

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2024

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

### EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV      Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

*HADJ KOUIDER Assia & MOGHRANI Lamia*

### *Thème*

**Optimisation de la production des enzymes hydrolytiques  
par une souche fongique locale *Penicillium* sp.**

Soutenu le: 25/06/2024

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>Mme. BACHOUCHE-MESRANE Nassima</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme. BENSMAIL Souhila</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme. BENSMAIL Samira</i>	<i>Doctorante</i>	<i>Univ. de Boumerdes</i>	<i>Co-promotrice</i>
<i>Mme. DJOUAHRA-FAHEM Djamila</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2023/2024

# Remerciements

*En premier lieu, nous tenons à remercier **Allah**, le clément et le miséricordieux, de nous avoir éclairé le chemin qui mène à la réussite et d'avoir facilité toutes les tâches avant d'arriver au terme de ce travail. Nous remercions **DIEU** pour ça et pour tout le reste.*

*Nous souhaitons exprimer notre gratitude à **Mme BENSMAIL Souhila**, notre promotrice, pour avoir accepté l'encadrement de ce travail et nous avoir accordé leur temps, pour ses conseils précieux et pour sa confiance qui nous a suivis et guidé tout au long de ce travail, Merci pour avoir mis votre expérience à notre profit.*

*Nous avons également l'honneur et le plaisir de présenter nos remerciements à **Mme BENSMAIL Samira**, notre co-promotrice, pour ses conseils, sa disponibilité et ses aides durant les manipulations.*

*On adresse nos sincères remerciements aux membres du jury, **Mme BACHOUCHE-MESRANE Nassima** et **Mme DJOUAHRA-FAHEM Djamila** qui ont accepté d'évaluer ce travail.*

*On tient d'exprimer aussi notre sincère reconnaissance et notre plus profond respect à **Mme MESRANE Karima** et **Mme HADIOUCHE Houria**, responsables des laboratoires de microbiologie pour ses orientations et ses aides.*

*Merci pour tous ceux et celles ayant contribué de près ou de loin, d'une façon ou d'une autre à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je commence par rendre grâce à DIEU, pour me donner le courage et la volonté de poursuivre mes études, et arriver à ce stade. Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions, je dédie ce travail à:*

*L'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir un jour, mon adorable cher père Lamouri. Toute l'encre du monde ne peut suffire pour exprimer mes sentiments pour toi. Tu as toujours été mon maître de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Tu étais et tu resteras pour moi ma référence et la lumière qui éclaire mon chemin*

*Ma mère Fadhila, qui m'a entouré d'amour inconditionnel et qui met tout en œuvre pour que je réussisse. Aucune dédicace ne serait exprimée mon respect et mon amour éternel pour les sacrifices que vous avez fait pour mon éducation et mon bien être.*

*Mes chères sœurs, pour leur amour, soutien et encouragements, qui m'ont soutenue et surtout m'ont supporté au moment difficile. Que Dieu les protège : Khaoula et Amel*

*Mes chers frères: Mohamed et Abd El Rahim*

*Mes merveilleux amis sans exception ni oubli, qui ont partagés avec moi tous les moments de joie et de bonheur et, merci à chaque fois que j'avais des doutes, vous étiez là pour m'encourager et me rappeler ma propre valeur.*

*Mon adorable binôme Lamia*

*À tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin.*



# *Dédicaces*

*À ma Chère Maman*

*Vous avez toujours été à mes côtés pour me soutenir, m'encourager, et me guider. Ton affection me couvre, ta présence a toujours été la source de ma force pour affronter tous les obstacles. Je ne trouve pas les mots justes pour exprimer ma gratitude pour vos sacrifices et vos prières. Que Dieu la protège pour moi. Je lui souhaite une bonne santé et une longue vie, je te porte toujours très ancre dans mon cœur.*

*À mes chères adorables sœurs :*

*Houria, Hananne et Sabrina*

*À mes frères :*

*Mohemed, Laïd, Fateh pour leur soutien et leur encouragement tout au long de mon parcours universitaire.*

*À ma chère et belle compagne, Assia*

*À mes chères Amies :*

*Fatima, Lydia, Amel, Soumia, Kawter, Nawel, Rima, Amina, Aya, Ahlem, Marwa et Lina avec tout mon amour et mes remerciements, vous êtes mes sœurs et mes amies sur lesquelles je peux compter.*

*À mes collègues de spécialité Biochimie Appliquée*

*A toute la famille MOGHRANI*

*Merci de votre présence, soutien et de m'avoir encouragé à aller plus loin. A tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.*



## ***Table des Matières***

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
<b>Introduction</b> .....	1
<b><i>Chapitre I. Synthèse Bibliographique</i></b>	
<b>I. Enzymes hydrolytiques</b> .....	3
I.1. Amylases .....	3
I.1.1. Classification.....	3
I.1.2. Mécanisme d'action .....	4
I.1.3. Applications industrielles.....	4
I.2. Enzymes protéolytiques .....	6
I.2.1. Classification.....	6
I.2.2. Applications industrielles.....	7
I.3. Lipases .....	9
I.3.1. Classification.....	9
I.3.2. Applications industrielles .....	10
I.4. Pectinases .....	11
<b>II. Enzymes lignocellulosiques</b> .....	12
II.1. Cellulases .....	12
II.2. Hémicellulases .....	13
II.2.1. Les xylanases .....	13
II.2.2. Les mannanases .....	14
II.2.3. Ligninases .....	14
<b>III. Fermentation sur milieu solide</b> .....	16
III.1. Avantages et inconvénients de la SSF.....	17
III.2. Le support.....	17
III.3. Facteurs clés influençant la SSF.....	18
III.3.1. Le pH.....	18
III.3.2. Activité de l'eau .....	18
III.3.3. La température.....	19
III.3.4. Taille des particules de substrat .....	19
III.3.5. Aération et agitation .....	19

<b>IV. <i>Penicillium</i> sp.</b> .....	20
IV.1. Le genre <i>Penicillium</i> .....	21
IV.1.1. Reproduction .....	21
IV.1.2. Taxonomie de <i>Penicillium</i> .....	21
IV.1.3. Morphologie de <i>Penicillium</i> .....	22
IV.1.4. Applications industrielles.....	23

## ***Chapitre II. Matériel et Méthodes***

<b>I. Matériel</b> .....	24
I.1. Matériel non biologique .....	24
I.2. Matériel biologique .....	24
<b>II. Méthodes</b> .....	24
II.1. Revivification de la souche.....	24
II.2. Vérification des caractéristiques de <i>Penicillium</i> sp. ....	24
II.3. Détection de la production des enzymes hydrolytiques et lignocellulotiques .....	25
II.4. Production des enzymes d'intérêt .....	27
II.4.1. Préparation de l'inoculum .....	27
II.4.2. Dénombrement des spores .....	28
II.4.3. Conduite de la fermentation et détermination des conditions optimales de production	28
II.4.4. Extraction des enzymes .....	31
II.5. Dosage des activités enzymatiques.....	31
II.5.1. Mesure de l'activité protéolytique .....	31
II.5.2. Détermination de l'activité coagulante .....	33
II.5.3. Dosage de l'activité amylasique .....	34
II.5.4. Dosage de l'activité laccase.....	35
II.6. Estimation de la teneur en protéines.....	36

## ***Chapitre III. Résultats et Discussion***

III.1. Caractéristiques phénotypiques de la souche <i>Penicillium</i> sp. ....	38
III.2. Criblage de la production des enzymes d'intérêt .....	39
III.3. Optimisation de la production d'enzymes par SSF .....	42
III.3.1. Influence de la température d'incubation .....	43
III.3.2. Influence du pH du milieu minéral .....	45
III.3.3. Effet du taux d'humidité .....	48
III.3.4. Effet des oligoéléments .....	50

*Table des matières*

---

III.3.5. Effet du temps d'incubation .....	51
<b>Conclusion</b> .....	54
<b>Références Bibliographiques</b> .....	56
<b>Annexes</b>	

## *Liste des Abréviations*

**A:** Absorbance.

**AAmy:** Activité Amylase.

**AC:** Activité Coagulante.

**AL:** Activité Laccase.

**AP:** Activité Protéolytique.

**BSA:** *Bovin Serum Albumin.*

**CAM:** *Casein Agar Medium*

**CDA:** *Czapek-Dox Agar.*

**CMC:** Carboxyméthyl-cellulose

**DNS:** Acide 3,5 dinitrosalicylique.

**EC:** *Enzyme Commission*

**G:** Grossissement.

**GH:** *Glucoside Hydrolase*

**GRAS:** *Generally Recognized As Safe*

**MS:** *Mineral Solution.*

**p/v:** poids/volume.

**PDA:** *Potato Dextrose Agar.*

**pH:** potentiel d'hydrogène.

**rpm:** rotation par minute.

**SmF:** *Submerged Fermentation.*

**SMO:** Solution Minérale aux Oligo-éléments.

**sp:** Espèce.

**SSF:** *Solid State Fermentation.*

**t:** Temps.

**TCA:** *TriChloroacetic Acid.*

**U:** Unité.

**UI:** Unité Internationale.

**V:** Volume.



## Liste des Figures

<b>Figure 1:</b> Les différentes applications des protéases .....	7
<b>Figure 2:</b> Classification des lipases .....	10
<b>Figure 3:</b> Modèle schématique de la croissance fongique sur le substrat solide, montrant les différentes couches mycéliennes .....	16
<b>Figure 4:</b> Structure des conidiophores de <i>Penicillium</i> : (A) <i>Penicillium</i> monoverticillés, (B) <i>Penicillium</i> biverticillés, (C) <i>Penicillium</i> triverticillés, (D) <i>Penicillium</i> quaterverticillés.....	22
<b>Figure 5:</b> Les étapes de préparation d'inoculum de <i>Penicillium</i> sp. pour lancer la fermentation .....	27
<b>Figure 6:</b> Dénombrement des spores de <i>Penicillium</i> sp. sur cellule de Malassez.....	28
<b>Figure 7:</b> Etapes d'extraction des enzymes d'intérêt à partir des moûts de fermentation <i>via</i> un système d'agitation horizontale.....	31
<b>Figure 8:</b> Courbe étalon de la tyrosine (1 mg/mL) pour le dosage de l'activité protéolytique .....	33
<b>Figure 9:</b> Courbe étalon du maltose (1 mg/mL) pour le dosage de l'activité amylase .....	35
<b>Figure 10:</b> Courbe étalon de BSA (1 mg/mL) pour le dosage des protéines .....	37
<b>Figure 11:</b> Aspects macroscopiques de <i>Penicillium</i> sp. sur milieu Sabouraud (A) et PDA (B), ainsi que les caractéristiques microscopiques de la souche (C, D) .....	39
<b>Figure 12:</b> Effet de la température d'incubation sur la production multienzymatique par <i>Penicillium</i> sp.....	44
<b>Figure 13:</b> Impact de la température de fermentation sur la croissance de <i>Penicillium</i> sp. sous les conditions SSF.....	44
<b>Figure 14:</b> Développement mycélien de <i>Penicillium</i> sp. sur son de blé à différents pH .....	46
<b>Figure 15:</b> Influence du pH sur la production des enzymes hydrolytique et laccases par <i>Penicillium</i> sp.....	47
<b>Figure 16:</b> Effet du taux d'humidité initial sur la production des enzymes d'intérêt par <i>Penicillium</i> sp.....	49
<b>Figure 17:</b> Effet de la solution minérale sur le taux des différentes enzymes produites par <i>Penicillium</i> sp.....	50
<b>Figure 18:</b> Effet du temps d'incubation (h) sur la production des enzymes d'intérêt par <i>Penicillium</i> sp.....	52

## **Liste des Tableaux**

<b>Tableau I:</b> Avantages et inconvénient de la SSF .....	17
<b>Tableau II:</b> Composition des milieux de criblage des enzymes laccases et cellulases.....	25
<b>Tableau III:</b> Méthodes de criblage de quelques enzymes hydrolytiques. ....	26
<b>Tableau IV:</b> Composition des solutions minérales utilisées .....	30
<b>Tableau V:</b> Dosage de la teneur en protéines des extraits enzymatiques. ....	36
<b>Tableau VI:</b> Résultats de criblage de six enzymes hydrolytiques produites par <i>Penicillium</i> sp. .....	40
<b>Tableau VII:</b> Résultats du screening de la production de quelques enzymes lignocellulosiques par <i>Penicillium</i> sp.....	42
<b>Tableau A1:</b> Liste du matériel non biologique utilisé pendant l'expérimentation.....	(Annexes)
<b>Tableau A2:</b> Elaboration de la gamme d'étalonnage de tyrosine (1 mg/mL).....	(Annexes)
<b>Tableau A3:</b> Préparation de la gamme étalon de maltose (1 mg/mL).....	(Annexes)
<b>Tableau A4:</b> Préparation de la gamme d'étalonnage de BSA (1 mg/mL).....	(Annexes)

# *Introduction*

## **INTRODUCTION**

Dans les organismes vivants, les enzymes pilotent les réactions biochimiques et constituent une machinerie essentielle du métabolisme. Ce sont des molécules protéiques hautement évoluées qui s'organisent parfaitement pour remplir des fonctions spécifiques. En tant que catalyseurs biologiques verts, les enzymes forment un groupe bien étudié de macromolécules présentant une grande diversité et spécificité, favorisant leur application dans les différentes industries comme des outils incontournables dans de nombreuses étapes de transformation (Nair et Jayachandran, 2019).

Les microorganismes sont la principale source d'enzymes générant des quantités élevées d'enzymes extracellulaires dans des conditions contrôlées, grâce à des méthodes de fermentation bien établies, et pendant une période relativement courte. Le criblage des souches hyper-productrices d'enzymes est simple et permet d'examiner des milliers de cultures en peu de temps. En plus, la manipulation génétiques des souches est aisée et pratiquée dans un temps limité (Sanchez et Demain, 2017; Singh et al., 2019).

Le développement des enzymes commerciales est une activité spécialisée qui nécessite généralement des compétences élevées dans les domaines suivants :

- Criblage de nouvelles souches productrices d'enzymes et leur amélioration;
- Fermentation pour la production d'enzymes;
- Purification des enzymatiques à grande échelle;
- Formulation d'enzymes à vendre (Patel et al., 2023).

Les microorganismes utilisés pour la production d'enzymes industrielles comprennent environ 50 bactéries et champignons GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Sanchez et Demain, 2017). Parmi eux, les levures et les moisissures jouent un rôle crucial dans la production d'enzymes industrielles, représentant plus de 50% de celles-ci. Leur spécificité pour divers substrats, leurs conditions de réaction modérées, la formation minimale de sous-produits et leur rendement élevé en font des acteurs essentiels dans ce domaine (Anbu et al., 2016; Al-Maqtari et al., 2019; Thapa et al., 2019).

Les champignons filamenteux (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Rhizopus*, *Mucor*, etc.) sont des producteurs potentiels d'enzymes soit par fermentation submergée (SmF) ou à l'état solide (dos Santos et al., 2017). La fermentation sur milieu solide (SSF) a beaucoup d'avantages par rapport à la SmF (Selim et Mostapha, 2017). Elle est très favorable aux processus industriels en raison d'une demande moindre en eau et en énergie,

d'un rendement en produit plus élevé, d'un capital et de coûts réduits, vu l'utilisation de déchets agricoles comme substrat (ex. la paille de riz, la bagasse de canne à sucre, le son de blé, les épis de maïs, etc.). Le faible niveau d'humidité en SSF qui facilite le contrôle de contaminations, l'absence de la mousse et le nombre faible des étapes de purification à entreprendre offrent plus d'avantages à ce processus (Ertan et al., 2014; Srivastava et al., 2019). De ce fait, la SSF est devenue actuellement plus préférée à la SmF, dont plusieurs travaux sont entrepris afin d'améliorer la performances de bioréacteurs élaborés (Srivastava et al., 2019).

La composition du milieu et les conditions physico-chimiques de la fermentation sont généralement optimisées pour chaque souche bactérienne ou fongique productrice d'enzyme recherchée, en adaptant la méthode classique (un seul paramètre à la fois). Des méthodes statistiques sont également utilisées pour produire les enzymes industrielles avec des rendements élevés (Niyonzima et al., 2020).

Plusieurs espèces fongiques sont aujourd'hui utilisées à des fins commerciales pour produire des enzymes et des métabolites, participant ainsi au développement d'une gamme diversifiée de processus industriels (Anteckka et al., 2016). Parmi lesquelles, on trouve *Penicillium* sp., qui est devenu l'un des hôtes les plus importants pour la production d'enzymes alimentaires, en raison de ses caractéristiques uniques de sécurité alimentaire et de ses excellents systèmes de sécrétion des protéines. Il représente l'une des sources les plus significatives de protéases et d'amylases, qui représentent plus de 60 et 30% du marché total des enzymes, respectivement (Sanchez et Demain, 2017; Paul et al., 2021).

L'objectif initial de cette étude est de démontrer la capacité d'une souche fongique locale, *Penicillium* sp., à produire différentes enzymes hydrolytiques et lignocellulotiques. En deuxième lieu, l'optimisation des conditions de la production multienzymatique sur un milieu solide à base du son de blé. Cela sera réalisé en évaluant les effets des différents paramètres de la SSF (la température, le pH et le taux d'humidité, additions des sels minéraux, temps d'incubation) sur l'expression des activités enzymatiques recherchées en appliquant la méthode classique d'optimisation.

# *Chapitre I*

## *Synthèse Bibliographique*

## I. Enzymes hydrolytiques

Les hydrolases forment une catégorie d'enzymes qui utilisent l'eau comme donneur de groupes hydroxyles lors de la dégradation du substrat. En terme simple, une hydrolase catalyse la coupure des liaisons chimiques spécifiques dans des biomolécules pour donner deux plus petites (Shukla et al., 2022). Elles représentent 75% des ventes mondiales d'enzymes industrielles (Adetunji et al., 2023).

### I.1. Amylases

Les amylases, également connues sous le nom des glycosides hydrolases, constituent le système enzymatique qui agit en synergie pour hydrolyser les liaisons glycosidiques présentes dans les molécules d'amidon et produisent des dextrines et des oligosaccharides. Elles occupent un quart (environ 30%) du marché mondial des enzymes, en raison de leurs nombreuses applications biotechnologiques dans plusieurs industries impliquées dans la transformation de l'amidon, afin de générer des produits de valeur (Suriya et al., 2016; Farooq et al., 2021).

#### I.1.1. Classification

Les amylases sont classées en deux types, les endo-amylases et les exo-amylases. Bien que ces enzymes soient impliquées dans l'hydrolyse du même type de liaisons, elles sont cependant différentes en ce qui concerne leur mécanisme d'action (Martin et al., 2019). La  $\beta$ -amylase et la glucoamylase forment respectivement leurs propres familles 14 et 15, dans la classification séquentielle des glycoside hydrolases (GH), alors que l' $\alpha$ -amylase appartient à la famille GH 13 (Kerényiová et Janeček, 2020).

- 1.  $\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1):** encore appelées  $\alpha$ -1,4 glucan-4-glucanohydrolase (Singh et al., 2019), appartiennent à une famille d'endo-amylases qui catalysent la rupture des liaisons internes  $\alpha$ -1,4-glycosidiques d'amylose ou d'amylopectine, en présence de calcium, mais non pas celles du glucose terminal et des liaisons  $\alpha$ -1,6. Les produits d'hydrolyse comprennent du maltose, du maltotriose et des oligosaccharides ramifiés de 6 à 8 unités de glucose, avec des liaisons  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 (Souza, 2010; Suriya et al., 2016). Les différentes formes d' $\alpha$ -amylases ont des profils de stabilité thermique variés avec un optimum d'activité à pH 7,0 (Farooq et al., 2021).
- 2. Les  $\beta$ -Amylases (EC 3.2.1.2):** connues sous les noms de 1,4- $\alpha$ -D-glucane maltohydrolases, glycogénase ; amylase saccharogène, sont couramment présentes dans les plantes, les bactéries et les champignons. Elles génèrent du maltose en

hydrolysant les liaisons  $\alpha$ -1,4-glucane des extrémités non réductrices de l'amidon. La  $\beta$ -Amylase est responsable du goût sucré des fruits mûrs car elle hydrolyse l'amidon en maltose pendant la maturation des fruits. La  $\beta$ -amylase présente une activité hydrolytique maximale à un pH allant de 4,0 à 5,5 (Gurung et al., 2013; Suriya et al., 2016).

- 3. La glucoamylase (EC 3.2.1.3):** est souvent désignée sous le nom glucane  $\alpha$ -1,4-glucosidase, amyloglucosidase, exo- $\alpha$ -1,4-glucosidase ou glucoamylase 1,4- $\alpha$ -D-glucan-glucohydrolase (Vaidya et al., 2015). Sa fonction principale est d'hydrolyser les liaisons  $\alpha$ -1,6 et  $\alpha$ -1,4-glycosidiques non réductrices d'amylose et d'amylopectine, produisant du glucose. Son pH optimal est 3 et peut être utilisée efficacement dans des environnements acides (Farooq et al., 2021).

### I.1.2. Mécanisme d'action

Le mécanisme catalytique proposé pour les glycosyl hydrolases comprend trois étapes. Au cours de la première étape, l'oxygène glycosidique reçoit un proton du donneur Glu<sub>261</sub>, puis Asp<sub>231</sub> réalise une attaque nucléophile sur le C1 du sucre au sous-site -1. Après le départ de la partie aglycone du substrat, une molécule d'eau est activée, vraisemblablement par le Glu<sub>261</sub> désormais déprotoné. Cette molécule d'eau hydrolyse la liaison covalente entre l'oxygène nucléophile et le C1 du sucre du sous-site-1, complétant ainsi le cycle catalytique. L'Asp<sub>328</sub> n'intervient pas directement dans ce mécanisme catalytique, mais il est néanmoins connu pour être important pour la catalyse (Elyasi Far et al., 2020).

### I.1.3. Applications industrielles

Les amylases présentent de nombreuses applications potentielles et largement utilisées sur le plan industriel (Suriya et al., 2016).

#### 1. Industrie alimentaire

Les amylases sont largement utilisées dans divers secteurs de l'industrie agroalimentaire, incluant la boulangerie, la brasserie, la production d'aides digestives, la fabrication de gâteaux, de jus de fruits et de sirops d'amidon. Dans la boulangerie, ces enzymes sont souvent incorporées dans la pâte pour dégrader l'amidon de la farine en dextrines plus petites, qui sont ensuite fermentées par la levure. Cet ajout d'amylases accélère le processus de fermentation et réduit la viscosité de la pâte, entraînant ainsi une amélioration du volume et de la texture du produit final. Cela augmente la teneur en sucre dans la pâte, améliorant ainsi le goût, la couleur de la croûte et les qualités de grillage du pain.



Outre la production de composés fermentescibles, les amylases jouent également un rôle dans la prévention du rassissement du pain lors de la cuisson, ce qui prolonge la durée de conservation de ces produits. Actuellement, les amylases sont aussi employées dans le prétraitement des aliments pour animaux pour améliorer la digestibilité des fibres, ainsi que pour clarifier la bière et les jus de fruits (Farooq et al., 2021).

## **2. Industrie des détergents**

L'intégration d'enzymes dans les formules des détergents améliore leur efficacité contre les taches résistantes tout en préservant l'environnement. Environ 90% des détergents liquides contiennent des amylases, qui représentent le deuxième type d'enzymes le plus couramment utilisé dans ces formulations enzymatiques (John, 2017; Farooq et al., 2021). Dans les lessives et les lave-vaisselle automatiques, ces enzymes sont employées pour désagréger les résidus alimentaires tels que ceux issus des pommes de terre, des sauces, du chocolat, etc. Les amylases sont actives à des basses températures et dans un environnement alcalin, conservant ainsi leur stabilité nécessaire dans des conditions détergentes sous un stress oxydatif (Souza et al., 2015; Farooq et al., 2021).

## **3. Industrie de papiers**

Pour protéger le papier des taches lors du traitement, il est enduit d'agents d'encollage. L'amidon est l'agent d'encollage le plus apprécié dans l'industrie papetière. L' $\alpha$ -amylase effectue une hydrolyse partielle de l'amidon et réduit la viscosité dans un processus discontinu ou continu (Suriya et al., 2016).

## **4. Industries des biocarburants et du textile**

L'éthanol est le biocarburant liquide le plus largement adopté. Ces dernières années, la production de bioéthanol à partir de diverses sources de matières premières a été étroitement suivie. L'amidon est généralement préféré comme matière première pour la production de bioéthanol en raison de son faible prix et de sa disponibilité par rapport aux autres substrats utilisés. Le schéma de conversion de l'amidon en éthanol débute par la liquéfaction de l'amidon pour former une suspension d'amidon visqueuse. La saccharification, vient par la suite pour hydrolyser l'amidon via des amylases (ex. glucoamylase,  $\alpha$ -amylase) en sucres fermentescibles qui seront transformés par un micro-organisme (ex. *Saccharomyces cerevisiae*) en éthanol (Vaidya et al., 2015; Farooq et al., 2021).

Dans l'industrie textile, les amylases sont utilisées pour le désencollage. Avant la fabrication du tissu, des agents d'encollage tels que l'amidon sont appliqués sur le fil pour

assurer un processus de tissage rapide et sécurisé (prévenir la rupture du fil de chaîne pendant le tissage). L'utilisation de l'amidon est très avantageuse en raison de son faible coût, sa disponibilité et de sa facilité d'élimination. Les  $\alpha$ -amylases éliminent sélectivement l'ensimage et n'attaquent pas les fibres. L'amylase produite par *Bacillus* a été utilisée pendant longtemps dans les industries textiles (Souza et al., 2015).

## I.2. Enzymes protéolytiques

Les protéases constituent le groupe d'enzymes le plus vaste et le plus complexe, qui catalysent la dégradation des protéines en clivant les liaisons peptidiques qui existent entre les résidus d'acides aminés dans une chaîne polypeptidique. Elles constituent l'un des groupes d'enzymes les plus importants, représentant plus de 65% des ventes totales d'enzymes dans le monde (Adetunji et al., 2023). Selon la classification de la Commission des Enzymes (EC), les protéases appartiennent au groupe 3 des hydrolases et sont spécifiquement répertoriées dans le sous-groupe 4 (Dos Santos Aguilar et Sato, 2018).

Les micro-organismes offrent une ressource exceptionnelle en termes de protéases en raison de leur diversité biochimique et de leur susceptibilité aux manipulations génétiques. Parmi celles-ci, les protéases bactériennes surpassent en importance les protéases d'origine animale et fongique (Bach et al., 2012). Outre les innombrables propriétés de la protéase, il a été jugé essentiel d'étudier plus le potentiel des protéases, en particulier la stabilité vis-à-vis des tensioactifs, la température et les exigences en cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Kumar et al., 2008).

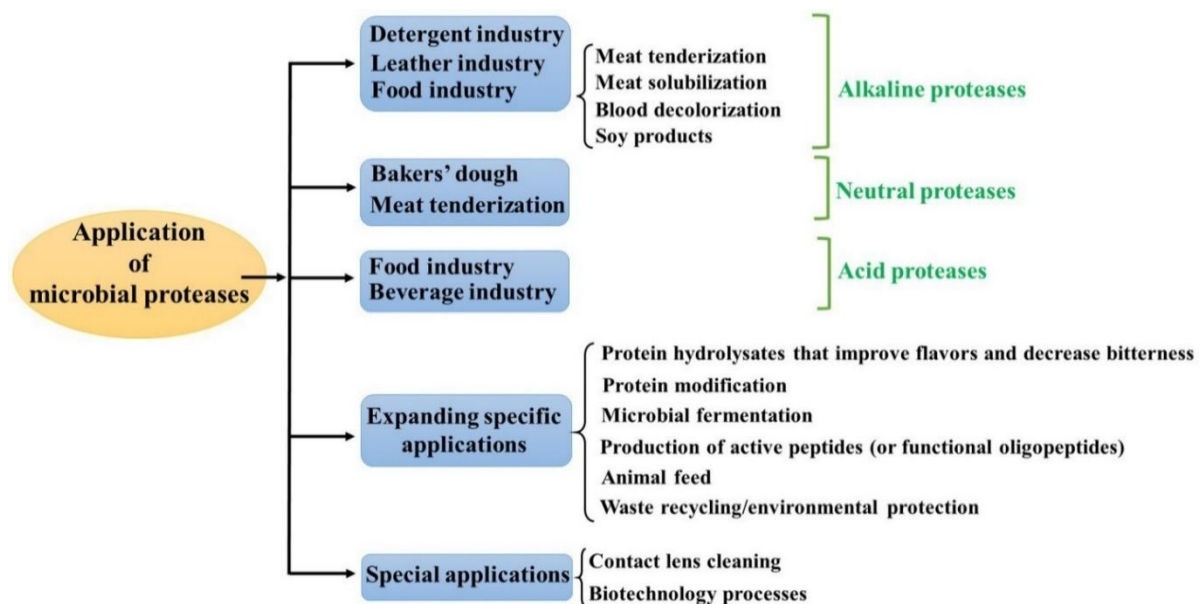
### I.2.1. Classification

Les protéases se répartissent principalement en deux groupes distincts: les exopeptidases et les endopeptidases. Les exopeptidases (EC 3.4.11-19) interviennent au niveau des extrémités des chaînes polypeptidiques (Raveendran et al., 2018), et selon leur site d'action, elles sont classées en amino- et carboxypeptidases. Les aminopeptidases (EC 3.4.11-14) agissent à l'extrémité N-terminal des chaînes peptidiques, libérant soit un seul résidu d'acide aminé, un dipeptide, ou un tripeptide. De leur côté, les carboxypeptidases (EC 3.4.15-18) interviennent aux extrémités C-terminal des chaînes polypeptidiques, libérant un seul acide aminé ou un dipeptide. Ces carboxypeptidases se divisent en trois grandes catégories: les sérines peptidases (EC 2.4.16), les métallopeptidases (EC 2.4.17) et les cystéines peptidases (EC 2.4.18), en fonction de la composition des résidus d'acides aminés formant le site actif de ces enzymes (Ward, 2011).

Les endopeptidases (EC 3.4.21-25) agissent de manière aléatoire dans les régions internes des chaînes polypeptidiques. Les endopeptidases sont en outre classées en six groupes, selon le(s) résidu(s) catalytique(s) présent dans le site actif: sérine, aspartique, cystéine, métallo, acide glutamique et thréonine protéases (Raveendran et al., 2018).

### I.2.2. Applications industrielles

Les protéases microbiennes sont les leaders du secteur industriel des enzymes dans le marché mondial et représentent près de 40% du marché global des enzymes (Souza et al., 2015). Les protéases sont appliquées dans différents secteurs industriels et biotechnologiques (Fig. 1).



**Figure 01:** Les différentes applications des protéases (Song et al., 2023).

#### 1. Industrie alimentaire

Les industries fromagères utilisent souvent des sources microbiennes de protéases pour la coagulation du lait; l'étape cruciale dans le processus de transformation pour 75% des types de fromage. Cependant, ces enzymes présentent deux inconvénients: un rendement faible et une amertume en cas de conservation prolongée. Les protéases aspartiques sont les plus adaptées pour les industries fromagères (Banerjee et Ray, 2017). Les protéases naturelles contribuent de manière significative aux caractéristiques aromatiques du fromage. Ils sont utilisés pour accélérer l'affinage des fromages, pour modifier les propriétés fonctionnelles et réduire les propriétés allergènes des produits laitiers (Raveendran et al., 2018).

En boulangerie, les protéases jouent un rôle dans la modification du gluten, qui est une protéine insoluble et qui détermine les propriétés viscoélastiques et la capacité d'expansion de

masse au cours du processus de cuisson (Dos Santos Aguilar et Sato, 2018). La protéase produite par *Aspergillus oryzae* hydrolyse le gluten et augmente la qualité organoleptique du produit fini (Banerjee et Ray, 2017).

## **2. Industrie des détergents**

Une évolution significative s'est produite ces dernières années, passant des protéases utilisées comme simples additifs à leur intégration systématique dans tous les types de détergents (Dos Santos Aguilar et Sato, 2018). L'utilisation de protéases dans l'industrie des détergents représente actuellement environ 20% (Razzaq et al., 2019). La protéase idéale pouvant être utilisée dans les industries des détergents devrait avoir deux caractéristiques: stable à pH alcalin et compatible avec les détergents. Les protéases produites par *Bacillus* sp. sont très utiles dans la fabrication de détergents à lessive. D'un point de vue environnemental, l'utilisation de protéases microbiennes dans la fabrication de détergents est plus sûr pour la santé et la nature (Banerjee et Ray, 2017).

## **3. Gestion des déchets**

Les protéases sont utilisées pour traiter diverses formes de déchets, notamment les déchets solides, liquides et dangereux. Ces enzymes contribuent également à la dégradation des déchets en les convertissant en molécules simples pouvant être utilisées par d'autres organismes pour des activités métaboliques et contribuent ainsi à réduire la demande biologique en oxygène des systèmes aquatiques (Solanki et al., 2021).

## **4. Domaine médical**

Les protéases possèdent des propriétés thérapeutiques distinctes qui sont utiles dans le développement de divers médicaments contre des maladies mortelles telles que les anticancéreux, infections antimicrobiennes, anti-inflammatoires, et la dissolution des caillots avec diverses autres applications (Solanki et al., 2021). Les protéases aspartiques sont utilisées comme aides digestives (Theron et Divol, 2014).

## **5. Autres utilisations**

Au-delà de leurs utilisations industrielles et médicinales, les protéases sont essentielles en recherche fondamentale. Leur clivage sélectif des liaisons peptidiques est employé pour étudier la relation structure-fonction, la synthèse de peptides et le séquençage des protéines (Jisha et al., 2013).

### I.3. Lipases

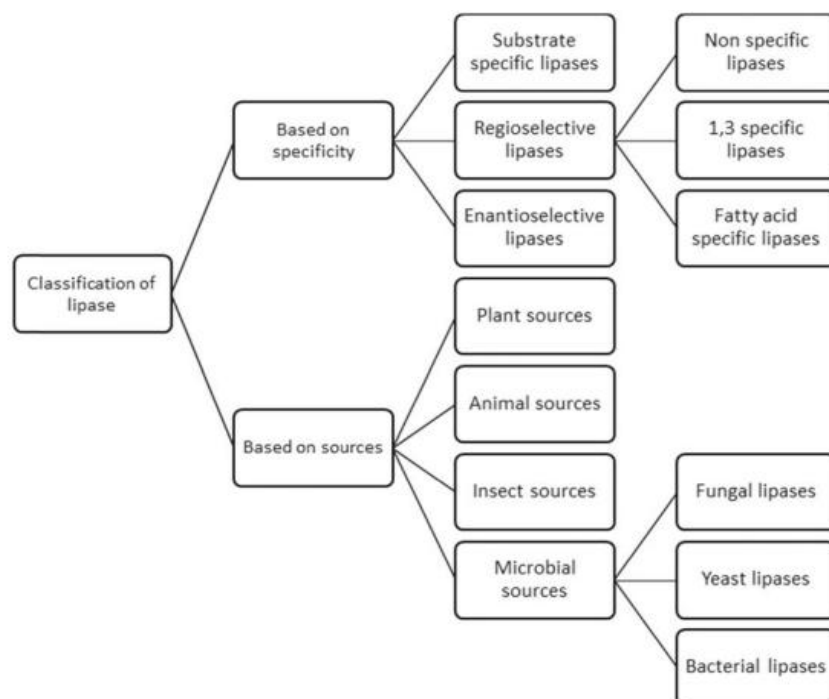
Les triacylglycérol acyl-hydrolases (EC 3.1.1.3) ou lipases sont reconnues comme un groupe d'enzymes potentielles qui catalysent l'hydrolyse des matières grasses et des huiles insolubles (triglycérides), pour former des monoglycérides, des diglycérides, du glycérol et des acides gras libres, sans besoin de cofacteurs (Chandra et al., 2020; Kumar et al., 2023). Les lipases, membres de la famille des sérine hydrolases, catalysent un large éventail de réactions appelées réactions de bioconversion (estérification, acidolyse, inter-estérification, aminolyse, hydrolyse des triglycérides) (Kiran et al., 2016; Kumar et al., 2023).

Les lipases microbiennes ont attiré une attention croissante dans les domaines industriels plutôt que celles dérivées d'animaux et de plantes en raison de leurs caractéristiques appropriées, leur capacité fonctionnelle dans des conditions très difficiles, grande stabilité dans les solvants organiques et leur sélectivité chimique (Kumar et al., 2023).

#### I.3.1. Classification

Les lipases peuvent être classées en fonction de leurs spécificités et sources (**Fig. 2**) (Verma et al., 2021) :

1. Lipases spécifiques au substrat peuvent être utilisées efficacement dans des réactions, où elles agissent sélectivement sur un substrat spécifique dans un mélange de matières premières brutes, facilitant ainsi la synthèse du produit souhaité.
2. Lipases régio-sélectives ont tendance à orienter la réaction dans une direction favorable par rapport aux autres réactions secondaires. Une telle propriété des lipases revêt une importance capitale pour les industries chimiques et pharmaceutiques, en particulier dans la production de composés isomères qui présentent une fonction optimale uniquement sous une configuration spécifique (Sarmah et al., 2018).
3. Lipases énantio-sélectives hydrolysent spécifiquement l'un des isomères d'un racémate. Ces lipases peuvent différencier les énantiomères dans un mélange racémique. Certains des processus catalysés par les lipases énantio-spécifiques comprennent la trans-estérification d'alcools secondaires en produits pharmaceutiques, l'hydrolyse du benzoate de menthol en produits cosmétiques/alimentaires et l'hydrolyse de l'ester méthylique de l'acide glucidique en produits médicaux (Verma et al., 2021).



**Figure 02:** Classification des lipases (Sarmah et al., 2018).

### I.3.2. Applications industrielles

Les lipases microbiennes sont devenues un groupe majeur d'enzymes biotechnologiques avec plusieurs applications industrielles, en raison de la polyvalence de leurs propriétés et de la facilité de leur production en masse.

#### 1. Industrie alimentaire

Les lipases exercent un rôle primordial dans le domaine de la production laitière, en décomposant la matière grasse du lait pour améliorer le goût des fromages, en particulier ceux à pâte molle (réduction de la longueur des chaînes d'acides gras). De nos jours, elles sont également exploitées pour accélérer le processus d'affinage du fromage et favoriser la lipolyse des matières grasses, du beurre et de la crème. Dans le secteur de l'industrie alimentaire, l'amélioration des huiles et des graisses est un domaine crucial nécessitant des technologies économiques et respectueuses de l'environnement, et ce sont des constituants très importants des aliments. Des lipides relativement économiques et moins appropriés peuvent être transformés en graisses de plus grande valeur par modification de la localisation des chaînes d'acides gras via l'application des lipases (Chandra et al., 2020; Ali et al., 2023).

#### 2. Industrie des détergents

Aujourd'hui, les enzymes constituent des éléments principaux dans les formulations de détergents, parmi lesquelles les lipases microbiennes jouent un rôle important pour

l'élimination des taches grasses telles que le beurre, l'huile, etc. du tissu, difficiles à éliminer sous un lavage normal (Priji et al., 2016).

### 3. Utilisation dans le diagnostic

Les lipases sont considérées comme des cibles médicamenteuses ou des enzymes marqueurs importantes dans le domaine médical. La présence des niveaux élevés de lipases peuvent indiquer certaines infections ou maladies et peuvent être utilisés comme outil de diagnostic. Elles sont utilisées dans la détermination des triglycérides sériques, via la libération du glycérol qui est déterminé par des réactions colorimétriques liées aux enzymes. (Gurung et al., 2013).

### 4. Autres applications

Dans l'industrie du cuir, la lipase d'*Aspergillus cervinus* a été correctement immobilisée sur des billes de chitosane-alginate et utilisée efficacement comme additif aux détergents et à des fins d'épilation du cuir. Les lipases sont également utilisées pour éliminer les agents de lubrification utilisés lors de l'ensimage, ce qui améliore la qualité du processus de teinture. Le désencollage du denim et d'autres tissus en coton est effectué commercialement par un processus biocatalytique impliquant les lipases (Ismail et al., 2021).

## I.4. Pectinases

Les pectinases est un terme générique utilisé pour désigner un groupe d'enzymes qui catalysent la dégradation des substances pectiques par des réactions d'hydrolyse, de trans-élimination ainsi que de dé-estérification, en raison de la grande hétérogénéité structurale de pectine (Kaur et al., 2023; Rehman, 2023). Par conséquent, les pectinases ont été classées dans différents groupes, tels que les protopectinases, les polygalacturonases (PMG, EC 3.2.1.1), les polyméthylestérases (EC 3.1.1.11 et EC 3.1.1.6), les pectine lyases (PL, EC 4.2.2.10) et les pectate lyases (Singh et al., 2019; Kaur et al., 2023).

Elles sont naturellement produites par divers organismes, notamment les bactéries, champignons, levures, insectes, protozoaires, nématodes et les plantes (Kaur et al., 2023; Rehman, 2023). Les champignons filamenteux, comme *A. niger* et *A. carbonarius*, sont les plus préférés puisqu'environ 90% des enzymes produites peuvent être sécrétées dans le milieu de culture (Soares et al., 2012).

Les pectinases ont un large éventail d'applications dans la préparation de jus de fruits (clarification et réduction de viscosité), la transformation des textiles, la fabrication du papier, le traitement des eaux usées contenant de la pectine, le dégommeage des fibres de plantes, la

clarification du vin, la transformation de l'huile et l'industrie du café et du thé (Rehman, 2023).

## II. Enzymes lignocellulosiques

La matière végétale ou la biomasse lignocellulosique, composée principalement de cellulose (35–50%), d'hémicellulose (20–35%) et de lignine (15–30%), est dégradée par les enzymes lignocellulosiques en sucres simples (ex. le glucose) (Toushik et al., 2017), qui peuvent ensuite être utilisés pour produire des biocarburants, des produits chimiques ou d'autres produits biologiques (Saldarriaga-Hernández et al., 2020). Les principales catégories d'enzymes lignocellulosiques comprennent les cellulases, les hémicellulases et les enzymes dégradant la lignine (Ravindran et Jaiswal, 2016).

### II.1. Cellulases

Ces enzymes comprennent un ensemble de glycosides hydrolases dont l'action implique l'hydrolyse des liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques de la cellulose, polymère majeur présent dans la biomasse. Ces enzymes présentent une action synergique lors de la dégradation de la chaîne de cellulose. Le mécanisme d'action des cellulases le plus largement accepté implique trois classes d'enzymes: les endoglucanases (1,4-D-glucane-4-glucohydrolase, EC 3.2.1.4), les exocellobiohydrolases (1,4-D-glucane glucohydrolase, EC 3.2.1.74) et les  $\beta$ -glucosidases (D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21). Les premières hydrolysent les liaisons glycosidiques des substrats cellulotiques, alors que les exoglucanases attaquent les extrémités cristallines des substrats pour produire du cellobiose. Ce dernier est converti en glucose par l'action de la  $\beta$ -glucosidase. Ce type de complexe enzymatique est produit par une grande variété de micro-organismes, dont la plupart des préparations commerciales de cellulases sont produites par des champignons filamenteux des genres *Trichoderma* et *Aspergillus* (Farinas et al., 2015; Singh et al., 2019).

Les cellulases sont classées au deuxième rang sur le marché mondial des enzymes industrielles sur la base du volume d'affaires et le nombre d'applications à grande échelle (Ejaz et al., 2019):

1. Dans le domaine alimentaire, les cellulases mettent à profit leur capacité à extraire des composants du thé vert, des protéines de soja, des huiles essentielles, des arômes et de l'amidon de patate douce. En collaboration avec les hémicellulases et les pectinases, elles jouent un rôle essentiel dans l'extraction et la clarification des jus de fruits, en



décomposant la phase solide. Les enzymes ci-dessus sont également utilisées dans le processus de production du vinaigre d'orange et de l'agar-agar (Soares et al., 2012).

2. L'utilisation des cellulases dans l'industrie du papier est encore un domaine émergent et l'application la plus populaire et la plus réussite des cellulases se situe dans l'industrie textile, où elles sont utilisées pour le traitement biologique des jeans, le polissage biologique des tissus et du coton, ainsi que pour améliorer l'apparence des tissus (Ejaz et al., 2019).
3. Les cellulases améliorent la valeur nutritionnelle des aliments destinés aux animaux de compagnie et la pisciculture en éliminant des substances anti-nutritionnelles. Les cellulases ont également trouvé des applications sous forme d'aides digestifs, dans les industries pharmaceutiques, étant donné que les fibres de cellulose ne sont pas faciles à digérer (ex. la digestine) (Behera et al., 2017).

## II.2. Hémicellulases

Les hémicellulases sont une classe d'enzymes qui décomposent les hémicelluloses, une composante importante de la biomasse lignocellulosique. Elles agissent en catalysant la dégradation des liaisons entre les unités de sucre dans les hémicelluloses. Cela entraîne la libération des sucres simples tels que le xylose, le mannose, le glucose et d'autres sucres pentoses et hexoses (Dhawan et Kaur, 2007).

### II.2.1. Les xylanases

Les xylanases (EC 3.2.1.8), également appelées endo- $\beta$ -1,4-xylane xylanohydrolases, appartiennent à la famille des glycosides hydrolases (GH10), qui catalysent l'hydrolyse du xylane en xylo-oligosaccharides, xylo-biose et D-xylose (Singh et al., 2019). Les xylanases sont classifiées en fonction de leur poids moléculaire, point isoélectrique, structure cristalline, propriétés cinétiques et de la spécificité des substrats (Bharadwaj et al., 2019). Les xylanases sont issues de diverses sources telles que les champignons, bactéries, levures, algues marines, les graines, mais les principales sources de ces enzymes sont les champignons (ex. *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp.) et les bactéries (ex. *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp.) (Shah et Vishwa, 2019).

En raison de leur potentiel industriel, les enzymes xylanolytiques microbiennes ont attiré une grande attention au cours de la dernière décennie (Goswani et Rawat, 2015). Elles sont utilisées dans le secteur de la fabrication de papier pour améliorer la qualité du produit final en traitant la pâte. Elles facilitent également la conversion du xylane en xylose, la

production de protoplastes de cellules végétales, le ramollissement des légumes, la liquéfaction du mucilage de café, la préparation de la pâte en boulangerie, la récupération des huiles des mines souterraines et l'extraction des pigments et des huiles végétales (Juturu et Wu, 2012).

### **II.2.2. Les mannanases**

Les  $\beta$ -mannanases (EC 3.2.1.78) sont des enzymes essentielles qui déclenchent la dégradation des mannanes en coupant de manière aléatoire le squelette pour libérer de courts  $\beta$ -1,4-manno-oligomères et produire de nouvelles extrémités de chaîne (Morrill et al., 2015). Cette classe d'enzymes se retrouve dans les familles GH 5, 26 et 113. Il a été rapporté que les principaux produits obtenus lors de l'hydrolyse du mannane par les  $\beta$ -mannanases sont le mannobiose et le mannotriose. Seules les mannanases GH 5 et 113 présenteraient une activité de transglycosylation, alors qu'aucun rapport de ce type n'a été enregistré pour les mannanases GH26 (Malgas et al., 2015).

Des mannanases ont été découvertes dans différents organismes, qu'ils soient végétaux, animaux ou microscopiques. Les  $\beta$ -mannanases provenant de micro-organismes se caractérisent par leur stabilité supérieure avec de nombreuses applications industrielles dans divers secteurs, notamment l'industrie alimentaire, textile, papetière, des détergents, ainsi que dans la production d'énergie, l'alimentation animale et les produits pharmaceutiques (Dawood, 2020).

### **II.2.3. Ligninases**

Les ligninases comprennent généralement deux types principaux d'enzymes: les peroxydases et les laccases. Les peroxydases (peroxydases de lignine et peroxydases de manganèse) agissent en utilisant le peroxyde d'hydrogène pour oxyder la lignine. Les laccases, d'autre part, sont des enzymes multicuivre qui oxydent la lignine en utilisant l'oxygène moléculaire (Kumar et Chandra, 2020).

Les laccases (oxygène oxydoréductases, EC 1.10.3.2) sont des enzymes multicuivre impliquées dans la catalyse de l'oxydation de divers substrats phénoliques et non phénoliques. Elles jouent un rôle crucial dans la réticulation des monomères, la dégradation des polymères naturels et synthétiques, ainsi que dans le clivage des cycles des composés aromatiques. Ces enzymes contiennent 15 à 30% de glucides et ont une masse moléculaire de 60–90 kDa (Shraddha et al., 2011). Les laccases effectuent une oxydation électronique des phénols et de ses composés associés et réduisent l'oxygène en eau. Lorsque le substrat est oxydé par une

laccase, il perd un seul électron et forme généralement un radical libre qui peut subir une oxydation supplémentaire ou des réactions non enzymatiques, notamment une hydratation, une dismutation et une polymérisation (Liu et Kokare, 2017). Actuellement, les laccases proviennent de plantes (graines de maïs, mangue, pêches, pins, etc.), d'insectes (*Bombyx*, *Calliphora*, etc.) et des microorganismes, surtout les champignons filamenteux (Singh et al., 2019). En raison de leur forte capacité oxydante, les laccases ont de nombreuses applications biotechnologiques dans diverses industries (Singh et al., 2019).

### **1. Transformation de la lignine dans l'industrie des pâtes et papiers**

Les laccases sont capables de dépolymériser la lignine et de délignifier les pâtes de bois en supprimant les phénols potentiellement nocifs générés par la décomposition de la lignine. Les laccases agissent tout d'abord sur de petits fragments de lignine phénoliques qui réagissent avec le polymère de lignine, ce qui entraîne ensuite sa dégradation (Upadhyay et al., 2016).

### **2. Industrie de textiles**

Les laccases sont utilisées pour améliorer la blancheur lors du blanchiment conventionnel du coton. Elles trouvent également des applications potentielles pour le nettoyage, comme le lavage des vêtements, afin d'éliminer l'odeur générée lors du lavage des tissus, et de la vaisselle (Kunamneni et al., 2008).

### **3. Industrie alimentaire**

Les laccases possèdent un grand potentiel pour être utilisées comme additifs alimentaires dans la transformation des aliments (Upadhyay et al., 2016). Une large gamme d'enzymes est utilisée pour l'élimination des composés phénoliques indésirables dans la boulangerie et la transformation des jus et pour améliorer la texture, le volume, la saveur et la fraîcheur du pain. L'incorporation de laccase dans la pâte renforce les structures du gluten, ce qui augmente la résistance des produits de boulangerie: le volume des produits augmente, la structure de la mie devient plus uniforme et les produits de boulangerie gagnent en moelleux. Grâce à l'ajout de laccase, la pâte devient moins collante, tandis que sa résistance et sa stabilité augmentent, ce qui améliore également la performance des machines, ce qui peut également être constaté en utilisant une farine de mauvaise qualité (Shraddha et al., 2011).

### **4. Autres applications**

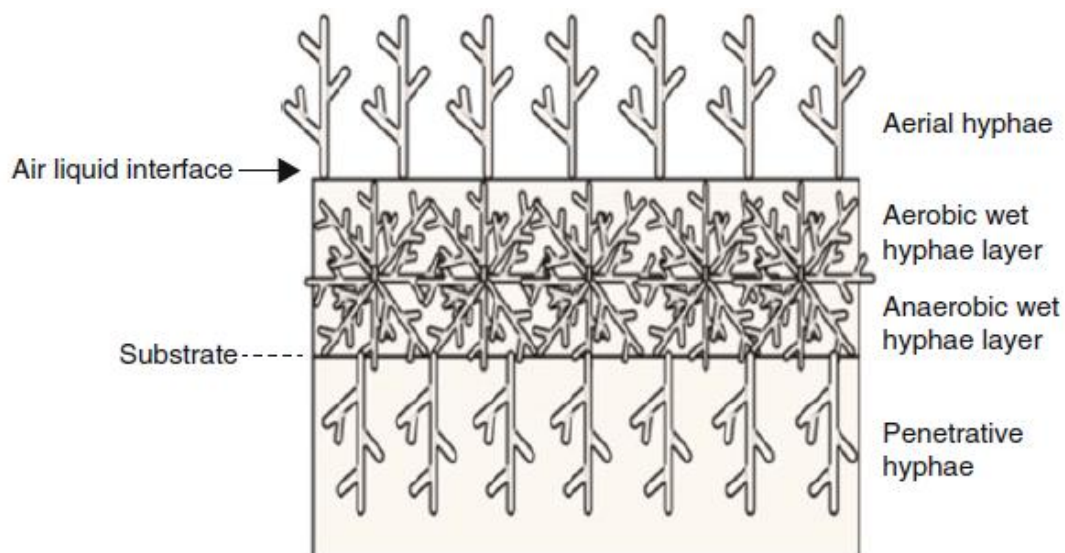
Les laccases peuvent diminuer les odeurs provenant des sites de traitement des déchets, des exploitations agricoles et des usines de pâte à papier, grâce à leur capacité à catalyser des réactions de transfert d'électrons sans besoin de cofacteurs supplémentaires, elles peuvent

également être utilisées comme biocapteurs pour détecter divers composés phénoliques, l'oxygène et l'azote. En tant que biocapteur, les laccases peuvent détecter la morphine, la codéine, la catécholamine, estimer les composés phénoliques et les flavonoïdes végétaux dans les jus de fruits. Récemment, une laccase a été utilisée comme biocatalyseur pour la synthèse de substances organiques ainsi que dans la conception de bio-piles (Shraddha et al., 2011).

### III. Fermentation sur milieu solide

Dans le système SSF (*Solid-State Fermentation*), la culture utilise un substrat solide (synthétique ou naturel) avec suffisamment d'humidité uniquement pour maintenir la croissance et le métabolisme du micro-organisme (en d'autres termes, il n'y a pas d'eau libre). (Farinas et al., 2015; Šelo et al., 2021). La SSF est un processus hétérogène en trois phases, comprenant la matière solide, liquide et la phase gazeuse, ce qui offre des avantages potentiels pour la culture microbienne (Thomas et al., 2013).

La fermentation solide peut être particulièrement avantageuse pour la culture de champignons filamenteux, car elle simule l'habitat naturel de ces microorganismes qui poussent à la surface et à l'intérieur du substrat grâce à leur croissance apicale, conduisant à une productivité enzymatique plus élevée que les procédés SmF (Farinas et al., 2015; Šelo et al., 2021). Les hyphes fongiques forment une couche de biomasse sur les particules de substrat (une couche supérieure et une couche inférieure et des pointes d'hyphes pénétrant dans le substrat formant les mycéliums) (**Fig. 3**) (Šelo et al., 2021).



**Figure 03:** Modèle schématique de la croissance fongique sur le substrat solide, montrant les différentes couches mycéliennes (Barrios-González, 2012).

Les champignons filamenteux ont un grand potentiel dans la production d'enzymes à haute valeur commerciale par SSF en utilisant des substrats solides, tels que le son de blé, la bagasse, paille de riz, déchets de fruits et légumes, fibre de coco, etc. (Šelo et al., 2021).

### III.1. Avantages et inconvénients

La SSF présente de nombreux avantages et quelques inconvénients dans la production de divers métabolites et des enzymes par rapport à la SmF (*Submerged Fermentation*) (Tableau I).

**Tableau I:** Avantages et inconvénient de la SSF (Chen, 2013; Abdul Manan et Webb, 2018; Deb et Vimala, 2018; Nkemnaso, 2019; Behera et al., 2019; Šelo et al., 2021).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un apport suffisant en oxygène, sans l'ajout des systèmes d'aération.</li> <li>• L'environnement solide ressemble davantage à l'habitat naturel des champignons filamenteux.</li> <li>• Les substrats utilisés sont des déchets riches en nutriments ce qui assure leur recyclage.</li> <li>• Adaptée aux champignons et micro-organismes qui nécessitent moins d'humidité.</li> <li>• Le même substrat peut être utilisé pendant de longues périodes de fermentation et peut être utilisé très lentement et régulièrement.</li> <li>• Productivité plus élevée en enzymes et en métabolites.</li> <li>• Coût moindre de la production (en raison de l'utilisation de résidus agro-industriels bon marché comme des substrats).</li> <li>• Consommation moindre d'eau (minimise la contamination) et d'énergie.</li> <li>• Utilisation moindre de produits chimiques pour contrôler les paramètres de la SSF.</li> <li>• Une production moindre des effluents.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mycélium fongique reste attaché au substrat solide, ce qui rend la séparation et l'estimation de la biomasse plus difficiles.</li> <li>• Difficultés de réguler la variation des paramètres du processus comme le pH et la teneur en humidité, concentrations en oxygène, etc. durant la SSF.</li> <li>• Il existe un risque de contamination par des espèces fongiques indésirables.</li> <li>• L'aération peut parfois être difficile en raison de concentrations élevées de substrat.</li> <li>• Les spores doivent germer, car elles ont généralement des phases de latence plus longues, ce qui prolonge la durée de la fermentation par rapport la SmF.</li> </ul>

### III.2. Le support

Le choix du substrat est crucial en SSF, car il influe sur plusieurs paramètres tels que la taille des particules, la composition biochimique (surtout pour les supports organiques), la capacité de rétention d'eau, la porosité, la valeur nutritive, la disponibilité et le coût (Krishna,

2005; Naik et Lele, 2012). Les supports se divisent en deux catégories: inertes et organiques, et existent sous trois formes distinctes:

- Matériaux organiques naturels comprenant des polymères insolubles et complexes (ex. la bagasse, les pulpes de betterave, la paille, le bois, etc.).
- Matériaux synthétiques comme la mousse de polyuréthane.
- Matériaux minéraux tels que les granules d'argile, la perlite, et la pouzzolane.

### III.3. Facteurs clés influençant la SSF

La réussite des systèmes SSF peut être influencée par de nombreux facteurs, parmi lesquels l'ajout de nutriments (sources de carbone, sources d'azote, sels minéraux, etc.), le degré d'humidité, la température, le pH du milieu et le taux d'aération. etc.

#### III.3.1. Le pH

Dans le système SSF, le pH est un paramètre de croissance très important et très déterminant pour le métabolisme et la croissance des micro-organismes. Le substrat utilisé dans ce système possède lui-même un effet tampon en raison de sa composition chimique complexe, mais il est difficile de surveiller les changements en raison des caractéristiques hétérogènes du substrat et de l'absence d'eau libre. La contamination bactérienne peut être évitée dans les systèmes SSF exploitant les champignons et les levures, en cultivant à un pH autre que celui qui convient aux bactéries (López-Calleja et al., 2012). Ainsi, les caractéristiques du substrat solide, la faible teneur en eau et l'absence d'un dispositif approprié de contrôle du pH en ligne constituent des défis majeurs pour l'optimisation du pH (Kumar et al., 2021).

#### III.3.2. Activité de l'eau

L'eau est indispensable à la croissance des cellules, au fonctionnement métabolique et aux réactions enzymatiques. Elle joue également un rôle crucial dans le transport des éléments nutritifs, des métabolites extracellulaires et des gaz pendant la SSF (Bellon-Maurel et al., 2003). La limitation en eau peut réduire le taux de croissance microbienne et diminuer la formation des produits souhaités, tels que les enzymes (Farinas et al., 2015).

L'humidité est un facteur intimement lié à la définition de la SSF et aux caractéristiques du substrat. L'importance de l'eau dans le système est due au fait que la grande majorité des cellules viables se caractérisent par une teneur en humidité de 70 à 80%. D'une manière générale, il a été établi que dans le cas des bactéries, la teneur en humidité de la matrice solide doit dépasser les 70%. Pour la levure, la plage d'humidité peut être un peu large, entre 72 et

60%, et dans le cas des champignons, la plage peut aller de 20 à 70%. Cette certitude en elle-même pourrait représenter un grand avantage pour le développement d'un processus SSF spécifique. Dans le cas où le niveau d'humidité optimal pour la croissance des micro-organismes utilisés est relativement faible, cela pourrait constituer une barrière naturelle contre d'éventuels contaminants (Rodriguez et al., 2008).

### **III.3.3. La température**

La température de croissance des micro-organismes est également un facteur essentiel pour réguler la SSF. En général, elle est réalisée par des microorganismes mésophiles, tandis que les champignons, en particulier, peuvent survivre dans un intervalle de températures large, allant de 20–55°C. Un contrôle optimal de la température donnera un rendement maximal en produit souhaité, car les microorganismes fonctionnent mieux à leur température optimale. De plus, la génération de chaleur lors de la SSF est directement proportionnelle à l'activité métabolique du microorganisme utilisé (Srivastava et al., 2019).

### **III.3.4. Taille des particules de substrat**

La taille idéale des particules est souvent un équilibre entre la facilité d'accès des microorganismes aux nutriments et la disponibilité de l'oxygène. Dans la SSF, les substrats couramment utilisés sont insolubles dans l'eau. En pratique, ces substrats absorbent l'eau, permettant ainsi aux micro-organismes de croître et d'effectuer leurs activités métaboliques. Les bactéries et les levures se développent à la surface du substrat, tandis que le mycélium fongique pénètre dans ses particules. Les substrats naturels sont abondants et moins coûteux que les substrats synthétiques, mais ils nécessitent souvent un prétraitement pour rendre leurs composants chimiques plus accessibles et leur structure physique plus sensible à la pénétration de mycélium. Dans le traitement physique, le hachage et le broyage sont utilisés pour réduire la taille des particules. Le traitement chimique comprend le chauffage à haute température, traitement acide ou alcalin. Une supplémentation en nutriments peut être nécessaire pour stimuler la croissance et induire la synthèse des enzymes (Bettache et al., 2014).

### **III.3.5. Aération et agitation**

En SSF, l'aération permet de maintenir des conditions aérobies, d'éliminer le CO<sub>2</sub> généré et de réguler la température et le niveau d'humidité du substrat. L'environnement gazeux dans les systèmes SSF peut affecter de manière significative les niveaux de croissance cellulaire et de production d'enzymes. Dans les cultures aérobies SmF, l'apport d'oxygène est souvent le

facteur limitant la croissance, en raison de son faible solubilité dans l'eau, tandis que dans les procédés SSF, l'accès à l'oxygène atmosphérique est libre. L'aération est plus facile en SSF vu la diffusion rapide de l'oxygène à travers le film d'eau entourant les particules du substrat (Farinas et al., 2015).

L'agitation est l'un des paramètres les plus importants dans les fermentations aérobies car elle assure l'homogénéité du système. L'activité microbienne est affectée par le mélange alors que dans d'autres cas, aucun effet indésirable n'est constaté. Il faut toutefois souligner que l'agitation n'est pas utilisée dans de nombreux processus SSF aérobies effectués en réacteurs statiques, tels que les fermenteurs à plateaux. En revanche, l'agitation est généralement un élément essentiel dans des bioréacteurs SSF à agitation continue (Barrios-González, 2012).

#### **IV. *Penicillium* sp.**

Dans le règne fongique, les champignons filamenteux se distinguent en tant qu'organismes eucaryotes non vasculaires, généralement multicellulaires. La croissance et le développement de ces organismes sont définis par des filaments connus sous le nom des hyphes, qui forment un réseau appelé mycélium. Ce réseau explore son environnement à la recherche de nutriments *via* la sécrétion des exoenzymes qui digèrent les grosses molécules, telles que les polysaccharides, les lipides et les protéines, en petites molécules qui peuvent être absorbées et utilisées. Les moisissures sont généralement considérés comme des hétérotrophes qui dépendent uniquement des nutriments provenant d'autres organismes pour leur métabolisme (McConnaughey, 2014; Powers-Fletcher et al., 2016).

Les champignons filamenteux se développent sous forme de mycélium végétatif, capable de produire des spores sexuées ou asexuées (conidies), selon les espèces et les conditions, pour leur reproduction. Les spores marquent à la fois le début et la fin du cycle de vie des champignons filamenteux (Drougard, 2018). Les systèmes à base de champignons filamenteux présentent plusieurs avantages par rapport aux autres systèmes pour la production des enzymes, car la sécrétion élevée d'enzymes est un trait commun de leur mode de vie décomposeur (Su et al., 2012). Les espèces de champignons filamenteux sont omniprésentes vu la capacité de ce groupe de microorganismes à se développer sur presque n'importe quel substrat et dans des conditions difficiles comme pour le genre *Aspergillus* et *Penicillium* (Egbuta et al., 2017).



#### IV.1. Le genre *Penicillium*

Le nom *Penicillium* est dérivé de *penicillus*, qui signifie « petit pinceau », introduit par Link en 1809 (Houbraken et al., 2014) en décrivant les trois espèces: *P. candidum*, *P. glaucum* et *P. expansum*. Les *Penicillium* spp. sont des champignons imparfaits faisant partie du phylum des ascomycètes, qui est largement répandue dans le sol, l'air et sur diverses surfaces végétales et alimentaires (ex. bois, compost, épices, céréales, fruits frais, légumes,...etc.) (Yadav et al., 2018). Les impacts positifs incluent l'utilisation de ces champignons dans les fermentations alimentaires, la production d'acides organiques et d'enzymes (Houbraken et al., 2014). *Penicillium* est un vaste genre comptant environ 300 espèces reconnues, dont 50 ou plus sont courantes. Presque toutes les espèces poussent bien sur une large gamme de milieux de laboratoire, produisant de petites colonies circulaires, généralement abondamment avec des couleurs gris-vert ou gris-bleu (Pitt, 2014).

##### IV.1.1. Reproduction

Les champignons ont deux modes de reproduction, à savoir asexuée et sexuée. Le genre *Penicillium* était considéré comme anamorphe, caractérisé par une reproduction asexuée basée sur une production abondante de conidies. Les formes sexuées, appelées téléomorphes, étaient associées aux genres *Eupenicillium* et *Talaromyces* (Dyer et Kück, 2017).

##### IV.1.2. Taxonomie de *Penicilium*

Initialement, la classification des espèces de *Penicillium* était établie en se fondant sur des caractéristiques macro et microscopiques, ce qui la rendait complexe en raison de la grande diversité phénotypique de ces champignons. Avec environ 300 espèces répertoriées, le genre *Penicillium* est classé dans le taxon suivant (Houbraken et Samson, 2011) :

Règne : Mycota

Embranchement : Eumycota

Sous-embranchement : Ascomycotina

Classe : Euascomycètes

Ordre : Eurotiales

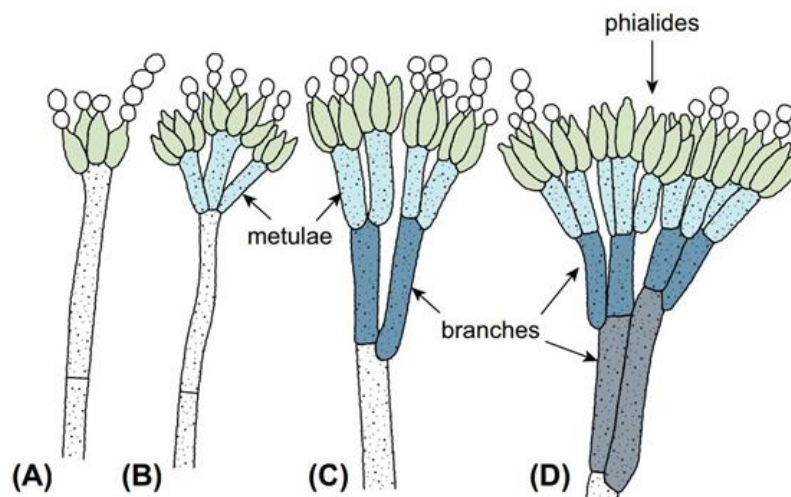
Famille : Aspergillaceae

Genre : *Penicillium*

### IV.1.3. Morphologie de *Penicillium*

Les colonies de *Penicillium* se développent généralement rapidement et ont une couleur verdâtre, parfois blanche. Elles sont constituées de conidiophores densément regroupés. Au microscope, on observe des chaînes de conidies unicellulaires produites en succession basipète à partir d'une cellule conidiogène spécialisée, appelée phialide. Ces chaînes, nommées basocatenates, présentent la plus jeune conidie à l'extrémité basale ou proximale de la chaîne. Les phialides peuvent se former individuellement, en groupes, ou à partir de métules ramifiées, donnant une apparence de pinceau, pénicille. Ce dernier peut comporter à la fois des branches et des métules (avant-dernières branches portant un verticille de phialides). Toutes les cellules positionnées entre les métules et les stipes des conidiophores sont désignées sous le nom de branches.

La ramification est utilisée comme caractéristique importante pour identifier les espèces de *Penicillium*. La ramification peut être simple (non ramifiée ou monoverticillée), à un étage (biverticillée symétrique), à deux étages (biverticillée-asymétrique) ou à trois étages ou plus (**Fig. 4**). Les conidiophores sont hyalins, avec des parois lisses ou rugueuses. Les phialides ont généralement une forme de flacon avec une base cylindrique et un col distinct, ou une forme lancéolée avec une base étroite se rétrécissant vers un sommet pointu. Les conidies se forment en longues chaînes sèches, divergentes ou en colonnes, de forme globuleuses, ellipsoïdales, cylindriques ou fusiformes, hyalines ou verdâtres, à parois lisses ou rugueuses (Srinivasan et al., 2020).



**Figure 04:** Structure des conidiophores de *Penicillium* : (A) *Penicillium* monoverticillés, (B) *Penicillium* biverticillés, (C) *Penicillium* triverticillés, (D) *Penicillium* quaterverticillés (Srinivasan et al., 2020).

**IV.1.4. Applications industrielles**

Le genre *Penicilium* revêt une importance majeure dans l'environnement naturel ainsi que dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Nigam et al., 2018). Ce genre est utilisé comme source importante de production de cocktails d'enzymes contenant des xylanases, glucanases, protéases acides, pectinases, cellulase et des lipases. Ces enzymes pourraient être utilisées également comme additifs dans l'alimentation animale pour améliorer l'efficacité de digestion (Cai et Yang, 2023).

Les *Penicillium* spp. représentent une source riche de composés ayant une activité antimicrobienne, et c'est de ce genre qu'a émergé l'aube de l'âge d'or de la découverte d'antibiotiques naturels. Il existe toujours un besoin urgent de trouver de nouveaux composés antimicrobiens capables de combattre les souches fongiques et bactériennes multi-résistantes, ayant de nouveaux modes d'action, qui constitue un moyen efficace permettant aux bactéries d'échapper à l'élimination et l'augmentation de la virulence. Les champignons *Penicillium* représentent toujours une source potentielle de composés antimicrobiens, même plusieurs années après la découverte de la pénicilline (Lindsay et al., 2023).

# *Chapitre II*

## *Matériel & Méthodes*

Nous avons conduit notre démarche expérimentale dans les laboratoires pédagogiques de Microbiologie et Biochimie de la faculté SNV-ST de l'Université Akli Mohand Oulhadj à Bouira. L'objectif principal de ce travail était d'améliorer les conditions de production de quelques enzymes extracellulaires, principalement hydrolytiques, par une souche fongique locale *via* la fermentation sur milieu solide.

## I. Matériel

### I.1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique, incluant la verrerie, les réactifs, les produits chimiques, l'équipement, ainsi que les appareils utilisés durant notre partie expérimentale est détaillé dans l'**Annexe 1**.

### I.2. Matériel biologique

La souche fongique utilisée pour la production des enzymes d'intérêt par SSF est *Penicillium* sp., isolée à partir d'un sol agricole de la Commune d'Aomar, Wilaya de Bouira, au cours de l'année 2020-2021 (Bensmail et al., 2021). Cette souche a été purifiée au niveau du laboratoire de Microbiologie du Département de Biologie (FSNV-ST, Université de Bouira), puis conservée à 4°C sur gélose PDA inclinée (voir composition: **Annexe 2**). Le maintien de la survie de la souche a été assuré par des repiquages sur la même gélose tous les trois à six mois.

Des cultures solides sur son de blé dur, acheté auprès d'un moulin à grains au niveau de la Commune d'Aomar (Wilaya de Bouira), ont été conduites dans le but de produire les enzymes hydrolytiques et lignocellulosiques d'intérêt.

## II. Méthodes

### II.1. Revivification de la souche

Cette étape a été initiée par la préparation des boîtes de Pétri contenant la gélose PDA stérile par autoclavage à 121°C pendant 20 min. A l'aide d'une anse de platine stérile, quelques spores et/ou fragments mycéliens ont été prélevés à partir du tube de conservation contenant la souche de *Penicillium* sp., puis ensemencés sur les boîtes de Pétri déjà préparées. Ces dernières ont été incubées pendant 5–7 jours à 30°C.

### II.2. Vérification des caractéristiques de *Penicillium* sp.

Afin d'examiner les propriétés macroscopiques de la souche *Penicillium* sp., de nouvelles cultures sur milieu PDA ont été préparées par transfert de quelques spores ou des

fragments mycéliens sur un milieu neuf et stérile (PAD et Sabouraud). Après 4 à 5 jours d'incubation à 30°C, les propriétés incluant la couleur, les dimensions, la consistance et la croissance des colonies, ainsi que l'aspect du revers ont été évaluées à l'œil nu. Ce test a été complété par celui visant les caractéristiques microscopiques de la souche d'intérêt (couleur, l'apparence et la taille des conidiophores, la forme des spores, les conidiophores et les hyphes,...etc.). Cet examen microscopique a été réalisé à l'état frais à partir des cultures jeunes en étalant quelques fragments de mycélium sur des lames propres, dont certaines ont été colorées par la solution au bleu de méthylène (1%, p/v) pendant 5 min.

### II.3. Détection de la production des enzymes hydrolytiques et lignocellulotiques

La méthode de Hankin et Anagnostakis proposée en 1975 a été utilisée pour vérifier la capacité de *Penicillium* sp. à produire plusieurs enzymes hydrolytiques (amylases, protéases, chitinases, gélatinases, lipases et pectinases) et lignocellulosiques (cellulases et laccases) sur des géloses ayant des compositions spécifiques, dont le substrat de l'enzyme recherchée est introduit comme la seule source de carbone ou d'azote. L'évaluation de l'activité enzymatique a pris en compte différents critères, comme la présence ou l'absence de la zone d'hydrolyse, la modification de la couleur du milieu, ou l'apparition d'une couleur spécifique autour de la colonie, selon le type du milieu employé.

Pour mettre en évidence la production des huit types d'enzymes visées, quelques spores prélevées à partir d'une culture jeune de *Penicillium* sp. ont été ensemencées au centre des différentes géloses en boîtes de Pétri. Après incubation à 30°C pendant des périodes variables, la mise en évidence de l'expression des enzymes a été évaluée sur la base de consignes répertoriées dans les **Tableaux II** et **III**, détaillant en plus la composition des milieux utilisés.

**Tableau II:** Composition des milieux de criblage des enzymes laccases et cellulases.

Enzymes recherchées	Composition du milieu (g/L)	Lecture des résultats	Références
Laccases	0,04 g du colorant bleu de bromophénol a été ajouté à 200 mL de gélose PDA en surfusion suivi d'une stérilisation à 121°C pendant 20 min.	La présence d'une zone jaune autour des colonies confirme la production de laccases.	Tekere et al., 2001
	1 g d'acide tannique dissous dans un volume réduit d'eau distillée, a été additionné à 200 mL de la gélose PDA en surfusion après stérilisation.	La formation d'une couleur brun rougeâtre sous le revers indique la sécrétion de laccases.	Kiiskinen et al., 2004
Cellulases	Saccharose 30, NaNO <sub>3</sub> 3, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5; KCl 0,5; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,01; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1; agar-agar 12, carboxyméthyl-cellulose (CMC) 10.	La sécrétion de cellulases est déterminée par l'apparition d'une zone d'hydrolyse claire autour des colonies, suite au traitement par une solution diluée de Lugol.	Bellaouchi et al., 2021

Tableau III: Méthodes de criblage de quelques enzymes hydrolytiques.

Enzymes recherchées	Composition du milieu (g/L)	Lecture des résultats	Références
<b>Protéases</b>	<i>Czapeck-Dox Agar</i> : saccharose 30; NaNO <sub>3</sub> 3; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5; KCl 0,5; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,01; caséine 1; agar-agar 15.	La détection de la zone d'hydrolyse autour des colonies capables de dégrader la caséine se voie directement, sans besoin d'additifs supplémentaires.	Agrawal et al., 2005
	<i>Casein Agar Medium</i> : extrait de pomme de terre 30, caséine 5, agar-agar 24.		Sattar et al., 2019
<b>Amylases</b>	Amidon 2, peptone 1, extrait de levure 1, agar-agar 15	Les boîtes ont été inondées avec une solution aqueuse d'IKI à 1%. La formation d'une zone jaune ou claire autour des colonies et le développement d'une couleur bleue sur la surface du milieu indiquent l'hydrolyse de l'amidon	Abdel-Raheem et Shearer, 2002
<b>Pectinases</b>	<i>Milieu MS modifié</i> : KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2, NH <sub>4</sub> Cl 1, NaCl 1, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,10, pectine 2, agar-agar 15.	Après inondation des boîtes avec une solution d'iodure de potassium, un halo clair se forme où la dépolymérisation de la pectine s'est produite.	Kabir et Tasmim, 2019
<b>Chitinases</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,30, acide citrique 1, agar-agar 15, chitine colloïdale 4,50, pourpre de bromocrésol 0,15 et 0,2 mL de Tween 80. Le pH a été ajusté à 4,70 avant stérilisation par autoclave.	La dégradation de la chitine en N-acétyl-glucosamine entraîne un déplacement du pH de milieu vers l'alcalinité induisant ainsi un virage de la couleur de pourpre de bromocrésol (du jaune au violet) autour de la colonie fongique productrice de chitinases.	Agrawal et Kotasthane, 2012
<b>Gélatinases</b>	Une solution de gélatine à 8% (p/v) dans l'eau distillée a été stérilisée séparément puis ajoutée au milieu PDA en surfusion à raison de 5% (v/v).	La production de gélatinases est positive en cas de formation d'une zone claire autour des colonies. L'ajout d'acide trichloroacétique rend l'halo plus vif, facilitant ainsi la mesure du diamètre de la zone d'hydrolyse.	Abdel-Raheem et Shearer, 2002
<b>Lipases</b>	Peptone 10, NaCl 5, CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O 0,10, agar-agar 18, Tween 80 10 mL.	La lipolyse est confirmée par l'apparition d'une précipitation visuelle des cristaux de calcium autour de la colonie, provoquée par les acides gras libérés par la réaction d'hydrolyse.	Pham et al., 2021

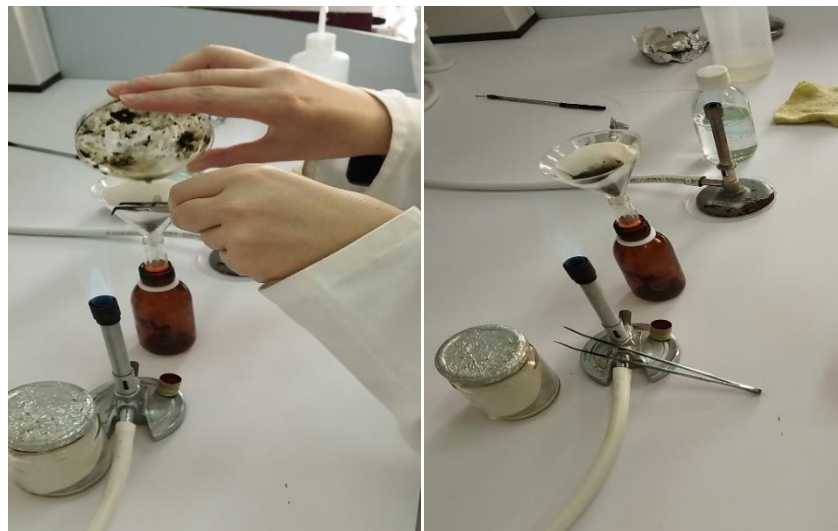
Tous les tests de criblage ont été réalisés en triple sur des milieux spécifiques supplémentés aux antibiotiques (chloramphénicol 0,05 g/L, amoxicilline 0,5 g/L) pour empêcher la croissance bactérienne. Après une incubation à 30°C, l'activité enzymatique a été évaluée en mesurant soit le diamètre de la zone claire en millimètres, soit l'intensité de la coloration autour des colonies.

#### II.4. Production des enzymes d'intérêt

Le processus choisi pour produire les enzymes cibles (amylases, protéases, enzymes coagulant le lait et laccases) par la souche *Penicillium* sp. est la fermentation sur milieu solide (SSF). Avant de lancer chaque expérience de fermentation, des étapes préliminaires ont été adoptées pour récupérer des spores jeunes et préparer l'inoculum.

##### II.4.1. Préparation de l'inoculum

Suite à la culture de *Penicillium* sp. sur milieu PDA pendant 5 jours à 30°C, la suspension de spores a été préparée en grattant chaque boîte de Pétri inondée par 10 mL d'eau distillée contenant 0,1% de Tween 80 (v/v) (Prasanna et al., 2016), à l'aide d'une anse de platine stérile pour libérer les spores. Toujours sous des conditions aseptiques, la suspension a été filtrée à travers un papier Wattman n°3 déposé sur un entonnoir stérile (**Fig. 5**), afin d'éliminer les résidus de mycélium et de milieu de culture, et pour récupérer une suspension mère concentrée.



**Figure 05:** Les étapes de préparation d'inoculum de *Penicillium* sp. pour lancer la fermentation.



### II.4.2. Dénombrement des spores

Après une étape de dilution de la suspension mère, le nombre des spores a été directement évalué en utilisant une cellule de Malassez sous microscope photonique avec un G×400 (**Fig. 6**). Une fois que la taille d'inoculum désirée a été aboutie, une mesure de la turbidité de cette suspension a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à 650 nm contre une solution de Tween 80 à 0,1% (v/v) utilisée comme blanc. Cette longueur d'onde représente le  $\lambda_{\max}$  de la suspension fongique déterminé sur la base d'un balayage réalisé dans le domaine de la lumière visible. Avant chaque inoculation du milieu de fermentation, des lectures photométriques ont été effectuées pour avoir une absorbance de 0,075 correspondant à la taille d'inoculum choisie ( $2 \times 10^7$  spores/mL), sans passer par le dénombrement direct sous microscope.



**Figure 06:** Dénombrement des spores de *Penicillium* sp. sur cellule de Malassez.

### II.4.3. Conduite de la fermentation et détermination des conditions optimales de production

Dans le but de définir les conditions idéales de production des quatre enzymes par *Penicillium* sp., la méthode classique d'un seul facteur à la fois a été choisie. Malgré ses limitations, le temps prolongé de l'expérimentation et le manque de considération des interactions entre les paramètres, cette approche reste l'outil le plus couramment utilisé en cas où des informations préliminaires sur les conditions opératoires spécifiques ne sont pas disponibles (ex. nouvelle souche utilisée, nouveau substrat de la SSF, un système de fermentation différent,...) (Queiroga et al., 2013; Irfan et al., 2014).

La méthode est basée sur une stratégie différente de celle des plans d'expériences, où un seul facteur affectant le processus étudié est varié, par contre les autres paramètres sont maintenus constants (Bader et al., 2023). Cela permet d'évaluer l'effet individuel d'un paramètre et d'identifier sa valeur optimale avant de passer à l'optimisation du facteur suivant (Wang et Wan, 2009).

Afin d'améliorer les conditions de production des enzymes cibles par *Penicillium sp.*, la température de fermentation, le pH du milieu, le taux d'humidité, la solution d'oligoéléments ajoutée au substrat et le temps d'incubation ont été choisis comme les premiers paramètres à optimiser. Afin d'atteindre notre objectif, le son de blé dur a été appliqué comme substrat de la SSF. Grâce à sa forte teneur en protéines, amidon, cellulose, sels minéraux et autres composants, ce milieu favorise et soutient la production des enzymes d'intérêt (Balandrán-Quintana et al., 2014; Li et al., 2022).

### 1. Effet de la température d'incubation

Pour chaque essai, 10 g du son de blé dur correctement broyé ont été introduits dans un Erlenmeyer de 250 mL puis mélangés avec un volume bien défini de la solution minérale Czapeck-Dox (composition en g/L:  $\text{NaNO}_3$  2,50,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,50,  $\text{KCl}$  0,50) (Tunga et al., 1998), pour avoir un taux d'humidité de 51,6% déterminé selon la méthode d'AOAC et Horwitz (1975). Avant l'autoclavage, le pH initial de la fermentation a été ajusté à 4,0. Les Erlenmeyers ont été bouchés avec du coton cardé, enveloppés du papier aluminium, puis stérilisés à 121°C pendant 20 min. Après refroidissement, 1 mL de la suspension de spores contenant  $2 \times 10^7$  spores/mL a été inoculé dans chaque milieu, suivi d'une incubation à différentes températures (20, 25, 30, 35 et 40°C) pendant 72 h. Les activités enzymatiques ont été mesurées après 3 jours d'incubation suite à l'étape d'extraction.

### 2. Effet du pH de milieu minéral

Afin de déterminer le pH optimal pour la production des enzymes recherchées, nous avons effectué des fermentations à la température optimale préalablement déterminée, en suivant le même protocole expérimental comme précédemment, mais en ajustant le pH de la solution minérale (Czapeck-Dox) à différentes valeurs: 3, 4, 5, 6 et 7. L'ajustement du pH a été réalisé en utilisant une solution d'HCl 1 N et/ou du NaOH 1 N.

### 3. Effet du taux d'humidité

L'effet de la teneur en humidité sur la production des enzymes a été examiné et optimisé en cultivant la souche *Penicillium* sp. sur son de blé en présence de différents volumes de la solution saline, correspondant aux taux d'humidité suivants: 38,26%, 51,6%, 64,25%, 69,7% et 73,6%. La méthode de détermination des taux d'humidité est détaillée dans l'Annexe 3. La fermentation a été opérée sous les conditions optimales déterminées jusqu'à ce stade pendant une période de trois jours.

### 4. Effet de la solution minérale

Après la sélection des optimums pour les trois facteurs précédents, nous avons évalué par la suite l'effet d'addition de quatre solutions minérales en plus de celle de Czapeck-Dox : la solution M-15, la solution M-9, la solution SM et la solution SM aux oligoéléments (SMO) (Tableau IV). En SSF, l'ajout du milieu minéral au substrat solide est considéré comme un moyen efficace pour régler son pH, l'enrichir en oligo-éléments et ajuster le niveau d'humidité (Singhania et Pandey, 2017). Les fermentations sont conduites pendant 72 h sous les conditions optimales déterminées jusqu'à cette étape.

**Tableau IV:** Composition des solutions minérales utilisées.

Solution	Composition en g/L	Références
M-15	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 3; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1; FeSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 0,01	
M-9	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 12,8; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3; NaCl 0,5; NH <sub>4</sub> Cl 1; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5; CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,01	Tunga et al., 1998
SM	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 5, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1, NaCl 1	Sumantha et al., 2005
SMO	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 5, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1, NaCl 1 avec 0,1% (v/v) de la solution d'oligoéléments (p/v) ayant la composition suivante: 0,08% MnSO <sub>4</sub> , 0,17% ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,25% FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.	Binod et al., 2005

### 5. Effet du temps d'incubation

Pour analyser le profil de production des enzymes par *Penicillium* sp. et déterminer la durée d'incubation optimale permettant d'atteindre les activités enzymatiques maximales de l'extrait brut, nous avons lancé la fermentation cette fois à différentes durées (1 à 5 jours), avec un intervalle de 24 h sous les conditions optimales antérieurement définies.

#### II.4.4. Extraction des enzymes

Après chaque phase de fermentation, les enzymes produites ainsi que d'autres métabolites sont extraits du substrat fermenté en utilisant 50 mL d'eau distillée, sous agitation (200 rpm) pendant 2 h à 30°C, dans un incubateur-agitateur horizontal (**Fig. 7**). Les mélanges résultants sont ensuite filtrés séparément à travers une gaze, ensuite centrifugés à 5500 rpm pendant 10 min à 4°C, afin d'éliminer les spores, les débris de mycélium et autres particules insolubles du substrat. Les surnageants récupérés contenant les enzymes produites ont été utilisés pour le dosage et la détermination des différentes activités enzymatiques (Campos et al., 2024).



**Figure 07:** Etapes d'extraction des enzymes d'intérêt à partir des moûts de fermentation *via* un système d'agitation horizontale.

#### II.5. Dosage des activités enzymatiques

Les extraits enzymatiques collectés après chaque étape de fermentation ont été soumis à des dosages identiques pour évaluer leur teneur en protéines, ainsi que leurs activités protéolytique, coagulante, amylasique et laccase. Chaque dosage a été réalisé en triplicata et les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type.

##### II.5.1. Mesure de l'activité protéolytique

- **Principe**

L'évaluation de l'activité protéolytique des extraits bruts a été réalisée en adaptant la méthode à la caséine d'Anson (1938) et en suivant le protocole de Lowry et al. (1951). Cette approche repose sur la quantification de la concentration en tyrosine après l'hydrolyse enzymatique de la caséine, utilisée comme substrat, en peptides simples et acides aminés libres (Chughtai et al., 2023). L'action enzymatique est bloquée par l'addition de TCA, qui précipite également les protéines non hydrolysées, éliminées ensuite par centrifugation et/ou

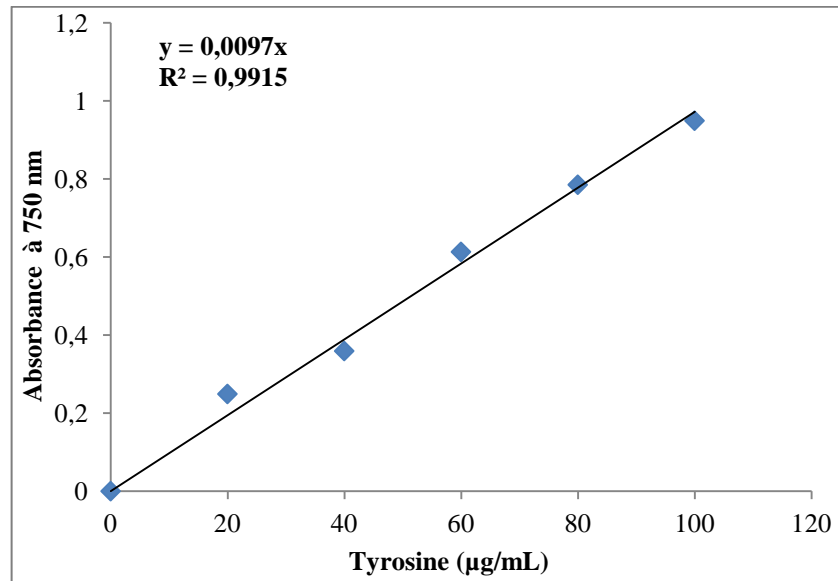
par filtration. Le réactif de Folin-Ciocalteu est ensuite introduit dans la solution finale. Ce réactif produit un complexe bleu après réaction avec les résidus de tyrosine et de tryptophane. (Sidikou et al., 2005; Ras et al., 2008).

- **Mode opératoire**

Le dosage de l'activité protéolytique (AP) se déroule en deux étapes distinctes: (1) la préparation du milieu réactionnel (impliquant l'action de l'enzyme sur la caséine) et (2) l'estimation de la quantité des produits formés par un dosage colorimétrique. Pour la première étape, on mélange dans des tubes coniques 0,5 mL de chaque extrait enzymatique avec 2,5 mL de la solution de caséine à 2,5% (p/v) préparée dans le tampon citrate/phosphate de Na (0,1 M; pH 5,2) (voir préparation: **Annexe 4**), ainsi que 0,5 mL de ce dernier. Suite à l'agitation, les mélanges réactionnels ont été incubés dans un bain Marie à 40°C pendant 30 min. Ensuite, 5 mL de la solution de TCA à 4% (p/v) ont été ajoutés pour stopper la réaction. Les mélanges ont été centrifugés à 5500 rpm pendant 10 min, et les surnageants récupérés contiennent les produits de la réaction d'hydrolyse. Le blanc a été préparé par l'eau distillée à la place de l'extrait enzymatique.

Pour la deuxième étape, 0,5 mL a été retiré de chaque surnageant, puis mélangé avec 0,5 mL du tampon citrate/phosphate de sodium (0,1 ; pH 5,2), additionné de 2,5 mL de carbonate de sodium (2%, p/v) préparé dans du NaOH à 0,4 N. Après un repos de 10 min à température ambiante, un volume de 0,5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1:10, v/v) a été ajouté dans chaque tube à essai. L'absorbance des échantillons a été mesurée à 750 nm après 30 min d'incubation.

L'activité protéolytique a été calculée par référence à une courbe étalon (**Fig. 8**) établi en utilisant la tyrosine (1 mg/mL) comme standard (voir préparation: **Annexe 5**). Une unité d'activité (U) correspond à l'équivalent de 1 µg de tyrosine libéré/min/mL d'extrait enzymatique.



**Figure 08:** Courbe étalon de la tyrosine (1 mg/mL) pour le dosage de l'activité protéolytique.

### II.5.2. Détermination de l'activité coagulante

- **Principe**

La coagulation du lait se produit lorsque les micelles de caséines s'agrègent et précipitent, suite à la diminution du pH du lait près de leur point isoélectrique (~4,60). Ce processus peut également être déclenché par une enzyme protéolytique. Cela favorise la coagulation du complexe de caséines en transformant le phosphocaseinate de calcium soluble dans le lait en phospho-paracaseinate insoluble (Ilboudo et al., 2012).

- **Mode opératoire**

L'activité coagulante (AC) des extraits récupérés a été mesurée selon la méthode utilisée par Arima et al. (1970). Le substrat était du lait écrémé (0% matière grasse) dissout dans la solution du chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) à 10 mM. Le pH du substrat a été ajusté à 6,40 à l'aide d'une solution du NaOH et/ou d'HCl (0,1 N). Après une période de repos (1 h à 27°C), on a ajouté 1 mL de chaque extrait enzymatique à 10 mL du lait écrémé pré-incubé à 35°C pendant 15 min. Le temps requis pour initier l'apparition des premiers flocons de la coagulation a été enregistré pour chaque tube, maintenu à 35°C et subissant un mouvement de rotation long de temps-en-temps dans le bain Marie.

L'activité coagulante a été quantifiée en utilisant l'unité de force coagulante de Soxhlet. Cette unité représente le nombre d'unités de poids ou de volume du lait coagulable en 40 min à 35°C par unité de poids ou de volume de la préparation enzymatique, selon la relation suivante:

$$\text{AC (US/mL)} = \frac{2400 \times V1}{T \times V2}$$

Où :

**2400**: 40 min × 60 sec.

**V<sub>1</sub>**: volume du lait écrémé à coaguler.

**V<sub>2</sub>**: volume de l'extrait enzymatique utilisé.

**T**: temps de coagulation (en sec).

### II.5.3. Dosage de l'activité amylasique

- **Principe**

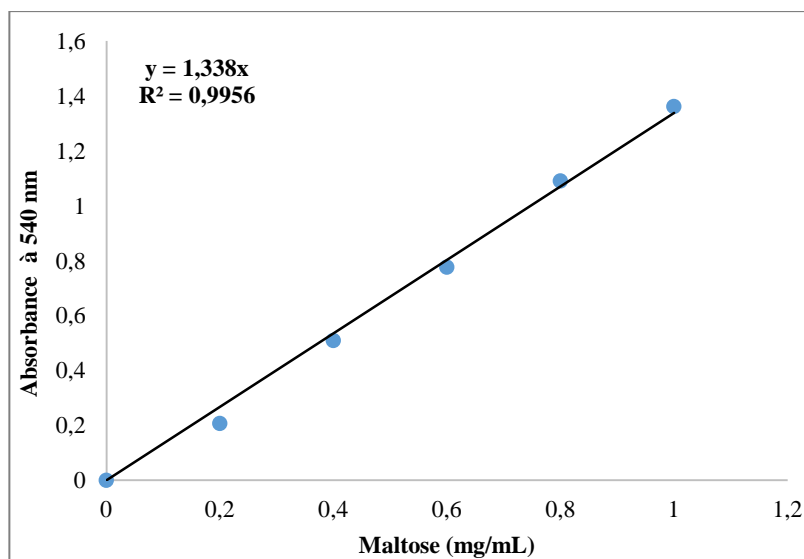
L'activité amylase (AAmy) a été testée en utilisant le protocole à l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) (Bernfeld, 1955), en utilisant l'amidon soluble comme substrat. Ce test implique principalement l'augmentation de la couleur intense du complexe « maltose libéré lors de l'hydrolyse d'amidon – réactif DNS », mesurée à 540 nm via un spectrophotomètre (Nolasco-Soria, 2021). En conditions chaudes et alcalines, l'acide 3,5-dinitrosalicylique est réduit par les propriétés réductrices du glucose. Ce réactif qui est initialement jaune, est transformé en acide 3-amino-5-nitrosalicylique, de couleur rouge orangée (Toumi, 2018).

- **Mode opératoire**

Un g de la poudre d'amidon dissous dans 100 mL du tampon phosphate (0,1 M, pH 5) (voir préparation: **Annexe 4**) est laissé sous agitation à 100°C jusqu'à l'ébullition. La solution obtenue a été incubée à 40°C pendant 15 min après une phase de refroidissement. Un échantillon dilué de 0,2 mL a été ajouté à 0,2 mL de la solution d'amidon déjà préparée, puis le mélange a été maintenu à la même température pendant 30 min. Par la suite, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 0,2 mL du réactif DNS (voir préparation: **Annexe 4**). Le développement de la couleur caractéristique a été observé après un chauffage à 100°C pendant 5 min.

Après refroidissement rapide, 0,9 mL d'eau distillée a été ajouté, et l'absorbance a été mesurée à 540 nm (Visvanathan et al., 2020). La concentration du maltose réducteur, en tant que le produit principal de l'activité amylase, a été mesurée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec le même sucre (**Fig. 9**) (voir préparation: **Annexe 5**). L'activité amylasique est exprimée comme la quantité d'extrait enzymatique nécessaire pour produire 1 mg de sucre réducteur (équivalent au maltose) par min et par mL d'extrait à 40°C. Le blanc, contenant de l'eau distillée à la place de l'extrait enzymatique brut, et un témoin négatif pour

chaque essai (extrait enzymatique dénaturé à 100°C pendant 15 min), ont également été inclus dans l'analyse (Nisa et al., 2021).



**Figure 09:** Courbe étalon du maltose (1 mg/mL) pour le dosage de l'activité amylase.

#### II.5.4. Dosage de l'activité laccase

- **Principe**

Le réactif de gaïacol a été signalé par Kalra et al. (2013) comme substrat efficace pour le dosage de l'activité Laccase. Cette dernière a été déterminée par la formation d'une couleur brun rougeâtre intense résultant de l'oxydation du gaïacol par une laccase (Albu et al., 2020).

- **Mode opératoire**

Pour doser cette activité, 1 mL de gaïacol (2 mM) utilisé comme substrat de la réaction, a été mélangé avec 1 mL d'extrait enzymatique brut et 3 mL du tampon acétate de sodium (10 mM, pH 5) (voir préparation: **Annexe 4**). Dans un autre tube, 1 mL d'eau distillée au lieu d'extrait brut a été ajouté aux autres réactifs pour préparer l'essai à blanc. En parallèle, un extrait enzymatique utilisé comme témoin négatif a été préalablement dénaturé à 100°C et analysé sous les mêmes conditions. Suite à un chauffage au bain marie pendant 15 min à 30°C, nous avons mesuré l'absorbance de chaque essai à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à 450 nm. L'activité laccase (AL) a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction du gaïacol à cette longueur d'onde.

Une unité d'activité enzymatique représente la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1  $\mu$ mol de gaïacol par minute dans des conditions optimales (Ali et al., 2020). Elle est calculée selon la formule suivante et exprimée en UI/mL:

$$AL = \frac{A \times V}{t \times e \times v}$$



Avec :

**A**: absorbance à 450 nm.

**V**: volume total du mélange.

**v**: volume de l'extrait enzymatique.

**t**: temps d'incubation (15 min).

**e**: coefficient d'extinction du gaïacol ( $0,674 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) (Abd El Monssef et al., 2016).

## II.6. Estimation de la teneur en protéines

- **Principe**

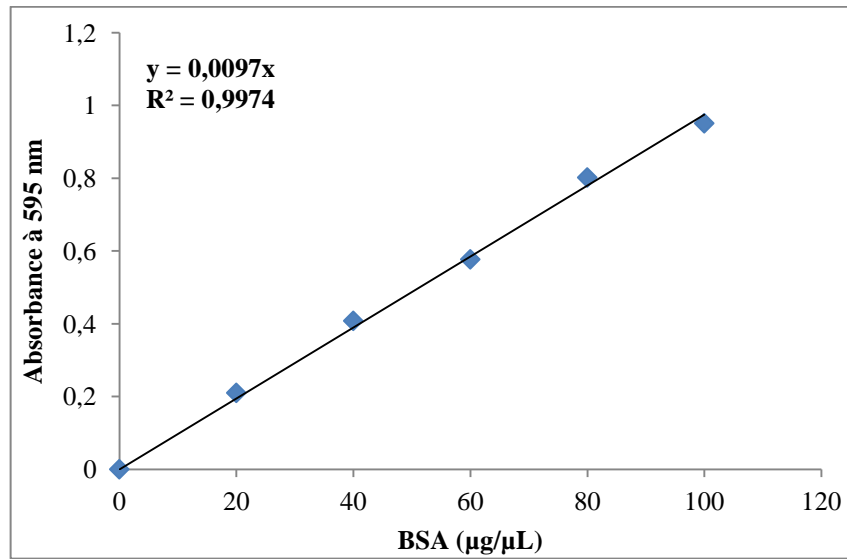
Le test de Bradford a été décrit pour la première fois par Bradford (1976) et est devenu la méthode privilégiée pour quantifier les protéines. Le mécanisme de base du test est la liaison du colorant bleu brillant de Coomassie G-250 à pH acide aux résidus d'acides aminés basiques tels que l'arginine, l'histidine, également à la phénylalanine, le tryptophane, les résidus de tyrosine, ainsi qu'aux interactions hydrophobes dans les protéines, ce qui entraîne un changement de couleur vers le bleu (Nouroozi et al., 2014). Les principaux avantages pratiques de cette méthode sont la simplicité de préparation du réactif et le développement rapide de la couleur (5–10 min) qui reste stable jusqu'à 30 min (Wilson et Walker, 2010).

- **Mode opératoire**

Le réactif de Bradford a été préparé selon un protocole bien défini (voir préparation: **Annexe 4**), ensuite le dosage de la teneur en protéines des extraits bruts a été accompli selon les étapes résumées dans le **Tableau V**. La concentration en protéines des extraits enzymatiques, exprimées en mg/mL, a été déterminée en exploitant l'équation de la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la BSA comme standard (**Fig. 10**) (voir préparation: **Annexe 5**).

**Tableau V:** Dosage de la teneur en protéines des extraits enzymatiques.

	Tube	Blanc	Echantillon
<b>Réactif et solutions</b>			
Extrait enzymatique (mL)		-	0,1
Réactif de Bradford (mL)		3	
Eau distillé (mL)		0,1	-
Homogénéisation au vortex puis incubation de 5 à 10 min à l'obscurité			
L'absorbance des échantillons est mesurée à 595 nm			



**Figure 10:** Courbe étalon de BSA (1 mg/mL) pour le dosage des protéines.

# *Chapitre III*

## *Résultats & Discussion*

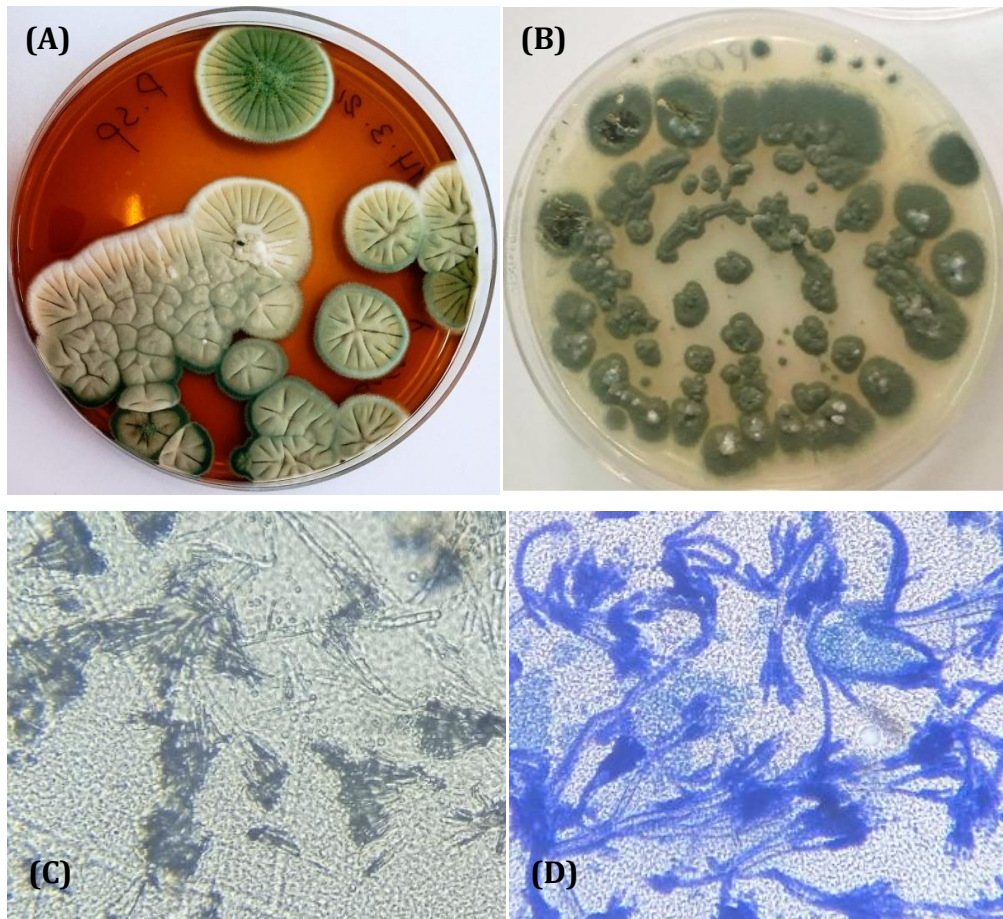
### III. Résultats et discussion

Dans cette partie du manuscrit, on va présenter les résultats obtenus en relation avec la mise en évidence de la synthèse de huit types d'enzymes (hydrolytiques et lignocellulosiques) par la souche locale *Penicillium* sp. sur des géloses spécifiques, ainsi que la recherche des conditions optimales de certains facteurs affectant le processus SSF, visant à maximiser la production de quelques enzymes d'intérêt en utilisant du son de blé dur comme substrat.

#### III.1. Caractéristiques phénotypiques de la souche *Penicillium* sp.

La première étape dans notre travail était le contrôle de la pureté et les propriétés macroscopiques et microscopiques de *Penicillium* sp., en utilisant deux milieux de culture PDA et Sabouraud, après une période d'incubation de 5 jours à 30°C.

- L'étude macroscopique a été effectuée directement à l'œil nu en examinant les cultures développées sur les deux milieux: les colonies de *Penicillium* sp. ont une forme circulaire avec la formation de crêtes sur le milieu Sabouraud (**Fig. 11A**). Elles sont caractérisées par un contour blanc, gris à vert foncé, par contre le centre des colonies varie du blanc-marron au vert vif ou un peu foncé. Les colonies sont moins poudreuses par rapport à celles cultivées sur milieu PDA (**Fig. 11B**). Ces dernières ont une couleur verte plus foncée et étalée avec des taches blanches sans la formation de crêtes.
- Les caractéristiques microscopiques de *Penicillium* sp. ont été examinées à l'aide d'un microscope optique. La souche se distingue par la présence de conidies en forme de pinceau, émises par des phialides portées par des métules, donnant naissance à des spores sphériques unicellulaires, abondantes et disposées en chaînes. Les conidiophores étaient hyalins et quaterverticillés. Le mycélium est septé en certaines régions (**Fig. 11 C, D**). L'observation a été plus claire après coloration au bleu de méthylène à 1%.




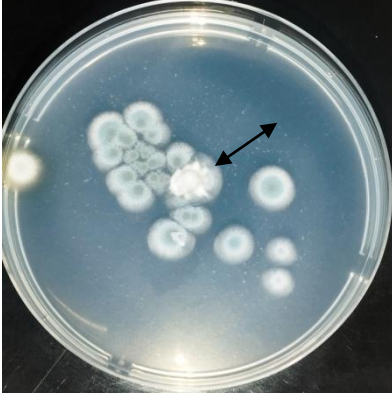


**Figure 11:** Aspects macroscopiques de *Penicillium* sp. sur milieu Sabouraud (A) et PDA (B), ainsi que les caractéristiques microscopiques de la souche (C, D) (G×400).




### III.2. Criblage de la production des enzymes d'intérêt

La capacité de *Penicillium* sp. à produire huit types d'enzymes à savoir: amylases, protéases, pectinases, laccases, gélatinases, chitinases, cellulases et lipases, a été évaluée sur des géloses spécifiques à base du substrat de chaque enzyme, comme inducteur de production.

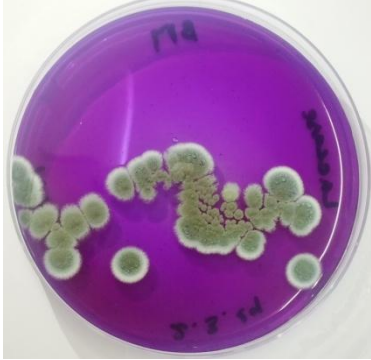

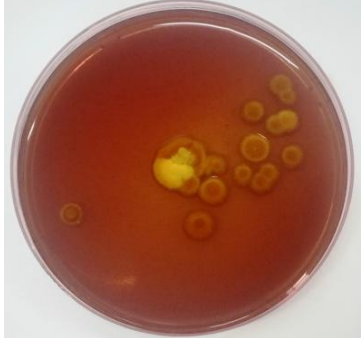
En se basant sur les résultats présentés dans les deux **Tableaux VI** et **VII**, la souche fongique est capable de produire les laccases sur milieu à base d'acide tannique, chitinases, amylases, protéases sur les deux milieux utilisés (CDA, CAM), lipases et pectinases. Par contre, elle est incapable de sécréter dans les milieux testés de cellulases, gélatinases et laccases sur milieu à base du bleu de bromophénol. Les zones d'hydrolyse obtenues ainsi que l'intensité des couleurs développées sont en relation étroite avec la quantité d'enzymes libérées dans chaque milieu, qui est influencée par la concentration des substrats utilisés et la période d'incubation.

Tableau VI: Résultats de criblage de six enzymes hydrolytiques produites par *Penicillium* sp.

Enzymes recherchées	Résultats	Photos des boîtes après (ou sans) révélation
Amylases	Positif: formation d'un halo d'hydrolyse de $12,70 \pm 1,15$ mm	
Protéases sur milieu CDA	Positif: apparition d'une zone d'hydrolyse de $30 \pm 1$ mm.	
Protéases sur milieu CAM	Positif: apparition d'une zone d'hydrolyse très claire de $13,33 \pm 1,05$ mm.	
Gélatinases	Aucune zone d'hydrolyse	

<p><b>Pectinases</b></p>	<p>Positif: dégradation de la pectine sur une zone de <math>17 \pm 0,0</math> mm.</p>	
<p><b>Chitinases</b></p>	<p>Positif (+): apparition d'une couleur pourpre un peu foncée autour des colonies, sur un milieu jaune.</p>	
<p><b>Lipases</b></p>	<p>Positif (++) : apparition d'une zone de cristaux de calcium précipité (jaune très claire) autour des colonies.</p>	

**Tableau VII:** Résultats du screening de la production de quelques enzymes lignocellulosiques par *Penicillium* sp.

Enzymes recherchées	Résultats	Photos des boîtes après (ou sans) révélation
Laccases sur milieu à base du bleu de bromophénol	Absence de la zone jaune autour des colonies.	
Laccases sur milieu à base d'acide tannique	Positif (++) : le revers des colonies est caractérisé par une couleur marron foncée.	
Cellulases	Absence de la zone d'hydrolyse.	

### III.3. Optimisation de la production d'enzymes par SSF

L'optimisation du processus SSF pour la production d'enzymes vise à maintenir des conditions de réaction optimales et homogènes, une qualité de produit constante et minimiser l'exposition au stress microbien. Pour chaque enzyme, une stratégie complète et détaillée d'optimisation et de caractérisation du processus impliquant la conception du processus, le type de fermentation et l'élucidation des paramètres pertinents influençant le rendement de production doit être déchiffrée (Kapoor et Kaira, 2016).

Suite à la confirmation de la capacité de *Penicillium* sp. à produire les enzymes d'intérêt ciblées, nous avons procédé à la production des enzymes protéolytiques, amylasiques et



enzymes coagulant le lait par SSF sur son de blé dur. L'objectif de cette étape était de déterminer les meilleures conditions physicochimiques assurant une production simultanée et maximale des trois enzymes, avec une estimation des conditions favorables pour l'expression de laccases sur ce milieu.

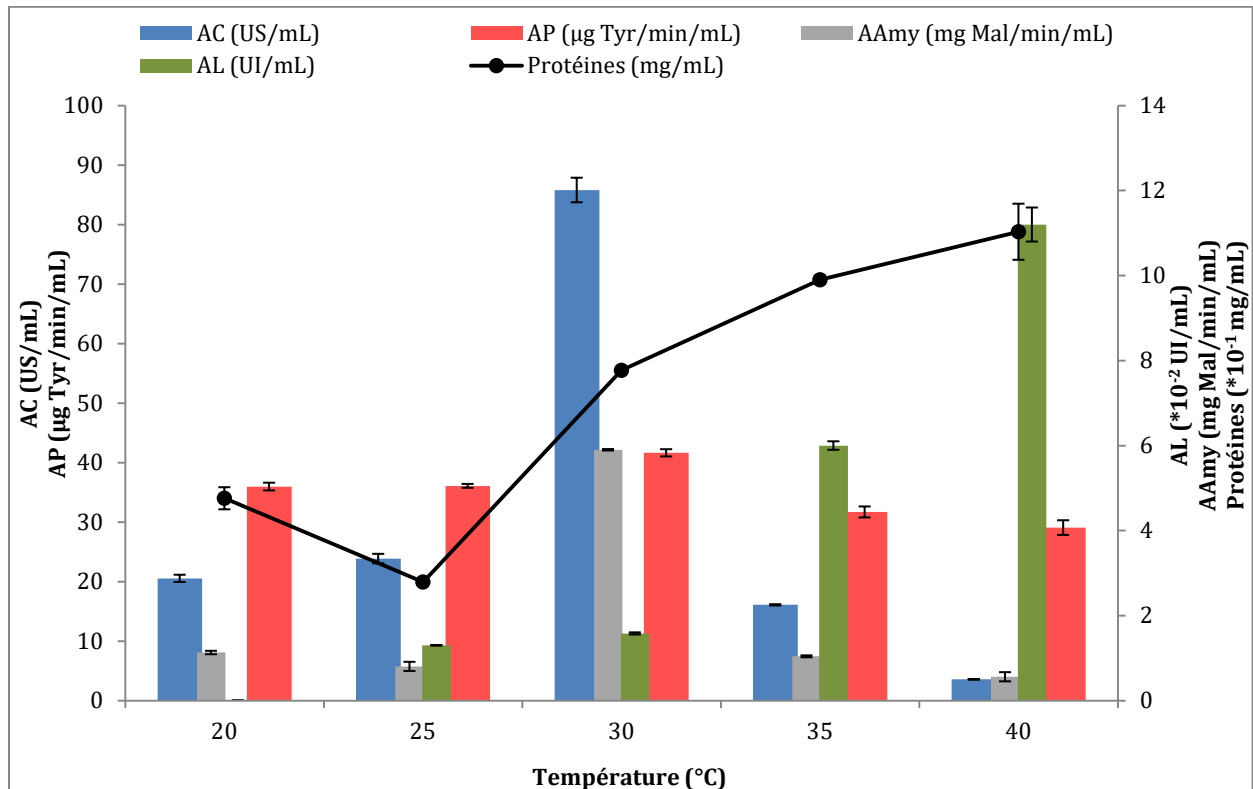
La méthode conventionnelle d'un seul facteur à la fois a été choisie comme moyen pour déterminer les conditions optimales de quelques facteurs clés, à savoir la température et le temps d'incubation, pH et le taux d'humidité ainsi que le type de la solution minérale à ajouter au milieu. Il est important de souligner que le son de blé a été employé comme l'unique substrat pour la SSF, sans l'adjonction d'autres additifs, comme les sources de carbone et d'azote, des surfactants, autres résidus agroindustriels,...etc.

### III.3.1. Influence de la température d'incubation

La température a une conséquence directe sur divers processus biologiques en affectant l'activité enzymatique, la dénaturation des protéines et la croissance des micro-organismes (Kapoor et Kaira, 2016). La température est l'une des variables les plus importantes affectant le processus SSF, car la croissance microbienne dans des conditions aérobies entraîne la libération de chaleur métabolique (Farinas et al., 2015).

Les fermentations que nous avons lancées pour la production des enzymes d'intérêt par *Penicillium* sp. ont été incubées à différentes températures (20, 25, 30, 35 et 40°C) afin d'étudier l'effet de ce paramètre.

Selon la **Figure 12**, il est clair que la croissance et la production des enzymes ciblées sont fortement influencées par la température d'incubation, avec un pic d'efficacité à 30°C pour les amylases ( $5,9 \pm 0,017$  mg Mal/min/mL), les protéases ( $41,63 \pm 0,61$  µg Tyr/min/mL) et les enzymes coagulantes ( $85,8 \pm 2,068$  US/mL). Des températures supérieures à l'optimum entraînent une réduction de ces activités, probablement due à la dénaturation des enzymes produites, l'évaporation d'eau et la diminution du taux d'humidité (Abdullah et al., 2017), qui ont influé négativement sur la croissance de *Penicillium* sp. comme c'est illustré dans la **Figure 13**. Étant donné que le processus SSF se produit en absence d'eau libre, il est difficile d'éliminer la chaleur métabolique produite lors de la croissance microbienne, en raison de la conductivité thermique limitée du substrat solide et de la faible capacité thermique de l'air. Par conséquent, la caractérisation de chaque souche en termes d'influence de la température sur la cinétique de croissance et la formation des produits désirés est essentielle pour le développement des bioprocédés SSF (Farinas et al., 2015).



**Figure 12:** Effet de la température d'incubation sur la production multienzymatique par *Penicillium* sp. (Conditions: solution Czapek-Dox, pH=4, H=51,6%, 72 h).



**Figure 13:** Impact de la température de fermentation sur la croissance de *Penicillium* sp. sous les conditions SSF.

À l'inverse, nous avons noté une augmentation de la production de laccases à mesure que la température augmente, atteignant une valeur maximale de  $0,113 \pm 0,0045$  UI/mL à 40°C. En parallèle, une diminution progressive des autres activités a été observée avec des températures plus faibles ou plus élevées par rapport à l'optimum, ce qui démontre que la souche de *Penicillium* sp. étudiée préfère les environnements mésophiles pour la croissance et la production de ces enzymes. Le taux maximal en protéines a été signalé à 40°C ( $11,03 \pm$

0,66 mg/mL), en raison de la croissance limitée et la faible consommation des protéines du milieu de fermentation. Par conséquent, la température de 30°C a été sélectionnée comme l'optimum afin de produire les enzymes recherchées pour la suite du travail.

Les travaux suivants montrent que la température optimale pour la production des amylases et/ou des protéases est similaire à celle déterminée dans notre étude (à 30°C) :

- Le travail d'Erdal et Taskin (2010) porte sur la production d' $\alpha$ -amylase sur les déchets d'amande comme substrat *via* le processus SSF. Un maximum de production (434 U/g) a été atteint après 6 jours d'incubation. Cette valeur est supérieure par un facteur de 5,3 si on la compare à nos résultats (82 U/g).
- La production maximale d'amylase de l'ordre de 9,5 mg Mal/min/mL a été obtenue par croissance de la souche *Penicillium* sp. sur son de blé à 30°C avec une durée d'incubation de 72 h (Abdullah et al., 2017).
- Les espèces isolées par Shruthi et al. (2020), correspondant à *P. camemberti*, *P. citrinum* et *P. chrysogenum* ont été capables d'exprimer des activités amylases de l'ordre de  $0,4 \pm 0,08$ ;  $0,27 \pm 0,015$  et  $0,48 \pm 0,005$  UI/mL, respectivement, après SSF sur son de blé pendant 5 jours. Toutes ces activités sont plus faibles par rapport à celle qui caractérise notre souche locale, l'équivalent de  $16,40 \pm 0,07$  UI/mL.
- Sreedevi et al. (2014) ont signalé la température de 30°C comme optimum pour la production de protéase alcaline par *Penicillium* sp. avec une activité de 3,9  $\mu$ g Tyr/min/mL.

Par contre, Sindhu et al. (2009a,b) ont confirmé que la production maximale d'amylases et de protéases par *P. janthinellum* (NCIM 4960) et *P. godlewskii* SBSS 25 a été observée à une température de 35°C. Le travail publié par Hasan et al. (2023) a montré que la production maximale de laccases par *P. martensii* NRC 345 est obtenue lorsque la température de fermentation est maintenue à 30°C.

Pour les coagulases, une activité coagulante de 8 US/mL a été obtenue par culture de la souche *P. camemberti* 0798400075 sur coques de café à 40°C pendant 48 h (de Oliveira Melo et al., 2023). Cette valeur est presque 10 fois plus faible à celle aboutie par notre souche.

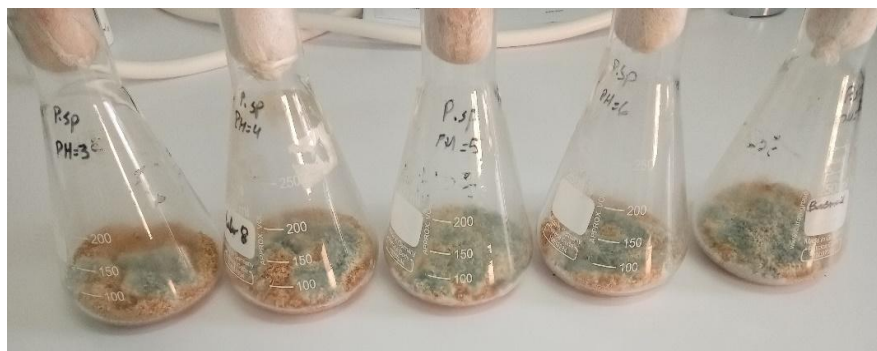
### III.3.2. Influence du pH du milieu minéral

Une autre variable à prendre en compte lors d'un processus SSF est le pH. Il exerce une influence majeure sur l'efficacité globale de la fermentation, puisqu'il se change en réponse aux activités métaboliques en cours (libération ou consommation des acides organiques)

(Farinas et al., 2015). Le pH du milieu affecte le transport de divers produits métaboliques, la stabilité et la sensibilité des enzymes, ainsi que la physiologie microbienne (Kapoor et Kaira, 2016, Farooq et al., 2021). Pour ces raisons, le pH du processus de production doit être contrôlé au niveau optimal.

Afin de tester l'effet de ce facteur sur la production multienzymatique par *Penicillium* sp., nous avons lancé des fermentations dont le pH du substrat SSF a été fixé à des niveaux allant du milieu acide au milieu neutre, vu que les moisissures sont bien adaptées à des environnements acides à légèrement acides (entre 3 et 5 d'après Santos et al., 2021).

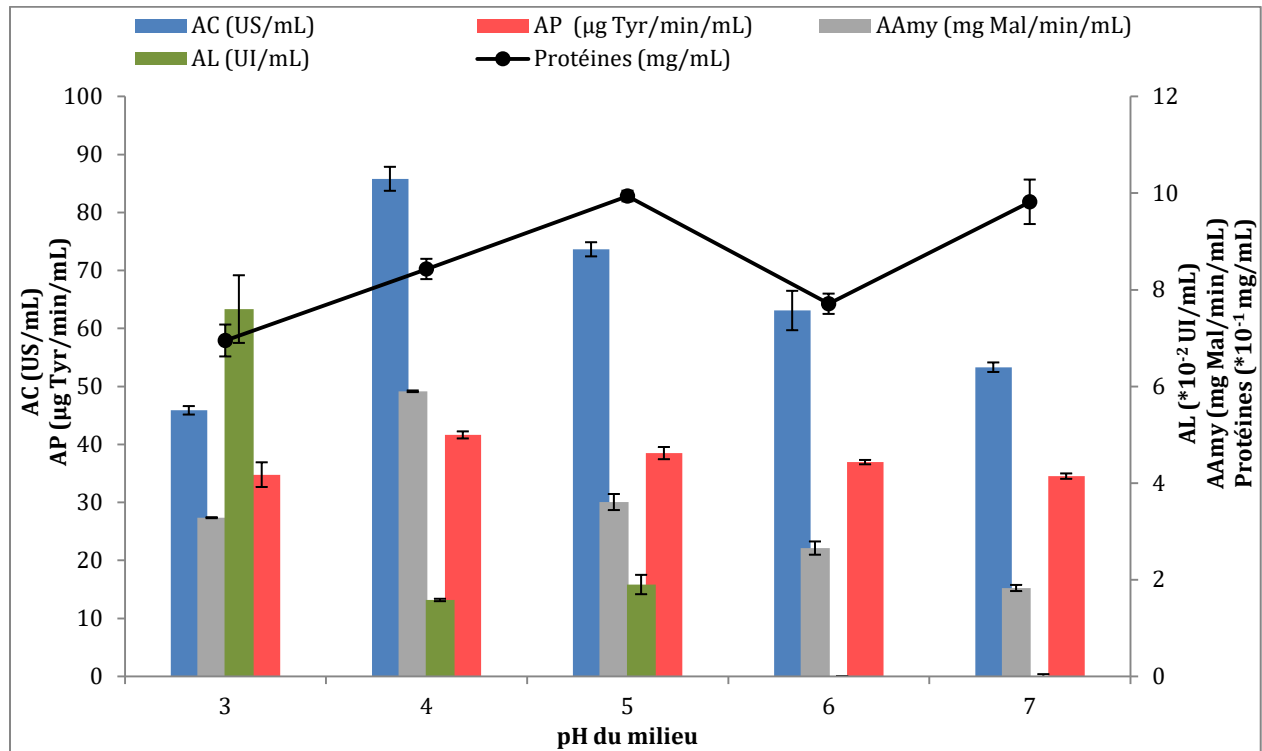
La **Figure 14** illustre de manière évidente que le pH choisi a un effet sur la croissance de la souche sur son de blé, qui augmente en se rapproche du milieu neutre. Cependant, les activités amylase, protéase et coagulant le lait des extraits bruts obtenus à ce niveau d'expérimentation sont maximales à pH 4 après 72 h d'incubation à 30°C (**Fig. 15**). Ces activités chutent de façon progressive en se déplaçant vers le milieu neutre. Cette observation concerne les amylases et les coagulases, par contre la production de protéases n'a été pas affectée de façon significative par la variation du pH de milieu.



**Figure 14:** Développement mycélien de *Penicillium* sp. sur son de blé à différents pH.

D'autre part, l'activité laccase apparait à un niveau maximal ( $0,076 \pm 0,007$  UI/mL) à pH 3, puis diminue à pH 4, mais qui augmente de nouveau à pH 5 ( $0,019 \pm 0,002$  UI/mL). La teneur en protéine était plus élevée à des pH différents de l'optimum (à pH 5 et 7).

L'activité enzymatique est généralement fortement influencée par le pH, car les sites actifs des enzymes dépendent souvent de la présence d'espèces ioniques pour maintenir des conformations permettant une liaison et une transformation efficaces au substrat. Cependant, la surveillance et le contrôle du pH dans le processus SSF ne sont pas simples et la plupart des études rapportées dans la littérature ont seulement décrit l'influence du pH initial du milieu sur la production d'enzymes sous ce système (Farinas et al., 2015).



**Figure 15:** Influence du pH sur la production des enzymes hydrolytique et laccases par *Penicillium* sp. (Conditions: T=30°C; solution Czapek-Dox; H=51,6%, 72 h).

Les formulations de substrat, en particulier les sources d'azote, le pouvoir tampon des différents composants utilisés ou l'emploi d'un tampon n'ayant aucune influence néfaste sur l'activité biologique peuvent aider à surmonter dans une certaine mesure le problème de la variabilité du pH au cours des processus SSF (Kapoor et Kaira, 2016). Les substrats agro-industriels possèdent une action tampon unique et présentent donc l'un de leurs avantages pour la production d'enzymes en SSF (Erdal et Taskin, 2010). Pour cela, nous avons sélectionné le son de blé comme substrat de la SSF, en plus des autres avantages déjà mentionnés liés à sa composition biochimique. A part l'activité laccase, les autres activités enzymatiques dosées, surtout dans le cas de protéases, ne sont pas assez différentes entre elles, en passant d'un pH à un autre, ce qui démontre l'effet tampon du substrat utilisé.

Nos résultats concordent bien avec ceux obtenus par Shruthi et al. (2020) pour la production d' $\alpha$ -amylase par *P. citrinum*. Le rendement optimal de production de la même enzyme a été observé lorsque *P. janthinellum* a été cultivé sur son de blé ayant un pH 5 (Sindhu et al., 2009a). Erdal et Taskin (2010) avec Abdullah et al. (2017) ont rapporté un pH optimal de l'ordre de 6,0 pour la production d'amylases par *P. expansum* MT-1 et *Penicillium* sp., où cette dernière souche était capable d'atteindre une activité ( $12 \pm 0,1$  UI/mL) plus faible par comparaison à nos résultats ( $16,40 \pm 0,07$  UI/mL). Far et al. (2020) ont confirmé que la

plupart des champignons et compris les penicilliums se développent idéalement dans des conditions légèrement acides, ce qui est en accord avec notre étude.

Germano et al. (2003) et Ikram-UI-Haq et Umber (2006) ont rapporté que des pH acides de l'ordre de 4,5 et 5,5 étaient les optima pour la production de protéases de *Penicillium* sp. et *P. chrysogenum* IHH5 par SSF, respectivement. Les mêmes valeurs de pH ont assuré une production maximale de laccases par *P. chrysogenum* (Ire et Ahuekwe, 2016; Senthivelan et al., 2019).

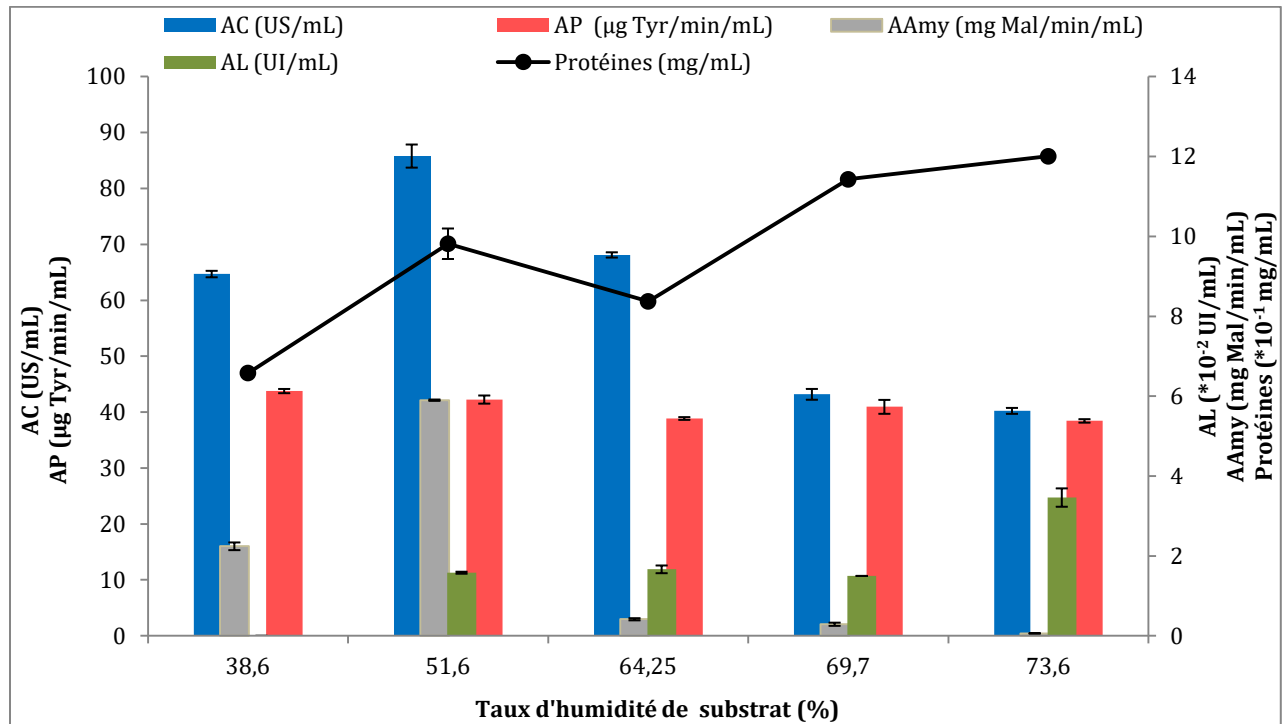
### III.3.3. Effet du taux d'humidité

Le niveau d'humidité optimal varie en fonction de la source microbienne et le substrat. Les champignons filamenteux peuvent se développer et synthétiser des enzymes à un faible niveau d'humidité, mais pour les bactéries, un niveau d'humidité élevé est requis (Farooq et al., 2021). La teneur en eau est l'un des paramètres opérationnels les plus importants affectant la diffusion des nutriments dans le système réactionnel et leur absorption par les agents microbiens, ainsi que le maintien de la stabilité et la fonction des structures biologiques (Farinas et al., 2015). Pour visualiser l'impact de ce paramètre sur la production des enzymes d'intérêt par *Penicillium* sp., cinq taux d'humidité ont été testés et les résultats atteints sont détaillés dans la **Figure 16**.

Nos résultats révèlent que le taux d'humidité initial fixé à 51,60%, et qui correspond à l'ajout de 10 mL de la solution minérale au son de blé, assure une activité maximale d'amylase et d'enzymes coagulant le lait. La diminution ou l'augmentation de ce taux provoque une diminution de la production de ces enzymes. À un niveau d'humidité de 38,26%, une légère amélioration de la production de protéases a été observée, bien qu'elle ne soit pas statistiquement significative. D'autre part, l'activité laccase a été détectée uniquement dans les extraits bruts obtenus avec des milieux très humides avec un maximum à 73,6% ( $0,034 \pm 0,0023$  UI/mL). Les teneurs en protéines les plus élevées sont enregistrés pour les taux d'humidité de 69,7% et 73,6% ( $11,42 \pm 0,02$  et  $12 \pm 0,03$  mg/mL, respectivement).

Les études d'Agrawal et al. (2004) et d'Usman et al. (2021) démontrent aussi que la production maximale des protéases a été obtenue à une teneur en humidité de 50%, tandis que la plus faible a été enregistrée à 65%. Cela peut être dû à la différence de nature du substrat solide utilisé pour la fermentation. Des niveaux d'humidité très proches de nos résultats, de l'ordre de 50% et 60% ont été rapportés par Djekrif et al. (2024), Sundarram et Murthy

(2014), ainsi que Sindhu et al. (2009b) comme l'optimum pour la production de protéases à partir de *Penicillium* sp., *P. janthinellum* et *P. godlewskii* SBSS 25, respectivement.



**Figure 16:** Effet du taux d'humidité initial sur la production des enzymes d'intérêt par *Penicillium* sp. (Conditions: T=30°C; solution Czapek-Dox; pH=4, 72 h).

La présente étude a rapporté une teneur en humidité plus faible pour une production maximale d'enzymes d'intérêt par rapport à d'autres travaux. Des taux d'humidité très élevés de l'ordre de 70%, 80% et même 100% ont été les optima pour la production d' $\alpha$ -amylase par *P. expansum* MT-1, protéase par *Penicillium* sp. LCJ228 et d' $\alpha$ -amylase par *Penicillium* sp. via SSF, en utilisant les déchets d'amande (Erdal et Taskin, 2010), le tourteau d'arachide (Benluvankar et al., 2015) et le son de blé (Abdullah et al., 2017) comme substrats, respectivement. Cela peut être dû à la différence de nature du substrat solide utilisé pour la fermentation et le microorganisme exploité.

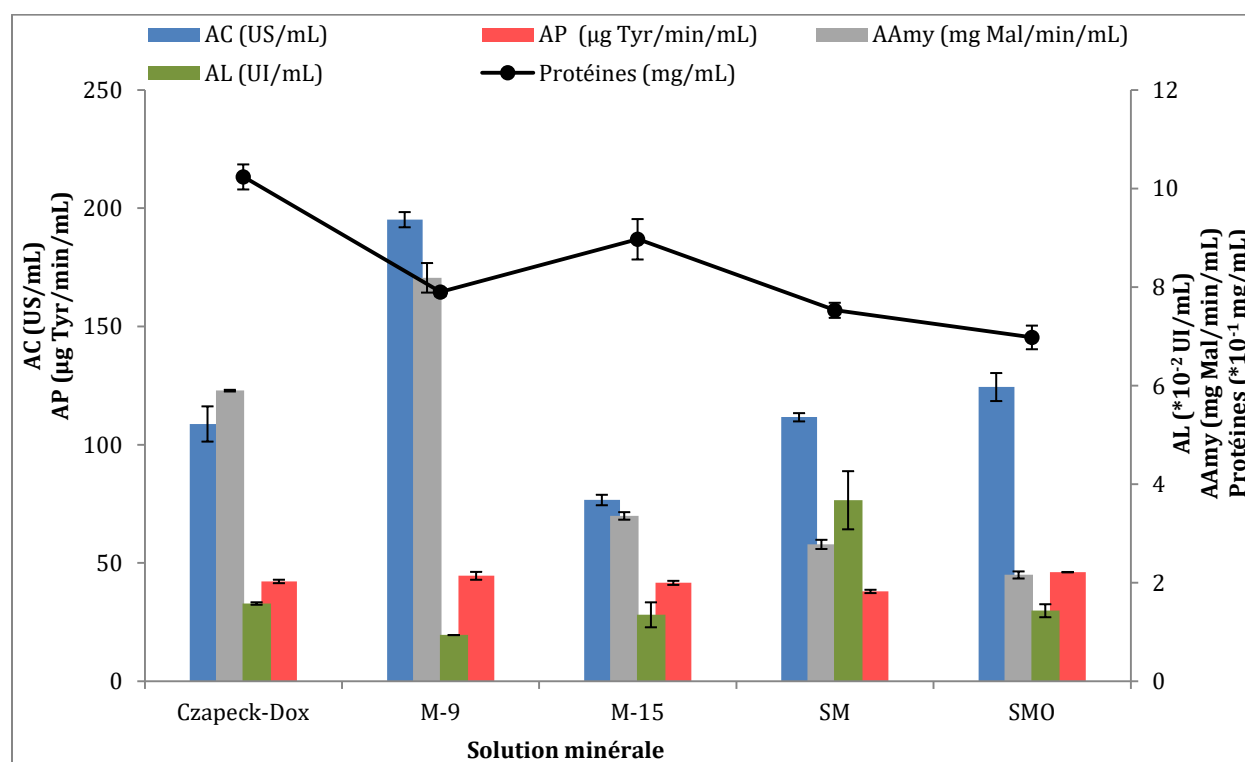
L'importance cruciale du niveau d'humidité dans les processus SSF et son effet sur la production et la sécrétion d'enzymes peuvent être attribués à l'interférence de l'humidité dans les propriétés physiques des substrats solides. La faible teneur en humidité conduit à une croissance sous-optimale, une réduction de la solubilité des nutriments du substrat et un faible degré de gonflement (Ertan et al., 2006). D'un autre côté, l'augmentation du niveau d'humidité réduit la porosité et la surface des particules solides, rendre le film d'eau absorbé

par les particules plus épaies, limitant ainsi le transfert d'oxygène ce qui provoque des rendements plus faibles en enzymes (Ertan et al., 2006; Shruthi et al., 2020).

### III.3.4. Effet des oligoéléments

La supplémentation du milieu SSF par l'addition d'autres sources de C, N ou des sels minéraux est nécessaire lorsque le micro-organisme est cultivé sur un substrat solide qui n'apporte pas les quantités requises de nutriments, afin d'augmenter la croissance microbienne et la production d'enzymes durant l'étape initiale de la fermentation (Kumar et Kanwar, 2012; Farinas et al., 2015). Les macros et micronutriments qui doivent être fournis dans le milieu de croissance comprennent : P, S, K, Mg, Ca, Zn, Mn, Cu, Fe, Co et I, ainsi que d'autres éléments en quantités traces (Farinas et al., 2015).

Pour comprendre le rôle des sels minéraux, différentes solutions minérales (solution Czapeck-Dox, M-9, M-15, SM et SMO) ont été employées pour hydrater le son de blé et le renforcer en oligoéléments. Les résultats de cette phase de l'expérimentation sont résumés dans la **Figure 17**.



**Figure 17:** Effet de la solution minérale sur le taux des différentes enzymes produites par *Penicillium sp.* (Conditions: T=30°C, pH=4, H=51,6%, 72 h).

Les résultats obtenus ont démontré que même si la production des différentes enzymes était satisfaisante avec la solution Czapeck-Dox, sauf pour les laccases, elle était maximale en utilisant la solution minérale M-9, où nous avons noté une augmentation significative avec un



facteur de 1,4 et 2,3 concernant l'activité amylase et coagulante, respectivement, pour atteindre des valeurs de l'ordre de  $8,2 \pm 0,3$  mg Mal/min/mL et  $195,825 \pm 7,45$  US/mL. Cela peut être favorisé par l'introduction du  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en quantité élevée dans la composition du milieu M-9 par comparaison aux autres solutions minérales testées. Selon Singh et al., (2017), le phosphore est indispensable pour la synthèse des phospholipides, la production des molécules énergétiques et des acides nucléiques, où sa concentration dans le milieu est capable de renforcer ou inhiber la production de plusieurs métabolites primaires et secondaires.

Nous pouvons ajouter l'effet du calcium qui est fortement impliqué dans la croissance apicale des pointes hyphales. Il participe dans l'activation de la contraction des microtubules d'actine pour déplacer les vésicules de Spitzenkörper (contenant les enzymes hydrolytiques) vers l'extrémité des hyphes (Deacon, 2006). Cet élément minéral figure uniquement dans la composition de la solution M-9.

Pour l'activité protéolytique, nous avons constaté qu'elle est presque stable entre les différentes solutions utilisées, avec une légère augmentation ( $46,17 \pm 0,091$   $\mu\text{g Tyr/min/mL}$ ) en appliquant la solution SMO. Par contre, la solution SM favorise la synthèse des laccases avec une activité de  $0,037 \pm 0,006$  UI/mL, ce qui représente une élévation par un facteur de 2,34 par rapport aux étapes précédentes (Czapeck-Dox comme la solution minérale). En revanche, une stabilité de la teneur en protéines ( $6,97 \pm 0,24 - 8,97 \pm 0,41$  mg/mL) a été constatée pour les différents milieux avec une légère augmentation dans le cas d'ajout de la solution Czapeck-Dox.

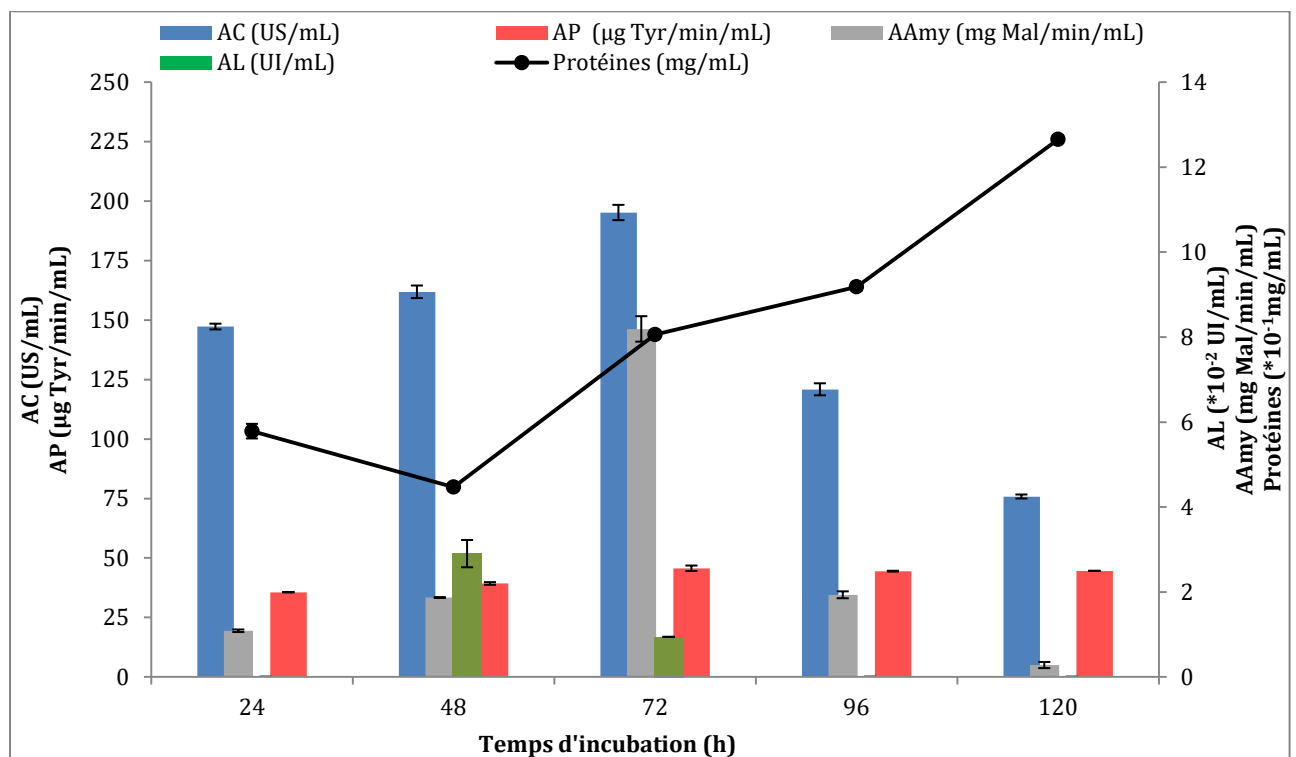
Presque tous les travaux scientifiques consultés liés à l'influence d'addition des sels minéraux au milieu de fermentation se basent sur l'étude de l'effet individuel de chaque type de sel utilisé séparément, seulement un nombre limité a étudié l'effet d'ajout d'une solution minérale contenant plusieurs oligoéléments. Les travaux publiés par Bensmail et al. (2015, 2020) révèlent que l'ajout de la solution Czapeck-Dox et la solution minérale M-9 au son de blé était la condition optimale pour maximiser la production de protéases et coagulases par *Aspergillus niger* FFB1 et *Mucor circinelloides* (von Tieghem), respectivement.

### III.3.5. Effet du temps d'incubation

Semblable aux effets des autres variables du processus SSF, la période de culture joue un rôle primordial et généralement elle est toujours le dernier facteur à optimiser après l'optimisation de tous les paramètres du procédé (Erdal et Taskin, 2010; Farinas et al., 2015).

Afin de préciser le meilleur temps d'incubation pour la production des enzymes recherchées, de nouvelles fermentations préparées en tenant compte des optima des paramètres précédemment évalués ont été incubées pendant des durées variables, s'étalant de 1 à 5 jours, avec un intervalle de 24 heures entre chaque période.

Les résultats présentés dans la **Figure 18** montrent clairement que la période d'incubation influence la production des quatre enzymes, qui augmente avec le temps d'incubation, atteignant un maximum au 3<sup>ème</sup> jour, à l'exception de laccases. Après cette période, une diminution significative des activités amylase et coagulante a été observée, ce qui pourrait être dû à une carence en nutriments ou à l'accumulation d'autres sous-produits dans le milieu de fermentation (inhibiteurs et déchets métaboliques générés par le champignon) (Benlucankar et al., 2015; Farooq et al., 2021; Boondaeng et al., 2024). Cependant, nous n'avons pas observé de changements significatifs dans l'activité protéase après 72 h d'incubation. Ces résultats rendent le processus plus efficace et surtout économique.



**Figure 18:** Effet du temps d'incubation (h) sur la production des enzymes d'intérêt par *Penicillium* sp. (Conditions: T=30°C, solution M-9, pH=4, H=51,6%).

La production d'enzymes dépend donc de la biomasse pendant la phase exponentielle de croissance. Les enzymes produites étant des métabolites primaires, elles sont synthétisées pendant la phase de croissance exponentielle et leur production commence à diminuer à mesure que les cellules entrent dans la phase de déclin (Boondaeng et al., 2024).

En accord avec les présents résultats, Abdullah et al. (2017) ont également observé la production maximale d' $\alpha$ -amylase par *Penicillium* sp. au 3<sup>ème</sup> jour d'incubation. De même, chez *Penicillium* sp. (Agrawal et al., 2004) et *A. niger* FFB1 (Bensmail et al., 2015), la production maximale de protéases et coagulases a été atteinte après la même période d'incubation et qui a diminué par la suite.

Les résultats présentés par Sindhu et al. (2009b) et Shruthi et al. (2020) indiquent que la production des amylases était maximale après les premières 96 h par *P. godlewskii*, *P. citrinum* et *A. clavatus*, respectivement. La même conclusion a été signalée par Bensmail et al. (2020) concernant la production de protéases et enzymes coagulant le lait par *M. circinelloides*.

Nos résultats sont plus encourageants à cet égard, la durée d'incubation optimale était de 72 h, ce qui est inférieur à la durée rapportée (144 h) pour de nombreux travaux (Erdal et Taskin, 2010; Singh et al., 2014; Benlurvankar et al., 2016). Ainsi, nos résultats rendent le processus plus économique en réduisant le temps consommé et les besoins énergétiques.

*Conclusion*

## **CONCLUSION**

L'objectif principal de cette étude est d'améliorer les conditions de production d'une gamme d'enzymes, principalement hydrolytiques, par une souche de *Penicillium* sp. isolée d'un sol agricole de la région de Bouira, en utilisant le système SSF avec du son de blé comme substrat.

Comme première étape, la capacité de la souche à produire diverses enzymes (hydrolytiques et lignocellulosiques) a été criblée sur des géloses contenant les substrats des enzymes ciblées. En se basant sur le développement des halos d'hydrolyse, les variations de couleur ou la disparition de celle-ci dans le milieu, *Penicillium* sp. a été qualifiée comme une souche très intéressante capable de sécréter des amylases, protéases, pectinases, chitinases, lipases et des laccases, ce qui représente 80% des activités testées.

Dans la deuxième partie, nous avons visé à déterminer les conditions optimales de production des enzymes suivantes par *Penicillium* sp.: amylases, protéases, coagulases et laccases. La variation de quelques paramètres de la SSF a révélé que l'optimum de production des trois premières enzymes a été obtenu sur son de blé (10 g) humidifié avec la solution minérale M-9 (pH = 4) à un taux de 56,1% et incubé à 30°C pendant 72 h. Les activités exprimées sous ces conditions ont été améliorées par un facteur de 2,3 et 1,4 pour les coagulases ( $195,825 \pm 7,45$  US/mL) et les amylases ( $8,2 \pm 0,3$  mg Mal/min/mL), respectivement, avec une légère augmentation ( $45,63 \pm 1,155$  µg Tyr/min/mL) dans le cas des protéases, par rapport à l'étape initiale. Par contre, les conditions de production du maximum d'activité laccase ont été très différentes (milieu plus acide contenant moins de sels minéraux, température et taux d'humidité élevés).

Cette étape d'optimisation a été avérée efficace, en étudiant seulement l'effet de cinq facteurs affectant le processus SSF, ce qui signifie que la production des enzymes d'intérêt est susceptible d'être améliorée en évaluant l'impact d'autres paramètres tels que la taille de l'inoculum, la quantité et la taille des particules du substrat, l'ajout de sources de carbone et d'azote, etc., en adoptant la méthode classique et la planification expérimentale, afin de développer un modèle mathématique qui régit les conditions de production multienzymatique par la souche *Penicillium* sp.

## *Conclusion*

---

La présente étude doit être complétée par une caractérisation biochimique et moléculaire afin d'identifier l'espèce de la souche isolée. Du même, il serait très intéressant de rechercher les conditions favorisant la production des autres enzymes criblées sur le même substrat ou d'autres résidus agroindustriels, dont le choix sera basé sur la composition de chaque déchet et l'absence de la production des mycotoxines. De plus, l'efficacité des extraits enzymatiques élaborés, sous forme brute ou purifiée, doit être démontrée via leur application dans divers secteurs industriels tels que les détergents, la production laitière, la panification, etc.

*Références  
Bibliographiques*

## *Références Bibliographiques*

- Abdul Manan, M., & Webb, C. (2018). Estimating fungal growth in submerged fermentation in the presence of solid particles based on colour development. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(3), 618-627. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1440974>
- Abd El Monssef, R. A., Hassan, E. A., & Ramadan, E. M. (2016). Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 145-154.
- Abdel-Raheem, A., & Shearer, C. (2002). Extracellular enzyme production by fresh water ascomycetes. *Fungal Diversity*, 11, 1-19.
- Abdullah, R., Nadeem, S., Iqtedar, M., Kaleem, A., Iftikhar, T., & Naz, S. (2017). Influence of growth conditions on enhanced production of alpha amylase from *Penicillium* species in solid state fermentation. *Indian Journal of Biotechnology*, 16(3), 426-432.
- Adetunji, A. I., Olaitan, M. O., Erasmus, M., & Olaniran, A. O. (2023). Microbial proteases: A next generation green catalyst for industrial, environmental and biomedical sustainability. *Food Materials Research*, 3(1). <https://doi.org/10.48130/FMR-2023-0012>
- Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T., & Patil, S. (2004). Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 39(8), 977-981.
- Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T., & Patil, S. (2005). Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 40(3-4), 1131-1136.
- Agrawal, T., & Kotasthane, A. S. (2012). Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *SpringerPlus*, 1, 1-10.
- Albu, C. V., Rădoi, T. A., Diguță, C. F., Matei, F., & Cornea, C. P. (2020). Screening among micro and macromycetes for laccase production. *AgroLife Scientific Journal*, 9(1).
- Ali, E. A. M., Abd Ellatif, S., & Abdel Razik, E. (2020). Production, purification, characterization and immobilization of laccase from *Phoma betae* and its application in synthetic dyes decolorization. *Egyptian Journal of Botany*, 60(1), 301-312.
- Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., & Lee, I.-J. (2023). The recent advances in the utility of microbial lipases : A Review. *Microorganisms*, 11(2), 510. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020510>
- Al-Maqtari, Q. A., Waleed, A. A., & Mahdi, A. A. (2019). Microbial enzymes produced by fermentation and their applications in the food industry-A review. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 8(1), 2319-1473.



- Anbu, P., Gopinath, S. C., Chaulagain, B. P., & Lakshmi Priya, T. (2017). Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2016. *Biomed Research International*, 2017.
- Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology*, 22(1), 79.
- Antecka, A., Bizukojc, M., & Ledakowicz, S. (2016). Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-9.
- Arima, K., Yu, J. & Iwasaki, S. (1970). Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In Perlmann, G., Lorand, L. (eds.) *Methods in Enzymology*. (pp. 446-459). New York: Academic Press.
- Association of Official Agricultural Chemists, & Horwitz, W. (1975). *Official methods of analysis* (Vol. 222). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Bach, E., Sant'Anna, V., Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., & Brandelli, A. (2012). Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. *Process Biochemistry*, 47(12), 2455-2462. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.10.007>
- Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 119-143. <https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1408256>
- Barrios-González, J. (2012). Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, 47(2), 175-185. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_6)
- Bader, J., Narayanan, H., Arosio, P., & Leroux, J. C. (2023). Improving extracellular vesicles production through a Bayesian optimization-based experimental design. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 182, 103-114.
- Baladrán-Quintana, R. R., Mercado-Ruiz, J. N., & Mendoza-Wilson, A. M. (2015). Wheat bran proteins: a review of their uses and potential. *Food Reviews International*, 31(3), 279-293.
- Bellaouchi, R., Abouloifa, H., Rokni, Y., Hasnaoui, A., Ghabbour, N., Hakkou, A., ... & Asehrou, A. (2021). Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00145-y>
- Benlurvankar, V., Jebapriya, G. R., & Gnanadoss, J. J. (2015). Protease production by *Penicillium* sp. LCJ228 under solid state fermentation using groundnut oilcake as substrate. *International Journal of Life Science & Pharma Research*, 50(1), 12-19.
- Benlurvankar, V., Priya, S. E., & Gnanadoss, J. J. (2016). Medium formulation and its optimization for increased protease production by *Penicillium* sp. LCJ228 and its potential in blood stain removal. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 4(1), 020-026.

- Bensmail, S., Boudjema, K., & Naimi-Fazouane, F. (2020). Production of extracellular rennin-like enzyme by a newly isolate *Mucor circinelloides* (von Tieghem) and its application in Camembert cheese making. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 7(1), 16-24.
- Bensmail, S., Mechakra, A., & Fazouane-Naimi, F. (2015). Optimization of milk-clotting protease production by a local isolate of *Aspergillus niger* FFB1 in solid-state fermentation. *Journal of Microbiology, Biotechnology, and Food Science*, 4(5), 467-472.
- Bensmail, S., Sini Boukrout, A., & Bellili, H. (2021). *Isolement, identification et screening des souches fongiques productrices d'enzymes d'intérêt industriel*. Mémoire de Master: Biotechnologie Microbienne, Faculté SNV-ST, Université de Bouira.
- Bernfeld, P. (1955).  $\alpha$  and  $\beta$ -amylases. In: Colowisck, S. P., Kaplan, N. O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, 1(l. c), 149-158. Academic Press, USA.
- Bettache, A., Messis, A., Duchiron, F., & Benallaoua, S. (2014). Solide-State fermentation technology for bioconversion of lignocellulose. *Int. J. Emerg. Technol. Adv. Eng*, 4, 486-490.
- Behera, B. C., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 197-210. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>
- Behera, S. S., Ray, R. C., Das, U., Panda, S. K., & Saranraj, P. (2019). Microorganisms in Fermentation. In A. Berenjian (Éd.), *Essentials in Fermentation Technology* (p. 1-39). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6_1)
- Bellon-Maurel, V., Orliac, O., & Christen, P. (2003). Sensors and measurements in Solid State Fermentation: A review. *Process Biochemistry*, 38(6), 881-896. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00093-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00093-6)
- Binod, P., Pusztahelyi, T., Nagy, V., Sandhya, C., Szakács, G., Pócsi, I., & Pandey, A. (2005). Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(7), 880-887.
- Boondaeng, A., Keabpimai, J., Trakunjae, C., Vaithanomsat, P., Srichola, P., & Niyomvong, N. (2024). Cellulase production under solid-state fermentation by *Aspergillus* sp. IN5: Parameter optimization and application. *Heliyon*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26601>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Cai, Y., & Yang, G. (2023). Enzyme cocktail with hyperactive lipase through Solid-State Fermentation by the novel strain *Penicillium* sp. Y-21. *Scientific Reports*, 13(1), 14527. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41912-w>.

- Campos, A. O., Asevedo, E. A., Souza Filho, P. F., & Santos, E. S. D. (2024). Extraction of cellulases produced through solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* CCT-2768 using green coconut fibers pretreated by steam explosion combined with alkali. *Biomass*, 4(1), 92-106.
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
- Chen, H. (2013). *Modern Solid State Fermentation : Theory and Practice*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1>
- Chughtai, S., Bhatti, K. H., Zahra, A., Siddique, E. H., Baqir, M. Z., Syed, K., ... & Ajaib, M. (2023). Production, characterization and kinetic studies of proteases by screening of indigenous biomass. *GU Journal of Phytosciences*, 3(3), 217-223.
- Dawood, A. (2020). Applications of microbial  $\beta$ -mannanases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 598630. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.598630>
- Deacon, J. W. (2006). *Fungal biology*. 4th Ed. Oxford, England: Blackwell Publishing Ltd, John Wiley & Sons. 371 p.
- Deb, A., & Vimala, R. (2018). Camptothecin loaded graphene oxide nanoparticle functionalized with polyethylene glycol and folic acid for anticancer drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 43, 333-342. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.10.025>
- de Oliveira Melo, A. M., Silva, T. P., de Carvalho Tavares, I. M., Silva, F. N., Bilal, M., Salay, L. C., ... & De Oliveira, J. R. (2023). New protease produced by solid state fermentation of *Penicillium camemberti* 0798400075 using coffee hull applied in milk coagulation. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2834065/v1>.
- Dhawan, S., & Kaur, J. (2007). Microbial mannanases: An overview of production and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(4), 197-216. <https://doi.org/10.1080/07388550701775919>
- Djekrif, S. D., El Hadeif El Okki, A. A. K., Bennamoun, L., Djekrif, A., Nouadri, T., & Gillmann, L. (2024). Production optimization, partial characterization, and gluten-digesting ability of the acidic protease from *Clavispora lusitaniae* PC3. *Fermentation*, 10(3), 139.
- dos Santos, F. C. P., Cunha, J. R. B., do val de Assis, F. G., & Leal, P. L. (2017). Enzyme production by soil filamentous fungi under solid-state fermentation in banana stalk. *Comunicata Scientiae*, 8(3), 424-431
- Dos Santos Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases : Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>
- Drougard, M. (2018). *Compréhension et contrôle de la morphologie des champignons filamenteux en culture liquide* (Doctoral dissertation, Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France).

- Dyer, P. S., & Kück, U. (2017). Sex and the imperfect fungi. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0043-2017>
- Egbuta, M., Mwanza, M., & Babalola, O. (2017). Health risks associated with exposure to filamentous fungi. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7), 719. <https://doi.org/10.3390/ijerph14070719>
- Ejaz, U., Muhammad, S., Ali, F. I., Hashmi, I. A., & Sohail, M. (2019). Methyltrioctylammonium chloride mediated removal of lignin from sugarcane bagasse for thermostable cellulase production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 1064-1072. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.206>
- Elyasi Far, B., Ahmadi, Y., Yari Khosroshahi, A., & Dilmaghani, A. (2020). Microbial alpha-amylase production : Progress, challenges and perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(3), 350-358. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.043>
- Erdal, S. E. R. K. A. N., & Taskin, M. E. S. U. T. (2010). Production of  $\alpha$ -amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(3), 5342-5350.
- Ertan, F., Balkan, B., & Yarkin, Z. (2014). Determination of the effects of initial glucose on the production of  $\alpha$ -amylase from *Penicillium* sp. under solid-state and submerged fermentation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(1), 96-101.
- Ertan, F., Balkan, B., Balkan, S., & Aktac, T. (2006). Solid state fermentation for the production of  $\alpha$ -amylase from *Penicillium chrysogenum* using mixed agricultural by-products as substrate. *Biologia*, 61(6), 657-661.
- Farinas, C. S. (2015). Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 179-188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092>
- Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of  $\alpha$ -amylase: A review. *Archives of Microbiology*, 203, 1281-1292. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y>
- Germano, S., Pandey, A., Osaku, C. A., Rocha, S. N., & Soccol, C. R. (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2), 246-251.
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Arshad, M. K. M., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Chinni, S. V. (2017). Biotechnological processes in microbial amylase production. *BioMed Research International*, 2017, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A Broader view : microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2013/329121>

- Goswani, G. K., & Rawat, S. (2015). Microbial xylanase and their applications. *Int J Curr Res Acad Rev*, 3(6), 436-450.
- Hankin, L., & Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67(3), 597-607.
- Hasan, S., Anwar, Z., Khalid, W., Afzal, F., Zafar, M., Ali, U., ... & Aljobair, M. O. (2023). Laccase production from local biomass using solid state fermentation. *Fermentation*, 9(2), 179.
- Houbraken, J., De Vries, R. P., & Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 86, p. 199-249). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>
- Houbraken, J., & Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*, 70, 1-51. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.01>
- Ikram-Ul-Haq, H. M., & Umber, H. (2006). Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions. *Journal of Agriculture & Social Sciences*, 2(1), 23-25.
- Ilboudo, A. J., Savadogo, A., Seydi, M. G., & Traore, A. S. (2012). Place de la matière azotée dans le mécanisme de la coagulation présure du lait. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(6), 6075-6087.
- Ire, F., & Ahuekwe, E. (2016). Production of fungal laccase using orange peelings as substrate by submerged static fermentation. *British Microbiology Research Journal*, 15(5), 1-19.
- Irfan, M., Nadeem, M., & Syed, Q. (2014). One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(3), 317-326.
- Ismail, A. R., Kashtoh, H., & Baek, K.-H. (2021). Temperature-resistant and solvent-tolerant lipases as industrial biocatalysts : Biotechnological approaches and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 127-142. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.101>
- Jisha, N. V., B. Smitha, R., Pradeep, S., Sreedevi, S., N. Unni, K., Sajith, S., Priji, P., Sarath Josh, M., & Benjamin, S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*, 01(03), 39-51. <https://doi.org/10.4236/aer.2013.13005>
- John, J. (2017). Amylases-bioprocess and potential applications : A review. *International Journal of Bioinformatics and Biological Science*, 5(2), 41. <https://doi.org/10.5958/2321-7111.2017.00006.3>
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2012). Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1219-1227. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.006>

- Kabir, M. S., & Tasmim, T. (2019). Isolation of pectinase producing bacteria from the rhizosphere of *Andrographis paniculata* nees and 16S rRNA gene sequence comparison of some potential strains. *Advances in Microbiology*, 9(1), 1-13.
- Kalra, K., Chauhan, R., Shavez, M., & Sachdeva, S. (2013). Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. and effect of pH and temperature on its activity. *Int. J. Chem. Environ. Technol*, 5(5), 2229-2235.
- Kapoor, M., Panwar, D., & Kaira, G. S. (2016). Bioprocesses for enzyme production using agro-industrial wastes: technical challenges and commercialization potential. In *Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production* (pp. 61-93). Academic Press.
- Kaur, D., Sharma, V., Joshi, A., Batra, N., Ramniwas, S., & Sharma, A. K. (2023). Pectinases as promising green biocatalysts having broad-spectrum applications: Recent trends, scope, and relevance. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 70(5), 1663-1678. <https://doi.org/10.1002/bab.2464>
- Keharom, S., Mahachai, R., & Chanthai, S. (2016). The optimization study of  $\alpha$ -amylase activity based on central composite design-response surface methodology by dinitrosalicylic acid method. *International Food Research Journal*, 23(1), 10-17.
- Kerényiová, L., & Janeček, Š. (2020). A detailed in silico analysis of the amylolytic family GH126 and its possible relatedness to family GH76. *Carbohydrate Research*, 494, 108082. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108082>
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), pdb-prot102269.
- Kiiskinen, L. L., Rättö, M., & Kruus, K. (2004). Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 640-646.
- Krishna, C. (2005). Solid-State Fermentation Systems—An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1-2), 1-30. <https://doi.org/10.1080/07388550590925383>
- Kumar, A., & Chandra, R. (2020). Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon*, 6(2), e03170. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>
- Kumar, A., & Kanwar, S. S. (2012). Lipase production in solid-state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 6(1), 13-27.
- Kumar, A. G., Nagesh, N., Prabhakar, T. G., & Sekaran, G. (2008). Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresource Technology*, 99(7), 2364-2372. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.001>

- Kumar, A., Verma, V., Dubey, V. K., Srivastava, A., Garg, S. K., Singh, V. P., & Arora, P. K. (2023). Industrial applications of fungal lipases: a review. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1142536. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1142536>
- Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A. K., & Singhanian, R. R. (2021). Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites : Challenges and solutions. *Bioresource Technology*, *323*, 124566. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, *7*(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-32>
- Lindsay, C. A., Kinghorn, A. D., & Rakotondraibe, H. L. (2023). Bioactive and unusual steroids from *Penicillium* fungi. *Phytochemistry*, 113638.
- Liu, X., & Kokare, C. (2017). Microbial enzymes of use in industry. In *Biotechnology of Microbial Enzymes* (p. 267-298). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
- Li, N., Wang, S., Wang, T., Liu, R., Zhi, Z., Wu, T., ... & Zhang, M. (2022). Valorization of wheat bran by three fungi solid-state fermentation: physicochemical properties, antioxidant activity and flavor characteristics, *Foods*, *11*(12), 1722.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. boil. Chem.*, *193*(1), 265-275.
- López-Calleja, A. C., Cuadra, T., Barrios-González, J., Fierro, F., & Fernández, F. J. (2012). Solid-State and Submerged Fermentations show different gene expression profiles in cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum*. *Microbial Physiology*, *22*(2), 126-134. <https://doi.org/10.1159/000338987>
- Malgas, S., Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2015). A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase and  $\alpha$ -galactosidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(8), 1167-1175. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1878-2>
- Martin, M. F., Okpo, E. A., & Andy, I. E. (2019). Microbial amylases: A review. *World News of Natural Sciences*, *22*. 174-179.
- McConnaughey, M. (2014). Physical chemical properties of fungi. *Reference Module in Biomedical Research*, 1-3. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05231-4>
- Morrill, J., Kulcinskaja, E., Sulewska, A. M., Lahtinen, S., Stålbbrand, H., Svensson, B., & Abou Hachem, M. (2015). The GH5 1,4- $\beta$ -mannanase from *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BI-04 possesses a low-affinity mannan-binding module and highlights the diversity of mannanolytic enzymes. *BMC Biochemistry*, *16*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12858-015-0055-4>

- Mondo, J., Balezi, A., Mugomoka, V., Zigashane, L., Bagula, E., Kashosi, T., ... & Mushagalusa, G. (2016). Effets des milieux de culture (PDA, SDA, SPDA, blé et maïs) sur la productivité in vitro de la souche P969 du *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. *Afrique Science*, 12(4), 374-381.
- Naik, A., & Lele, S. (2012). Solid state fermentation of pomegranate seed for lovastatin production: A bioprocessing approach. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(05), 643-647. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.35083>
- Nair, I. C., & Jayachandran, K. (2019). Aspartic proteases in food industry. *Green Bio-processes, Energy, Environment, and Sustainability*, 15-30. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_3)
- Nigam, D., Asthana, M., & Kumar, A. (2018). *Penicillium*. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (p. 187-200). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00010-7>
- Nisa, I. K., Sitoresmi, P., Lukiati, B., Saptawati, R. T., & Rodiansyah, A. (2021). The potential of amylase enzyme activity against bacteria isolated from several lakes in East Java, *Indonesia. Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(1).
- Niyonzima, F. N., Veena, S. M., & More, S. S. (2020). Industrial production and optimization of microbial enzymes. (pp. 115-135). In Arora, N. K. et al. (eds.), *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries, Microorganisms for Sustainability 11*, Springer Nature Singapore Pte Ltd. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_5)
- Nkemnaso, C. (2019). Solid State Fermentation: Substrates uses and applications in Biomass and Metabolites Production—A Review. *South Asian Res. J. Bio. Appl. Biosci.*, 1(1), 20-29.
- Nolasco-Soria, H. (2021). Amylase quantification in aquaculture fish studies: A revision of most used procedures and presentation of a new practical protocol for its assessment. *Aquaculture*, 538, 736536.
- Nouroozi, R. V., Noroozi, M. V., & Ahmadizadeh, M. (2015). Determination of protein concentration using Bradford microplate protein quantification assay. *Disease and Diagnosis*, 4(1), 11-17.
- Patel, A. K., Dong, C. D., Chen, C. W., Pandey, A., & Singhanian, R. R. (2023). Production, purification, and application of microbial enzymes. In *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 25-57). Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00002-9>
- Paul, J. S., Gupta, N., Beliya, E., Tiwari, S., & Jadhav, S. K. (2021). Aspects and recent trends in microbial  $\alpha$ -amylase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193, 2649-2698. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03546-4>
- Pavani, P., Kumar, K., Rani, A., Venkatesu, P., & Lee, M. J. (2021). The influence of sodium phosphate buffer on the stability of various proteins: Insights into protein-buffer interactions. *Journal of Molecular Liquids*, 331, 115753.



- Pham, V. H. T., Kim, J., Chang, S., & Chung, W. (2021). Investigation of lipolytic-secreting bacteria from an artificially polluted soil using a modified culture method and optimization of their lipase production. *Microorganisms*, 9(12), 2590. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122590>
- Pitt, J. I. (2014). *PENICILLIUM* | *Penicillium* and *Talaromyces*: In *Encyclopedia of Food Microbiology* (p. 6-13). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00248-2>
- Powers-Fletcher, M. V., Kendall, B. A., Griffin, A. T., & Hanson, K. E. (2016). Filamentous fungi. *Microbiology Spectrum*, 4(3), 4.3.23. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0002-2015>
- Prasanna, H. N., Ramanjaneyulu, G., & Rajasekhar Reddy, B. (2016). Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp. *3 Biotech*, 6, 1-11.
- Priji, P., Sajith, S., Abdul Faisal, P., & Benjamin, S. (2016). Microbial lipases – Properties and applications. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(2), 799-807. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.6.2.799-807>
- Queiroga, A. C., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2013). Medium factors affecting extracellular protease activity by *Bacillus* sp. HTS 102—A novel wild strain isolated from Portuguese merino wool. *Natural Science*, 5(6A), 44-53.
- Ras, M., Girbal-Neuhauser, E., Paul, E., Spérandio, M., & Lefebvre, D. (2008). Protein extraction from activated sludge: an analytical approach. *Water research*, 42(8-9), 1867-1878.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., ... & Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16-30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. (2016). Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: A review. *Bioengineering*, 3(4), 30. <https://doi.org/10.3390/bioengineering3040030>
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>
- Rehman, H. U. (2023). Applications of pectinolytic enzymes in process industries. In *Utilization of Pectin in the Food and Drug Industries*. IntechOpen. 10.5772/intechopen.110033
- Saldarriaga-Hernández, S., Velasco-Ayala, C., Leal-Isla Flores, P., De Jesús Rostro-Alanis, M., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H. M. N., & Carrillo-Nieves, D. (2020). Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1099-1116. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.047>
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, 34(1), 5-28. <https://doi.org/10.1002/btpr.2581>

- Sanchez, S., & Demain, A. L. (2017). Useful microbial enzymes—an introduction. In *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 1-11). Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00001-7>
- Santos, F. A., de Carvalho-Gonçalves, L. C. T., de Carvalho Cardoso-Simões, A. L., & de Melo Santos, S. F. (2021). Evaluation of the production of cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15 using corncob and wheat bran as substrates. *Bioresource Technology Reports*, *14*, 100648.
- Sattar, H., Bibi, Z., Kamran, A., Aman, A., & Qader, S. A. U. (2019). Degradation of complex casein polymer: production and optimization of a novel serine metalloprotease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *21*, 101256.
- Selim, A., Mostafa, A., & Eid, M. (2017). Amylase production by some local fungal isolates using some agricultural by-products via Solid State Fermentation. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, *8*(9), 217-220.
- Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., Tomas, S., Koceva Komlenić, D., & Bucić-Kojić, A. (2021). A Comprehensive review on valorization of agro-food industrial residues by Solid-State Fermentation. *Foods*, *10*(5), 927. <https://doi.org/10.3390/foods10050927>
- Senthivelan, T., Kanagaraj, J., Panda, R. C., & Narayani, T. (2019). Screening and production of a potential extracellular fungal laccase from *Penicillium chrysogenum*: Media optimization by response surface methodology (RSM) and central composite rotatable design (CCRD). *Biotechnology Reports*, *23*, e00344.
- Shah, K., & Vishwa, A. P. (2019). Microbial xylanase production and their industrial application in industry: a review. *Microbiology and Biotechnology in Human Life*, 112-132.
- Shradha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., & Kumar, A. (2011). Laccase : Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Research*, *2011*, 1-11. <https://doi.org/10.4061/2011/217861>
- Shukla, E., D. Bendre, A., & M. Gaikwad, S. (2022). Hydrolases : The most diverse class of enzymes. In S. Haider, A. Haider, & A. Catalá (Éds.), *Biochemistry* (Vol. 29). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102350>
- Shruthi, B. R., Achur, R. N. H., & Nayaka Boramuthi, T. (2020). Optimized solid-state fermentation medium enhances the multienzymes production from *Penicillium citrinum* and *Aspergillus clavatus*. *Current Microbiology*, *77*(9), 2192-2206.
- Singh, R. S., Singh, T., & Pandey, A. (2019). Microbial enzymes—An overview. In *Advances in Enzyme Technology* (p. 1-40). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00001-7>
- Sidikou, I. D., Remy, B., Hornick, J. L., Losson, B., Duquesnoy, N., Yenikoye, A., & Beckers, J. F. (2005). Le pepsinogène et la pro-chymosine des bovins: connaissances actuelles, applications et perspectives dans la stratégie de lutte contre les verminoses gastro-intestinales. *Ann. Méd. Vét*, *149*, 213-228.

- Sindhu, R., Suprabha, G. N., & Shashidhar, S. (2009a). Optimization of process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 3(9), 498-503.
- Sindhu, R., Suprabha, G. N., & Shashidhar, S. (2009b). Optimization of process parameters for the production of alkaline protease from *Penicillium godlewskii* SBSS 25 and its application in detergent industry. *African Journal of Microbiology Research*, 3(9), 515-522.
- Singh, R. S., Singh, T., & Pandey, A. (2019). Microbial enzymes—an overview. *Advances in Enzyme Technology*, 1-40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00001-7>
- Singh, S., Singh, S., Bali, V., Sharma, L., & Mangla, J. (2014). Production of fungal amylases using cheap, readily available agro-residues, for potential application in textile industry. *BioMed Research International*, 2014.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. M. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2087.
- Singhanian, R. R., Pandey, A. (2017). Biotechnology for agricultural waste recycling. In Wong, j. W.-C., Tyagi, D. R., & Pandey, A. (eds.), *Current developments in Biotechnology and bio-energizing: Solid waste management*. (pp. 223-240). Elsevier.
- Soares, I., Tavora, Z., Patera, R., & Baroni, S. (2012). Microorganism-produced enzymes in the food industry. In B. Valdez (Éd.), *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*. InTech. <https://doi.org/10.5772/31256>
- Solanki, P., Putatunda, C., Kumar, A., Bhatia, R., & Walia, A. (2021). Microbial proteases : Ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech*, 11(10), 428. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>
- Song, P., Zhang, X., Wang, S., Xu, W., Wang, F., Fu, R., & Wei, F. (2023). Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1236368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236368>
- Souza, P. M. D. (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*, 41, 850-861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Souza, P. M. D., Bittencourt, M. L. D. A., Caprara, C. C., Freitas, M. D., Almeida, R. P. C. D., Silveira, D., Fonseca, Y. M., Ferreira Filho, E. X., Pessoa Junior, A., & Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337-346. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>
- Sreedevi, B., Eswari, G., & Kumari, J. P. (2014). Purification, optimization and production of alkaline protease from *Penicillium* isolates through solid state fermentation. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 8(1):665-670.

- Srinivasan, R., Prabhu, G., Prasad, M., Mishra, M., Chaudhary, M., & Srivastava, R. (2020). *Penicillium*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (p. 651-667). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00032-0>
- Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, P. W., & Mishra, P. K. (2019). Solid-State Fermentation strategy for microbial metabolites production : An overview. In *new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (p. 345-354). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00023-2>
- Stoll, V. S., & Blanchard, J. S. (2009). Buffers: principles and practice. In Burgess, R. R. & Deutscher, M. P. (eds) *Guide to protein purification*, 2nd Ed, *Methods in enzymology*, Vol. 463. (pp. 43-56). San Diego, USA: Academic Press, Elsevier.
- Sumantha, A., Sandhya, C., Szakacs, G., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2005). Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 43(4), 313-319.
- Sundarram, A., & Murthy, T. P. K. (2014).  $\alpha$ -amylase production and applications: a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166-175.
- Su, X., Schmitz, G., Zhang, M., Mackie, R. I., & Cann, I. K. O. (2012). Heterologous gene expression in filamentous fungi. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 81, p. 1-61). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394382-8.00001-0>
- Suriya, J., Bharathiraja, S., Krishnan, M., Manivasagan, P., & Kim, S.-K. (2016). Marine microbial amylases: properties and applications. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 79, p. 161-177). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.001>
- Tekere, M., Mswaka, A. Y., Zvauya, R., & Read, J. S. (2001). Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(4-5), 420-426.
- Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F. C., Nasr, K. A., ... & Zhou, S. (2019). Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular biotechnology*, 61, 579-601.
- Theron, L. W., & Divol, B. (2014). Microbial aspartic proteases: Current and potential applications in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(21), 8853-8868. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6035-6>
- Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146-161. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- Touthik, S. H., Lee, K., Lee, J., & Kim, K. (2017). Functional applications of lignocellulolytic enzymes in the fruit and vegetable processing industries. *Journal of Food Science*, 82(3), 585-593. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13636>

- Toumi, S. (2018). *Isolement et caractérisation des souches levuriennes productrices d'amylase à partir de sol saharien Algérien et cultivée sur un milieu à base de lactosérum* (Doctoral dissertation, Université Djillali Liabes de SBA). 90 p.
- Tunga, R., Banerjee, R., & Bhattacharyya, B. C. (1998). Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. *Bioprocess Engineering*, *19*(3), 187-190.
- Upadhyay, P., Shrivastava, R., & Agrawal, P. K. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, *6*(1), 15. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3>
- Vaidya, S. O. U. M. Y. A., Srivastava, P. K., Rathore, P. R. A. G. Y. A., & Pandey, A. K. (2015). Amylases: a prospective enzyme in the field of biotechnology. *Journal of Applied Biosciences*, *41*(1), 1-18.
- Verma, S., Meghwanshi, G. K., & Kumar, R. (2021). Current perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenomics. *Biochimie*, *182*, 23-36. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.12.027>
- Visvanathan, R., Qader, M., Jayathilake, C., Jayawardana, B. C., Liyanage, R., & Sivakanesan, R. (2020). Critical review on conventional spectroscopic  $\alpha$ -amylase activity detection methods: merits, demerits, and future prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(7), 2836-2847.
- Wang, J., & Wan, W. (2009). Experimental design methods for fermentative hydrogen production: a review. *International journal of hydrogen energy*, *34*(1), 235-244.
- Ward, O. P. (2011). Proteases. *Comprehensive Biotechnology*, 571–582. <https://doi.org/10.1016%2FB978-0-08-088504-9.00222-1>
- Wilson, K., & Walker, J. (2010). Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. 7th Ed. Cambridge, UK: Cambridge university press. 744 p.
- Yadav, A. N., Verma, P., Kumar, V., Sangwan, P., Mishra, S., Panjiar, N., Gupta, V. K., & Saxena, A. K. (2018). Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (p. 3-18). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00001-6>

# *Annexes*

## Annexe 1

Tableau A1: Liste du matériel non biologique utilisé pendant l'expérimentation.

Réactifs	Appareils	Verrerie et petit matériel
Acide chlorhydrique (HCl)	Agitateur horizontal (Stuart, <i>Reciprocating Shaker</i> , SSL2)	Béchers (25, 50, 100, 500 mL)
Acide 3,5-dinitrosalicylique	Agitateur magnétique avec plaque chauffante (Hotplate Stirrer, VELP Scientifica)	Tubes à essai + tubes coniques
Acide ortho-phosphorique à 85%	Autoclave (Wise Clave)	Erlenmeyers (250 mL, 500 mL)
Acide trichloracétique (TCA)	Bain-marie (Memmert)	Entonnoirs de différentes tailles.
Acétate de sodium, Acide citrique	Balance (Ohaus)	Eprouvettes (10, 25, 50, 100 mL).
Agar-Agar, Glucose, Maltose, Tween 80, Acide acétique,	Bec Bunsen (Erdgaz)	Fioles (50, 100, 250, 500 mL).
Amidon, Caséine, BSA, Tyrosine	Etuve (Memmert, Edmund Buhler GmBH)	Micropipettes (100-1000 µL, 10-100 µL).
Carbonate de sodium (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Microscope optique (OPTICA Axiom 2000)	Papier Filtre Wattman n°3.
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	pH mètre (Ohaus)	Boîtes de Pétri, anse de platine,....
Chlorure de potassium (KCl)	Spectrophotomètre (Optima, SP-3000 nano)	
Ethanol absolu 96%, lait écrémé (0% MG), Chitine, Pectine, Gélatine	Centrifugeuse réfrigérée (MPW-352R, MED. Instruments)	
Réactif de Folin-Ciocalteu		
Bleu de bromophénol, Bleu de bromocrésol		
Gaïacol (C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ), Bleu Brillant de Coomassie G-250		
Hydroxyde de sodium (NaOH)		
Phosphate de sodium dibasique (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )		
Phosphate de sodium monobasique (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )		
Sulfate d'ammonium (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)		
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)		
Tartrate double de Na et K,....		

**Annexe 2**

***Préparation du milieu PDA (Potato Dextrose Agar)***

Pomme de terre.....	200 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Chloramphénicol.....	0,05 g
Amoxicilline.....	0,5 g
pH final.....	5,60± 0,2

Ce milieu a été préparé à base de la pomme de terre en suivant les étapes ci-dessous:

Lavage des pommes de terre suivi du découpage et d'un pesage à la balance (200g pour préparer 1 L). Les morceaux obtenus ont été cuits dans un bécher gradué de 2 L contenant de l'eau distillé. L'ensemble est met sur une plaque chauffante pendant 1 h jusqu'au ramollissement. Le filtrat récupéré après filtration à travers une passoire a été mélangé avec l'agar-agar et le glucose. L'homogénéisation de la solution a été faite à l'aide d'un agitateur magnétique avec chauffage. A la fin on a ajouté les antibiotiques et le volume a été complété jusqu'à 1 L. Le milieu introduit dans des flacons de 200 mL a été stérilisé par autoclave à 121°C pendant 20 min (Mondo et al., 2016).



### **Annexe 3**

#### ***Détermination du taux d'humidité*** AOAC et Horwitz (1975)

- Peser avec précision des creusets vides à 0,0001 g.
- Introduire 10 g de son de blé dans chaque creuset et ajouter un volume spécifié de la solution minérale. Enregistrer le poids obtenu pour chaque creuset.
- Sécher les creusets dans une étuve à 105°C pendant 4 h.
- Après refroidissement dans un dessiccateur contenant du gel de silice activé à la même température, peser à nouveau les creusets.
- Calculer le taux d'humidité en utilisant la formule suivante:

$$\mathbf{TH(\%)} = \frac{P_0 - P}{P_0} \times \mathbf{100}$$

Où:

**P<sub>0</sub>**: poids de son de blé humide.

**P**: poids de son de blé après le séchage.

## Annexe 4

### *Préparation des solutions tampons et réactifs*

#### **1. Tampon citrate/Phosphate de sodium (0,1 M; pH 5,2)**

- ✓ Solution A: Acide citrique ( $C_6H_8O_7 \cdot 1H_2O$ ) à 0,1 M.
- ✓ Solution B: Phosphate de sodium dibasique ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ) à 0,2 M.

Pour obtenir une solution tampon à pH 5,2 : mélangez 23,3 mL de la solution A et 26,7 mL de la solution B, puis complétez le volume à 100 mL avec de l'eau distillée (Stoll et Blanchard, 2009).

#### **2. Tampon phosphate (0,1 M; pH 5)**

Pour préparer un tampon phosphate à 0,1 M et pH 5, mélangez 93,5 mL de la solution A (phosphate de sodium monobasique à 0,2 M) avec 6,5 mL de la solution B (phosphate de sodium dibasique à 0,2 M). Ensuite, diluez le mélange à 200 mL et vérifiez à nouveau le pH (Pavani et al., 2021).

#### **3. Tampon acétate de sodium (0,01 M; pH5)**

Pour préparer une solution tampon d'acétate de sodium (0,01 M; pH 5), mélangez 14,8 mL de la solution A (acide acétique à 0,2 M) avec 35,2 mL de la solution B (acétate de sodium à 0,2 M), puis diluez jusqu'à 100 mL avec de l'eau distillée. Ensuite, pour obtenir un tampon à 10 mM, diluez cette solution selon les instructions de Stoll et Blanchard (2009).

#### **4. Réactif de DNS**

- Mesurer 40 g de tartrate double Na et K dans un flacon de 500 mL.
- Ajouter 1,6 g du NaOH + 20 mL d'eau distillé.
- Dissoudre complètement le mélange (en chauffant doucement), sous agitation à l'abri de lumière.
- Ajouter après solubilisation 1 g du DNS.
- Couvrir avec du papier aluminium et attendre la dissolution du DNS.
- Laisser refroidir et compléter le volume à 100 mL avec de l'eau distillée.
- Boucher hermétiquement et conserver à 4°C à l'abri de la lumière pendant 15 jours (Keharom et al., 2016).

## **5. Réactif de Bradford**

Une solution mère de colorant a été préparée. Celle-ci contient 0,025 g de Bleu Brillant de Coomassie G250 dissout dans 12,5 mL d'éthanol à 96% dans un bécher protégé par du papier aluminium et agité pendant 2 h. Le tout a été additionné à 25 mL d'acide ortho-phosphorique 85% et puis le volume a été complété à 250 mL avec de l'eau distillée. Ce réactif doit être filtré à l'obscurité. Il peut être conservé pendant 1 mois à une température de 4°C et à l'abri de la lumière (Kielkopf et al., 2020).

## Annexe 5

### *Elaboration des gammes étalon*

#### 1. Activité protéolytique

**Tableau A2:** Elaboration de la gamme d'étalonnage de tyrosine (1 mg/mL).

N° du tube	Blanc	1	2	3	4	5
<b>Réactif et solutions</b>						
Vol de Tyr à prélever (µL)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (ou tampon) (µL)	1	980	960	940	920	900
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> à 2% (mL)	2,5					
Agiter correctement puis laisser stabiliser le mélange pendant 10 min						
Réactif de Folin-Ciocalteu (1/10 <sup>6</sup> ) (mL)	0,5					
Mélanger de nouveau rapidement et énergiquement après chaque addition du réactif de Folin et laisser reposer à l'ombre pendant 30 min au minimum, puis lire l'absorbance à 750 nm.						

#### 2. Activité amylasique

**Tableau A3:** Préparation de la gamme étalon de maltose (1 mg/mL).

N° du tube	Blanc	1	2	3	4	5
<b>Réactif et solutions</b>						
Solution de maltose (µL)	0	200	400	600	800	1000
Tampon phosphate (0,1M; pH 5) (µL)	1000	800	600	400	200	0
DNS (mL)	1					
Chauffage à 100°C pendant 5 min.						
Refroidissement, puis l'ajout de 500 µL d'eau distillée.						
Homogénéiser bien puis lire l'absorbance à 540 nm.						

### 3. Dosage des protéines

**Tableau A4:** Préparation de la gamme d'étalonnage de BSA (1 mg/mL).

<b>N° du tube</b>	<b>Blanc</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Réactif et solutions</b>						
Solution de BSA ( $\mu\text{L}$ )	0	20	40	60	80	100
Eau distillée ( $\mu\text{L}$ )	100	80	60	40	20	0
Réactif de Bradford (mL)	3					
Homogénéiser bien, laisser reposer pendant 5-10 min puis mesurer l'absorbance à 595 nm.						

## Résumé

Les hydrolases forment un groupe important d'enzymes largement utilisées en recherche scientifique et dans diverses industries telles que de détergents, alimentaires, pharmaceutiques, industrie de textiles,...etc. La recherche de nouvelles souches microbiennes capables de produire plusieurs enzymes sur des milieux de fermentation est un objectif ciblé par de nombreux travaux. Dans cette étude, nous avons cherché à comprendre l'impact de différents paramètres physicochimiques de la fermentation solide sur la production d'enzymes hydrolytiques (amylases, protéases et enzymes coagulant le lait) et laccases par une souche fongique locale *Penicillium* sp. cultivée sur son de blé dur, suite à une étape de screening sur des milieux de culture spécifiques. Cette dernière a révélé la capacité de la souche isolée à sécréter 80% des activités criblées (protéases, amylases, chitinases, lipases, laccases et pectinases). Les résultats obtenus ont montré que l'optimum de production des hydrolases ciblées a été abouti en incubant la souche fongique à 30°C sur son de blé humidifié avec la solution minérale M-9 (pH=4,0) à un taux d'humidité de 51,6%. L'extrait enzymatique brut obtenu sous ces conditions exerce une activité amyliques (8,188±0,294 mg Mal/min/mL), protéolytique (45,625±1,155 U/mL) et coagulante (195,182±3,211 US/mL) maximales après seulement 3 jours d'incubation. Pour les laccases, les conditions de production ont été totalement différentes. Les propriétés enzymatiques de la souche *Penicillium* sp. sont prometteuses pour une utilisation potentielle dans divers secteurs industriels.

**Mots clés :** *Penicillium* sp., hydrolases, amylase, protéase, SSF, activité coagulante, optimisation.

## Abstract

Hydrolases are an important group of enzymes widely used in scientific research and in various industries such as detergents, food, pharmaceuticals, textiles, etc. Searching for new microbial strains capable of producing multiple enzymes on fermentation media is a goal pursued by numerous works. In this study, we tried to understand the effect of different physicochemical parameters of solid-state fermentation on the production of hydrolytic enzymes (amylases, proteases, and milk-clotting enzymes) and laccases by a local fungal strain *Penicillium* sp. grown on durum wheat bran, following a screening step on specific culture media. The latter showed the ability of the isolated strain to secrete 80% of the screened activities (proteases, amylases, chitinases, lipases, laccases and pectinases). The obtained results showed that the optimal production of the targeted hydrolases was achieved by incubating the fungal strain at 30°C on wheat bran moistened with the mineral solution M-9 (pH=4.0) at a rate of humidity of 51.6%. The crude enzymatic extract obtained under these conditions exhibited maximum amylase (8.188±0.294 mg Mal/min/mL), proteolytic (45.625±1.155 U/mL) and milk-clotting (195.182±3.211 US/mL) activities after only 3 days of incubation. For laccases, the production conditions were completely different. The enzymatic properties of the *Penicillium* sp. are promising for potential use in various industrial sectors.

**Keywords:** *Penicillium* sp., hydrolases, amylase, protease, milk-clotting activity, SSF, optimization.

## المخلص

تشكل الهيدرولازات مجموعة مهمة من الإنزيمات المستخدمة على نطاق واسع في البحث العلمي وفي مختلف الصناعات مثل المنظفات والأغذية والأدوية والمنسوجات وما إلى ذلك. البحث عن سلالات ميكروبية جديدة قادرة على إنتاج إنزيمات متعددة على وسائط التخمر هو هدف تسعى إليه العديد من الأعمال. في هذه الدراسة، حاولنا فهم تأثير العوامل الفيزيوكيميائية المختلفة للتخمر في الحالة الصلبة على إنتاج الإنزيمات المحللة (الأميلاز، البروتياز، مخثرات الحليب) واللاكازات بواسطة السلالة الفطرية المحلية *Penicillium* sp. المزروعة على نخالة القمح القاسي، بعد مرحلة الفحص على وسائط استزراع محددة. كشفت هذا الأخيرة عن قدرة السلالة المعزولة على إفراز 80% من الأنشطة التي تم فحصها (البروتياز، الأميلاز، الكيتيناز، الليباز، اللاكازات والبكتيناز). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الإنتاج الأمثل للهيدرولازات المستهدفة تم تحقيقه عن طريق حضارة السلالة الفطرية عند 30 درجة مئوية على نخالة القمح المبللة بالمحلول المعدني M-9 (الرقم الهيدروجيني = 4.0) بمعدل رطوبة 51.6%. أظهر المستخلص الأنزيمي الخام الذي تم الحصول عليه في ظل هذه الظروف أقصى قدر من أنشطة الأميلاز (8.188 ± 0.294 ملغ/دقيقة/مل)، المحلل للبروتين (45.625 ± 1.155 وحدة/مل) ونشاط تخثر الحليب (195.182 ± 3.211 وحدة سوكسلي/مل) بعد 3 أيام فقط من "الحضارة". بالنسبة لللاكاز، كانت ظروف الإنتاج مختلفة تمامًا. الخصائص الأنزيمية لـ *Penicillium* sp. وإعادة للاستخدام المحتمل في مختلف القطاعات الصناعية.

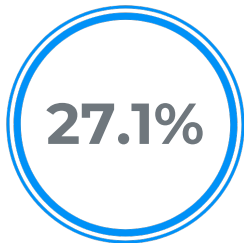
**الكلمات المفتاحية:** *Penicillium* sp., إنزيمات الهيدرولاز, الأميلاز, البروتياز, نشاط التخثر, SSF, التحسين.



ID: afwkwa-67019

## Certificat d'analyse de la similarité textuelle

- Nom du document: **HADJ KOUIDER Assia & MOGHRANI Lamia (M2-Biochimie appliquée) BENSMAIL S. (Test N°3).docx**
- Soumis par: **DJENADI Katia**
- Faculté: -
- Date de soumission: **2024-06-15**



### Taux global de similarité

- **27.1%** Similarité Forte
- **0.0%** Similarité Proche
- **0.0%** Exclu manuellement



### Nombre de sources

- 177** sources internet
- 0** sources Thèses-Algérie
- 0** sources dépôt privé



### Passages surlignés

- 15936** mots
- 108153** caractères

**i** Ce document est un certificat et résumé d'analyse et de détection de similarité textuelle qui peut être utilisé pour l'établissement d'un rapport de plagiat. Il revient à l'examineur, l'encadrant ou bien au comité déontologique de l'université ou de l'école d'émettre un avis quant au statut de plagiat du document analysé.

© Consultez l'**arrêté N° 1082 du 27 Décembre 2020 fixant les règles relatives à la prévention et la lutte contre le plagiat** pour en savoir plus concernant ce qui est considéré comme étant un acte de plagiat, les procédures ainsi que les sanctions.

Taille minimale des passages: **15 mots**. Niveau de tolérance de la similarité: **Majeur**

Signature d'intégrité

