'hydrolyse de la cellulose. Le système de cellulases montre une activité collective plus élevée que la somme des activités de différentes autres enzymes, un phénomène connu sous le nom de synergie (LYND *et al*, 2002). Quatre formes de synergisme ont été rapportées (DIN *et al*, 1994 ; TEERI, 1997) :

- Synergie endo-exoglucanase ;
- Synergie exo-exoglucanase ;
- Synergie exoglucanase et β -glucosidase (la cellobiose en tant que produit final) ;
- Synergie intramoléculaire entre les domaines catalytiques et le « linker ».

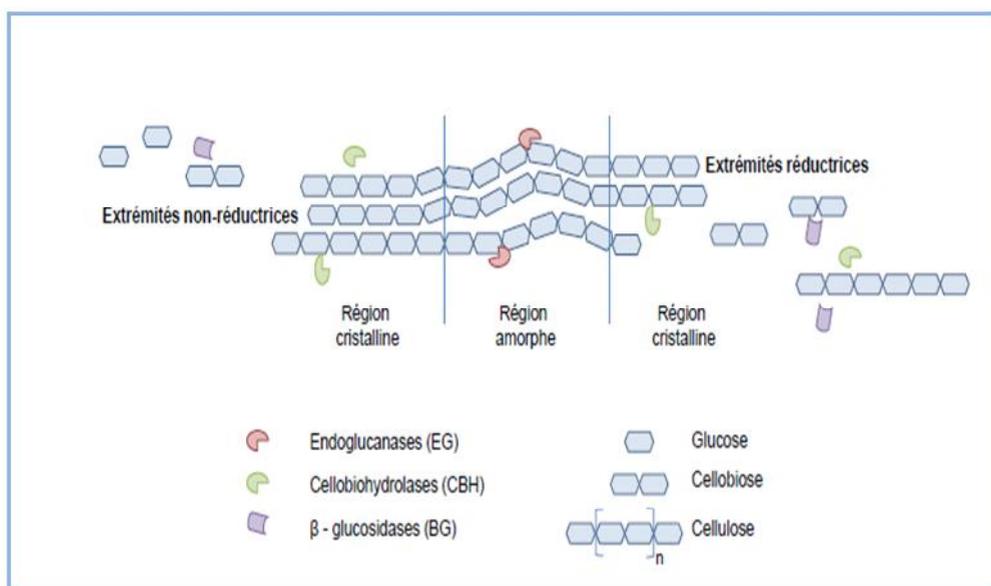


Figure 08 : Schéma présentatif du mode d'action synergique des cellulases (GUSAKOV, 2011).

1.1.2.3. Les différentes origines de la cellulase

Les cellulases sont largement répandues dans la nature (XU *et al*, 2000). De ce fait, elles peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale ou microbienne.

- **Origine animale**

Plusieurs espèces animales (herbivores) utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif (SMANT *et al*, 1998). Ainsi, peu de cellulases endogènes ont été décrites chez des organismes supérieurs (XU *et al*, 2000).

- **Origine végétale**

Les cellulases végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces (RICCIO *et al*, 1999), des céréales tels que l'orge, le son ou le riz (SRINIVASA *et al*, 2004). Les préparations cellulasiques d'origine végétale sont dépourvues d'exo- β glucanases (MANDELS *et al*, 1976).

- **Origine microbienne**

Les cellulases microbiennes sont produites à partir d'un grand nombre de microorganismes (bactéries, moisissures, champignons et levures) capables de dégrader la cellulose en libérant des acides organiques tels que : l'acide formique, l'acide butyrique et l'acide acétique avec dégagement de CO₂ (BRISOU, 1971).

Les bactéries et les moisissures utilisent la cellulose pour la production de quantités substantielles d'enzymes extracellulaires qui sont alors facilement récupérées du milieu de culture après fermentation (RAPP et BEERMAN, 1991).

1.1.2.4. Production de cellulase

La production de cellulases a été rapportée à partir d'une grande variété de bactéries (IMMANUAL, 2006) et de champignons (SARAO *et al*, 2010) (Tableau III). Cependant, les champignons filamenteux sont les préférés pour la production d'enzymes commerciales, car la quantité d'enzymes produites par ces cultures est supérieure à celle obtenue à partir de levures ou de bactéries (BAKRI, 2003). La quasi-totalité des champignons du genre *Aspergillus* produisent de la cellulase, par conséquent, ce genre a le potentiel pour dominer l'industrie des enzymes. *Aspergillus* et *Trichoderma spp* sont bien connus dans la production des cellulases (PEIJ, 1998).

Industriellement, les enzymes sont traditionnellement obtenues par fermentation submergée ou liquide (FML) en raison de la facilité de manipulation et une meilleure maîtrise

Revue bibliographique sur les enzymes recherchées

des facteurs environnementaux tels que la température et le pH. Cependant, la technique de fermentation en milieu solide (FMS) peut améliorer le rendement et réduit le coût de la production de l'enzyme (GHILDYAL *et al*, 1985 ; HUI *et al*, 2010). Les champignons filamenteux sont les micro-organismes les plus couramment utilisés dans SSF parce qu'ils sont capables de croître sur des matériaux solides à faible teneur en eau (PANDEY, 1992). Il existe plusieurs rapports décrivant l'utilisation des résidus agro-industriels pour la production de cellulose tels que la paille de blé, le son de blé et de paille de riz en tant que substrats (BISWAS *et al*, 1990 ; GOYAL *et al*, 2008 ; SINGHANIA *et al*, 2010). Les autres avantages de SSF comprennent une productivité supérieure, technique simple et faible consommation d'énergie (ZENG et CHEN, 2009 ; SOUZA et MAGHALHAES, 2010).

Tableau III : Quelques microorganismes producteurs des enzymes cellulolytiques.

Microorganisme	Substrat	Enzyme	Activité	Référence
Champignons	<i>Aspergillus Niger</i> A20	Cellulose	Cellobiase	27.5 U/ml (PANDEY <i>et al</i> , 1999)
	<i>Aspergillus Niger</i> NRRL3	Le son de blé / épi de maïs	Carboxy-méthylcellulase (CMC ase)	1.9 U/ml (WEBER et AGBLEVOR, 2005)
	<i>Trichoderma reesi</i> RUT C30	Avicel	Endoglucanase	1.8 U/ml (KERN <i>et al</i> , 1995)
	<i>Trichoderma reesi</i> ZU 02	résidus d'épi de maïs	Cellulase	5.48 IU/ml (SHEN et XIA, 2004)
Bactéries	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Cellulose	Cellulase	- (DESVAUX <i>et al</i> , 2006)
	Bacillus flexus	CMC	(CMC ase)	- (TRIVEDI, 2011)
	<i>E. coli</i> BL21	CMC	Endoglucanase	0.715 IU/ml (Tang <i>et al</i> , 2009)

1.1.2.5. Applications

L'intérêt que porte la biotechnologie à la cellulase s'explique par ces vastes applications.

En effet, son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui une fois fermenté permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques notamment des gras volatiles d'où l'importance, écologique et industrielle, considérable des cellulases ce qui revoie à différentes applications industrielles (tableau IV).

Tableau IV : Applications de la cellulase dans différentes industries (ODIER et ROUAU, 1985 ; GUSAKOV *et al*, 2000 ; KUHAD *et al*, 2011).

Industries	Applications
Agricultures	Amélioration de la croissance des plantes et la floraison ; Amélioration de la qualité des sols ;
Alimentaires	La clarification des jus de fruits, et le contrôle de l'amertume d'agrumes ; Amélioration de la texture et la qualité des produits de boulangerie.
Détergents	Amélioration de luminosité de la couleur et l'élimination de la saleté; L'élimination des protubérances rugueuses dans les tissus de coton;
Bioconversion	Conversion des matières cellulosiques à l'éthanol, et d'autres solvants; Amélioration de la digestion des aliments et l'absorption.
Pâtes et papiers	Additif dans le blanchiment des pâtes; Production de carton biodégradable, serviettes en papier, et papier hygiénique.
Textiles	Ramollissement des vêtements et restauration de la luminosité des couleurs; Amélioration de la stabilité des tissus cellulosiques.
Autres	Améliore l'extraction et la qualité de l'huile d'olive; Réduction du risque de déchets de la biomasse; Utilisation dans des formules médicamenteuses comme aides digestives.

1.2. Les enzymes xylanolytiques

1.2.1. Le xylane

Le xylane est le principal polysaccharide hémicellulosique trouvée dans la paroi cellulaire des végétaux et particulièrement des bois durs (SRINIVASAN et MEENAKSHI, 2008 ; TAIBI *et al*, 2012). Il représente 30 % de la masse sèche des plantes (VALENTINA DOBREVA *et al*, 2012) et environ un tiers du carbone organique renouvelable sur terre, étant essentiellement un constituant de la paroi secondaire, il est associé à la lignine.

La solubilité du xylane dépend non seulement de sa masse moléculaire mais aussi de la nature des chaînes latérales. Généralement, ce substrat est plus soluble en milieu alcalin qu'en milieu neutre ou acide (MOURANCHE et COSTES, 1985). Son degré de polymérisation se situe entre 100 à 200 unités de xylose (BEGUIN et AUBERT, 1992).

1.2.1.1. Structure

Le xylane est un hétéropolymère linéaire d'unités de xylose (de 50 à 200 résidus de xylose) reliées entre elles par des liaisons β -(1-4) (BELMOKHTAR, 2012), qui peut être substitué par du D-galacturonate en α (1,2) (lui-même pouvant être O-méthylé en position 4 ; glucuronoxylane), par des résidus de L-arabinose en α (1,2) ou α (1,3) (arabinoxylanes), ou par les deux (glucurono-arabinoxylanes GAX) (Figure 09).

Souvent, la structure du xylane comporte diverses chaînes latérales telles que les groupements acétyl-arabinofuranosyl et methyl-glucuronyl sur lesquelles viennent se greffer des composés aromatiques (acide ferulique et acide para-coumarique) (GEROIS *et al*, 2000). Ces chaînes latérales déterminent la solubilité, la conformation physique et la réactivité de la molécule xylane avec les autres composants héli-cellulosiques et donc une grande influence sur le mode et le degré de clivage enzymatique.

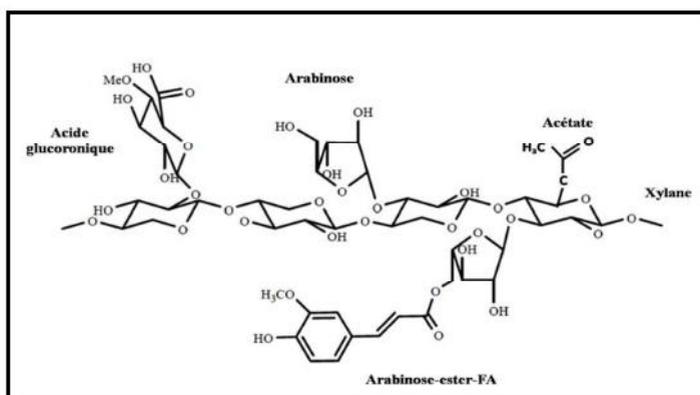


Figure 09 : Structures chimiques d'une chaîne de xylane (SCHELLER et ULVSKOV, 2010).

1.2.2. Les Xylanases

Les xylanases sont des glycosides hydrolases qui catalysent l'hydrolyse des liaisons β (1 \rightarrow 4)-D-xylosidiques dans les régions non substituées des chaînes de xylane pour libérer du xylose. Ce dernier est réduit pour donner un polyol non naturel le xylitol, brisant ainsi l'hémicellulose, l'une des principales composantes de la paroi (KARUNAKARAN *et al*, 2014).

Elles sont secrétées par une grande variété d'organismes incluant les bactéries, les champignons (thermophiles), les levures, les algues, les plantes et d'autres sources naturelles (MOURANCHE et COSTES, 1985 ; SONI *et al*, 2008). Leur nom officiel est endo-1,4- β -xylanase, mais des termes synonymes couramment utilisés comprennent xylanase, endoxylanase, le 1,4- β -D-xylane-xylanohydrolase, endo-1,4- β -D-xylanase, β -1,4-xylanase et β -xylanase. Les caractéristiques des xylanases sont représentées dans le tableau V.

Tableau V : Caractéristiques des xylanases (BAKRI, 2003).

Caractéristiques Enzymes	Endo- β -(1,4)-D-xylanase	Exo- β -(1,4)-D-xylanases
Code chiffré	EC 3.2.1.8	EC 3.2.1.37
masse moléculaire	20 kDa famille F	35 kDa famille G
Aspect	poudre soluble dans l'eau brun foncé	
Humidité	10%	
Température optimum	40 C° à 50 C°	
pH optimum	Compris entre 6,5 et 7,5	
Activité	5,000 U / g	

WONG *et al* (1988) classaient les xylanases sur la base de leurs propriétés physicochimiques en deux groupes : celles de faible poids moléculaire (< 30 kDa) et de pI basique et celles de grand poids moléculaire (> 30 kDa) et de pI acide. Cependant, COLLINS *et al* (2005) notent que cette classification était incomplète. Plus tard, un système de classification plus complet a été admis et permettait la classification des xylanases par la comparaison des structures primaires de leurs domaines catalytiques. Ce système regroupait les xylanases en six familles (de A à F). De ce système de classification, les xylanases font partie des familles 10 (autrefois F) et 11 (autrefois G) dont leurs propriétés sont représentées dans le tableau VI.

Tableau VI : Propriétés des endo-xylanases des familles 10 et 11 (BAKRI, 2003 ; BIELY, 2003).

Propriétés des endoxylanases	Famille 10	Famille 11
La masse moléculaire	Habituellement > 30KDa	Habituellement < 30KDa
Le point Isoélectrique	Habituellement < 7	Habituellement > 7
Site de liaison du substrat	peu profond	clivage profond
Acides aminés catalytiques	Deux Acides Glutamique (occasionnellement 1 Glutamate et 1 Aspartate)	Deux Acides Glutamique (occasionnellement 1 Glutamat et 1 Aspartate)
Nombre de sous sites	4-5	5-7
Substrat spécifique	Moins spécifique	Plus spécifique

1.2.2.1. Structure des xylanases

Les endoxylanases de faible masse moléculaire (famille G ou GH11) ont une structure cristalline qui comporte trois feuillets β anti-parallèles et une hélice α qui forment une main droite partiellement fermée, laissant apparaître une large crevasse sur l'un des cotés de la molécule ainsi que le « pouce » de l'enzyme. Ce dernier est suspecté de contribuer à la spécificité du substrat pouvant entrer dans la crevasse catalytique, et d'être de surcroît la cible d'inhibiteurs protéiques (SA-PEREIRA *et al*, 2003) (Figure 10).

Les xylanases sont constituées de domaines dits fonctionnels et d'autres dits non fonctionnels reliés par des régions fortement enrichies en acides aminés hydroxylés. Tous les domaines ne sont pas retrouvés au sein d'une même famille. Les xylanases de la famille 10, généralement plus volumineuses, possèdent souvent un nombre plus élevé de domaines fonctionnels que celles de la famille 11. Parmi ces domaines, il existe :

- Un domaine catalytique (DC) qui permet la coupure de la liaison glycosidique reliant deux xyloses. La majorité des xylanases possèdent un DC mais il existe celles qui possèdent deux DC, généralement le cas d'un plus grand nombre de xylanase de la famille 10 par exemple, la xylanase de *Ruminococcus flavefaciens*. Les séquences d'acides aminés des DC de xylanases appartenant à la même famille ont des taux d'homologie importants, proche de 50% (TORROEN *et al*, 1992).

- Un domaine de liaison aux polysaccharides (XYLAN BINDING DOMAINS) qui fixe la xylanase sur les xylandes. La présence d'un XBD apporterait des propriétés intéressantes pour l'enzyme (GILKES *et al*, 1991).

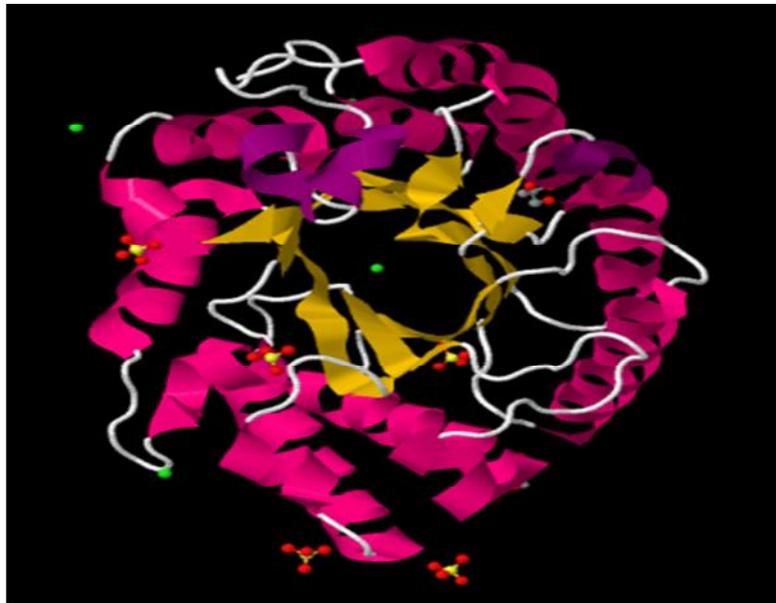


Figure 10 : Structure tridimensionnelle d'une endo-xylanase de *Trichoderma reesei* (SAVCHENKO *et al*, 2015).

1.2.2.2. Mécanisme d'action

L'hydrolyse des xylandes nécessite l'intervention de systèmes enzymatiques hétérogènes constitués de différents types d'activités xylanolytiques, principalement les endoxylanases, les β -xylosidases et les enzymes débranchantes.

- Les endo-D-xylanases, β -D-(1,4) xylane xylanohydrolase (EC 3.2.1.8), dégradent leurs substrats par une attaque intramoléculaire de type β (1-4) xylosidiques en libérant des oligomères de petite taille.
- Les exo-xylanases et les β -xylosidases (EC 3.2.1.37) hydrolysent les petits oligomères libérés par les endoxylanases, en xylose et provoquent une inversion de configuration du D-xylose libéré (GUERFALI, 2011 ; KIZAWA *et al*, 1991).
- Les enzymes accessoires ou enzymes de débranchement éliminant les chaînes latérales sont aussi nécessaires. Ce sont les α -L-arabinofuranosidases ou xylandes-1,4- β -xylonidases (EC 3.2.1.55), les α -glucuronidases, les acétyl-estérases, acetyl-xylane estérases et coumarique et ferulique estérases (GUERFALI, 2011).

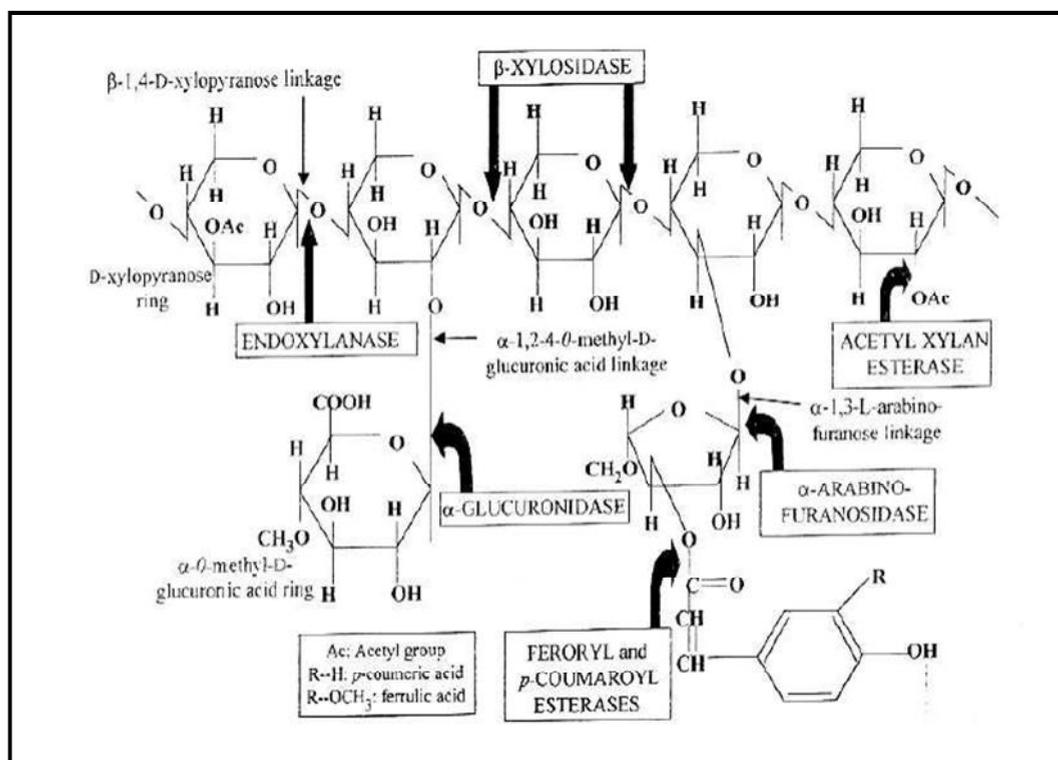


Figure 11 : Mode d'action des enzymes xylanolytiques sur la chaîne principale et les ramifications du xylane (BEG *et al*, 2001).

1.2.2.3. Production de xylanases

Les champignons filamenteux sont des producteurs particulièrement intéressants de xylanases parce qu'ils sécrètent des enzymes dans le milieu et leur taux de production est beaucoup plus élevé que celui des levures et des bactéries (Tableau VII).

Les genres fongiques *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Pichia* sont considérés comme de grands producteurs de xylanases (ADSUL *et al*, 2005). En plus des xylanases, les champignons produisent plusieurs enzymes auxiliaires nécessaires pour la dégradation de xylane substitué (POLIZELI *et al*, 2005).

Les xylanases sont produites soit par fermentation solide (FMS) ou par fermentation submergée (FML) (AGNIHOTRI *et al*, 2010). Cette production repose essentiellement sur le choix du substrat inducteur et la composition optimale du milieu de fermentation. La plupart des xylanases industrielles sont produites par des procédés de fermentation en milieu liquide (POLIZELI *et al*, 2005). Cependant la fermentation en milieu solide est également importante. La productivité de l'enzyme via la fermentation solide est beaucoup plus élevée que celle de la fermentation submergée (AGNIHOTRI *et al*, 2010).

Tableau VII : Quelques microorganismes producteurs de xylanase.

Microorganisme	Substrat	Enzyme	Référence
Champignons	<i>Penicillium sp.</i> 40	β-Methyl xyloside	Endoxylanase (KIMURA <i>et al</i> , 2000)
	<i>Penicillium digitatum</i>	Riz	Xylanase (AFIFI <i>et al</i> , 2008)
	<i>Trichoderma sp</i>	Paille de riz	D-xylanase (SHAMALA et SREEKANTIAH, 1986)
	<i>Aspergillus niger</i>	-	Xylanase (FREDERIK <i>et al</i> , 1985 ; XU <i>et al</i> , 2000)
Bactéries	<i>Enterobacter sp.</i> MTCC 5112	-	Xylanase (KHANDEPARKA et BHOSLE, 2006)
	<i>Staphylococcus .sp</i>	-	Xylanase (GUPTA <i>et al</i> , 2000)

Les xylanes purs sont d'excellents substrats car leurs produits d'hydrolyse sont des inducteurs de xylanases. L'utilisation de tels substrats augmente la production enzymatique et aboutit à une induction sélective des xylanases, avec une faible activité cellulosique chez un nombre important de microorganismes (HOU et SHAW, 2008).

Les avantages des procédés de FMS plus FML comprennent un faible coût de culture pour la fermentation, un risque plus faible de contamination (BEG *et al*, 2001), une meilleure stabilité de l'enzyme, mimant l'habitude naturelle du champignon et la production d'enzymes avec des activités spécifiques plus élevées (CONSIDINE et COUGHLAN, 1989). Les conditions de FMS sont particulièrement appropriées pour la croissance des champignons, étant donné que ces organismes sont capables de croître à des activités relativement faibles, contrairement à la plupart des bactéries et des levures, qui ne peuvent pas proliférer dans ces conditions de culture (CORRAL, 2006).

La fermentation submergée permet un meilleur contrôle des conditions durant la fermentation (GIVRE et MOSS, 1987). La FML de micro-organismes aérobies est un procédé largement utilisé pour la production de cellulase et de xylanase (GARCIA *et al*, 2002).

1.2.2.4. Applications

Les xylanases sont fréquemment utilisées dans la formulation d'aliments pour les animaux (amélioration de la digestibilité et de la valeur nutritive), en industries des jus de fruits et brassicoles (amélioration de l'extraction ou la filtration). En industrie du papier, ces enzymes améliorent la pureté de la cellulose, par une réduction de 50 % de la quantité de chlore nécessaire au blanchiment du papier et de la quantité d'organochlorés rejetés dans l'environnement.

Les applications de xylanases sont nombreuses, elles se résument dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Applications de xylanases dans les différentes industries (COLLINS *et al*, 2005 ; GABRIEL, 2005).

Industries	Applications
Alimentaires	Amélioration de la macération, clarification des jus et réduction de la viscosité ; Utilisées comme additifs pour améliorer la qualité boulangère ; Grâce à leur effet antiracissants, elles permettent une meilleure rétention d'eau.
Pâtes et papiers	Bioblanchiment de la pâte kraft, ce qui augmente sa brillance ; Séparation des encres; Amélioration de la manipulation de la pâte et la qualité des produits cuits au four.
Textiles	Préparation des fibres par trempage et macération remplaçant les procédés chimiques
Bioconversions	Production des composés fermentescibles, carburants renouvelables (bioéthanol), et tensio-actifs.
Autres	Génération d'édulcorant naturel utilisé dans les dentifrices et divers produits pharmaceutiques.

1.3. Les enzymes amylolytiques

1.3.1. Amidon

L'amidon est la deuxième grande réserve alimentaire de polysaccharide dans la nature après la cellulose (SHARMA et SATYANARAYANA, 2013). C'est une macromolécule glucidique présente chez de nombreux végétaux, notamment dans les organes de réserve comme le tubercule de pomme de terre et dans les graines (blé, maïs, riz, etc.) où elle

constitue une forme de stockage du glucose (BULEON *et al*, 1998 ; SUMITANI *et al*, 1998 ; LEE *et al*, 2010) (Figure 12).

L'amidon contribue fortement aux propriétés texturales de nombreux aliments et largement utilisé dans les applications alimentaires et industrielles comme épaississant, stabilisant colloïdal, agent gélifiant, et agent de rétention d'eau et de charge (SINGHA *et al*, 2007).

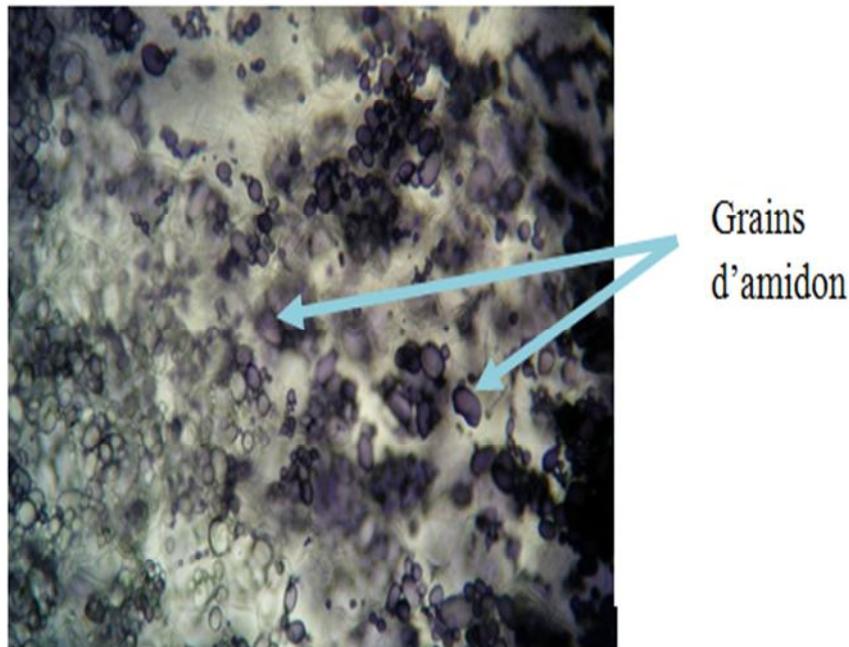


Figure 12 : Photo de grains d'amidon sous microscope électronique au grossissement moyen 100 (MANUMANU, 2010).

1.3.1.1. Structure

L'organisation structurale de l'amidon est principalement constituée de deux composés de masse moléculaire élevée, amylose et l'amylopectine (Figure 13).

L'amylose est un polymère linéaire insoluble dans l'eau constitué par un enchaînement de résidus de D-glucose (SORENSEN *et al*, 2004). Les molécules de glucose sont reliées entre elles par des liaisons α (1,4) glycosidique. On note cependant un très faible pourcentage de ramification en liaison α (1,6) glycosidique (de l'ordre de 1%). La molécule d'amylose peut renfermer de 500 à 20000 résidus glucose et représente 15 à 30% de la masse de l'amidon. (BANKS et GREENWOOD, 1975).

L'amylopectine a une structure ramifiée soluble dans l'eau plus abondante que l'amylose. Elle représente 70 à 85% de la masse de l'amidon. Les molécules de D-glucose (10 à 60 unités de glucose) sont reliées entre elles par des liaisons α (1,4) glycosidique mais aussi

par des liaisons α (1,6) glycosidiques donnant à l'amylopectine une structure arborescente. Les points de branchement sont répartis tous les 20 à 30 résidus de glucose. La molécule d'amylopectine possède des masses molaires beaucoup plus élevées de l'ordre de plusieurs millions (FOGARTY, 1983).

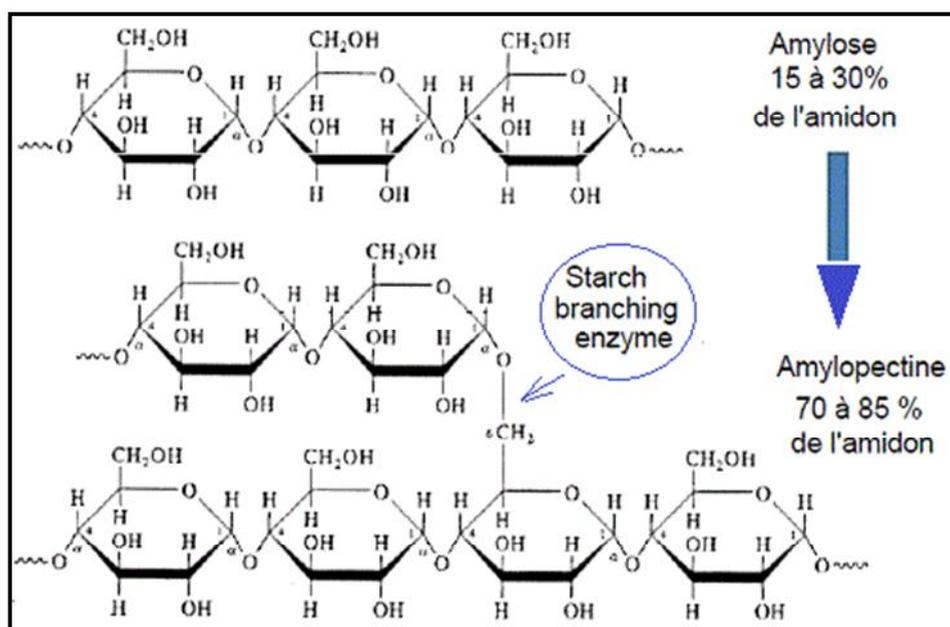


Figure 13 : Structure chimique des composants de l'amidon (L'amylose et l'amylopectine) (BULEON *et al*, 1998).

1.3.2. Les amylases

Les enzymes amylolytiques ou amylases appartiennent à la grande famille des hydrolases (qui représente 75% des enzymes produites) et plus précisément le groupe des glycosides hydrolases (GH). Elles sont obtenues généralement à partir de malt (céréales germées) ou de microorganismes.

Les amylases industrielles sont le plus souvent d'origine fongique parce qu'elles sont particulièrement actives et résistantes à la chaleur. Mais pour les pays en développement, ces amylases microbiennes sont coûteuses. L'intérêt est donc énorme pour ces pays d'exploiter des amylases plus accessibles comme les céréales maltées et ayant des propriétés appropriées aux applications industrielles visées.

Selon MICHELIN *et al*, 2010 et GUPTA *et al*, 2003, les GH peuvent être classées en trois grands groupes : les endoamylases (l' α -amylase (EC 3.2.1.1)); les exoamylases regroupent la β -amylase (EC 3.2.1.2), l' α -glucosidase (EC 3.2.1.20) et la glucoamylase (γ -amylase (EC 3.2.1.3)) et les enzymes débranchantes regroupent la pullulanase (EC 3.2.1.41)

et l'isoamylase (EC 3.2.1.68) qui hydrolysent les liaisons α -1,6 de l'amylopectine (AGRAWAL *et al*, 2005 ; AKKAYA *et al*, 2012).

Généralement, ces trois groupes travaillent en synergie. L'action synergique trouvée dans les complexes amylolytiques est bénéfique pour l'hydrolyse de l'amidon, car elle augmente la vitesse de réaction globale et diminue la rétro-inhibition des produits (CASTRO *et al*, 2011).

Ces enzymes ont été classés en trois familles indépendantes de glycoside hydrolase : GH13 (alpha-amylases), GH14 (beta-amylases) et GH15 (glucoamylases) (HENRISSAT, 1991 ; SVENSSON, 1994 ; KURIKI et IMANAKA, 1999 ; GREGOR *et al*, 2001 ; JANECEK *et al*, 2014), qui sont très différents les uns des autres par leurs séquences d'acides aminés, leurs structures tridimensionnelles, leurs mécanismes réactionnels et leurs mécanismes catalytiques (JANECEK, 1994 ; COUTINHO et REILLY, 1997).

➤ **Alpha amylase**

L' α amylase est une enzyme industrielle, largement présente chez les animaux, les végétaux et les microorganismes (ARCHANA SHARMA et SATYANARAYANA, 2012 ; SHRUTI PURI *et al*, 2013). C'est une macromolécule appartenant à la famille des glycosides hydrolases nommée GH13, de type endoglycanases (MOBINI *et al*, 2011). Elle hydrolyse les liaisons osidiques α (1 \rightarrow 4) de l'amidon en libérant le glucose, le maltose, le maltotriose et de la dextrine.

➤ **Beta amylase**

Beta (β) amylase est alternativement connue comme α -D 1,4 glucanmaltohydrolase. C'est une exo-enzyme saccharifiante qui hydrolyse les chaînes d'amylose et d'amylopectine à partir de l'extrémité non réductrice (liaison α -1-4) en libérant du β -maltose (KOSSMANN et LLOYD, 2000). L'hydrolyse de l'amylopectine est bloquée au niveau des points de branchement α (1 \rightarrow 6), ce qui conduit à la production du maltose (50% à 60%) et de dextrine (VALLIER *et al*, 1977).

La principale fonction de la β -amylase est son implication dans la dégradation de l'amidon chez les plantes. SCHEIDIG *et al* (2002) ont démontré le rôle de la β -amylase dans la dégradation de l'amidon transitoire.

➤ **Gamma amylase :**

Gamma (γ) amylase est une enzyme également connue sous le nom de glucane α -1-4-glucosidase, exo-1, 4-a- glucosidase, la glucoamylase (TATENO *et al*, 2007) qui hydrolyse les extrémités non réductrices de l'amylose et l'amylopectine, ce qui donne du glucose avec un

mécanisme de déplacement unique et clive également α (1-3) pour former le maltose (SCRIBAN, 1993).

Selon le type d'amylase, les caractéristiques physicochimiques différentes (Tableau IX).

Tableau IX : Caractéristiques des amylases (FRENCH, 1975 ; OHBA *et al*, 1979).

Caractéristiques Enzymes	α -amylase	β -amylase	γ -amylase
Code chiffré	EC 3.2.1.1	EC 3.2.1.2	EC 3.2.1.3
masse moléculaire	50 kDa ¹ 60,5 kDa ²	223.8 kDa	70 kDa ¹
Humidité	10 % ou moins		
Température optimum	30 °C - 50 °C	50 °C	55 °C
pH optimum	6.5 - 7.5	4 – 5.5	3.5 - 4.0

¹ : *Aspergillus niger* ; ² : *Penicillium camemberti*

1.3.2.1. Structure et mécanisme d'action

Du point de vue structural, l' α -amylase et la β -amylase forment un tonneau 8 (β/α) qui contient 8 feuilles β plissés qui se disposent de façon parallèle et de 8 hélices α . Elles portent leur site actif au niveau de la partie C-terminale des feuillettes β (MACGREGOR *et al*, 2001 ; CANTAREL *et al*, 2009) (Figure 14 A et B). Tandis que les γ -amylases sont en général des enzymes multi-domaines consistant en un domaine catalytique plié en hélice 6 (α / α) avec un site actif en forme d'entonnoir central relié à un domaine de liaison à l'amidon (NAKAI *et al*, 2005 ; KANG *et al*, 2008) (Figure 14 C).

Les mécanismes catalytiques des enzymes amylolytiques sont différents: Les α -amylases possèdent une triade catalytique constituée par deux aspartates (aspartate 197 et aspartate 300) et une glutamate 233 (UITDEHAAG *et al*, 1999), les β -amylases (MIKAMI *et al*, 1993) et les γ -amylases (ALESHIN *et al*, 1992) ont leurs mécanismes catalytiques formés par deux résidus d'acide glutamique (Glu 187 et Glu 382) (PUJADAS *et al*, 1996 ; COUTINHO et REILLY, 1997).

L' α -amylase a tendance à agir plus vite que la β -amylase, car elle peut agir n'importe où sur le substrat (LIU *et al*, 2010).

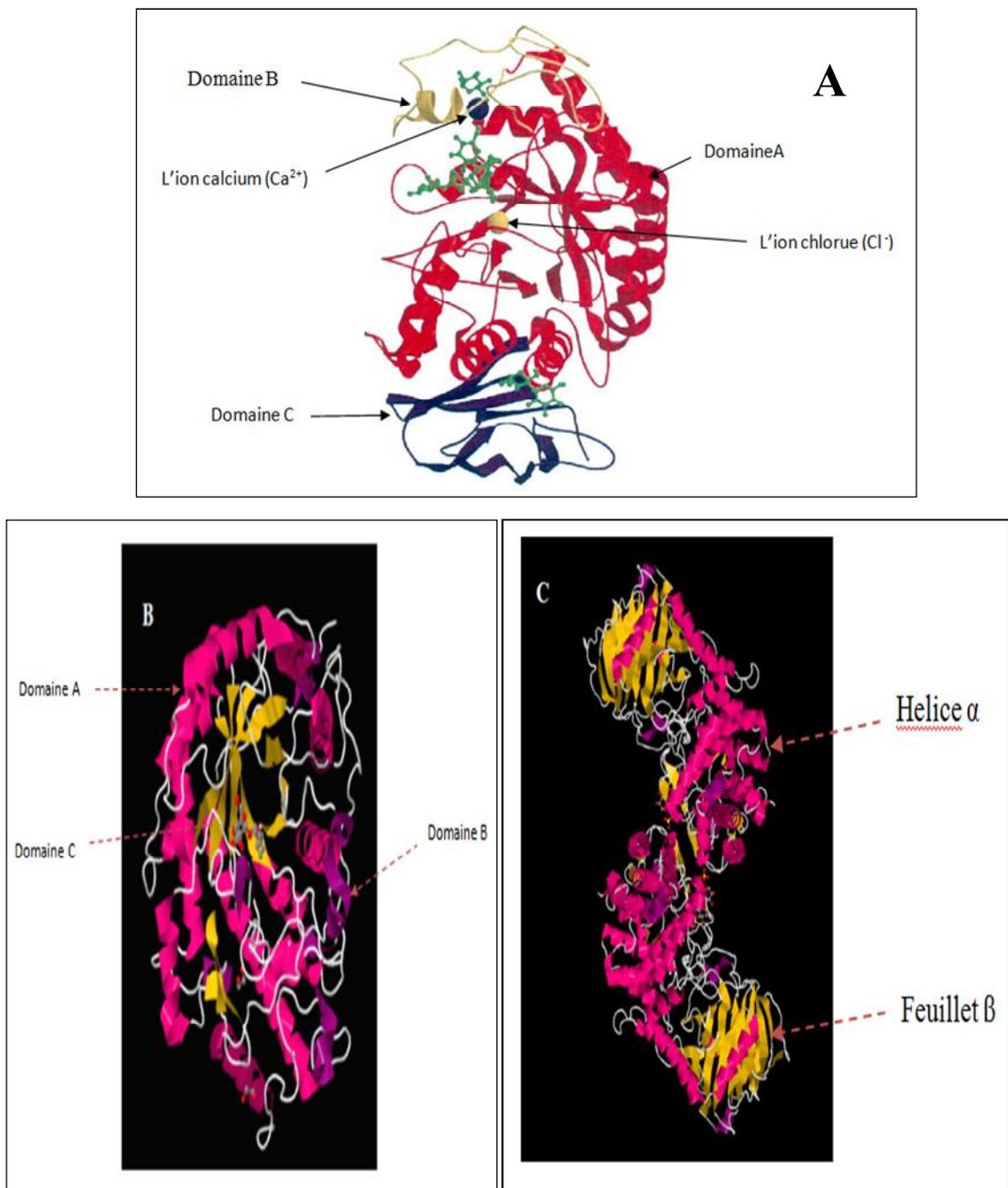


Figure 14 : Structure tridimensionnelle des enzymes amylolytiques (A= α -amylase ; B = β -amylase ; C = γ -amylase) (STEVENSON *et al*, 2010 ; SUGAHARA *et al*, 2013).

1.3.2.2. Origine des enzymes amylolytiques

Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères (FRENCH, 1975). Les tissus animaux ne contiennent pas de β -amylase, bien qu'elle puisse être présente dans les micro-organismes contenus dans le tube digestif.

Les alpha-amylases d'origine animale sont incapables d'hydrolyser la liaison α (1 \rightarrow 6) de l'amylopectine et celles qui sont d'origine végétale sont synthétisées par un mécanisme cellulaire compliqué, au cours de la germination des graines qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (BRAWN *et al*, 1993).

De nombreuses amylases aux propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermophiles. Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par fragmentation rapide en clivant les liaisons α (1 \rightarrow 4) (NADIRMAN *et al*, 2006).

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques existe depuis longtemps, en particulier, l'alpha-amylase dont les principaux producteurs sont les moisissures des genres *Aspergillus* et *Rhizopus* et les levures (BOUIX et LEVEAU, 1999).

1.3.2.3. La production d'amylases

Les amylases sont produites par une grande variété d'organismes vivants, allant des microorganismes aux plantes et aux animaux. L'histoire de la production industrielle d'enzymes remonte à l'époque où le Dr JOKICHI TAKAMINE a commencé la production d'une préparation d'enzymes digestives par culture d'*Aspergillus oryzae* dans du son de blé en 1894 (AIYER, 2005). A l'échelle industrielle, les amylases sont produites à partir de cultures microbiennes (milieu liquide et solide) ou par maltage des céréales.

1.3.2.3.1. La fermentation

La production d'enzymes microbiennes se fait soit par fermentation liquide ou par fermentation solide. Ces méthodes de production ont beaucoup été étudiées. Traditionnellement, la production se faisait par fermentation liquide en raison de la facilité de contrôle de différents paramètres (pH, température, aération et transfert d'oxygène et d'humidité), Mais elle est exigeante, couteuse et pas bien adaptée pour les organismes fongiques. Les innovations biotechnologiques dans le domaine des enzymes et des technologies de fermentation ont ouvert de nombreuses voies pour l'application de la fermentation solide. Celle-ci détient un énorme potentiel pour la production d'enzymes et elle est d'un intérêt particulier dans les procédés où le produit brut fermenté peut être utilisé directement comme source d'enzymes (SINGHANIA *et al*, 2009). En plus des avantages liés à ce type de production (faible coût, productivité supérieure, besoins en énergie réduits et absence de contrôle rigoureux), des résidus agro-industriels sont considérés comme les

Revue bibliographique sur les enzymes recherchées

meilleurs substrats pour la production d'enzymes dans la fermentation solide (ELLAIAH *et al*, 2002 ; CHIMATA *et al*, 2010). Le tableau X montre la production d'amylases chez quelques microorganismes par fermentation.

Tableau X : Production d'enzymes amylolytiques par certains microorganismes.

Microorganismes	Substrats	Types de fermentation	Activités détectées	Références
<i>Bacillus sp</i> PS-7	Son de riz	Solide (37°C, 48h)	145000 U/g (α -amylase)	(SODHI <i>et al</i> , 2005)
<i>Bacillus subtilis</i> RSKK96	Farine de maïs	Liquide (37°C, 72 h)	445 U/mg (α -amylase)	(AKCAN <i>et al</i> , 2011)
<i>Aspergillus niger</i>	Résidu de banane plantain	Solide (29°C, 144h)	33 EU (β -amylase)	(ADENIRAN <i>et al</i> , 2010)
<i>Chrysosporium asperatum</i>	Amidon de pomme de terre	Liquide (30°C, 72h)	97 IU/ml/min (α -amylase)	(SANGHVI <i>et al</i> , 2011)

1.3.2.3.2. Le maltage de céréales

Certaines céréales comme l'orge présentent naturellement des enzymes amylolytiques, tandis que dans d'autres, elles sont induites au cours d'une transformation (maltage des grains). Le maltage consiste à faire germer et sécher les graines dans des conditions propices (chaleur et humidité) pour obtenir le malt. Ce procédé technologique comporte trois étapes principales : le trempage, la germination et le séchage des graines. C'est un processus biologique complexe, impliquant toute une série de réactions biochimiques et physiologiques qui induisent : des transformations morphologiques (développement de l'embryon, des radicelles), le développement des enzymes hydrolytiques (α -amylase, β -amylase, α -glucosidase, pullulanase, etc.) et des modifications de l'endosperme (protéolyse, dégradation des parois cellulaires, etc.) (BAMFORTH, 1993 ; DZIEDZOAVE *et al*, 2010). Les enzymes sont fortement exprimées au cours de la germination sous l'influence des hormones de croissance telles que l'acide gibbérellique. En effet, cette hormone stimule la synthèse d'ARNm spécifiques des amylases et augmente l'efficacité de la traduction (MURALIKRISHNA et NIRMALA, 2005).

1.3.2.4. Applications

Les amylases ont des applications potentielles dans un grand nombre de procédés industriels tels que la nourriture, la fermentation et pharmaceutiques industries. Ceci se résume dans le tableau XI.

Tableau XI : Applications d’alpha amylase dans les différentes industries. (AEHLE et MISSET, 1999 ; AIYER, 2005 ; SOUZA *et al*, 2010 ; ALAM et KUMAR, 2011 ; HASHEMI *et al*, 2014).

Industries	Applications
Alimentaires	Amélioration de la vitesse de fermentation et la réduction de la viscosité de la pâte, ce qui entraîne une amélioration du volume et de la texture du produit ; Préparation de boissons sucrées non alcoolisées, de jus de fruits, et de gâteaux.
Détergents	Facilite la disparition des tâches en dégradant les souillures, permettant ainsi l'augmentation du pouvoir blanchissant.
Pâtes et papiers	Liquéfaction de l’amidon, pour préparer des sauces de couchage permettant d’éliminer les irrégularités superficielles de la feuille ; Réduit la viscosité de l'amidon pour le revêtement de papier approprié.
Textiles	Désencollage textile, qui permet d’éliminer la colle d’amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage.
Pharmaceutiques	Utilisée comme adjuvant pharmaceutique pour le traitement des troubles digestifs, de diabète et de l’obésité.

1.4. Valorisation de la biomasse lignocellulosique

1.4.1. La biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est l’une des principales ressources renouvelables présentes sur terre, et certainement une des moins coûteuses (SAIDI, 2011 ; GANESH et SARARALE, 2012). C’est une matière végétale ligneuse comme le bois, la bagasse de canne à sucre, herbes, feuilles, les tiges de maïs ou d'autres déchets agricoles (DIDDEREN, 2010). Elle est composée d'un polymère complexe, la lignocellulose, qui est elle-même composée de la cellulose (30 à 50%), l’hémicellulose (20% à 35%) et la lignine (15% à 25%), qui se dégradent en sucres simples, notamment en glucose, xylose et arabinose (LEE *et al*, 1999 ; GODIN *et al*, 2011 ; WARZYWODA *et al*, 2011).

En outre, de petites quantités d'autres matières telles que des protéines et des cendres de la pectine peuvent être trouvées dans les résidus lignocellulosiques, à des degrés divers en fonction de la source (RAGAUSKAS *et al*, 2006 ; SANCHEZ *et al*, 2009).

1.4.2. Bioconversion

De grandes quantités de déchets lignocellulosiques sont générées par la foresterie, les pratiques agricoles et les procédés industriels, en particulier dans les industries agroalimentaires telles que les brasseries, les pâtes et papiers, textiles et bois et les industries oléicoles (HARMAN et KUBICEK, 1998 ; BAJPAI, 1999). Ces déchets peuvent engendrer de sérieux problèmes de pollution de l'environnement (LAURENT *et al*, 2011). De nos jours, les procédés biotechnologiques de bioconversion nous viennent en aide en vue de dépolluer ces résidus industriels et de les biotransformer en produits d'intérêt. Toutefois, des résidus industriels complexes peuvent nécessiter des prétraitements physico-chimiques et enzymatiques améliorant leur biodigestibilité et leur porosité et augmentent l'accessibilité des micro-organismes pour les matériaux améliorant ainsi la production d'enzymes par FMS (LEITE *et al*, 2016).

La bioconversion de résidus ligno-cellulosiques est initiée principalement par des micro-organismes qui ont la capacité de produire des enzymes cellulolytiques ayant une activité spécifique élevée tels que les champignons et les bactéries qui sont capables de dégrader des matériaux ligno-cellulolytiques en sucres fermentescibles lors du processus de production de bioéthanol de deuxième génération (CHUNDAWAT *et al*, 2011).

Le procédé comprend quatre principales étapes : un prétraitement physicochimique, une hydrolyse enzymatique du substrat prétraité via l'utilisation des enzymes hémi-cellulolytiques, une étape de fermentation éthanolique par un microorganisme alcooligène et une séparation de l'éthanol produit par distillation. L'efficacité du procédé requiert aujourd'hui une amélioration globale de chacune des étapes afin d'obtenir un procédé performant quelque soit la nature des substrats lignocellulosiques utilisés (MARGEOT *et al*, 2009).

1.4.3. Production d'enzymes hydrolytiques

Au cours des dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour la production d'enzymes en utilisant des procédés à faible coût comme SSF. En ce sens, les substrats agro-industriels sont jugés acceptables pour la production d'enzymes par ce procédé. Les cellulases et les xylanases sont des enzymes lignocellulolytiques ayant des applications dans plusieurs secteurs industriels comme l'industrie des biocarburants, compte tenu des avantages de la voie

enzymatique dans la production de bioéthanol à partir de résidus lignocellulosiques (ZIMBARDI *et al*, 2013).

Plusieurs études ont été réalisées pour produire des enzymes cellulolytiques du processus de dégradation de biodéchets par de nombreux micro-organismes qui peuvent être aérobies, anaérobies, mésophiles ou thermophiles (KUHAD *et al*, 2010 ; SUN et CHENG, 2002), y compris les champignons tels que *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus sp.* (MANDEL et REESE, 1985 ; BROWN *et al*, 1987; LEITE *et al*, 2016) et quelques espèces bactériennes comme *Pseudomonas*, *Clostridium* (anaérobies), *Cellulomonas*, *Bacillus* (aérobies), *Cellulomonas* (des actinomycètes) et *Micro.coccus* ont également été signalés (NAKAMURA et KAPPAMURA, 1982 ; IMMANUEL *et al*, 2006).

Divers matériaux ont été utilisés comme substrats pour la production des ces enzymes, tels que la paille de riz, le son de blé, la paille de blé, la poudre de cellulose, du papier, la sciure, le lactosérum du lait ...etc (SHAMALA et SREEKANTIAH, 1986 ; BEG *et al*, 2001 ; MERINO et CHERRY, 2007).

Dans une étude récente, les travaux de LEITE *et al* (2016), visent à améliorer la production d'enzymes lignocellulolytiques par fermentation solide du grignon d'olives, issu de l'industrie oléicoles, par prétraitement avec des ultrasons. La composition des déchets oléicoles (grignons d'olive bruts et épuisés) a été comparée et plusieurs caractéristiques physico-chimiques étaient significativement différentes. L'utilisation des deux déchets en SSF a été évaluée et une projection de champignons pour la production de la xylanase et la cellulase a été réalisée. Après le dépistage, l'utilisation de grignons d'olive épuisés par *Aspergillus Niger* a conduit à des activités enzymatiques plus élevées (augmentation de 3 fois plus de l'activité de la xylanase et une diminution de l'activité de la cellulase).

1.4.4. Bioénergies issues par fermentation d'hydrolysats de cellulose

La valorisation des polysaccharides issus de la biomasse végétale et en particulier de la cellulose est un des grands défis de ce siècle. La plupart des études porte sur l'optimisation de la conversion des biopolymères en monomères pouvant remplacer les produits d'origine pétrolière, tant comme carburants que comme produits chimiques de base dans l'industrie des polymères (ELOUTASSI *et al*, 2014).

Le bioéthanol est le biocarburant dont l'usage est le plus répandu à l'échelle mondiale. Il est aujourd'hui produit à partir de deux grands types de cultures, les plantes sucrières (canne à sucre, betterave) et les plantes amylacées (blé, maïs), il est capable de remplacer

l'essence. L'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique est réputée difficile en comparaison avec les ressources amylacées (MARGEOT *et al*, 2009).

Plusieurs chercheurs ont démontré d'une part, que le coût du substrat joue un rôle crucial dans l'économie de la production d'enzymes, d'autre part, les coûts de la production des cellulases sont étroitement associés à la productivité de l'enzyme produite par les souches microbiennes (CHAHAL *et al*, 1992 ; OMOJASOLA et JILANI, 2008). Ce processus aiderait à réduire les pénuries d'aliments, résoudre le problème de l'élimination des déchets modernes et de diminuer la dépendance de l'homme sur les combustibles fossiles en fournissant une source pratique et renouvelable de l'énergie sous forme d'acides organiques ou d'autres produits chimiques (MAKOI et NDAKIDEMI, 2008). Lors de la fermentation en monoculture en batch, les cellulases produites ont un grand intérêt industriel et aussi les produits d'hydrolyse: hexoses monomères (glucose, mannose et galactose) et des pentoses (xylose et arabinose) sont fermentés en produits de valeur tels que l'éthanol (LAWFORD et ROUSSEAU, 2003), l'acide lactique (El HAWARY *et al*, 2003), et de l'hydrogène (TAGUCHI *et al*, 1996).

1.4.5. Autres biomolécules

L'obtention d'oligosaccharides et de dérivés pouvant avoir des propriétés biologiques ou physico-chimiques intéressantes constitue un autre axe de valorisation de la biomasse saccharidique. Par exemple, les oligosaccharides résultant d'une dégradation de la chitine, des xylanes, des glucanes sont des molécules d'intérêt recherchées pour leurs propriétés antibactériennes, immunostimulantes ou encore pour leur potentiel comme sondes dans l'étude des relations structure/activité des glyco-enzymes (CLAISSE, 2013).

Selon NEFZAOU (1983) les grignons d'olive sont très hautement ligno-cellulosiques. Ils peuvent causer plusieurs problèmes dans l'environnement et pour pallier à cette pollution, ils sont revalorisés en produits bénéfiques notamment dans les pays développés. La fermentation des grignons d'olive, par des champignons, en milieu solide produit une panoplie de composés d'arômes d'intérêt dans les domaines agroalimentaire, cosmétique et même pharmaceutique (KADEMI *et al*, 2003).

D'après GASSAN HODAIFA *et al* (2015) les résultats sur les grignons d'olive prétraités avec de l'eau chaude (autohydrolyse) à des températures allant de 150 à 225 C° pour 0-600 s ont été analysés en utilisant le facteur de gravité (log R0). Ce dernier lorsqu'il atteint une valeur égale à 3,7 garantit la solubilisation totale de hémicelluloses, préservant largement la cellulose et de la lignine dans les résidus solides.

Revue bibliographique sur les enzymes recherchées

Les résidus solides ont été hydrolysés par les cellulases pour évaluer la digestibilité enzymatique. Les résultats ont montré que la saccharification enzymatique de solides prétraités à 225 °C pour 600 s ont donné lieu à un rendement de D-glucose de 54,3% (12,6 kg / 100 kg OS), ce qui a amélioré 28 fois le rendement obtenu en utilisant des solides prétraités à 150 °C pour 600 s. Dans les meilleures conditions testées, l'autohydrolyse et le procédé enzymatique ont permis l'obtention des rendements très riches en oligosaccharides et en D-glucose (27,3 kg / 100 kg OS). A cet effet, le grignon d'olive est une matière première potentielle pour la production de sucres fermentescibles.

Une autre étude a été menée par MOYA RAMIREZ *et al* (2016) dans le but de démontrer l'efficacité du prétraitement de l'hydrolyse du grignon d'olives, issu de l'industrie oléicoles (OMW) (grignons d'olive) de les utiliser comme source de carbone dans la production de biosurfactants par fermentation à l'aide de deux espèces de bactéries: *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*. Les résultats obtenus ont montré que l'hydrolyse enzymatique effectuée avec un mélange de cellulases, d'hémicellulases et de la xylanase était le meilleur traitement préalable, ce qui donne 29,5 et 13,7 mg / L de rhamnolipides et de surfactines respectivement.

Dans les meilleures conditions ces derniers ont atteint des concentrations de 299 et 26,5 mg/L, des valeurs nettement plus élevées que celles obtenues avec les OMW non-hydrolysés. En outre, le prétraitement enzymatique semblait réduire partiellement les effets inhibiteurs des OMW sur la production des surfactines

Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

Le stage pratique a été réalisé au niveau du Laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'université MOULOUD MAMMERI de TIZI OUZOU.

Au cours de la présente expérimentation, des testes de mise en évidence de la production de certaines enzymes fongiques d'intérêt biotechnologiques ont été effectués via des méthodes biochimiques et microbiologiques.

Dans ce chapitre, les différents produits et matériaux utilisés seront présentés ainsi que les principes fondamentaux des différentes méthodes de culture et de dosage utilisées dans notre travail. Le diagramme présenté dans la figure 15 suivante récapitule la méthodologie suivie pour l'expérimentation.

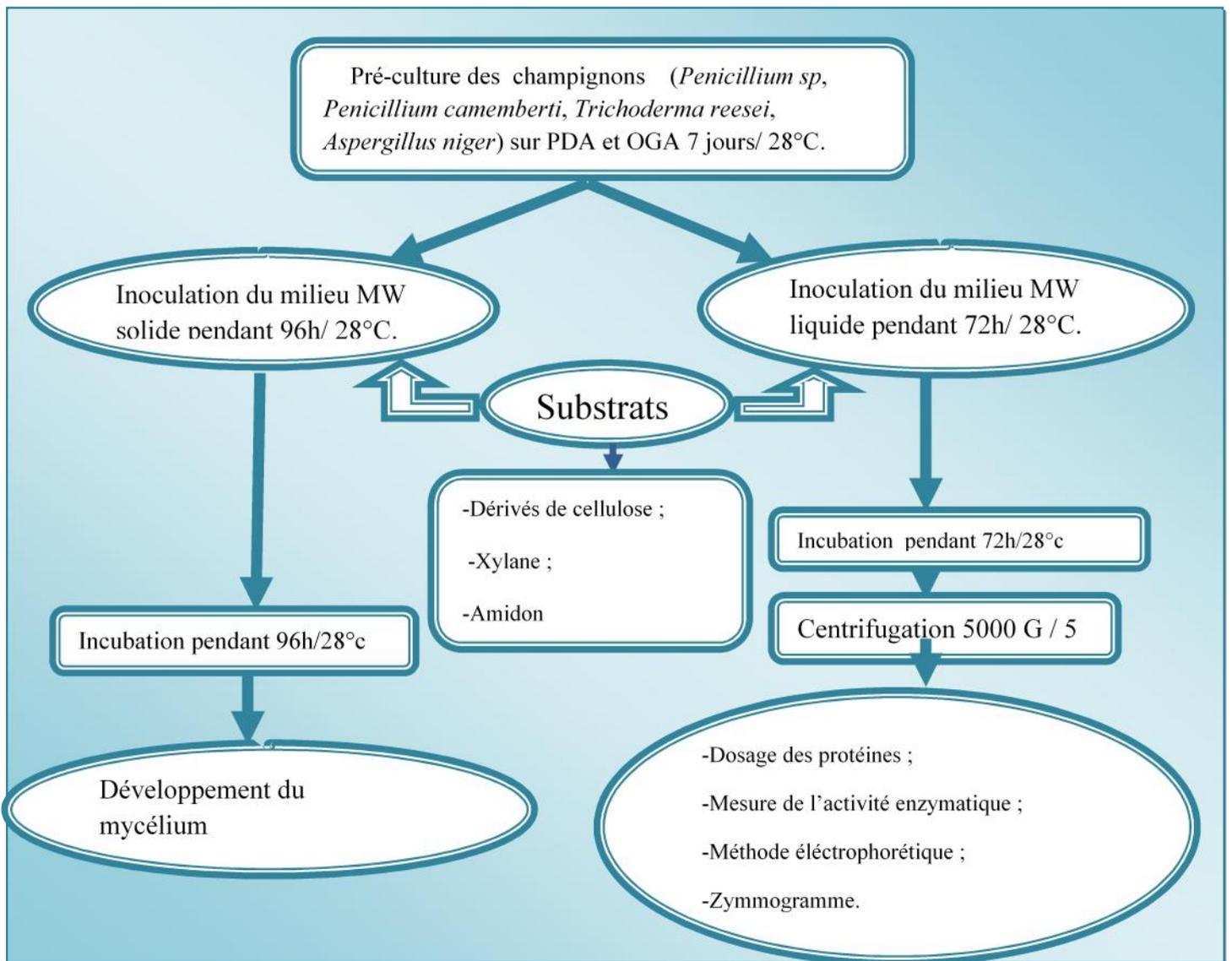


Figure 15 : Diagramme récapitulatif de méthode de travail.

2.1. Matériel

Les appareillages, verreries et autres matériel utilisés dans la présente étude sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau XII : Les différents appareillages, verreries et autres matériel utilisés.

Appareillage	Verrerie et autres matériel
<ul style="list-style-type: none">• Autoclave (PBINTERNATIONAL);• Bain Marie (MEMMERT);• Balance de précision à 0,01mg (SARTORIUS) et balances analytiques à affichage digital (0,01g) (DENVER INSTRUMENT);• Centrifugeuse réfrigérée, (SIGMA 3-18K, SIGMA 4-16K) ;• Centrifugeuse des petits volumes (2ml), (SIGMA 1-14) ;• Etuve (MEMMERT);• pH mètre (HANNA instrument);• Spectrophotomètre visible (SCHIMADZU);• Agitateurs variés (à barreau magnétiques chauffant et non chauffant, vortex) ;• Etuve (28-30°C) (BINDER) ;• Réfrigérateur.	<ul style="list-style-type: none">• Anse à boucle ;• Boîtes de pétri en plastique à 90 mm de diamètre ;• Erlen-Meyers de 250 ml et de 500 ml ;• Eprouvettes ;• Flacon de 250 ml et de 500 ml stériles ;• Micropipette ;• Papier aluminium ;• Pipettes graduées stériles ;• Pipettes pasteur stériles ;• Spatules ;• Tubes à essai stériles ;• Tubes de centrifugation.

2.2. Souches fongiques utilisées

Les souches fongiques utilisées sont : *Trichoderma reesei*, *Penicillium camemberti* PL21, *Penicillium sp* et *Aspergillus niger* ont été collectées au niveau du Laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB). L'aspect macroscopique de ces souches est représenté dans la figure 16.

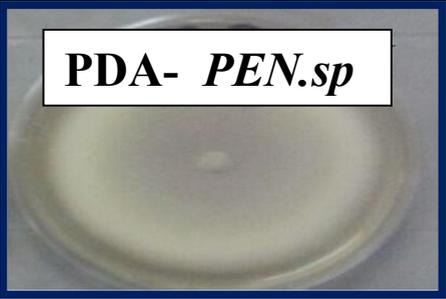
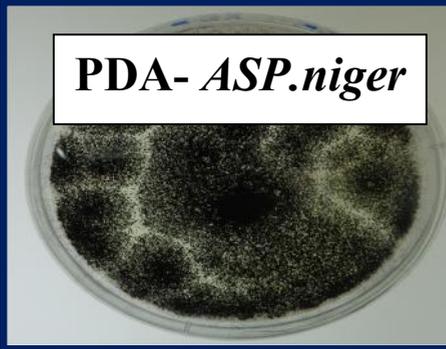
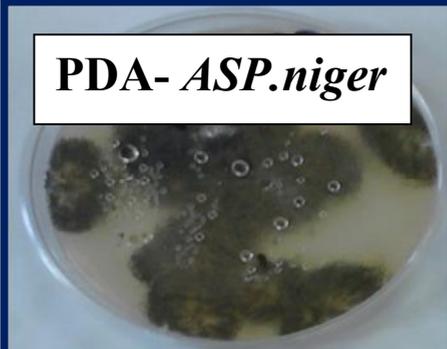
Souches fongiques	Images des souches sur milieu PDA	Images des souches sur milieu OGA
<i>Penicillium sp</i>	 <p>PDA- <i>PEN.sp</i></p>	 <p>OGA-<i>PEN.sp</i></p>
<i>Penicillium camemberti</i>	 <p>PDA- <i>PEN.c</i></p>	 <p>OGA - <i>PEN.c</i></p>
<i>Trichoderma reesei</i>	 <p>PDA- <i>T.reesei</i></p>	 <p>OGA - <i>T.reesei</i></p>
<i>Aspergillus niger</i>	 <p>PDA- <i>ASP.niger</i></p>	 <p>PDA- <i>ASP.niger</i></p>

Figure 16 : Aspect des pré-cultures des souches étudiées sur les deux milieux PDA et OGA.

2.3. Substrats et milieux de culture

La production de trois types d'enzymes : cellulases, xylanases et amylases est testée sur quatre souches de champignons filamenteux dans le milieu liquide et solide Mendel et weber (MW). Pour la production de cellulases, 3 types cellulose, carboxyméthylcellulose (CMC), cellulose microcristalline (Avicel) et acétate de cellulose (C100) sont soumis à la biodégradation fongique. La mise en évidence de la production de xylanases et d'amylases est réalisée respectivement, sur un milieu contenant du xylane (xylan from Birchwood) et de l'amidon comme seule source de carbone.

Les testes de croissance fongiques et de la mise en évidence des activités enzymatiques sont menés comme suit:

- Sur milieu solide constitué de milieu Mendel et weber (MW) additionné d'agar pour une culture sur boîte de Pétri. Le rouge de Congo et le lugol sont utilisés comme indicateurs colorés de dégradation, et ce respectivement pour les dérivés de cellulose, le xylane et l'amidon ;
- Sur milieu liquide MW additionné de substrats testés individuellement dans des erlenmeyers de 100 ml.

2.4. Inoculation des cultures

2.4.1. Milieu solide

A partir de pré-cultures de champignons *T.reesei* (*Trichoderma reesei*), *PEN.c* (*Penicillium camemberti* PL21), *ASP* (*Aspergillus niger*) et *PEN.sp* (*Penicillium sp*) sur le milieu PDA après 7 jours d'incubation à 28°C; des disques sont prélevés soigneusement à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Un disque de biomasse fongique est déposé au centre de chaque boîte de Pétri contenant le milieu MW additionné du rouge de congo puis incubés à 28°C.

2.4.2. Milieu liquide

Six disques de biomasse fongique sont plongés dans chaque erlenmeyer. Ensuite, ces derniers sont bouchés à l'aide de coton stérile et incubés à 28°C/72h. Les cultures sont soumises à une centrifugation, à 5000 G /5 min à 4°C, afin d'en extraire et récupérer les enzymes produites dans le surnageant.

2.5. Mesure de la matière sèche produite

Les cultures sont versées dans tubes à centrifugation pour pouvoir les centrifugés à 5000tours/10min à 4°C. Le culot résiduel va servir pour mesurer la matière sèche afin d'évaluer le développement des champignons. La biomasse cellulaire est alors séchée dans une étuve à 44°C jusqu'à obtention d'un poids sec constant.

2.6. Détermination de la teneur en protéines

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer les teneurs en protéine. Il s'agit de celles décrites par Lowry *et al* (1951) et Bradford (1976).

2.6.1. Méthode de Lowry *et al.* (1951)

- **Principe de la méthode**

La méthode de Lowry *et al* (1951) est une méthode de dosage colorimétrique. Le réactif de Folin-Ciocalteu (acide phospho-tungsto-molybdique) est plus ou moins réduit par les protéines (les groupements oxydés des acides aminés), notamment les groupements phénoliques du tryptophane et de la tyrosine et, dans une moindre mesure ceux de la cystéine et histidine. Cette réaction donne naissance à un complexe coloré : le bleu de molybdène dont l'intensité peut être mesurée au spectrophotomètre à 750 nm. Le mode opératoire est donné en annexe II.

La densité optique (DO) lue au spectrophotomètre à 750 nm permet de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon analysé en se référant à une courbe d'étalonnage $DO=f(C)$ établie avec des solutions en concentrations protéiques connues (Figure 17).

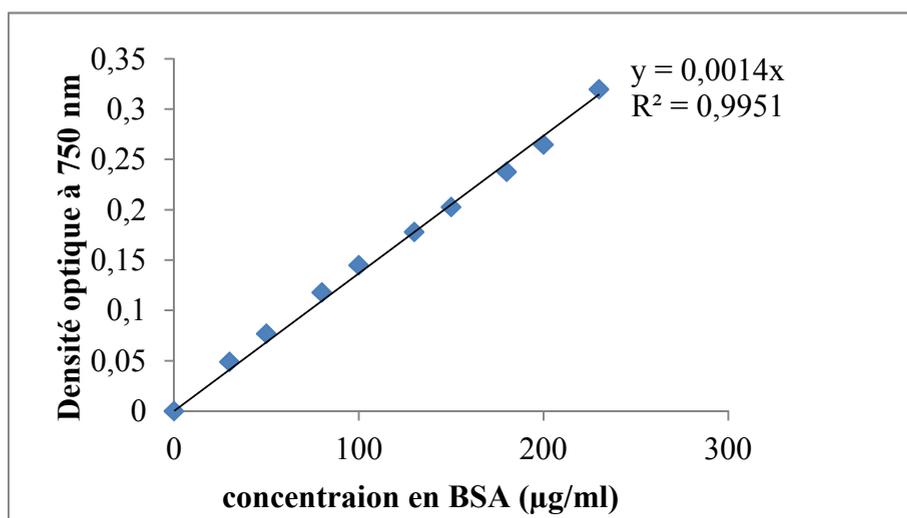


Figure 17 : Courbe étalon pour le dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al.*, (1951). L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine de référence ; R^2 = coefficient de corrélation

2.6.2. Méthode de Bradford (1976)

- **Principe de la méthode**

Bradford et al (1976) ont développé une méthode basée sur l'absorption du colorant bleu de Coomassie G250. En milieu méthanolique acide, ce colorant s'absorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'absorption qui passe du rouge au bleu. Cette absorption est mesurée 595 nm. Elle permet de doser des quantités de protéine de l'ordre du microgramme. Le mode opératoire est donné en annexe III.

La densité optique (DO) lue au spectrophotomètre à 595 nm permet de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon analysé en se référant à une courbe d'étalonnage $DO=f(C)$ établie avec des solutions en concentrations protéiques connues (Figure 18).

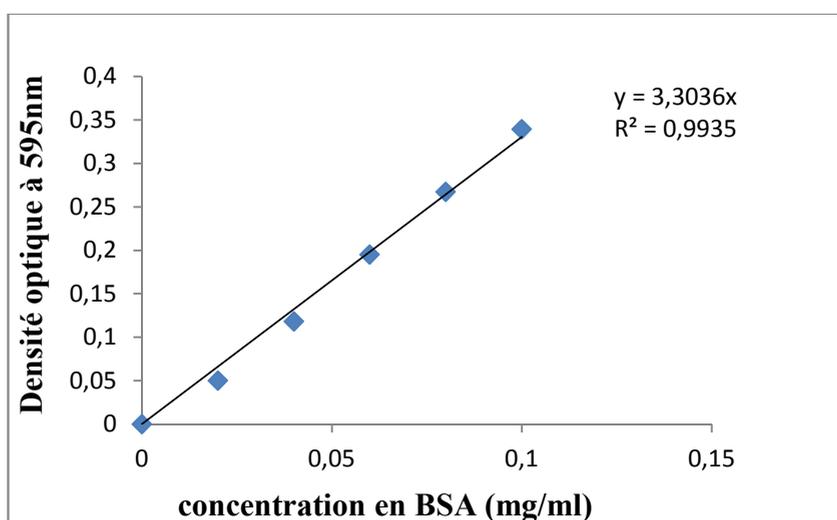


Figure 18 : Courbe étalon pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976). L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine de référence ; R^2 = coefficient de corrélation.

2.7. Dosage de l'activité enzymatique

- **Principe**

Afin de mesurer l'activité enzymatique, on utilise l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS), en milieu alcalin et à chaud, ce dernier est réduit en acide 3-amino- 5-nitrosalicylique en présence de sucres réducteurs (le maltose (Figure19), xylose (Figure20) et glucose (Figure 21) pour mesurer l'activité de la xylanase, α -amylase, cellulase, respectivement). Le composé obtenu est rouge orangé à reflets pourpres. Il peut être dosé par spectrophotométrie ($\lambda = 540\text{nm}$). Le mode opératoire est donné en annexe IV.

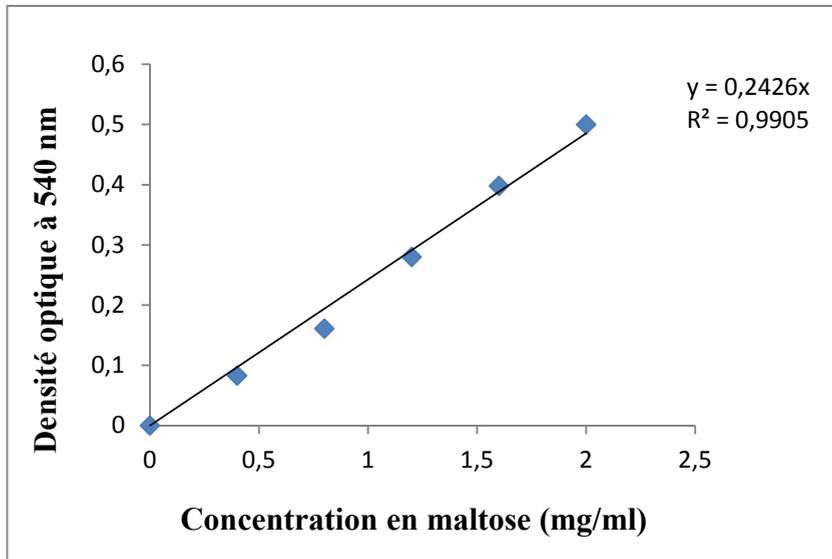


Figure 19: Courbe d'étalonnage pour le dosage colorimétrique du maltose.

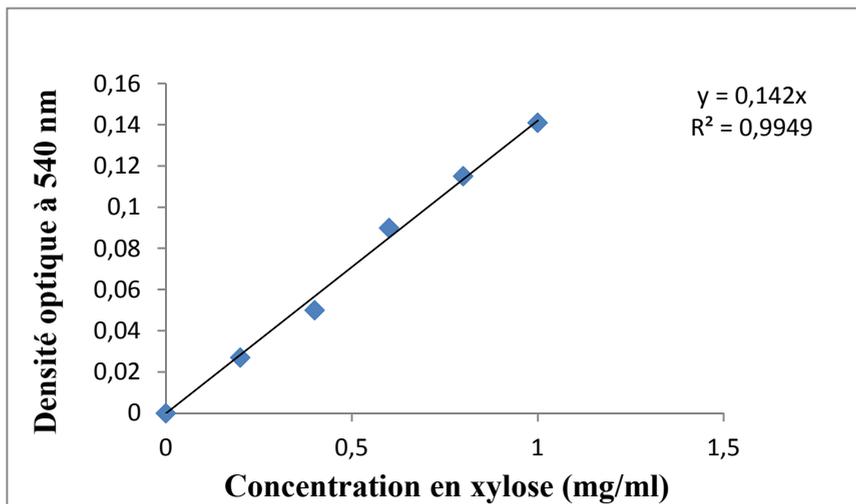


Figure 20: Courbe d'étalonnage pour le dosage colorimétrique du xylose.

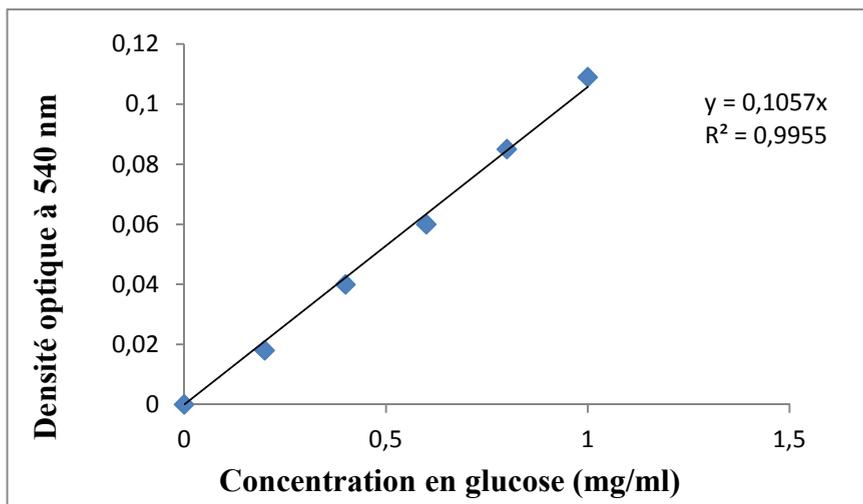


Figure 21: Courbe d'étalonnage pour le dosage colorimétrique du glucose.

2.8. Méthodes électrophorétiques

- **Principe général**

C'est une méthode permettant la séparation des constituants d'un mélange protéique sous l'action d'un champ électrique. Elle utilise le caractère amphotère des protéines dû à la présence des radicaux amines et carboxyliques dans la molécule.

La vitesse de déplacement ou mobilité électrophorétique dépend étroitement de leur charge globale et de leur poids moléculaire, ce qui permet aisément de séparer les composés d'un mélange sur la base de ces paramètres et des facteurs du milieu.

2.8.1. La séparation sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel polyacrylamide (PAGE) est considérée comme l'une des méthodes de séparation les plus fines. Elle est de plus rapide, précise, reproductible et sensible (VAN HEKKEN et THOMPSON, 1991).

Le gel de polyacrylamide est le produit de polymérisation de monomères d'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) et d'un agent de pontage habituellement le N, N' méthylène-bis-acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) et ce, en présence de persulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8$) et de N, N, N',N' -tétraméthyl -éthylène diamine (TEMED) comme catalyseurs de la réaction.

Le gel de polyacrylamide est transparent. Il permet une évaluation densitométrique plus aisée, comme il peut lui-même servir de tamis moléculaire. Les propriétés du gel sont déterminées selon la concentration en monomère ainsi que le degré de polymérisation et de pontage définis par des indices T et C calculés comme suit :

$$T (\%) = (a+b/v) \times 100 \quad C (\%) = (b/a+b) \times 100$$

Avec : a : acrylamide (g)

b : méthylène-bis-acrylamide (g)

v : volume de la solution (ml)

2.8.2. Conditions générale et conduite d'électrophorèse

2.8.2.1. Préparation des échantillons destinés à l'analyse électrophorétique

L'extrait enzymatique est prélevé à raison de 1 à 2 mg/ml, puis additionné d'un tampon d'échantillon. Du bleu de bromophénol est ajouté comme indicateur coloré au tampon pour permettre le suivi de la migration et repérer la fin de l'électrophorèse.

2.8.2.2. Dépôt de l'échantillon dans le gel et mise sous tension

Après avoir coulé le gel délicatement entre une plaque de verre et une plaque d'alumine, l'échantillon à analyser est déposé à raison de 20 à 25 µl dans chaque puits à l'aide d'une microseringue. L'unité d'électrophorèse est mise sous tension appropriée et la migration doit se dérouler en courant et voltage constants (20mA, 200V).

2.8.2.3. Révélation des bandes de migration électrophorétiques

A la fin de la migration, les gels de l'électrophorèse ont été révélés au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent.

➤ Coloration au bleu de Coomassie :

- **Fixation** : la fixation est faite par immersion du gel dans une solution d'acide trichloroacétique (TCA) 12% (p/v) pendant 45 min.
- **Coloration** : le gel est immergé 2 à 4 h dans une solution de coloration contenant du Bleu de Coomassie 0.2% (p/v) dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée (1 volume), méthanol (1 volume) et TCA 2% (p/v) ;
- **Décoloration** : elle est réalisée par immersion du gel dans le mélange (eau / méthanol / acide acétique).

➤ Coloration au nitrate d'argent :

- **Fixation** : les protéines sont fixées par immersion dans une solution constituée du mélange eau distillée, éthanol 30% (v/v), acide acétique 10% (v/v) pendant une nuit ;
- **Sensibilisation** : le gel est immergé dans une solution de thiosulfate de sodium 0.02% (p/v) pendant 1 min ;
- **Bain d'argent** : dans une solution de nitrate d'argent (AgNO_3) 0.1% (p/v) pendant 30 min ;
- **Développement** : elle est réalisée par immersion du gel dans le mélange carbonate de Na (Na_2CO_3) / thiosulfate de Na 2% (p/v) / formaldéhyde / eau distillée) ;
- **Arrêt du développement** : dans une solution d'acide acétique 1% (v/v) pendant 5min.

2.8.2.4. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes (PAGE SDS)

Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) de formule $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11} \text{SO}_3^- \text{Na}^+$, est un détergent anionique utilisé pour dissocier les complexes protéiques. Associé à un agent réducteur, le 2-mercaptoéthanol, chargé de rompre les ponts disulfures, le SDS solubilise les protéines et se fixe en excès sur ces derniers, leur confèrent ainsi une forte charge négative. De ce fait la séparation des différents composés de l'échantillon n'a lieu que selon leur différence de poids moléculaire.

Pour réaliser ce type de séparation, nous avons utilisé le protocole décrit par LAEMMLI et FAVRE (1973) qui se base sur un système bi phasique, comprenant deux types de gels superposés : un gel de concentration (T=4% et C=2.7%) en tampon (TRIS-HCL, pH 6.8), faiblement réticulé qui n'exerce aucun effet de tamisage moléculaire et tend plutôt à concentrer les échantillons et un gel de séparation (T=17% et C=2.7%) en tampon (TRIS-HCL, pH 8.8), à travers le quel les protéines migrent selon leur poids moléculaire.

Nous avons utilisé aussi le tampon d'électrode qui est composé de (Tris, glycine, SDS 1% ; pH 8.3).

Les échantillons protéiques sont préparés et mis en solution dans le tampon de gel de concentration, de SDS 10%, de 2-mercaptoéthanol (4%, v/v) et d'eau distillée. Ils sont chauffés à 100°C pendant 4 à 5 min puis additionnés de glycérol (50%, v/v).

La détermination du poids moléculaire des entités séparées s'effectue en faisant migrer dans les puits, et dans les mêmes conditions, des protéines étalons de poids moléculaire (PM) connus. Le mode opératoire est donné en annexe V.

2.9. Zymogramme des enzymes xylanolytiques, cellulolytiques, amylolytiques

• Principe

Cette technique d'électrophorèse permet de mettre en évidence directement l'activité enzymatique sur le gel d'électrophorèse en comparaison avec les bandes de protéines qui apparaissent sur ce même gel.

La séparation électrophorétique des xylanases, cellulases, amylases se fait en fonction de leur masse moléculaire apparente. La dégradation du substrat est ensuite mise en évidence, après coloration du gel au rouge Congo, par l'apparition de bandes. L'intensité de la dégradation est corrélée à la surface de la plage de lyse et donc proportionnelle à la quantité de xylanases, cellulases, amylases présentes. La masse moléculaire de l'enzyme responsable de cette dégradation est évaluée par comparaison avec des protéines témoins, ce qui permet son identification.

Le mode opératoire est donné en annexe VI, VII, VIII.

Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

3.1. Développement des souches sur milieu solide

Sur boîtes de Pétri, la croissance et les activités enzymatiques sont révélées avec un indicateur de couleur (Rouge de Congo et lugol) après dégradation des substrats (les dérivés de cellulose, le xylane et l'amidon), donc leur potentiel enzymatique est déterminé par les différentes modifications apparentes après dégradation qui se traduisent par la formation de zones claires autour des colonies (Zone d'hydrolyse). Cette méthode sur milieu solide a pour objectif de sélectionner des souches productrices d'enzymes, elle a été rapportée par KANG *et al* (2004) qui ont aussi trouvé des activités xylanases (5070 U/g) et cellulases (129 U/g) intéressantes chez *Aspergillus niger* lorsqu'elle est cultivée sur un milieu solide en utilisant la paille de riz comme substrat.

D'après les résultats obtenus et présentés dans les figures 22 et 23, les souches utilisées se développent différemment sur ces milieux sélectifs à base de dérivés de cellulose, xylane, et d'amidon.

Des diamètres bien visibles sont obtenus avec les souches d'*Aspergillus niger*, *Penicillium sp* et *Trichoderma reesei* qui semblent se développer plus facilement que *Penicillium camemberti* sur milieu solide à base de xylane et d'amidon. Concernant le milieu solide à base de dérivés de cellulose, les deux souches d'*Aspergillus niger* et *Penicillium sp* montre des diamètres mieux visibles par rapport aux deux autres souches *Trichoderma reesei* et *Penicillium camemberti*.

Les souches de *Penicillium sp* et d'*Aspergillus niger* se développent sur tous les milieux quelque soit le substrat utilisé. Tandis que *Penicillium camemberti* et *Trichoderma reesei* montrent une préférence pour le xylane et l'amidon.

Les champignons filamenteux sont des micro-organismes appropriés pour la fermentation sur milieu solide (FMS), en particulier parce que leur morphologie leur permet de coloniser et de pénétrer le substrat solide (RAHARDJO *et al*, 2002).

Plusieurs chercheurs ont rapporté la production de xylanases sur le son de blé (MALARVIZHI *et al*, 2003 ; HECK *et al*, 2005). Le son de blé commercial se compose de 30% de cellulose, 27% d'hémicellulose, 21% de lignine et 8% de cendres (GAWANDE et KAMAT, 1999). HALTRICH *et al* (1996) ont également rapporté que les xylanases ont toujours été associés à la cellulase.

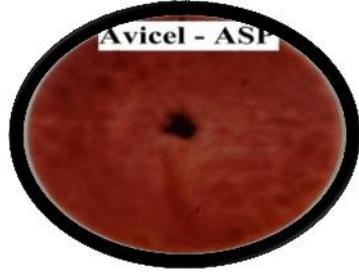
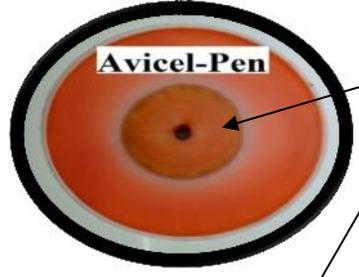
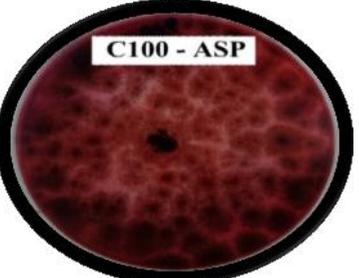
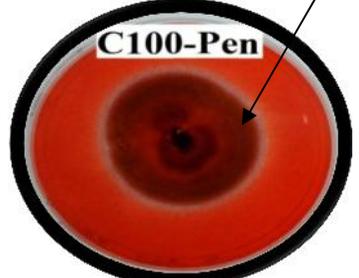
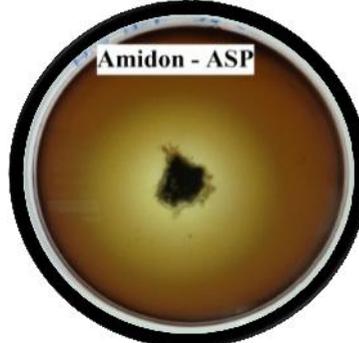
Souche Substrats	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium.sp</i>	
Avicel			<p>Zone de dégradation</p>
C 100			
Xylane			
Amidon (RG)			
Amidon (lugol)			

Figure 22 : Photographies des cultures d'*Aspergillus niger* et de *Penicillium.sp* sur milieu solide MW.

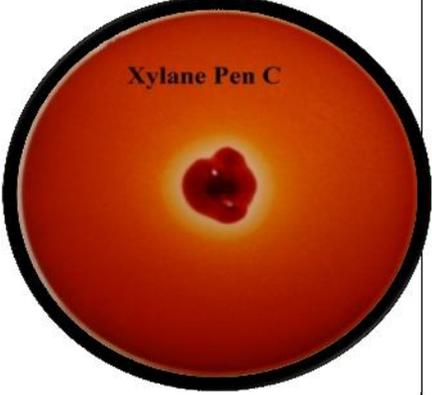
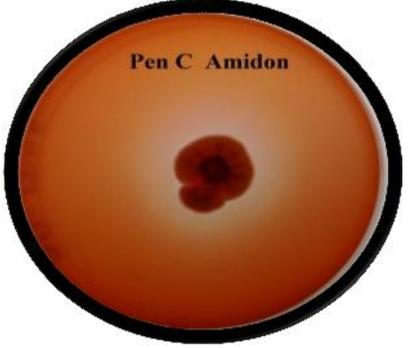
Souche Substrats	<i>Penicillium camemberti</i>	Souche Substrats	<i>Trichoderma reesei</i>
C 100		Avicel	
Xylane		Xylane	
Amidon (RG)		Amidon (RG)	
Amidon (Lugol)		Amidon (lugol)	

Figure 23 : Photographies des cultures de *Penicillium camemberti* et de *Trichoderma reesei* sur milieu solide MW.

3.2. Développement des souches sur milieu liquide

La croissance de diverses souches de champignons filamenteux est testée sur un milieu liquide MW en utilisant les dérivés de cellulose, xylane et l'amidon comme source de carbone et d'énergie. Elle est visualisée par la formation d'un voile mycélien à la limite liquide/air s'expliquant probablement par l'effet du flottement des spores s'associant ainsi à la région enzymatique (cellulosique, xylanolytique, amylolytique) la plus proche ou bien la recherche de l'oxygène. Des dépôts et des mycéliums en suspension sont aussi constatés.

Pour *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.*, de meilleurs taux de biodégradation des dérivés de cellulose, de xylane et d'amidon sont enregistrés sur milieu liquide avec des concentrations en protéines produites plus élevées par rapport aux deux autres souches. Cependant, d'après PETERSSON *et al* (1981) et KUBICEK (1998), le genre *Trichoderma* est connu parmi les souches fongiques les plus cellulolytiques par leur capacité à produire au moins deux exoglucanases (SHOEMAKER *et al*, 1983 ; CHEN *et al*, 1987), cinq endoglucanases (PENTILLA *et al*, 1987) et deux β -glucosidases (TAKASHIMA *et al*, 1999 ; NOGAWA *et al*, 2001).

Concernant *Penicillium camemberti*, la meilleure biodégradation a été obtenue dans le milieu à base de dérivés de cellulose, alors que sur le milieu à base de xylane et d'amidon un faible développement du mycélium est apparu.

Les substrats utilisés ont donc induit la sécrétion des enzymes, chez les souches étudiées. Ces quatre souches sont déjà connues dans la littérature comme productrices de cellulases (ROUSSOS et RAIMBAULT, 1982 ; ABO-STATE *et al*, 2010), Xylanases (SANJAY KAR *et al*, 2006 ; KARUNAKARAN *et al*, 2014), et amylases (ALAM et KUMAR, 2011).

3.2.1. Hydrolyse de la cellulose en milieu liquide

Les souches de *Penicillium camemberti*, *Penicillium sp.*, et d'*Aspergillus niger* montrent un meilleur développement contrairement à *Trichoderma reesei* un faible voile mycéliens est apparu (Figure 24).

Dans le milieu liquide comme dans le milieu solide, il y'a croissance des souches utilisées. Cela confirme bien que les dérivés de cellulose jouent un rôle d'inducteur et source de carbone surtout pour ces genres de champignons qui sont très utilisées dans le domaine industriel pour leur production de cellulases (FADEL, 2000 ; NIGHAT *et al*, 2004 ; SHONA *et al*, 2006).

La détermination de la matière sèche (MS), nous renseigne sur la croissance fongique sur les différents substrats testés. Selon les poids des biomasses obtenues c'est *Trichoderma reesei* et *Aspergillus niger* qui ont une meilleure croissance sur l'avicel avec un même poids qui est de 70mg/l comparait aux autres souches qui sont de 20 mg/l, 40 mg/l pour *Penicillium sp*, *Penicillium camemberti*, respectivement (Figure 27).

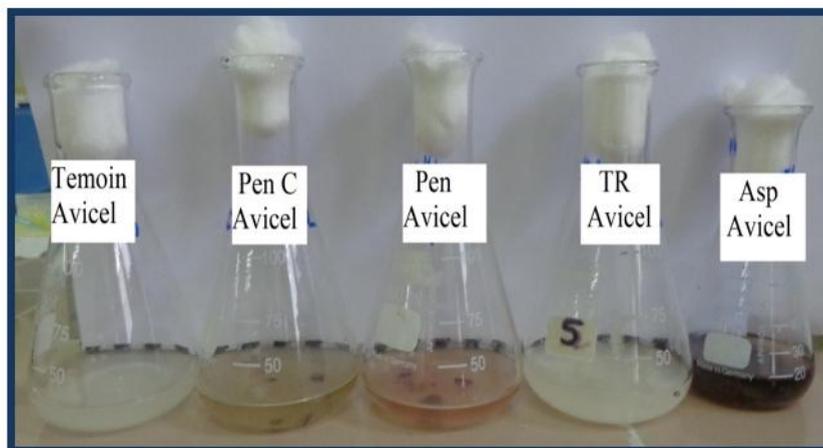


Figure 24 : Photographie d'une monoculture en batch des champignons sur le milieu liquide MW contenant l'un des dérivés de cellulose.

3.2.2. Hydrolyse du xylane en milieu liquide

Au niveau des erlenmeyers, un développement a été visible à l'œil nu qui se traduit par la formation de mycéliens. Mais ce dernier été meilleur chez *Penicillium sp*, et *Aspergillus niger* par rapport aux deux autres souches (*Trichoderma reesei* et *Penicillium camemberti*) (Figure 25). Cependant, nos résultats concordent avec ceux rapportés par d'autres chercheurs, par exemple, KARUNAKARAN *et al* (2014) ont constaté que le champignon *Aspergillus Niger* est le plus puissant pour la production de xylanase en utilisant la paille de riz comme substrat.

Plusieurs travaux ont testé la production de xylanases sur des milieux liquides à base de xylane pur (xylane de bouleau, xylane d'épeautre et d'avoine), ces substrats sont des inducteurs potentiels de xylanases, mais leur coût élevé est une contrainte à l'échelle industrielle d'où la nécessité d'utiliser des déchets lignocellulosiques agricoles tels que la paille de blé, le son de blé (GWANDE *et al*, 1999), la sciure du bois et l'écorce d'orange (GAWANDE et KAMAT, 1999 ; TERRASAN *et al*, 2010).

BAKRI *et al* (2003) ; SEYIS et AKSO (2005) ; FANG *et al* (2007) et ELLOUZE *et al* (2008) ont étudié les activités de divers microorganismes sur des substrats à base d'écorce d'orange et de citron. Les résultats ont révélé une meilleure activité avec l'écorce de citron

dans le cas de *Trichoderma harzanum* 1073 D3. Tandis que, chez *Aspergillus carneus*, *Bacillus subtilis* et *Sclerotinia sclerotiorum* une activité xylanolytique relativement faible a été détectée en utilisant l'écorce d'orange.

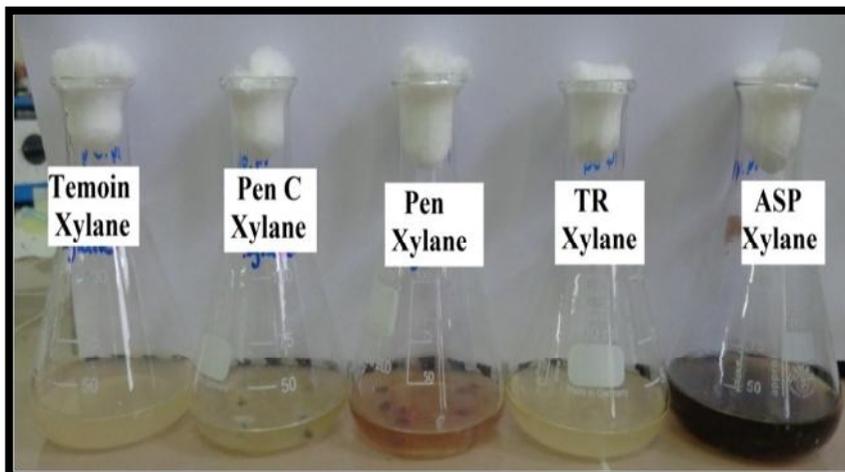


Figure 25 : Photographie d'une monoculture en batch des champignons sur le milieu liquide MW à base de xylane.

3.2.3. Hydrolyse de l'amidon en milieu liquide

Au niveau des erlenmeyers, il ya eu formation de mycéliens visibles à l'œil nue, ce qui signifie que ces genres de champignons ont une bonne activité et sont considérées comme productrices d'enzymes amylolytiques (Figure 26).

Selon les poids des biomasses obtenues c'est *Trichoderma reesei* qui a une meilleure croissance sur l'amidon (200mg/l) comparait aux autres souches qui sont de 110 mg/l, 70mg/l, 90mg/l pour *Penicillium sp*, *Penicillium camemberti*, *Aspergillus niger*, respectivement (Figure 27).

Selon BAKRI (2003) et ESPINE *et al* (2009), la fermentation du milieu liquide est beaucoup mieux adaptée aux microorganismes fongiques du genre *Penicillium* : (*P. urticae*, *P. roseo-citreum*, *P. camemberti PL21*) pour la production d' α -amylase avec un rendement d'activité de 6 à 10 U/ml en utilisant différents substrats principalement formé de déchets organiques comme la pulpe de betterave (BALDWIN *et al*, 1986), de déchets d'oranges (HART *et al*, 1991 ; MAHMOUD *et al*, 1998 et DIOMI *et al*, 2008) ou des produits céréaliers (PASCAL et THOMAS, 1990). D'après HUTCHEON *et al* (2005) les espèces d'*Aspergillus* produisent une grande variété d'enzymes extracellulaires tels que les amylases qui sont largement utilisés dans l'industrie.

DJEKRIF-DAKHMOCHE *et al* (2006) ont montré que *Aspergillus Niger* a des capacités hydrolytiques importantes dans la production d' α -amylase et, en raison de sa tolérance de l'acidité (pH <3), il permet d'éviter la contamination bactérienne.

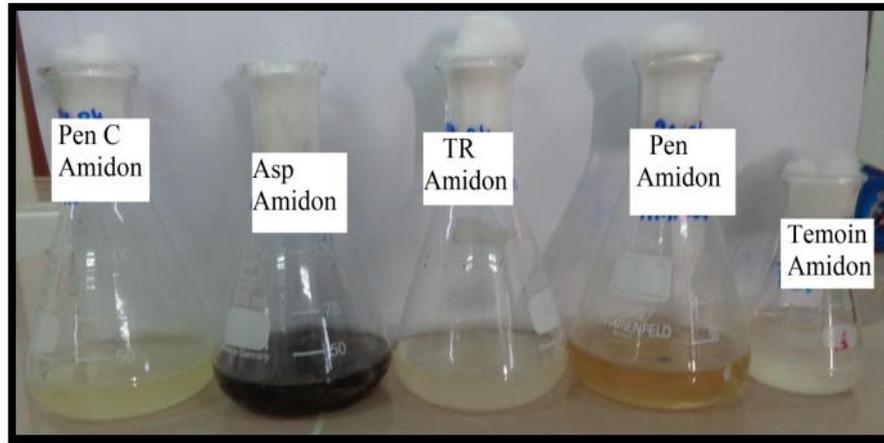


Figure 26 : Photographie d'une monoculture en batch des champignons sur le milieu liquide MW à base d'amidon.

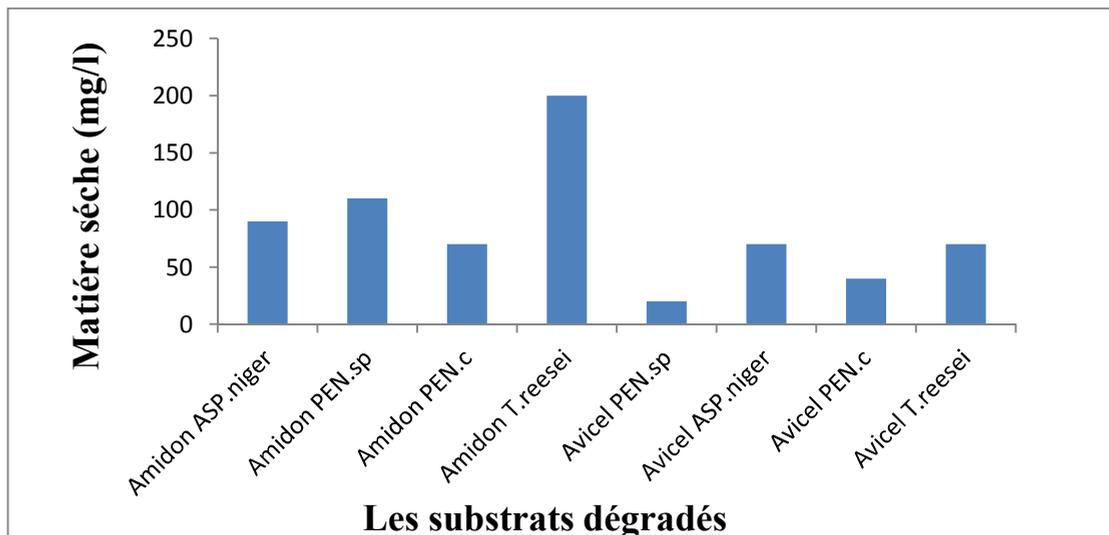


Figure 27 : Mesure de la matière sèche des culots après cultures des quatre genres de champignons.

3.3. Dosage de l'activité enzymatique

La croissance et/ou l'activité de biodégradation des microorganismes vis-à-vis des substrats testés a été mesurée par dosage des protéines et des sucres réducteurs totaux libérés contenus dans le surnageant de centrifugation des cultures. Les quantités de protéines

présentes dans les surnageants après 7 jours de culture d'*Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium camemberti* et *Penicillium sp* étudiés sont rapportées dans la figure 28.

La biosynthèse des protéines et l'activité enzymatique dépendent de la source de carbone utilisée, et varient suivant l'espèce et les cultures réalisées dans les mêmes conditions expérimentales. Des échantillons ont été prélevés à intervalles réguliers et l'activité de l'enzyme dans le surnageant de culture a été déterminée.

Penicillium sp produit des protéines qui dégradent les substrats utilisés à des taux de 36% (Avicel), 34.7% (Xylane) et 19.9% (Amidon). Ce qui signifie qu'elle a une activité enzymatique élevée lorsque l'avicel et le xylane sont utilisés comme source de carbone. Concernant *Penicillium camemberti*, le taux de dégradation du xylane (4.9%) est plus faible par rapport à l'amidon (18.38%) et l'avicel (16.8%). Cependant, la concentration de protéines produites sur le xylane est supérieure par rapport à celles qui dégradent l'amidon et l'avicel.

L'avicel et le xylane sont dégradés par la souche *Trichoderma reesei*, à des taux de 33.7% et 32% respectivement, en produisant des protéines à des concentrations de 1.85 mg/ml et 1.94 mg/ml respectivement. Alors que la concentration des protéines dégradant l'amidon est inférieure aux deux substrats précédents qui est de 0.871 mg/ml avec un taux de dégradation 18.8%.

Concernant la souche d'*Aspergillus niger* le taux de dégradation des substrats est de l'ordre de 39%, 35.5% et 29.3% pour l'amidon, le xylane et l'avicel respectivement. La concentration de protéines produites correspondant pour chaque substrat est de l'ordre de 1.014 mg/ml, 1.940 mg/ml et 2.130 mg/ml respectivement pour l'amidon, l'avicel et le xylane.

Parmi les souches étudiées, *Penicillium sp* et *Trichoderma reesei* donnent une culture abondante sur l'avicel et le xylane en produisant des protéines. Contrairement aux souches précédentes, *Aspergillus niger* et *Penicillium camemberti* donnent de faibles quantités de biomasse sur ces deux derniers substrats.

Tous les microorganismes testés dégradent l'amidon, mais seule la souche d'*Aspergillus niger* présente une activité amylasique importante qui est de 39%. Le phénomène d'induction de la biosynthèse des amylases au cours de la croissance d'*Aspergillus niger* a déjà été décrit par BARTON et COLT (1972) et GANDHI et COLL (1974). L'amidon agit comme inducteur comme cela était rapporté par plusieurs auteurs (DE SOUZA and DE OLIVEIRA, 2010).

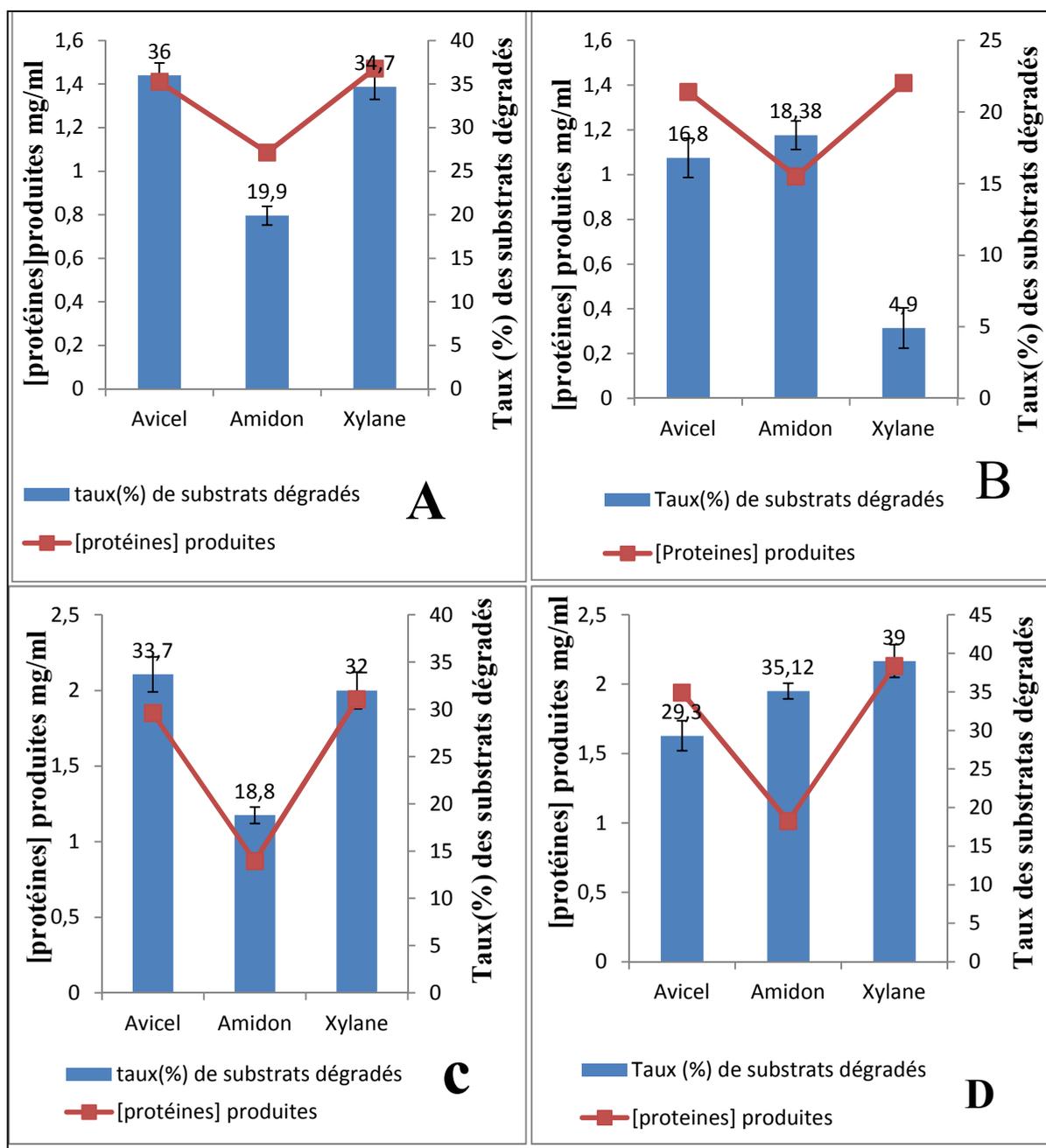


Figure 28 : Activité cellulolytique, xylanolytique et amylolytique sur trois substrats témoins Xylane, Avicel et CMC. (A) *Penicillium sp* ; (B) *Penicillium camemberti* ; (C) *Trichoderma reesei* ; et (D) d'*Aspergillus niger*.

3.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en PAGE-SDS des extraits de culture de différentes souches et leur zymogramme

Après la croissance, dans des conditions de culture optimales, de *Penicillium sp*, *Penicillium camemberti*, *Trichoderma reesei*, et d'*Aspergillus niger* dans des cultures liquides avec différents substrats à savoir du xylane, de la cellulose et de l'amidon, les filtrats brutes

ont été analysés par électrophorèse SDS-PAGE afin d'avoir une idée sur la composition de ces extraits. Des zymogrammes ont été réalisés pour mettre en évidence la présence d'enzymes à activité xylanolytique, cellulolytique et amylolytique.

3.4.1. Recherche d'activité xylanolytique

Le profil électrophorétique de l'extrait obtenu après culture sur du xylane (figure 26) a révélé plusieurs bandes de très faible intensité chez *Penicillium sp*, *Penicillium camemberti*, *Trichoderma reesei*, alors que chez *Aspergillus niger* on a obtenu des bandes de forte intensité. La différence d'intensité des bandes pourrait être liée à la concentration des protéines dans les extraits. Il semblerait que la concentration en protéines des extraits de culture des souches *Penicillium sp*, *Penicillium camemberti*, *Trichoderma reesei*, soit très faible comparativement à la souche *Aspergillus niger*.

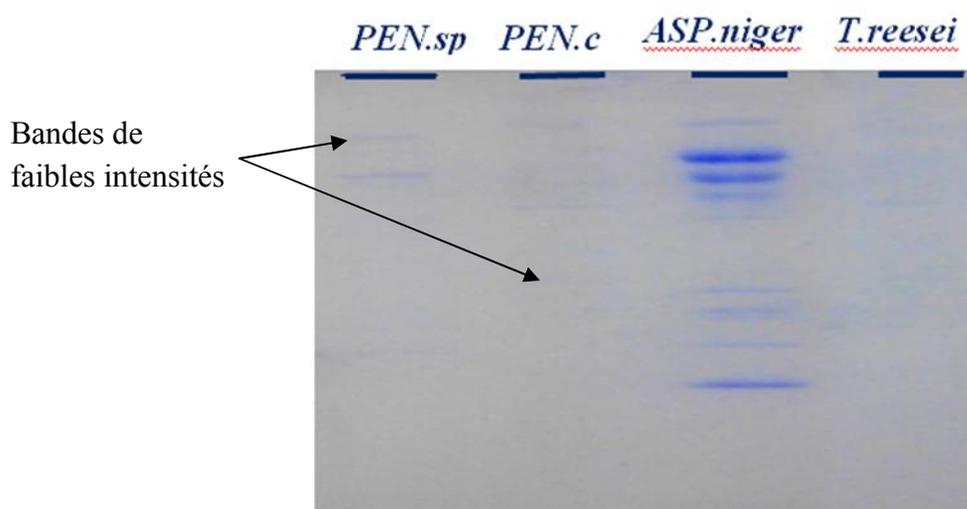


Figure 29 : Profil électrophorétique en SDS-PAGE avec β -ME des protéines du surnageant obtenu après culture sur du xylane.

L'analyse du zymogramme (figure 27) montre qu'au niveau de la souche d'*Aspergillus niger*, il y a présence d'une bande à activité xylanolytique (bande A) avec une masse moléculaire d'environ 31,6 kDa. Cette bande pourrait correspondre à la xylanase. Cette valeur de masse moléculaire est inférieure à celle observée par YUI TAKAHASHI *et al* (2013) qui est de 35 kDa et supérieure à celle observée par DOBREV et ZHEKOVA (2012) qui est de 26,9 kDa. Cette différence pourrait être due aux modifications post traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, hydroxylation, ...).

L'analyse du zymogramme (figure 27) concernant les extraits de culture des souches *Penicillium sp*, *Penicillium camemberti*, *Trichoderma reesei*, n'a fait apparaître aucune bande

à activité xylanolytique. Ce résultat pourrait s'expliquer par une faible activité xylanolytique non détectable par cette méthode à cause d'une faible concentration en enzyme.

Selon MURTHY et NAIDU (2012) le PM d'une xylanase produite par *Penicillium* sp est estimé à 27. En ce qui concerne le PM de la xylanase produite par *Trichoderma harzianum* qui a été purifié avec du sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie d'exclusion moléculaire est estimé à 29 (SANGHVI *et al*, 2010). Tandis que le PM de xylanase produite par *Trichoderma reesei* est de 20 (TENKANEN *et al*, 1992).

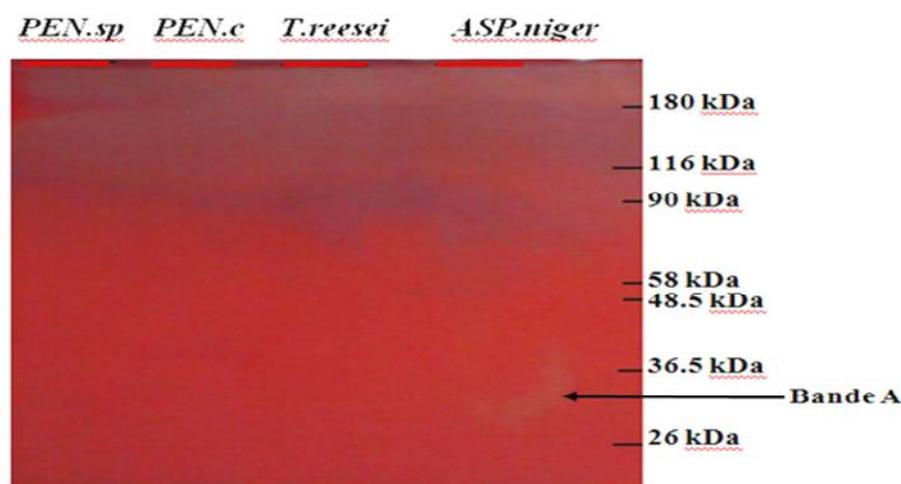


Figure 27 : Zymogramme de xylanase en conditions dénaturantes (SDS). Standard : (Alpha 2 macroglobuline from equine serum : 180 kDa ; β -galactosidase from *E.Coli* : 116 kDa ; Lactoferrine from humain milk : 90 kDa ; Pyruvate kinase (rabbit muscle) : 58 kDa ; Fumarase (porcine heart) 48.5 kDa ; Lactic déhydrogénase (rabbit muscle) 36.5 kDa ; Triosephosphate isomérase 26 kDa).

3.4.2. Recherche d'activité cellulolytique

Le profil électrophorétique de l'extrait obtenu après culture sur avicel (Figure 28) a révélé la présence de bandes de forte intensité chez *Penicillium* sp et *Aspergillus niger*, tandis qu'il y a absence de bandes chez les deux autres souches (*Trichoderma reesei* et *Penicillium camemberti*).

Au niveau de *Penicillium* sp deux bandes ont été révélées (bande B et B'), avec une masse moléculaire d'environ 48,5 KDa et 39,8 KDa respectivement.

Un zymogramme réalisé par P. PICART *et al* (2007) a révélé la présence de quatre bandes ayant des PM de 35, 37, 48 et 71. Ces bandes correspondent à des cellulases.

Cependant, les PM des bandes B et B' sont proche à deux de ceux rapportés par P. PICART *et al* (2007) qui sont de 48 et 37 respectivement.

L'étude faite par JORGENSEN *et al* (2003) a montré que *Penicillium sp* produit un ensemble complexe d'endoglucanases et d'exoglucanases. De ce fait, on peut suggérer que la bande B et B' pourrait correspondre au cellulase

La masse moléculaire des deux bandes, bande C et bande C', obtenue avec la souche *Aspergillus niger* est de 39,8 kDa et 36,5 kDa, respectivement. Une étude réalisée par DEVI. M et KUMAR. M (2012) sur *Aspergillus niger* a montré la présence de deux bandes dont leur PM est de 33 et 24. Ils ont supposé que ces bandes pourraient être des isoenzymes de la cellulase.

Travaillant sur un extrait de culture d'*Aspergillus niger* Z10, GOKHAN *et al* (2002) et SARANRAJ et STELLA (2016) ont observé deux bandes correspondant aux cellulases ayant des PM d'environ 83 et 50. Ces résultats sont différents de ceux obtenus dans notre travail, c'est la différence de souches qui pourrait influencer cette différence.

Dans le but de caractériser les bandes C et C', un zymogramme a été réalisé mais ce dernier était non exploitable dans le sens où aucune bande n'a pu être mise en évidence. Cela pourrait s'expliquer par une faible activité cellulosique non détectable par cette méthode mais cela ne signifie pas qu'il ya pas d'enzymes.

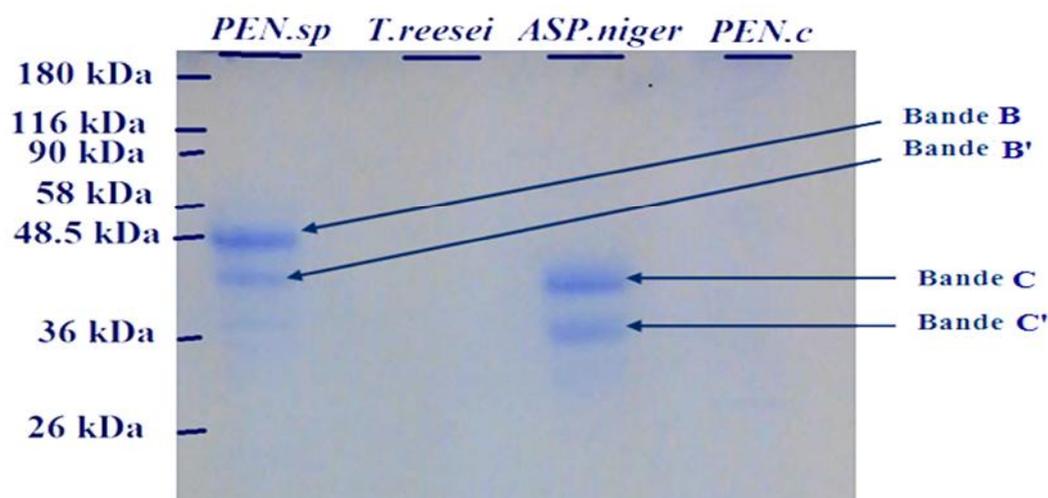


Figure 28 : Profil électrophorétique en SDS-PAGE avec β -ME des protéines du surnageant obtenu après culture sur l'avicel. (Alpha 2 macroglobuline from equine serum : 180 kDa ; β -galactosidase from E.Coli : 116 kDa ; Lactoferrim from humain milk : 90 kDa ; Pyruvate kinase (rabbit muscle) : 58 kDa ; Fumarase (porcine heart) 48.5 kDa ; Lactic déhydrogénase (rabbit muscle) 36.5 kDa ; Triosephosphate isomérase 26 kDa).

3.4.3. Recherche d'activité amylolytique

Le profil électrophorétique de l'extrait obtenu après culture sur l'amidon (Figure 29) a révélé seulement deux bandes (bande D, D') de taille différente au niveau d'*Aspergillus niger* avec des masses moléculaires d'environ 90 KDa et 39,8 KDa respectivement. Selon WANG *et al* (2016), la culture d'*Aspergillus niger* en utilisant l'amidon comme seule source de carbone induit la production d'une alpha amylase de PM ~ 50 et une gamma amylase de PM ~ 70. Cependant, les PM des bandes D et D' sont proches de ceux rapportés par WANG *et al* (2016), on pourrait supposer que la bande D' pourrait correspondre à l' α -amylase et la bande D pourrait correspondre à γ -amylase.

Concernant les extraits de culture des souches *Penicillium sp*, *Penicillium camemberti* et *Trichoderma reesei*, l'électrophorègramme n'a fait apparaître aucune bande. Ce résultat pourrait s'expliquer par une faible concentration en protéines.

Plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer les principales souches productrices d'alpha amylase ainsi que le poids moléculaire de cette dernière. Par exemple, NOUADRI *et al* (2010) ont estimé que le PM d'alpha amylase produite par *Penicillium camemberti* PL21 purifié par le sulfate d'ammonium est de 60,5, alors que HOTOP *et al* (1993) ont travaillé sur la même souche mais le PM était différent (64).

Un zymogramme a été réalisé mais il n'était pas exploitable dans le sens où aucune bande n'a pu être mise en évidence. Cela pourrait s'expliquer par une faible activité amylolytique non détectable par cette méthode mais cela ne signifie pas qu'il y a absence d'enzymes.

Afin d'avoir une meilleure production d'enzymes, on devrait penser à l'optimisation des paramètres tels que la durée de la culture, le pH et la température qui sont importants pour le développement des micro-organismes et pour la détermination des taux de croissance des micro-organismes ainsi que l'utilisation des techniques plus performantes et fiables tels que microfiltrations, HPLC ... etc et aussi concentrer l'échantillon lors de la culture.

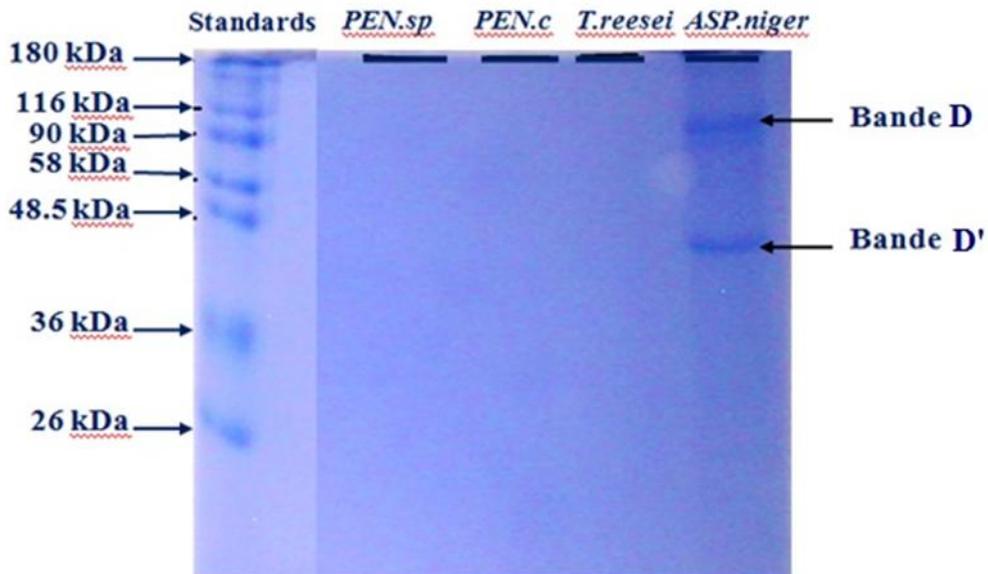


Figure 29 : Profil électrophorétique en SDS-PAGE avec β -ME des protéines du surnageant obtenu après culture sur l'amidon. (Alpha 2 macroglobuline from equine serum : 180 kDa ; β -galactosidase from E.Coli : 116 kDa ; Lactoferrin from human milk : 90 kDa ; Pyruvate kinase (rabbit muscle) : 58 kDa ; Fumarase (porcine heart) 48.5 kDa ; Lactic déhydrogénase (rabbit muscle) 36.5 kDa ; Triosephosphate isomérase 26 kDa).

Conclusion

Le but de la présente étude était la production et la mise en évidence des activités d'enzymes de type cellulases, xylanases et amylases issus de champignons filamenteux, *Trichoderma reesei*, *Penicillium sp*, *Penicillium camemberti*, *Aspergillus niger* sur milieu solide et liquide. Pour cela, les dérivés de cellulose, xylane et l'amidon sont utilisés comme substrats et la détermination de leur PM en réalisant une électrophorèse PAGE-SDS et un zymogramme.

Les résultats obtenus à partir des cultures en milieux solides ont montré que les souches utilisées se développent différemment et la sensibilité du test varie selon le substrat testé mais aussi la méthode employée. En effet, la sécrétion des enzymes est induite, avec de variables performances, par les substrats sur les deux milieux sélectifs à base de dérivés de cellulose, xylane et d'amidon.

La culture en milieu liquide ont aussi montré que les taux de biodégradation des substrats différents d'un genre de champignons à l'autre par exemple, pour *Aspergillus niger* un meilleur taux de biodégradation des dérivés de cellulose, de xylane et d'amidon est enregistré avec une concentration en protéines produites élevée de 1.940 mg/ml, 2.130 mg/ml et 2.130 mg/ml, respectivement. Même chose pour *Penicillium sp* mais avec des concentrations moins élevées en protéines produites qui dégradent le xylane (1,47 mg/ml), l'amidon (1,085 mg/ml) et l'avicel (1,41 mg/ml).

Concernant, *Trichoderma reesei* la meilleure biodégradation a été obtenue dans les milieux à base de xylane et de dérivés de cellulose qui est de 1.94 mg/ml, 1.85 mg/ml respectivement, alors que sur le milieu à base d'amidon un faible développement de 0.871 mg/ml est obtenu. Contrairement à *Penicillium camemberti*, un faible taux de biodégradation des substrats est enregistré

Il est à noter que les meilleures activités sont obtenues avec la souche d'*Aspergillus niger* quelque soit le substrat utilisé, tandis que *Penicillium sp*, *Penicillium camemberti* et *Trichoderma reesei* présentent des activités enzymatiques différentes selon leur préférence pour la source de carbone testée.

Le profil électrophorétique des extraits de culture sur le xylane a révélé plusieurs bandes de forte intensité chez *Aspergillus niger*. L'analyse du zymogramme a montré au niveau de cette souche l'apparition d'une seule bande à activité xylanolytique avec une masse moléculaire d'environ 31,6 kDa.

Le profil électrophorétique des extraits de culture sur l'avicel a donné quatre bandes protéiques, deux d'entre elles correspondent à celle de l'*Aspergillus niger* dont le PM est de 39,8 et 36,5, les deux autres correspondent à *Penicillium sp* dont leur masse moléculaire est d'environ 48.5 kDa et 39.8 kDa.

La caractérisation par PAGE-SDS des surnageants obtenus après culture sur l'amidon a révélé seulement deux bandes de taille différentes au niveau d'*Aspergillus niger* avec des masses moléculaires d'environ 39,8 kDa et 90 kDa, respectivement.

Ces résultats ouvrent d'autres perspectives qui consistent en l'optimisation des milieux de production pour un meilleur rendement et visualisation des activités enzymatiques avec les deux méthodes employées, et la purification des enzymes si elles sont destinées à un usage alimentaire ou pharmaceutique.

Références bibliographiques

- AEHLE W. et MISSET O. (1999).** Enzymes for industrial applications. In: Rehm H.J., Reed G., editors. *Biotechnology*, 2nd ed. Germany: Wiley-VCH., 189-216.
- AFIFI A.F., E. M.KAMEL., A.A. KHALIL., FOUAAD E.M., FAZXI and HOUSERY M. (2008).** Purification and characterization of α -amylase from *Penicillium olsonii* under the effect some Antioxidant Vitamins, *Global journal of Biotechnology and Biochemistry.*,3(1), 14-21.
- AGRAWAL M., PRADEEP S., CHANDRAAJ K. et GUMMADI S.N. (2005).** Hydrolysis of starch by amylase from *Bacillus sp.* KCA102: a statistical approach. *Process Biochemistry.*, 40, 2499 - 2507.
- AIYER P.V. (2005).** Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology.*, 4 (13), 1525-1529.
- AIYER P.V. (2005).** Amylases and their applications. *Afr. J. Biotechnol.*, 4, 1525-1529.
- AKKAYA B., YENIDUNYA A.F., and AKKAYA R. (2012).** Production and immobilization of a novel thermoalkalophilic extracellular amylase from bacilli isolate. *Int. J. Biol. Macromol.*, 50, 991-995.
- ALESHIN A.E., GOLUBEV A., FIRSOV L.M., HONZATKO R.B. (1992).** Crystal structure of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *X100* to 2.2 Å resolution. *J. Biol. Chem* ; 267, 19291-19298.
- ALEXANDRA CILOCI., CEZARA BIVOL., MARIA STRATA N. and VEACESLAV REVA. (2012).** Production and purification of α -amylase from *Aspergillus niger*. *Analele Universității din Oradea - Fascicula Biologie Tom. XIX.*, 1, 74-7.
- ALLAH ANTOINE ASSAMOI., DESTAIN J. and THONART P. (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(2), 281-294.
- BAKRI Y., JACQUES PH. et THONART PH. (2003).** Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (108), 737-748.
- BANS W. and GREENWOOD. (1975).** Starch and its components. Edinberg University Press.
- BEG Q.K., KAPOOR M., MAHAJAN L. and HOONDAL GS. (2001).** Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 56, 326-38.
- BEGUIN P. et AUBERT J.P. (1992).** La dégradation de la cellulose par les microorganismes. *ANN. Inst Pasteur /Actualité.*, 3. 91-115.

- BENSMAIL. L et TOUZI A. (2012).** Valorisation de la biomasse à des fins énergétiques : Contribution de la production de biogaz au développement durable. *Journal of Science Research.*, 3(1), 19-23.
- BHAT M.K. (2000).** Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances.* Elsevier Science Inc., 18, 355–383.
- BISWAS R ; PERSAD A and BISARIA V.S. (2014).** Production of Cellulolytic Enzymes. *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*, First Edition.
- BOUCHERBA N. (2014).** Valorisation des résidus agro-industriels., 2-8.
- BOUX M. AND LEVEAU J. Y. (1999).** Production des enzymes in Scriban R. *Biotechnologies, Ed. Lavoisier.*, 344-400.
- BRADFORD and MARION M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry.*, 72(2), 248-254.
- BRAWN S.H et KELLY .M. (1993).** Characterization of amylolytic enzymes having both (alpha)-1,4 and (alpha)-1,6 hydrolytic activity from the thermophilic *archaea Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis* *Applied and Environmental Microbiology.*, 59(8), 2614-2621.
- BROWN J.A., COLLIN S.A., WOOD T.M. (1987).** *Enz. Microbial Technol.*, 9, 176–80.
- BROWN R., MALCOLM J.R. and SAXENA. (2007).** Cellulose : Molecular and structure *Biology Inder M. Springer.*, XVI, 380.
- BULEON A., COLONNA P., PLANCHOT V. and BALL S. (1998).** Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 23, 85-112.
- BULEON. A., COLONNA. P., PLANCHOT. V et BALL. S (1998).** Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 23, 85-112.
- CANTAREL, B.L., COUTINHO, P.M., RANCUREL, C., BERNARD, T., LOMBARD, V., HENRISSAT, B. (2009).** The Carbohydrate-Active enZymes database (CAZy): an expert resource for glycomics. *Nucleic Acids Res.*, 37, 233- 238.
- CHAHAL P.S., CHAHAL D.S. and ANDRE G. (1992).** Cellulase production profile of *Trichoderma reesei* on different cellulosic substrates at various pH levels,” *Journal of Fermentation and Bioengineering.*, 74(2), 126-128.
- CHARITHA DEVI M. and SUNIL KUMAR M. (2012).** Production, Optimization and Partial purification of Cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 2 (1) ,120-128.

- CHAVEZ R., BULL P. and EY ZAGUIRRE J. (2006).** The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *J. Biotechnol.*, 1(2), 64-66.
- CHIMATA MK., SASIDHAR.P., CHALLA. S (2010).** Production of extracellular amylase from agricultural residues by a newly isolated *Aspergillus* species in solid state fermentation. *Afr. J. Biotechnol.*, 9(32), 5162-5169.
- CHUNDAWAT., SHISHIR P.S., BECKHAM., GREGG T., HIMMEL., MICHAEL E., DALE., BRUCE E. (2011).** Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering.*, 2, 121-145.
- COSGROVE. DJ. (2005).** Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 6, 850-861.
- COUTINHO, P.M., REILLY, P.J. (1997).** Glucoamylase, structural, functional, and evolutionary relationships. *Proteins.*, 29, 334-347.
- COUTINHO. P. M. et HENRISSAT. (1999).** Carbohydrate-Active Enzymes Server.
- DE SOUSA P.M., DE OLIVEIRA P. (2010).** Application of microbial α -amylase in industry. *Braz J Microbiol.*, 41(4), 850-61.
- DE SOUZA P.M and DE OLIVEIRA M. (2010).** Application of microbial α –amylase in industry. *Brazilian Journal of Microbiology* ., 41, 850-861.
- Demain AL., VAISHNAV P. (2009).** Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.*, 27, 297–306.
- DESCHAMPS F. and HUET M.C. (1984).** B-Glucosidase production in agitated solid fermentation, Study of its properties. *Biotechnology Letters.*, 6 (7), 451-456.
- DIDDREN I., DESTAIN J. and THONART P. (2008).** Procédés de bio-conversion en éthanol. In : *Le bioéthanol de seconde génération. La production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique*. Gembloux, Belgique : Les Presses Agronomiques de Gembloux., 21-56.
- DOBREVA V., CHOCHKOV R., DOBREV D., ZHEKOVA B. et HADJIKINOVA M. (2012).** Optimisation des conditions de culture et élaboration d'un schéma technologique de production d'enzyme xylanolitique de *Bacillus subtilis* pour application dans la panification. *Revue de génie industriel.*, 8, 63-75.
- EL-HAWARY FI., MOSTAFA Y.S., LASZALO E. (2003).** Cellulase production and conversion of rice straw to lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. *Acta Aliment Hung.*, 30, 281-295.
- ELLAIAH. P. M., ADINARAYANA. K., BHAVANI. Y., PADMAJA. P. et SRINIVASULU. (2002).** Optimization of process parameters for glucoamylase production

under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species, *Process Biochem.*, (38), 615–620.

ELOUTASSI N., BOUDINE L. et REMMAL A. (2014). Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération. *Revue des Energies Renouvelables.*, 17 (4), 600-609.

ELOUTASSIA N., LOUASTEB B., BOUDINEB L. and REMMALC A. (2013). Hydrolyse physico-chimique et biologique de la biomasse lignocellulosique pour la production de bio-éthanol de deuxième génération. *Revue « Nature & Technologie ». C-Sciences de l'Environnement.*, 10.

FOGARTY W. M. (1983). Microbial amylases. In *Microbial Enzymes and Biotechnology* ed. Fogarty, W.M., 1-92.

FRENCH D. ENAS N., DANIAL M. (1975). Chemistry and biochemistry of starch. MTP International review of science biochemistry of carbohydrates serie 1,5 Butterworth Park Press., 309-321.

FUBAO FUEBIOL SUNA., JIAPENG HONGA., JINGUANG HUB., JACK SADDLERB N., XU FANGC., ZHENYU ZHANGA and SONG SHENA. (2015). Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 79-80, China, Elsevier.

GANESH D. and SARATALE S.E.O. (2012). Lignocellulosics to Ethanol: The Future of the Chemical and Energy Industry, *African Journal of Biotechnology.*, 11(5), 1002-1013.

GAUTAN S.P., BUNDELA P.S., PANDEY A.K., JAMALUDDIN KHAN., AWASTHI M.K. and SARSAIYA S. (2011). Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. SAGE-Hindawi Access to Research. *Biotechnology Research International*.

GEKAS V. and LOPEZ-LEIVA. M. (1985). Hydrolysis of lactose : A littérature review. *Process Biochemistry.*, 20, 2-12.

GEROIS J., GRIANOTTA F., DE BUYL E., GARNIER B. and FRERE J.M. (2000). Purification and properties of three endo b-1-4 xylanases produces by *Streptomyces sp. strain S38*. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 178-186.

GIELKEN MMC., DEKKERS EVISSER J. and GRAAFF LH. (1999). Two cellobiohydrolase encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XInR for their expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 43-45.

GODIN B., AGNESEESSENS S., GOFFLOT S., LAMAUDIÈRE S., SINNAEVE G., GUERIN P.A. et DELCARTE J. (2011). Revue sur les Méthodes d'Analyse des

Polysaccharides Structuraux des Biomasses Lignocellulosiques', Biotechnology, Agronomy, Society and Environment., 15, 165-182.

GUPTA A., GUPTA V.K., MODI D.R. and YADAVA L.P. (2008). Production and characterization of alpha amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol.*, 7(3), 551-556.

GUPTA V.K ; GAUR R; YADAVA S.K. and DARMWAL N.S. (2009). Xylanase production optimization. *BioResources.*, 4(3), 932-945.

GUPTA. R ; GIGRAS. P ; MOHAPATRA. H ; GOSWAMI. V.K. and CHAUHAN. B. (2003). Microbial α - amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.*, 38, 1599-1616.

HARMAN GE and KUBICEK CP. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Enzymes. Biological Control and Commercial Applications, Taylor & Francis, London, UK;2.

HASHEMI M., RAZAVIA S.H., SHOJAOSADATI S.A. and MOUSAVI S.M. (2011). Evaluation of Ca-independent α -amylase production by *Bacillus sp. KR-8104* in submerged and solid state fermentation systems. *Iranian J. Biotech.*, 9, 188-196.

HASHEMI M., SHOJAOSADATI S.A., RAZAVI S.H. and MOUSAVI S.M. (2011). Different catalytic behaviour of α -amylase in response to the nitrogen substance used in the production phase. *J. Ind. Eng. Chem.*, 21, 772-778.

HENRISSAT B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *J. Biochem.*, 280, 309-316.

HOFER F., WEISSINGER E., MISCHAK H., MESSNER R., MEIXNER MONORI B., BLAAS D., VISSER J. and KUBICEK C.P. (1989). A monoclonal antibody against the alkaline extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei* : Reactivity with other *Trichoderma reesei* β -glucosidase. *Biochimica and Biophysica Acta.*, 992, 298-306.

HURST P.L., PATRICK A., SULLIVAN. and SHEPHERD M.G. (1977). Substrate Specificity and Mode of Action of a Cellulase from *Aspergillus niger*. *J.Biochem.*, 169, 389-395.

IMMANUEL G., DHANUSA R., PREMA P. and PALAVASAM A. (2006). Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 3, 25-34.

ISOGAI. A. (2000). Wood and cellulosic chemistry. Revised and expanded, Ed. N. Shiraishi., 2(14), 599 -625.

ITO F., YOSHIHIKO AMANO ; KOUICHI NOZAKI and INDER SEXENA M. (2004). The relation ship between cellulase activity and oligosaccharides and cellulose productions by *Acetobacter xylinum* ATCC23769. *J Biol. Macromol.*, 4(3), 83-90.

- JAHIR ALAM KHAN and SACHIN KUMAR YADAV. (2011).** Production of alpha amylase by *Aspergillus niger* using cheaper substrates employing solid state fermentation. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences.*, 1, 100.
- JANEČEK S (1994).** Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal alpha-amylases. *Eur. J. Biochem.*, 224, 519-524.
- JANEČEK S (2009).** Amylolytic enzymes-focus on the alpha amylase from archaea and plants. *Nova Biotechnologica.*, 9-1.
- JANEČEK S., SVENSSON B. and MACGREGOR E.A (2014).** α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cell Mol. Life Sci.*, 71, 1149-1170.
- JASPARD E. (2012).** Structure chimique de la cellulose.
- JASPREET SINGHA J., KAURB L. and MCCARTHY O.J. (2007).** Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications a review. *Food Hydrocolloids.*, 21, 1–22.
- JAWAID M., HAAFIZ M K., EICHHORN SJ. and AZMAN H. (2013).** Isolement et caractérisation de la cellulose microcristalline à partir de l'huile de palme résidu de biomasse.
- JULIO HECK X., PLINHO HERTZ F. and MARCO AYUB A.Z. (2002).** Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology.*, 33, 213-21.
- KANG M.S., OKUYAMA M., YAOI K., MITSUISHI Y., KIM Y.M., MORI H., KIMURA A. (2008).** Glycoside hydrolase family 31 *Escherichia coli* α -xylosidase. *Biocatal. Biotransform.*, 26, 96-103.
- KANNAN BALAN., PERUMAL P., NARAYANAN S. and THAYUMANAVAN PALVANNAN. (2015).** Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of novel 2-allyl amino 4-methyl sulfanyl butyric acid as α -amylase and α -glucosidase inhibitor. *Journal of Molecular Structure.*, 1081, 62-68.
- KARUNAKARAN S., SARAVANAN A., DHANASEKARAN S., SENBAGAM D. and SENTHIL KUMAR. B. (2014).** Xylanase Production from *Aspergillus niger*. *Int. J. Chem Tech Res.*, 6(9), 4206-4211.
- KASHIF A., EHSAN ELAHI VALEEM., QAMAR-UL-HAQ., IFFAT M and DAHOT M.U. (2014).** Optimal conditions for the production of industrial enzymes by *Aspergillus niger* using agricultural wastes as source of carbon. *FUUAST J. BIOL.*, 4(2), 205-211.

- KEERTHANA G ; KALAIVANI M.K. and SUMATHY A. (2013).** In vitro alpha amylase inhibitory and anti-oxidant activities of ethanolic extract of croton bonplandianum. *Asian J pharm clin Res.*, 6(4), 32-36.
- KHOKHAR I., IRUM M. and MUSHTAQ S. (2011).** Comparative Studies on the Amylase and Cellulase Production of *Aspergillus* and *Penicillium*. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.*, 15 (4), 657 – 661.
- KIRANMAYI M.U., VIJAYALAKSHMI S.P.M. and KRISHNA P.V. (2011).** Studies on influence of natural biowastes on cellulase production by *Aspergillus niger*. *J. Environ. Biol.*, 32, 695-699.
- KOSSMAMN J. and LLOYD J (2000).** Understanding and influencing starch biochemistry. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 35, 141- 196.
- KUHAD RC., GUPTA R., KHASA YP. And SINGH A. (2010).** Bioethanol production from Lantana camara (red sage): pretreatment, saccharification and fermentation. *Bioresource Technology.*, 101(21), 8348–8354.
- KURIKI T. and IMANAKA T. (1999).** The concept of the alpha amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 557-565.
- LAURENT P., ROIZ J. and WARTZ J. (2011).** Le bioraffinage une alternative prometteuse à la pétrochimie, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, Belgique., 597-610.
- LAWFORD HG., ROUSSEAU JD. (2003).** Cellulosic fuel ethanol-alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 105, 457-469.
- LE CORRE D ; BRAS J. and DUFRESNE A. (2010).** Starch nanoparticles a review. *Biomacromol.*, 11, 1139-1153.
- LEE SM., JIN LH., KIM JH., HAN SO., NA HB., HYEON T., KOO YM., KIM J. and LEE JH (2010).** β -Glucosidase coating on polymer nanofibers for improved cellulosic ethanol production. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 33, 141–147.
- LEE Y., IYER P. and TORGET R.X. (1999).** Dilute Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass, In: *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology.*, 65,94-11.
- LEGLIMI H., MERAIHI Z., BOUKHALFA-LEZZAR H., COPINET E. and DUCHIRON F. (2013).** Production and characterization of cellulolytic activities produced by *Trichoderma longibrachiatum* (GHL). *African Journal of Biotechnology.*, 12(5), 465-475.
- LEKCHIRI S., MOUEQQIT M., LEKCHIRI M. et LEKCHIRI A. (2013).** Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium Oxysporum F.sp Albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 7(1), 88-9.

- LIU Y., LU F., CHEN G. and SNYDER C.L. (2010).** High-level expression, purification and characterization of a recombinant medium-temperature α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Lett.*, 32, 119-124.
- MACGREGOR E.A., JANECEK S. and SVENSSO B. (2001).** Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1546, 1-20.
- MAKOI J.H.J.R. and NDAKIDEMI P. A. (2008).** Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology.*, 7(3), 181–191.
- MANDELS M. and REESE.** (1985). Fungal cellulase and microbial decomposition of cellulosic fibres. *Ind. J. Microbiol.*, 5, 5-20.
- MANDELS M. and WEBER J. (1969).** The production of cellulases. In *Cellulases and Their Applications, Advances in Chemistry Series 95*, pp, 391-413. American Chemical Society, Washington.
- MANUMANU. (2010).** Grains d'amidon de pomme de terre colorés au lugol observés au microscope optique.
- MARGEOT A., HAHN-HAGERDAL B., EDLUND M., SLADE R., MONOT F. (2009).** New improvements for lignocellulosic ethanol. *Curr Opin Biotechnol*; 20, 372.
- MENENDEZ E., GARCIA-FRAILE P. and RIVAS R. (2015).** Biotechnological applications of bacterial cellulases. *IMS Bioengineering.*, 2 (3), 163-182.
- MIKAMI B., HEHRE E.J., SATO M., KATSUBE Y., HIROSE M., MORITA Y. and SACCHETTINI J.C. (1993).** The 2 Å resolution structure of soyabean β -amylase complexed with α -cyclodextrin. *Biochemistry.*, 32, 6836-6845.
- MOBINI-DEHKORDI M. AFZALJAVAN F. and SAFFAR B. (2011).** Cloning of bacterial alpha amylase gene to *saccharomyces cerevisiae* for environmental applications. Third national conference of Biosafety and genetic engineering., 68.
- MOBINI-DEHKORDI M. and JAVAN F.A. (2013).** Application of alpha-amylase in biotechnology. *Journal of Biology and today's world.*, 1, 39-50.
- MOBINI-DEHKORDI M. NAHVI I., ZARKESH H., GHAEDI K. and AKKADA R. (2011).** Overexpression of FLO1 gene in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* by self-cloning method for increment of bioethanol production. Under Review.
- MOURANCHE A. and COSTES C. (1985).** Les Hémicellulases Hydrolases et dépolymérase, enzymes d'intérêt industriel. *Eds. Gauthier-Villars, Paris* ; 165-197.
- MOYA RAMIREZ I., TSAOUSI K., RUDDEN M., MARCHANT R., JURADO ALAMEDA E., GARCIA ROMAN M. and BANAT I.M. (2015).** Rhamnolipid and

surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresour. Technol.*, 198, 231-236.

MUBARAK N.M., WONG J.R., TAN K.W., SAHU J.N., ABDULLAH E.C ; JAYAKUMAR N.S. and GANESAN P. (2014). Immobilization of cellulase enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic.*, 107, 124–131, Elsevier.

MURALIKRISHNA G., NIRMALA M (2005). Cereal -amylases – an overview. *Carbohydrate Polymers.*, 60, 163-173.

NADIRMAN H. and YOSHIYUKI O. (2006). Mechanism of Hydrolysis of the Treated Starch Granules by Raw Starch Digesting Amylase from *Penicillium brunneum*, *Journal Starch Starke.*, 7, 25- 28.

NAIR S., SINDHU R and SHASHIDHAR S. (2008).Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. *African Journal of Microbiology Reseach.*, 2, 082-086.

NAKAI H., OKUYAMA M., KIM Y.M., SABURI W., WONGCHAWALIT J., MORI H., CHIBA S., KIMURA A. (2005). Molecular analysis of α -glucosidase belonging to GH-family 31. *Biologia.*, 60(16), 131-135.

NIELSON J-E., BORCHERT T-V et VRIED G. (2001). The determinant of -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering.* Oxford University Press., 14(7), 505-512.

NILSSON T. (1974). The dégradation of cellulose and the production of cellulase, xylanase, mannanase and amylase by wood - attacking microfungi. *Studia Forestalia Suecica*, Nr 114.

OKONKWOA I.F ; ODIBOB F.J.C. and OBELEC C.M. (2014). Time course for cellulase enzyme production by *Aspergillus Flavus* using different organic nitrogen sources. *Scientific Journal of Biological Sciences.*, 3(2), 24-28.

OMOJASOLA P.F.and JILANI O.P. (2008). Cellulase production by *Trichoderma longi*, *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* cultured on waste materials from orange. *Pakistan Journal of Biological Sciences.*, (11)20, 2382–2388.

PICART P ; DIAZA P. and PASTOR F.I.J. (2007). Cellulases from two *Penicillium* sp. Strains isolated from subtropical forest soil : production and characterisation. *Letters in Applied Microbiology.*, 45(1), 108-113.

PRADEEP R. and NARASIMHA G. (2011).Utilization of pea seed husk as a substrate for cellulase production by mutant *Aspergillus niger*. *Insight Biotechnology.*, 1(2), 17-22.

ROUSSOS S. et HANNIBAL L. (1984). Valorisation biotechnologique de la bagasse par la

production d'enzymes de champignons filamenteux cellulolytiques. *Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Appliquée.*, 81-97.

PUJADAS G., RAMIREZ F.M., VALERO R., PALAU J. (1996). Evolution of β -amylase: patterns of variation and conservation in subfamily sequences in relation to parsimony mechanisms. *Proteins.*, 25, 456-472.

RAGAUSKAS A.J., WILLIAMS C.K., DA VIRSON B.H., BRITOVSEK G., CAIMEY J. and ECKERT C.A., FREDERICK W.J., HALLET J.P., LEAK D.J., LIOTTA C.L., MIELENZ, J.R., MURPHY R., TREMPER., RET TSCHAPLINSKI T. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science.*, 311, 484-489.

RAGHUWANSHI S., DESWAL D., KARP M. (2014). Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. *Fuel* ; 124, 183–189.

RAHARDJO Y., WEBER F.J., HAEMES S., TRAMPER J., RINZEMA A. (2005). Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α -amylase production in a model solid-state fermentation system. *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 900–902.

RAJEEV SUKUMARAN K ; REETA R. and PANDEY A. (2005). Microbial cellulases – Production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research.*, 64, 832-844.

RAMESH CHANDER KUHAD ; RISHI GUPTA and AJAY SINGH. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research.*

ROUSSOS S. (1982). Mise au point d'une méthode pour l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et nutritionnels des champignons imparfaits. *Cah. O.H.S.T.O.M., sér, Biol.*, 45, 25-3.

SAIDI A. (2011). La biomasse lignocellulosique et la bioénergie. *Division Bio-énergie & Environnement.*, 21.

SANJAY KAR., ASISH MANDAL., PRADEEP DAS MOHAPATRA K., KESHAB MONDAL C., BIKASH PATI R. (2006). Production of cellulase- free xylanase by *Trichoderma Reesei* SAF3. *Brazilian Journal of Microbiology.*, (37), 462-464.

SARANRAJ J.P. et STELLA D. (2016). Optimization for cellulase production by *Aspergillus Niger* : Fungal cellulase optimization by *Aspergillus Niger*.

SASIDHARAN SREEDEVI ; SREEDHARAN SAJITH and SAILAS B (2013). Cellulase Producing Bacteria from the Wood-Yards on Kallai River Bank. *Advances in Microbiology.*, 3, 326-332.

- SCHEIDIG A., FROHLICH A., SCHULZ S., LLOYD J.R. and KOSSMAMN J. (2002).** Down regulation of a chloroplast-targeted betaamylase leads to starch-excess phenotype in leaves. *Plant J.*, 30, 581-591.
- SCRIBAN S. (1993).** Biotechnologie 4eme edition .Techniques et Documentation Lavoisier. Paris; 225- 250.
- SEHN C., MELEIRO L.P., FLAVIO H.M.S., DOUGLAS C.M., GUIMARAES L.H.S., JOAO A.J. and FURRIEL R.P.M. (2013).** Optimisation of β -Glucosidase, β -Xylosidase and xylanase Production by collectotrichum graminicola under Solid State Fermentation and Application in Raw Sugarcane Trash Saccharification., 14(2), 2875- 2902.
- SETHI S., APARNA DATTA., LAL GUPTA B. and GUPTA. S (2013).** Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. Hindawi publishing corporation, ISRN Biotechnologie.
- SHAMALA T.R. and SREEKANTIAH K.R. (1985).** Production of cellulases and o-xylanase by some selected fungal isolates. Department of Microbiology and Sanitation, Central Food Technological Research Institute, Mysore- 570 013, India.
- SHAMALA T.R. and SREEKANTIAH K.R. (1986)** Enzyme Microbial Technology., 8, 178-182.
- SHARMA A. and T. SATYANARAYANA. (2013).** Microbial acid-stable-amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry.*, 48, 201–21.
- SHIRAISHI. N. (2000).** Chemical modification of cellulose. Chap. 14
- SHRUTI PURI., ARORA M. and LOVELEEN SARAO. (2013).** Production and optimization of amylase and glucoamylase using *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology.*, 3(3), 83-88.
- SINGHANIA R R., PATEL A.K., SOCCOL C.R. and PANDEY A. (2009).** Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 44, 13–18.
- SODHI H.K., SHARMA K., GUPTA J.K. and SONI S.K. (2005).** Production of a thermostable -amylase from *Bacillus sp. PS-7* by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochem.*, 40, 525–534.
- SOMA MRUDULA and RANGASAMY MURUGAMMAL. (2011).** Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology.*, 42, 1119-1127.
- SOMERVILLE. C. (2006).** Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 22, 5378.

- SORENSEN J.F., KRAGH K.M., SIBBESEN O., DELCOUR J .and GOESAERT H. (2004).** Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications. *Biochim Biophys Acta.*, 1696, 275-287.
- SRINIVASAN M.C., MEENAKSHI V.R. (2008).** Microbiol xylanase for paper industry. *Biochemecal sciences division.* India. 12-13
- SUGAHARA M., TAKEHIRA M. and YUTANI K. (2013).** Effect of heavy atoms on the thermal stability of α -amylase from *Aspergillus oryzae*. PLoS ONE., 8,57432.
- SUMITANI J., NAGAE H., KAWAGUCHI T., ARAI M. (1998).** *Bacillus* animal type α -amylase: Cloning and sequencing of the gene, and comparison of the deduced amino acid sequence with that of other amylases. *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 428-432.
- SUN Y. and CHENG J. (2002).** Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.*, 83, 1–11.
- SVESSEON B (1994).** Protein engineering in the α -amylase family; catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol. Biol.*, 25, 141–157.
- TAGUCHI F., YAMADA K, HASEGAWA K., TAKISAITO T. and HARA K. (1996).** Continuous hydrogen production by *Clostridium sp. Strain n°2* from cellulose hydrolysate in an aqueous two phase system. *J. Ferm. Bioeng.*, 82,80-83.
- TANVEER BILALA., BISMA M., REIAZ UL REHMAN. and KUMAR M. (2015).** Influence of Various Parameters on Cellulase and Xylanase Production by Different Strains of *Trichoderma Species*. *Austin J Anal Pharm Chem.*, 2(1), 1034.
- TATENO T., FUKUDA H., KONDO A. (2007).** Production of L-Lysine from starch by *Corynebacterium glutamicum* displaying α -amylase on its cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74, 1213-1220.
- TEERI T. (1997).** Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *TIBTEC.*, 15, 160–167.
- TENKANEN M., PULS J., POUTANEM K. (1992).** Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial technology.*, 14(7), 566-574.
- UITDEHAAG J.C.M., MOSI R., KALK K.H., VAN DER VEEN B.A., DIJKHUIZEN L., WITHERS S.G., DIJKSTRA B.W. (1999).** X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α - amylase family. *Nat. Struct. Biol.*, 6, 432-436.
- VAIDYA S., SRIVASTAVA P.K., RATHORE. and A.K PANDEY. (2015).** Amylase : a prospective enzyme in the field of. *J. Appl. Biosci.*, 41(1), 1-18.

Références bibliographiques

VEHOVEC T., GARTNER A., PLANINSEK O. and OBREZA A. (2012). Influence of different types of commercially available microcrystalline cellulose on degradation of perindopril erbumine and enalapril maleate in binary mixtures. *Acta Pharm.*, 62(4), 515-28.

WALDEMAR O.S. and KING K.W. (1960). The Complexity and Mode of Action of the Cellulase System of *Cellvibrio gilvus*. *The Journal of Biological Chemistry.*, 235, 303-307.

WANG S., LIN C ; LIU Y ; SHEN Z ; JAYASSELAN J. and QIN W. (2016). Characterization of a starch-hydrolyzing α -amylase produced by *Aspergillus niger* WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment. *Int J Biochem Mol Biol.*, 7(1), 1-10.

WEI H., XU Q., TAYLOR L.E., BAKER J.O., TUCKER M.P. and DING S.Y. (2009). Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 20, 330–338.

WERTZ J-L. (2010). Le bioraffinage ou valorisation optimale de la biomasse *Document " Farr-Wal.*

WERTZ J-L., BEDUE O. and MERCIER J.P. (2010). *Cellulose science and technology.* Boca Raton, FL, USA: CRC Press., Lausanne, Switzerland: EPFL Press.

WOOD T.M., SHEILA I.MCCRAE. and BHAT K. (1989). Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose. The mechanism of fungal cellulase action. *J. Biochem.*, 260, 37-43.

ZHANG X-Z. and ZHANG Y.H.P. (2013). Cellulase : characteristics, sources, production, and applications. *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers, First Edition.*, 131-146.

ZHANG Y.H.P. (2008). Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefinerie. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35(5), 367-375.

KANG S.W., PARK Y.S., LEE J.S., HONG S.I. and KIM S.W. (2004). Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, 153-156.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1965). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.*, 193, 265-275.

PETTERSON G., FARGER S.L., BHIKHABHAI R. and LEANDOER K. (1981). In the Ekman-Days. *International Symposium on wood and pulping Chemistry, SCPI, Stockholm.*, 111, 39.

PIERRE B. and JEAN-PAUL A. (1992). Cellulases. Encyclopedia of microbiology. Rockefeller University New York. *Academic press inc.*

- KUBICEK C.P. and PENTTILA M.E. (1998).** Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In G. E. Harman and C. P. Kubicek., 49-72.
- SHOEMAKER S., SCHWEICKART V., LADNER M., GELFAND D., KWORK S., MYAMLO K. and INNIS M. (1983).** Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/Technology.*, 1, 691-695.
- CHEN C.M., GRITZALI M. and SALOHEIMO M. (1987).** Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology.*, 5, 274-278.
- PENTILLA M.E., ANDRE E.L., SALOHEIMO M., LEHTOVAARA P. and KNOWLES J.K. (1987).** Expression of two *Trichoderma reesei* endo-glucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.*, 3, 175-185.
- BARNETT C.C., BERKA R.M. and FOWLER T.** Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular beta-glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Bio/Technology.*, 9, 562-567.
- TAKASHIMA S., NAKAMURA A., HIDAKA M., MASAKI H. and UOZUMI T. (1999).** Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Hemicella grisea* and *Trichoderma reesei*. *J. Biochem.*, 125, 728-736.
- NOGAWA M., GOTO M., OKADA H. and MORIKAWA Y. (2001).** L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.*, 38, 329-334.
- ROUSSOS S. et RAIMBOLT M. (1982).** Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. Production de la cellulase de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu liquide. *Ann. Microbiol.*, 133B, 465-474.
- ABO-STATE M.A., HAMMAD A.I., SWELIM M. and GANNAM R.M. (2010).** Enhanced Production of Cellulase(S) By *Aspergillus spp.* Isolated From Agriculture Wastes by Solid State Fermentation. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 8 (4), 402-410.
- KARUNAKARAN S., SARAVANAN A., DHANASEKARAN S., SENBAGAM D. and SENTHIL KUMAR B. (2014).** Xylanase Production from *Aspergillus niger*. 6(9), 4207-4211.
- BARNOUD. (1980).** La cellulose.
- VIDAUD C. (1984).** Contribution à l'étude de l'introduction du système cellulosique de *Trichoderma sp* par utilisation d'analogie de substrat thiosaccharidique. Thèse de 3eme Cycle. Université de Grenoble.

- RAHARDJO Y.S.P., WEBER F.J., COMTE E.P., TRAMPER J. and RINZEMA A. (2002).** Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentationsystem. *Biotechnology and Bioengineering*, 78, 539-544.
- MALARVIZHI K., MURUGESAN K. and KALAICHELVAN P.T. (2003).** Xylanase production by *Ganoderma lucidum* on liquid and solid state fermentation. *Ind. J. Exp. Biol.*, 41, 620-626.
- HECK J.K., HERTZ P.F. and MAZ A. (2005).** Extraction optimization of xylanases obtained by solid-state cultivation of *Bacillus circulans* BL53. *Process Biochem.*, 40, 2891–2895.
- GAWANDA P.V. and KAMAT M.Y. (1999).** Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *J. Appl. Microbiol.*, 87, 511-519.
- HALTRICH D., NIDETZKY B., KULBE K.D., STEINER W. and ZUPANCIC S. (1996).** Production of fungal xylanases. *Biores. Technol.*, 58,137-161.
- FADEL M. (2000).** Production physiology of cellulases and glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. *Microb.chem.*, 1(5), 401-411.
- NIGHAT A., FARAOQ L., SIBTAIN H. and AMER J. (2004).** Molecular cloning of glucosidase gene from *Trichoderma harzanium*. *Biotechnol.*, 3(1), 63-66.
- SHONA M.D., ROBERTA L., FARRELL., THWAITES J.M., BENJAMIN W., HELD., BRETT E., ARENZ., JOEL A., JURGENS. And BLANCHETTE R.A. (2006).** Endoglucanase producing fungi isolated from Cape Evans historic expedition hut on Ross Island, Antarctica. *Environmental Microbiology.*, 8(7), 1212-1219.
- SANJAY K., MANDAL A., PRADEEP K., MOHAPATRA D., KESHAB C., MONDAL. And BIKASH R. (2006).** Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. *Brazilian Journal of Microbiology.*, 37, 462-464
- SEYIS I. and AKSOZ N. (2005).** Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *Brazilian Archives Biol. Technol.*, 48, 187-193.
- FANG C.H., CLAIR B., GRIL J. and ALMERAS T. (2007).** Transverse shrinkage in G-fibers as a function of cell wall layering and growth strain. *Wood Sci.Technol.*, 41, 659-671.
- ESPINE L., ESPERANZ A., and LOPEZ ELIZABET H. (2009).** Purification and Characterization of α -amylase from *Penicillium commune* produced by Solid State Fermentation. *Rev. Colomb. Quim.*,38, 191-208.

BAKRI Y. (2003). *Optimisation de la production de xylanases par Penicillium canescens 10-10c.* Thèse de doctorat : Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique).

BALDWIN P., VAN E.C., ISTASSE L. et BIENFAIT J.M. (1983). Fermentation en silos de laboratoire de pulpes de bettraves sucrières. *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology.*, 98, 792-797.

DIOMI M., ELISAVET K. and PAUL C. (2008). Fungal multienzyme production on industrial byproducts of the citrus-processing industry. *Biotechnology Laboratory Technology.*, 99, 2373-2383.

MAHMOUD A.U., GREENMAN. and SCRAGG A.I.I. (1998). Orange and potato peel extracts. Analysis and use as *Bacillus* substrat for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme and Microbial Technology.*, 22(2), 130-37.

HART H.E., PARISH M.E., BURNS J.K. and WICKER L. (1991). Orange finisher-pulpe as substrat polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. *J. of food sciences.*, 55, 480-83

PASCAL B. and THOMAS JEFFRIES W. (1990). Selective Production of Extracellular Peroxidases from *chryso sporium* in an Airlift Bioreactor. *Journal of fermentation and Bioengineering.*, 70(3) 158-163.

HUTCHEON G.M., VASISHT N. and BOLHUIS A. (2005). Characterisation of a highly stable alphaamylase from the halophilic archaeon Haloarcula hispanica. *Extremophiles.*, 9, 487-495.

DJEKRIF-DAKHOUCHE S., GHERIBI-AOULMI Z., MERAIHI Z. and BENNAMOUN L. (2006). Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J Food Process Eng.*, 7, 190–197.

BARTON L. L., GEORGI C. E. and LINEBACK D.R. (1972). Effect of maltose on glucoamylase formation by *A. niger*. *J. Bo~t.*, 111, 771-777.

GANDHI A.P., BARAT G.K. and DAS N.B. (1974). Studies on the production of fungal amylases. *Mycopath. Mycol.*, 52, 307-311.

L'analyse des xylanases fonctionnels dans la dégradation du xylane par *Aspergillus Niger* E-1 et la caractérisation de la famille GH 10 XynVII xylanase. *Springerplus.*, 2, 447.

DOBREV G. and ZHEKOVA R. (2012). Purification and characterization of endoxylanase XIn-2 from *Apergillus niger* B03. *Turkey biology journal.*, 36, 7-13.

Références bibliographiques

SANGHVI G.V., KOYANI R.D. and RAJPUT K.S. (2007). Production thermostable and partial purification by a solid state fermentation using wheat straw from agricultural waste. *Mycology.*, 1(2), 106-112.

PICART P., DIAZ P. And PASTOR F.I.J. (2007). Cellulases from two *Penicillium sp.* strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. *Letters in Applied Microbiology.*, 45(1), 108-113.

NOUADRI T., MERAIHI Z., DAKHMOUCHE S. and BENNAAMOUN L. (2010). Purification and characterization of the α -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. *African journal of Biochemistry Research.*, 4 (6), 155-162.

HOTOP S., MOLLER J., NIEHOF J. and SCHURGEL K. (1993). Influence of the preculture conditions on the pellet size distribution of *Penicillium chrysogenum* cultivations. *Process Biochemistry.*, 28, 99-104.

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de culture et des solutions utilisées

- Pour la production des enzymes :

Le milieu de culture PDA :

- 100g de pomme de terre cuite dans 100ml d'eau distillée pendant 15min, puis, on l'essor dans une compresse et on obtient un filtrat.
- Au filtrat obtenu on ajoute dans une fiole jaugée 10g de glucose et 10g d'agar, ensuite, on complète avec de l'eau distillée à 500ml, puis, on homogénéise et enfin on l'autoclave.

Le milieu de culture OGA :

- 40g OGA ;
- 1000 ml d'eau distillée.

Le milieu Mandel et Weber (MW) pour 1000ml d'eau distillée :

- 0,3g d'urée ; 1,4g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2g de KH_2PO_4 ; 0,4g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,75g de peptone ; 2ml de Tween 80 ; 5mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,6mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,25g d'extrait de levure .

- **Le milieu MW liquide + (Dérivés de celluloses, xylane, amidon) :**

- Pour un volume de 250 ml on lui additionne 0,5g de l'un des sucres.

- **Le milieu MW solide + (Dérivés de celluloses, xylane, amidon) :**

- Composition du milieu de MW (1000ml) + 18 g d'agar, on le divise dans 4 flacons de 250 ml, ensuite, on leur additionne chacun 2,5g de l'un des sucres, puis, on l'homogénéise, enfin on l'autoclave. Au moment de l'utilisation on lui additionne environs 2 ml du rouge Congo 1% pour mettre en évidence l'activité cellulolytique des champignons.

L'eau physiologique stérile (pH=5) :

- 9g de Chlorure de Sodium (NaCl) ;
- 1000 ml d'eau distillée.

Solution de NaOH (4N) :

- 16g de NaOH ;
- 100ml d'eau distillée.

**Annexe II : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY et al
(1951)**

1- Solutions :

Solution alcaline A :

- Na₂CO₃ anhydre 2% dans NaOH, 0,1M.

Solution Cuivrique B :

- 2ml de CuSO₄5H₂O, 0,5% + 2ml de tartrate de Na et K, 1%

Solution C :

- Solution A50 ml
- Solution B.....1 ml

Solution mère de BSA :

- BSA.....10 mg
- Eau distillé.....100 ml

Gamme étalon :

A partir de la solution mère BSA, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

N° du tube	1	2	4	4	5	6	7	8	9	10
[BSA µg/ml]	0	30	50	80	100	130	150	180	200	230
Volume de BSA prélevé (µl)	0	300	500	800	1000	1300	1500	1800	2000	2300
Eau distillée (µl)	2300	2000	1800	1500	1300	1000	800	500	300	0
Solution C (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
10 minutes à T° ambiante										
Folin – Ciocalteu (µl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
30 minutes à l'obscurité										
DO (750 nm)	0	0,049	0,077	0,118	0,145	0,179	0,20	0,23	0,265	0,32

2- Méthode :

- 1ml de la solution à doser ;
- Ajouter 5 ml de la solution C et mélanger ; laisser 10 min a température ambiante ;
- Ajouter 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu ;
- Homogénéiser rapidement et mettre les tubes 30min à l'obscurité ;
- Lire la DO à 750nm.

3- Expression des résultats :

Une courbe étalon est tracée en portant sur l'axe des abscisses, les concentrations en BSA des dilutions (gamme étalon) préalablement préparées et sur l'axe des ordonnées, les DO mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration en protéine inconnue X, est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses.

**Annexe III : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de Bradford
(1976)**

1- Solutions :

Solution mère de BSA :

- BSA.....10 mg
- Eau distillé.....100 ml

Préparation du réactif de Bradford :

À partir d'une solution de réactif de Bradford pure, on réalise une dilution au 1/10, puis conservé dans un flacon teinté à 4°C.

Gamme étalon :

A partir de la solution mère BSA, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

N° du tube	1	2	3	4	5	6
[BSA mg/ml]	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
Volume de BSA prélevé (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Reactifs dilué 1/10 (ml)	1	1	1	1	1	1
5 à 15 minutes à l'obscurité						
DO à 595 nm	0	0,050	0,118	0,195	0,267	0,339

2- Méthode :

Pour un volume de 100 µl d'échantillon, on ajoute 1 ml de réactif de Bradford.

3- Expression des résultats :

Le sérum albumine bovine a été utilisé comme protéine de référence. La densité optique obtenue a été ensuite convertie en mg de protéine grâce à une droite d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions.

Annexe IV : Détermination de l'activité enzymatique

1- Solutions :

Solution tampon citrate de sodium (50 mM) à un pH 4.8 :

- Solution A : 21,01g d'acide citrique dans 1L d'eau distillée.
- Solution B : 29,41g de citrate de sodium (C₆H₅O₇Na₃, 2H₂O) dans 1L d'eau distillée.

23ml solution A + 27ml solution

Solution mère maltose :

- Maltose.....100mg
- tampon citrate de sodium.....10 ml

Solution mère xylose :

- Xylose.....100mg
- tampon citrate de sodium10 ml

Solution mère glucose :

- Glucose.....100mg
- tampon citrate de sodium10 ml

Gamme étalon :

Tube	blanc	1	2	3	4	5
[Solution mère (10mg/ml)]	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Volume à prélever de la Solution mère (µl)	0	20	40	60	80	100
Tompon citrate de sodium (µl)	2000	1980	1960	1940	1920	1900
Incuber pendant 30 min à 50 °C						
DNS (ml)	3	3	3	3	3	3

5 min au bain marie à 100 °C						
Prélever de chaque tube 0.5 ml du mélange						
Eau distillée (ml)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
D.O (Maltose) à 540 nm	0	0,083	0,161	0,280	0,398	0,500
D.O (Xylose) à 540 nm	0	0,027	0,050	0,090	0,115	0,141
D.O (Glucose) à 540 nm	0	0,018	0,040	0,060	0,085	0,109

2- Méthode :

Substrats	Amidon (2% dans le tampon citrate)				Xylane (2% dans le tampon citrate)				Avicel (2% dans le tampon citrate)			
	Pen	PenC	TR	Asp	Pen	PenC	TR	Asp	Pen	PenC	TR	Asp
Souches												
Volume à prélever du substrat (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tampon citrate (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Volume à prélever du surnageant (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Incuber pendant 30 min à 50 °C												
DNS (ml)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5 min au bain marie à 100 °C												
Prélever de chaque tube 0.5 ml du mélange												
Eau distillée (ml)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
D.O à 540 nm	0,482	0,445	0,455	0,850	0,493	0,070	0,455	0,555	0,378	0,177	0,354	0,308

Annexe V : Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

1- Solutions :

Solution d'acrylamide (A) :

- Acrylamide.....37,5 g
- Bis-acrylamide.....1 g
- Eau distillée (qsp).....100 ml

Tampon du gel de séparation (S) :

- Tris.....18,15 g
- Eau distillée.....100 ml

Ajuster à pH 8,8 avec de l'HCl 4 N (6N)

Tampon du gel de concentration (C) :

- Tris.....6 g
- Eau distillée (qsp).....100ml

Ajuster à pH 6,8 avec de l'HCl 4 N (6N)

Tampon d'électrode (pH=8,4) :

- Tris1,2 g
- Glycine.....5,76 g
- SDS.....0,2 g
- Eau distillée (qsp).....200 ml

Tampon d'échantillon :

- Solution (C).....500 µl
- Eau distillée.....250 µl
- SDS 10 %250 µl
- 2-mercaptoéthanol50 µl

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon

Chauffage à 95°C pendant 4 à 5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide

Ajouter 200 µl d'une solution de glycérol 50 % (v/v) et quelques grains de bleu de bromophénol

• **Coloration au bleu de coomassie R 250 :**

Solution de fixation :

- TCA.....12g
- Eau distillée (qsp).....100 ml

Solution de coloration :

- Bleu de Coomassie R 250.....0,5 g

- TCA.....4 g
- Méthanol.....100 ml
- Eau distillée.....100 ml

Solution de décoloration :

- Acide acétique.....37,5 ml
- Eau distillée.....312,5 ml
- Méthanol.....150 ml

Solution de persulfate d'ammonium :

- Persulfate d'ammonium.....0,1 g
- Eau distillée (qsp).....1 ml

Coloration au nitrate d'argent :

Solution de fixation : (pendant 1 nuit)

- Ethanol 30%150 ml
- Acide acétique 10 %.....50 ml
- Eau distillée (qsp).....500 ml

Solution de sensibilisation : (pendant 1 min)

- Thiosulfate de sodium0,02 %

Solution de coloration (Bain d'argent) : (pendant 30 min)

- Nitrate d'argent.....0,1 %

Emballez la solution avec du papier aluminium et couvrez aussi le bac pendant le bain.

Solution de développement :

- Carbonate de sodium (Na_2CO_3).....12 g
- Thiosulfate de sodium 2%.....40 μl
- Formaldéhyde.....20 μl
- Eau distillée (qsp)1000 ml

Solution arrêt de développement :

- Acide acétique1%

Conduite de l'électrophorèse :

- Préparation du gel de séparation : T=15 %

Solution (A)2,85 ml

Solution (S)	1,87 ml
Eau distillée.....	2,65 ml
SDS 10%	75 µl
Persulfate d'ammonium 10%	80 µl
TEMED.....	11µl

Couler à environ 1,5 cm du sommet de la plaque de moindre hauteur

• **Préparation du gel de concentration : T= 4%**

- Solution (A).....500 µl
- Solution (C)1,25 ml
- Eau distillée3,2 ml
- SDS 10%.....50 µl
- Persulfate d'ammonium 10%.....80 µl
- TEMED.....11 µl

Couler immédiatement sur le gel de séparation polymérisé et mettre le peigne

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl

Mise sous tension : 20 mA, 200 V

Annexes VI : Zymogramme des enzymes xylanolytiques

1- Solution

Solution tampon phosphate sodium (0,06 M) à un pH 6,9 :

- Solution A : 9,073g KH_2PO_4 dans 1L d'eau distillée.
- Solution B : 11,87g $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ dans 1L d'eau distillée.

8 ml solution A + 92 ml solution B

2- Mode opératoire

L'extrait enzymatique brut (dialysat) a été analysé par électrophorèse.

Après l'électrophorèse :

- Immersion dans une solution de Triton X-100 à 2,5 % (m/v) pendant 30 min ;
- Le gel est débarrassé du Triton X-100 par rinçage à l'eau distillée puis une incubation dans du tampon phosphate 50 Mm pH 6,9 pendant 20 min à 50 °C ;
- Coloration au rouge de Congo 0,1 % pendant 15 min ;
- Lavage avec une solution NaCl à 1M ;
- Immersion dans de l'acide acétique à 0,5 % (m/v) pour stopper la réaction et augmenter le contraste.

Annexes VII : Zymogramme des enzymes cellulolytiques

1- Solution

Solution tampon phosphate sodium (0,06 M) à un pH 6,8 :

- Solution A : 9,073g KH_2PO_4 dans 1L d'eau distillée.
- Solution B : 11,87g Na_2HPO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$ dans 1L d'eau distillée.
53,4 ml solution A + 46,6 ml solution B

2- Mode opératoire

L'extrait enzymatique brut (dialysat) a été analysé par électrophorèse.

Après l'électrophorèse :

- Immersion dans une solution de Triton X-100 à 2,5 % (m/v) pendant 30 min ;
- Le gel est débarrassé du Triton X-100 par rinçage à l'eau distillée puis une incubation dans du tampon phosphate 50 Mm pH 6,8 pendant 20 min à 50 °C ;
- Coloration au rouge de Congo 0,1 % pendant 15 min ;
- Lavage avec une solution NaCl à 1M ;
- Immersion dans de l'acide acétique à 0,5 % (m/v) pour stopper la réaction et augmenter le contraste.

Annexes VII : Zymogramme des enzymes amylolytiques

1- Solution

Solution tampon phosphate sodium (0,06 M) à un pH 7 :

- Solution A : 9,073g KH_2PO_4 dans 1L d'eau distillée.
- Solution B : 11,87g Na_2HPO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$ dans 1L d'eau distillée.
41,3 ml solution A + 58,7 ml solution B

2- Mode opératoire

L'extrait enzymatique brut (dialysat) a été analysé par électrophorèse.

Après l'électrophorèse :

- Le gel est rincé à l'eau distillée puis une incubation dans du tampon phosphate 50 Mm pH 7 pendant 20 min à 50 °C ;
- Coloration au lugol 0,1 % pendant 15 min ;
- Lavage avec une solution NaCl à 1M ;
- Immersion dans de l'acide acétique à 0,5 % (m/v) pour stopper la réaction et augmenter le contraste.