



République algérienne démocratique et populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A. MIRA- BEJAIA  
Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département microbiologie

# Mémoire

Présenté par  
Melle. AZZOUZ Zahra

Pour l'obtention du diplôme de Magister

Filière : Biologie

Option : Microbiologie

Thème

**Production de cellulases et de xylanases fongiques par  
fermentation solide et liquide à base de paille et de son  
de blé**

Soutenu le : 14/10/2015

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
Mr ZAIDI Farid	Professeur	Univ. De Béjaïa	Président
Mr BENALLAOUA Said	Professeur	Univ. De Béjaïa	Rapporteur
Mr AISSAT Kamel	Professeur	Univ. De Béjaïa	Examineur
Mme BOUCHERBA Nawel	Maitre de Conférences A.	Univ. De Béjaïa	Examinatrice

Année Universitaire : 2015/2016.

## Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu au Professeur BENALLAOUA S. Directeur du Laboratoire de Microbiologie Appliquée pour m'avoir accueilli au sein de son équipe , proposé ce thème et accepté de superviser ce travail ; mais également pour la confiance qu'il ma témoigné et la liberté dans la prise d'initiatives dans les choix expérimentaux. Qu'il reçoive l'expression de ma vive gratitude.

Je souhaite remercier également Mlle Belhamiche N. pour m'avoir assisté et guidé durant la réalisation de ce travail. Je ne saurai la remercier assez pour son soutien.

Je remercie également Mr Zaidi F, professeur à l'université de Béjaia qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, ainsi les membres de jury , Mr Aissat K, professeur à l'université de Béjaia et Mme Boucherba N, maitre de conférence A à l'université de Béjaia, pour le temps qu'ils ont bien voulu consacrer à lire et à juger ce travail en tant qu'examineurs.

J'exprime toute ma sympathie à toutes les personnes du laboratoire de microbiologie Appliquée (LMA) pour leur amitié, leur aide et l'excellente ambiance de travail qu'ils ont fournie. Ma profonde reconnaissance à Mlle Azzouz Samia, Mlle Boufassa Louiza et Houfani Aicha Asma pour leurs précieux conseils et leurs disponibilités .Un immense merci également aux ingénieurs de laboratoire.

Enfin , je remercie toutes les personnes que je n'ai pas citée et ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire à*

*Mes parents*

*Mes frères plus particulièrement Zahir*

*Mes sœurs*

*Mes collègues de laboratoire d'analyse médicale d'immunologie de Dr Idjaad à Akbou*

*Mes chers collègues de la promotion Magister 2013. Je leur souhaite, à tous, une bonne continuation.*

## Liste des abréviations

**A** : Aspergillus  
**ACMC**ase: Activité Carboxyméthylcellulase.  
**AP** : Isolat *Trichoderma sp*  
**APF**ase: Activité papier filtre.  
**BG** : Isolat *Aspergillus sp*  
**BGs** :  $\beta$ -glucosidases  
**BLC**: Biomasse lignocellulosique.  
**CBD** : Cellulose Binding Domain.  
**CBH** : Cellobiohydrolase.  
**CBM** : Domaine de liaison au substrat.  
**CD** : Domaine catalytique.  
**CMC**: Carboxyméthyl cellulose.  
**DNS**: 3,5- acide dinitrosalicylique.  
**DP**: Degré de polymérisation.  
**E** : Enzyme  
**EG** : Endoglucanase.  
**FML** : Fermentation en milieu liquide  
**FMS** : Fermentation en milieu solide ou SSF  
**h** : Heure  
**H** : Humidité  
**IC** : Indice cellulolytique.  
**LC**: Lignocelluloses.  
**MEA**: Malt- Extract- Agar.  
**min** : Minute  
**ml** : Millilitre  
**mm**: Millimètre.  
**MS** : Matière sèche.  
**MW** : Mandels et Weber.  
**p /v** : masse par volume  
**p** : Poids  
**PDA**: Potato- Dextrose- Agar.  
**rpm** : Rotation par minute  
**s** : Seconde  
**S** : Substrat  
**sp** : Espèce  
**SPS** : Substrat poids sec.  
**T (°C)** : Température en degré Celsius  
**T** : *Trichoderma*  
**U** : Unité enzymatique  
**UI** : Unité internationale.  
**v/v** : Volume par Volume  
 **$\mu$**  : Micro

## Liste des figures

<b>Figure n°1</b> : structure de la biomasse lignocellulosique .....	3
<b>Figure n°2</b> : La cellulose.....	4
<b>Figure n°3</b> : Représentation schématique d'une microfibrille de cellulose .....	4
<b>Figure n°4</b> : Liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires de la cellulose .....	5
<b>Figure n°5</b> : Différents modèles d'hémicelluloses .....	6
<b>Figure n°6</b> ; Structure hypothétique d'un hémicellulose.....	7
<b>Figure n°7</b> : Structure de la lignine .....	8
<b>Figure n°8</b> : Schéma global du concept de bioraffinerie .....	11
<b>Figure n°9</b> : Technologies de prétraitement dans la production du bioéthanol .....	11
<b>Figure n°10</b> : Enzymes de la dégradation de la cellulose .....	12
<b>Figure n°11</b> : Structure moléculaire des endoglucanases .....	13
<b>Figure n°12</b> : Structure moléculaire des exoglucanases.....	14
<b>Figure n°13</b> : Action des principales hémicellulases nécessaires à l'hydrolyse des glucuron-arabinoxylanes.....	16
<b>Figure n°14</b> : Distribution des isolats en fonction des sites de prélèvement .....	42
<b>Figure n°15</b> : Photos du screening sur milieu gélosé représentant les zones d'hydrolyses des isolats.....	44
<b>Figure n°16</b> : Indices cellulolytiques des 66 isolats sur milieu CMC-Agar.....	45
<b>Figure n°17</b> : Activités CMCCase(A),Xylanase(B) et APFase(C) des 57 isolats fermentation liquide sur milieu MW.....	46
<b>Figure n°18</b> : Croissance fongique par la technique des lamelles .....	49
<b>Figure n°19</b> : Observations microscopiques de la souche <b>AP</b> comparée à des photos Standards.....	50
<b>Figure n°20</b> : Observations microscopiques des souches <b>AM</b> et <b>BD</b> comparées à des photos standards .....	50
<b>Figure n°21</b> : Observations microscopiques de la souche <b>BG</b> comparées à des photos Standards.....	50
<b>Figure n°22</b> : Cinétique de l'activité CMCCase des 04 isolats et ST Fermentation liquide : (A) : Paille de blé; (B) : Son de blé,(C) : Grignon d'olive .....	52
<b>Figure n°23</b> : Cinétique de l'activité APFase des 04 isolats et ST par fermentation liquide (A) : Paille de blé; (B) : Son de blé,(C) : Grignon d'olive .....	54

<b>Figure N° 24 :</b> Cinétique de l'activité de xylanase des 04 isolats et ST par Fermentation liquide (A) : Paille de blé; (B) : Son de blé,(C) : Grignon d'olive .....	56
<b>Figure n° 25 :</b> Aspect des cultures fongiques de <i>Trichoderma sp</i> (AP) et <i>Aspergillus sp</i> (BG) avec la fermentation solide de paille et son de blé.....	59
<b>Figure n° 26 :</b> Evolution de la MS des souches AP et BG au cours de la fermentation solide (A) : Paille de blé à 40% d'humidité,(B): Son de blé à 40% d'humidité ,(C) : Paille de blé à 80% d'humidité .....	61
<b>Figure n° 27 :</b> Evolution du pH au cours de la fermentation solide (A) : Paille de blé à 40% d'humidité, (B): Son de blé à 40% d'humidité, (C) : Paille de blé à 80% .....	63
<b>Figure n° 28 :</b> Evolution des activités CMC ases au cours de la fermentation solide: Paille de blé à 40% d'H, (B) : Son de blé à 40% d'H, (C) : Paille de blé à 80% d'H.....	65
<b>Figure n° 29 :</b> Evolution des activités APFase au cours de la fermentation solide (A):Paille de blé à 40% d'H, (B) : Son de blé à 40% d'H, (C): Paille de blé à 80% d'H.....	68
<b>Figure n° 30 :</b> Evolution des activités xylanases au cours de la fermentation solide (A): Paille de blé à 40% d'H, (B) : Son de blé à 40% d'H, (C) : Paille de blé à 80% d'H .....	70
<b>Figure n° 31 :</b> Effet du pH sur l'activité endoglucanase (A), Xylanase (B) et Papier filtre (C).....	72
<b>Figure n° 32 :</b> Effets de la température sur l'activité Endoglucanase (A), Xylanase (B) et Papier filtre (C).....	74
<b>Figure n°33:</b> Thermostabilité de l'extrait enzymatique en absence du substrat. (A) Endoglucanase, (B) : Xylanase, (C) : Papier filtre .....	76
<b>Figure n°34 :</b> Courbe d'étalonnage pour le dosage du Glucose (CMCases).....	Annexe III
<b>Figure n° 35 :</b> Courbe d'étalonnage pour le dosage du Glucose (APFases).....	Annexe III
<b>Figure n° 36 :</b> Courbe d'étalonnage pour le dosage du Xylose .....	Annexe III

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau I :</b> Composition chimique et production mondiale des principaux déchets L.C .....	<b>9</b>
<b>Tableau II :</b> Historique du développement de la fermentation en milieu solide .....	<b>21</b>
<b>Tableau III :</b> Principaux domaines d'applications de la fermentation en milieu solide .....	<b>23</b>
<b>Tableau IV :</b> Comparaison entre la FMS et FML .....	<b>27</b>
<b>Tableau V:</b> Informations relatives aux échantillons .....	<b>29</b>
<b>Tableau VI :</b> Etapes du dosage de l'activité papier filtre .....	<b>33</b>
<b>Tableau VII:</b> Etapes du dosage de l'activité CMC <sub>Case</sub> .....	<b>34</b>
<b>Tableau VIII:</b> Isolats fongiques des différents prélèvements .....	<b>43</b>
<b>Tableau IX :</b> Performances cellulolytiques des souches .....	<b>47</b>
<b>Tableau X:</b> Principaux caractères cultureux des isolats. ....	<b>48</b>
<b>Tableau XI:</b> Principaux caractères microscopiques des isolats dans le milieu PDA .....	<b>49</b>
<b>Tableau XII:</b> Etude comparée de la production d'enzymes cellulolytiques par fermentation submergée en présence de son de blé .....	<b>57</b>

Liste des abréviations  
Liste des figures  
Liste des tableaux

## Sommaire

INTRODUCTION GENERALE..... 1

### CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La biomasse lignocellulosique ..... 3  
1.1. La cellulose ..... 3  
1.2. Les hémicelluloses ..... 5  
1.3. La lignine..... 7  
1.4. Les principaux déchets et coproduits lignocellulosiques ..... 8  
1.4.1 La biomasse sèche ..... 9  
1.4.2 La biomasse humide ..... 10  
1.4.3 Valorisation de la biomasse..... 10  
2. Les enzymes lignocellulolytiques ..... 11  
2.1. Les cellulases..... 12  
2.1.1. Structure des cellulases ..... 12  
2.1.2. La synergie entre les cellulases ..... 15  
2.2. Les xylanases (Hémicellulases) ..... 15  
2.3. Les ligninases..... 16  
3. Les Champignons lignocellulolytiques ..... 17  
3.1. Généralités sur les champignons ..... 17  
3.2. Activité lignocellulolytique des champignons ..... 17  
3.2.1. Les cellulases fongiques ..... 19  
3.2.2. Les hémicellulases..... 19  
3.2.3. Capacités ligninolytiques de champignons ..... 19  
4. La fermentation de substrats solides (FMS) ..... 20  
4.1. Généralités et définitions..... 20  
4.2. Applications de la fermentation en milieu solide..... 22  
4.3. Conduite de procédés ..... 22  
4.3.1. Les supports ..... 22  
4.3.2. Les facteurs environnementaux ..... 24  
4.4. Comparaison des technologies de fermentation en milieux solide et liquide  
(submergée)..... 27

### CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Isolement de moisissures Cellulolytiques..... 28  
1.1. Echantillonnage ..... 28



1.2.	Isolement et sélection de moisissures cellulolytiques .....	29
1.3.	Purification .....	30
1.4.	Conservation des souches .....	30
<b>2.</b>	<b>Criblage des isolats cellulolytiques performants .....</b>	<b>31</b>
2.1.	Criblage sur milieu gélosé « Qualitatif » .....	31
2.2.	Criblage en milieu liquide agité « quantitatif » .....	32
<b>3.</b>	<b>Mesure des activités cellulolytiques et xylanolytiques .....</b>	<b>33</b>
3.1.	Activité papier filtre .....	33
3.2.	Activité carboxyméthylcellulase (CMCase) ou endoglucanase.....	34
3.3.	Activité xylanolytique.....	35
<b>4.</b>	<b>Observations macro et microscopiques des souches sélectionnées .....</b>	<b>35</b>
4.1.	Observations macroscopiques .....	35
4.2.	Identification microscopique .....	36
<b>5.</b>	<b>Mise en œuvre des fermentations liquide et solide avec des coproduit .....</b>	<b>37</b>
5.1.	Préparation des substrats de fermentation.....	37
5.2.	Tests préliminaires de criblage cellulolytique et xylanolytique par fermentation liquides des coproduits .....	37
5.3.	Production d'enzymes par Fermentation solide « SSF » .....	38
<b>5.3.1.</b>	<b>Analyses physico-chimiques .....</b>	<b>39</b>
5.4.	Activité enzymatique dans l'extrait brut de fermentation .....	40
<b>6.</b>	<b>Caractérisation partielle des cellulases et xylanases dans le surnageant .....</b>	<b>41</b>
6.1.	Effet de la température .....	41
6.2.	Effet du p H .....	41
6.3.	Thermostabilité.....	41
<b>7.</b>	<b>Analyse statistique. ....</b>	<b>41</b>

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

1.	Isolement sur milieu sélectif .....	42
2.	Criblage des isolats.....	44
2.1.	Criblage qualitatif sur milieu gélosé .....	44
2.2.	Criblage quantitatif en milieu liquide agité .....	45
3.	Etude Morphologique des isolats sélectionnés .....	47
3.1.	Macromorphologie .....	48
3.2.	Micromorphologie.....	49
4.	Production de cellulases et Xylanases par fermentation submergée de déchets ligno-cellulolytiques.....	51
4.1.	Production des endoglucanases .....	51
4.2.	Production de papier filtrases .....	53
4.3.	Production de xylanase.....	55

5. Production de cellulases et de xylanases par fermentation solide avec de la paille et du son de blé .....	58
5.1. Culture et croissance des souches .....	58
5.2. Evolution de la matière sèche et du pH au cours de la FMS .....	60
5.2.1. la matière sèche .....	60
5.2.2. Le pH de milieu .....	62
5.3. Activités enzymatiques des extraits .....	64
5.3.1. Activités d'endoglucanase (CMCase).....	64
5.3.2. Activités papier filtre (APFase).....	67
5.3.3. Activité xylanasiq (endoxylanases).....	71
6. Effet du pH et de la température sur les activités cellulases et xylanases d' <i>Aspergillus sp</i> (BG) .....	71
6.1. Effet du p H .....	71
6.2. Effets de la température.....	73
6.3. Thermostabilité en absence du substrat.....	75
Conclusion.....	79
Références bibliographiques	
Annexes	

## Résumé

La présente étude consiste à cribler des moisissures cellulolytiques performantes. 66 isolats capables de croître sur milieu gélosé en présence de CMC comme seule source de carbone et d'énergie sont soumis à un premier criblage qualitatif sur milieu gélosé (CMC-agar), cela a permis de les classer sur la base de leurs indices cellulolytiques. 57 isolats sont sélectionnés avec un IC supérieur ou égal à **1,25** à l'exception des moisissures envahissantes. Un deuxième criblage quantitatif sur milieu liquide a permis de sélectionner les isolats les plus performants, Toutes les souches testées présentent des activités APFase entre **0,071 et 0,274**, CMCCase entre **1,175 et 4,202** et xylanase entre **1,914 et 5,033**. Les souches **AP, AM, BG et BD** révèlent des activités CMCCase, APFase et xylanases relativement importantes. Ces résultats ont permis de choisir ces souches pour la fermentation submergée avec des substrats lignocellulosiques tel que le grignon d'olive, la paille et le son de blé. Une étude morphologique est réalisée sur ces 04 isolats sélectionnés et a permis de les rattacher aux genres *Trichoderma* (**AP**), *Aspergillus* (**BG**) et *Penicillium* (**AM** et **BD**). Des cinétiques de production des cellulases et xylanases sont réalisées en milieu liquide. Les résultats indiquent que les souches AP et BG présentent de meilleures activités avec la paille et le son de blé. Cela a abouti à la sélection de 2 souches de *Trichoderma sp* (**AP**) et *Aspergillus sp* (**BG**) pour réaliser une fermentation solide avec de la paille de blé humidifié à 40 et 80% et le son de blé humidifié à 40%. Certains paramètres de culture, pH et matière sèche sont suivis en même temps que la production de cellulases et de xylanases. Cette étude révèle qu'avec *Aspergillus sp*, la synthèse des enzymes atteint son maximum à 2 jours de fermentation avec la paille et le son de blé. Le maximum d'activité CMCCase, APFase et xylanase observé est de **25,442, 6,275, 551,141 UI/ml** respectivement. Enfin une caractérisation partielle des cellulases et xylanases de la souche **BG**, est effectuée dans le surnageant de culture du 2<sup>ème</sup> jour de fermentation. Les enzymes sont stables entre pH 3 et 9 avec un optimum de 3.0, 5.0 et 4.0 respectivement pour l'endoglucanase, xylanase et PFase. La température optimale des activités relatives est de 60°C pour l'endoglucanase et la xylanase et 40°C pour le papier filtre. Ces enzymes montrent une stabilité à 50°C. A 60°C; une stabilité est enregistrée pour la CMCCase et l'activité PFase, pour la xylanase est stable une 1 heure seulement. A 70°C; l'endoglucanase et la xylanase sont sensibles à cette température, tandis que APFase est stable durant 7 heures. Ces caractéristiques de thermostabilité et de pH acide sont recherchées par les industriels.

**Mots clés** : Lignocellulose, *Aspergillus sp*, *Trichoderma sp*, FMS, Cellulase, Xylanase.

# Introduction

Des millions de tonnes de biomasse lignocellulosiques sont rejetés chaque année sous forme de déchets solides agro-industriels et forestiers sans traitements appropriés, parmi les conséquences de ces rejets; la prolifération de parasites et la pollution de l'environnement en général, la biomasse lignocellulosique est composée : de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. La source la plus importante de carbone de la planète est la cellulose, synthétisée par les plantes terrestres et les algues marines avec  $0,85 \times 10^{11}$  tonnes par An (**Ang et al., 2015 ; Zha et al., 2012 ; Dar et al., 2013**).

La conversion des déchets lignocellulosiques en produits chimiques a attiré de plus en plus l'attention des chercheurs. L'épuisement rapide des ressources fossiles, l'augmentation de la demande d'énergie, de nourriture, de produits chimiques divers ainsi que la notion de développement durable en sont les principales causes. La conversion des déchets lignocellulosiques en biocarburants en est le principal exemple (**Qingxin et al., 2014**).

Le traitement chimique préliminaire de conversion de la biomasse lignocellulosique génère des effluents qui contiennent des substances toxiques et mutagènes. Ceci a conduit à des investigations intenses sur le traitement biologique de la biomasse lignocellulosique afin de réduire sensiblement l'utilisation des substances chimiques. L'hydrolyse biologique de la biomasse lignocellulosique nécessite des réactions synergiques entre les enzymes ligninolytiques, cellulolytiques et hémicellulolytiques pour la dégradation complète de ce complexe (**Woiciechowski et al., 2013 ; Ang et al., 2015**). Le prétraitement de la biomasse lignocellulosique est nécessaire car les enzymes d'une part ne peuvent pas accéder aux polysaccharides à cause de leur taille et d'autre part en raison de la couverture des polysaccharides par la lignine (**Watanabe, 2013**).

La dégradation enzymatique de la cellulose a été étudiée pendant des décennies. Il y a principalement trois types de cellulases, endoglucanases, exocellobiohydrolase et  $\beta$ -glucosidases. L'hydrolyse complète de la cellulose a besoin de l'action synergique de ces trois types d'enzymes. En outre, la dégradation de l'hémicellulose est réalisée par l'endoxylanase qui est spécifique des liaisons 1,4-B-D-xylosidiques du xylane ou du xyluglucane (**Cho et al., 2000 ; Ang et al., 2015**).

Dans la nature, de nombreux microorganismes sont capables de dégrader la cellulose et l'hémicellulose. Lors de leur croissance sur des substrats celluloses, ces microorganismes produisent un ensemble complexe de glycosyl hydrolases (**Qingxin et al., 2014**).

Les champignons sont considérés comme les meilleurs producteurs d'enzymes cellulolytiques en raison de leur cellulases naturelles douées d'une capacité de saccharification complète de la lignocellulose ( **Pimentel et al., 2014**).

Les champignons filamenteux, comme les espèces de *Trichoderma*, produisent tous les composants d'un système multienzymatique avec des spécificités et des modes d'action différents. Le système de cellulases de *Trichoderma reesei* a été le plus étudié parmi les champignons cellulolytiques. La production de cellulases a été également décrites chez des espèces d'*Aspergillus* ainsi que d'autres genres tel que *Penicillium*, *Acremonium* et *Chrysosporium* qui sont considérés comme des solutions de rechange possibles et prometteuses à *Trichoderma* ( **Tao et al.,2010 ; Lambertz et al.,2014**).

La production de lignocellulases est un processus finement contrôlé. La production d'enzyme est généralement déclenchée lorsque les substrats lignocellulosiques sont présents. Ceci est la raison pour laquelle la plupart des souches productrices de lignocellulases sont isolées des environnements riches en déchets lignocellulosiques ( **Qingxin et al., 2014**).

De nombreuses souches disponibles dans le commerce sont modifiées par mutagenèse pour obtenir des activités cellulases élevées. Toutefois pour produire des sucres fermentescibles, l'utilisation de souches sauvages demeure indispensable car certaines industries tels que l'industrie alimentaire interdisent strictement l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (OGM) ( **Qingxin et al., 2014**).

L'objectif de ce travail est de produire des cellulases et xylanases à partir des souches de moisissures lignocellulolytiques les mieux adaptées au procédés de fermentation sur milieux solides et liquides.

A cet effet, nous avons adopté une démarche classique qui consiste d'abord à isoler puis sélectionner des moisissures cellulolytiques. Les souches les plus performantes sont identifiées par les caractères macro et microscopiques. La production de cellulases et xylanases avec des déchets lignocellulolytique est réalisée par fermentation submergée et solide en utilisant le grignon d'olive, la paille et le son de blé comme seule source de carbone. Dans la dernière partie de ce travail, nous avons entamé une caractérisation partielle des enzymes produites par l'étude de l'effet du pH et de la température sur les activités enzymatiques produites.

# **Chapitre I**

## **Synthèse bibliographique**

## 1. La biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique, appelée parfois biomasse, est constituée de trois composants majeurs: la cellulose, l'hémicellulose et la Lignine. Elle comprend notamment les arbres et les herbes et représente la grande majorité de la biomasse, définie comme tout matériau d'origine biologique à l'exception des matériaux enfouis dans les formations géologiques ou fossilisées. En moyenne, la biomasse lignocellulosique contient 40-60 % de cellulose, 20-40 % d'hémicelluloses et 10-25 % de lignine (Van parijs et al., 2010).

Dans la paroi des cellules végétales, les chaînes linéaires hautement ordonnées de cellulose contribuent à la résistance physique, tandis que la lignine hydrophobe amorphe est responsable de la résistance aux produits chimiques, en particulier la protection contre l'eau. L'hémicellulose assure la liaison entre la cellulose et la lignine (Reguant et Rinaudo, 1999).

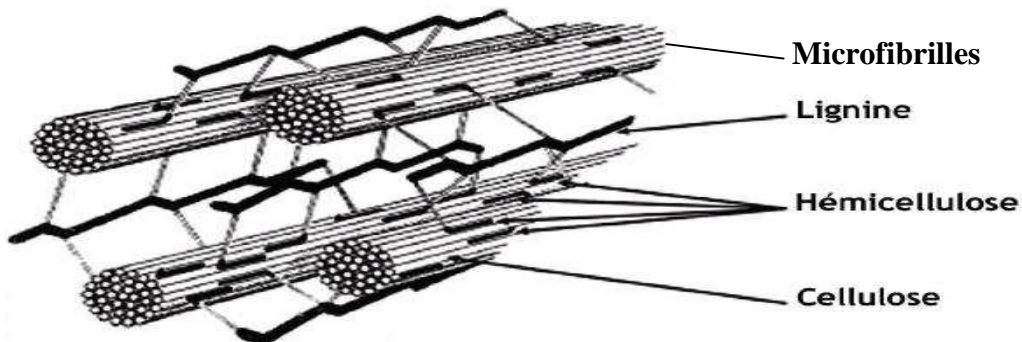


Figure n°1 : Structure de la biomasse lignocellulosique (Van parijs et al., 2010).

Ces molécules de cellulose sont reliées entre elles au moyen de molécules d'hémicellulose, chaînes polymériques formées principalement par des molécules de pentoses (sucres à 5 atomes de carbone ou C<sub>5</sub>), d'hexoses (sucres C<sub>6</sub>) et des acides uroniques. Le degré de polymérisation moyen est beaucoup plus faible (150 à 200). La lignine effectue la liaison entre les faisceaux de cellulose. C'est une chaîne polymérique constituée d'alcools, les monolignols, fortement réticulée, ce qui confère à la plante sa structure particulière. Les trois polymères constitutifs sont intimement associés entre eux, formant ainsi une matrice très rigide (fig. 1) (Van parijs et al., 2010).

### 1.1. La cellulose

La cellulose est le polysaccharide structural de base des parois des cellules végétales, qui peut représenter jusqu'à 50 % de la masse totale. Elle est la molécule organique la plus abondante sur terre, avec une production annuelle estimée à  $1.5 \times 10^{12}$  tonnes. Elle constitue par ailleurs 18 à 33 % du matériel végétal des litières méditerranéennes, la cellulose est un polymère linéaire constituée d'unités  $\beta$ -D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons  $\beta$ -



1,4 glycosidiques (fig. 2), sa formule chimique est  $(C_6H_{10}O_5)_x$  ( Alarcón-Gutiérrez, 2007; Balat, 2011).

Le degré de polymérisation moyen de la cellulose, correspond au nombre de motifs de  $\beta$ -D-glucopyranose, il varie de 8000-15 000 unités de glucose (Brown, 2004)

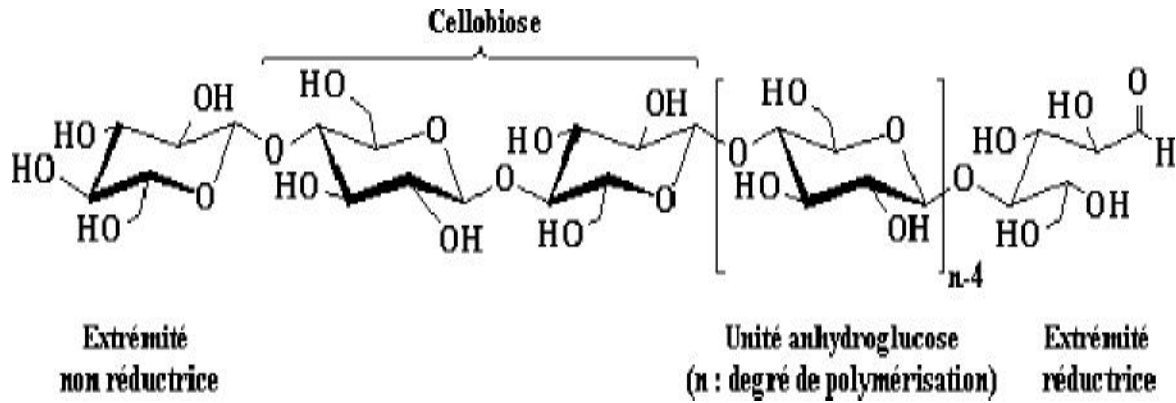


Figure n°2 : La cellulose (Brown, 2004).

Les nombreux groupements hydroxyles sont responsables du comportement physicochimique de la cellulose. Selon leur position dans l'unité glucose, ils sont capables de former des liaisons hydrogènes intramoléculeaires à l'intérieur d'une même chaîne de cellulose ou intermoléculeaires entre deux chaînes différentes constituant ainsi des microdomaines hautement organisés. Ces liaisons hydrogènes sont responsables de la formation des microfibrilles dans lesquelles certaines régions sont hautement ordonnées, cristallines et d'autres moins, dites amorphes (fig 3). La structure hautement cristalline n'est généralement pas accessible aux activités enzymatiques, tandis que les régions amorphes sont plus accessibles à la dégradation (Pérez et al., 2002).

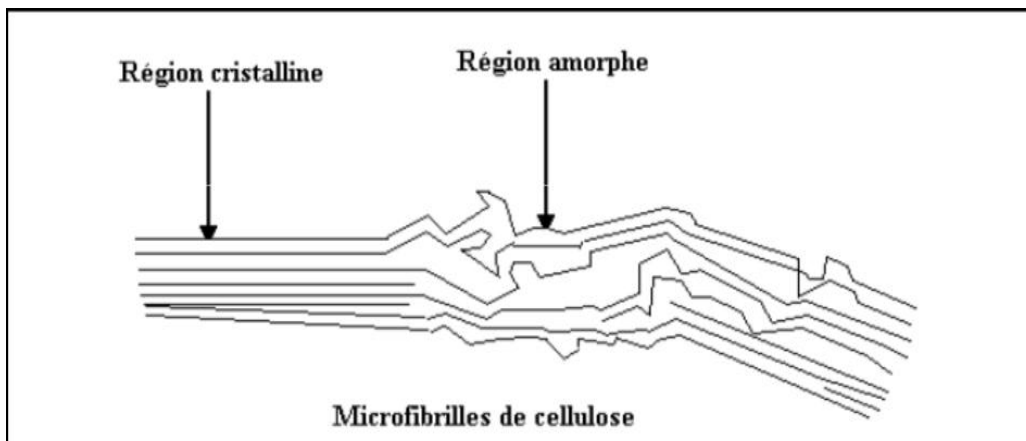


Figure n°3: Représentation schématique d'une microfibrille de cellulose (Pouzet, 2010).

Les liaisons hydrogènes ont plusieurs conséquences. Tout d'abord, du fait de leur grand nombre et de leur agencement, elles confèrent aux fibres de cellulose une très grande résistance mécanique. Puis, la cellulose est très difficilement soluble car il est peu aisé de rompre toutes ces interactions. Enfin, elle n'est pas fusible car la température nécessaire à rupture de ces liaisons hydrogènes est supérieure à celle de la décomposition de la molécule, qui a lieu par rupture du cycle glucopyranosique (Mazza, 2009).

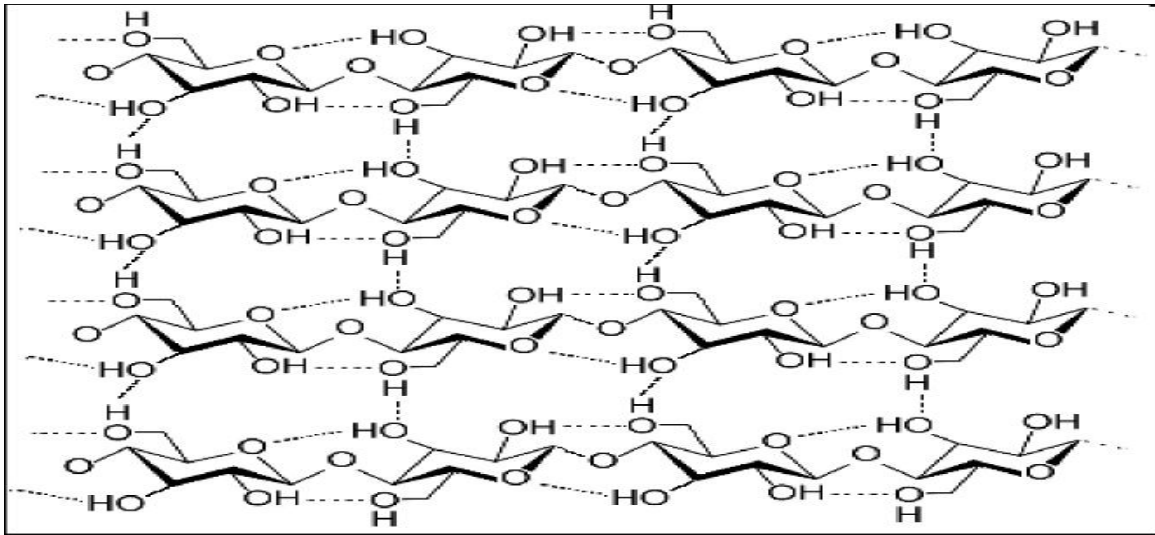


Figure n°4 : Liaisons hydrogène intra et intermoléculaires de la cellulose (Mazza, 2009).

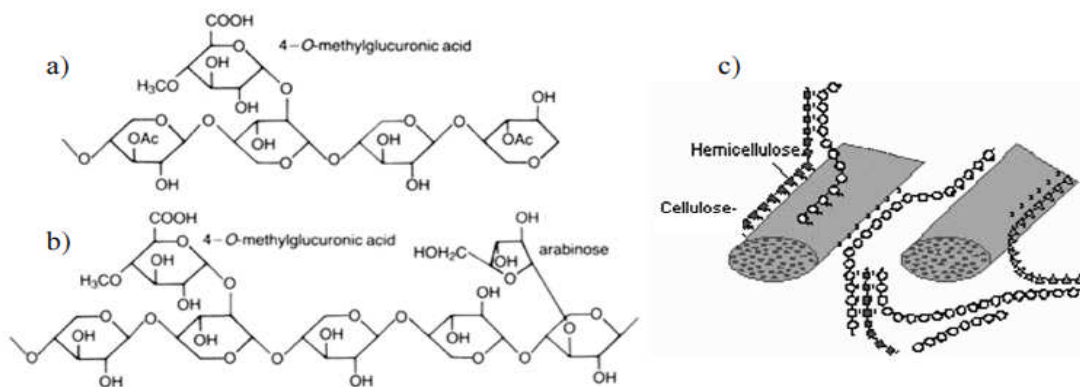
## 1.2. Les hémicelluloses

Le deuxième composant de la lignocellulose est l' hémicellulose qui constitue 25 à 30% de la matière sèche totale (Balat, 2011).

Ce sont des hétéropolysaccharides qui se trouvent associées dans la paroi végétale avec la cellulose et la lignine. Il s'agit de polymères non-cellulosiques à structure branchée constituée de différentes unités de sucres. On y trouve des pentoses ( $\beta$ -D- xylose,  $\alpha$ -L- arabinose), des hexoses ( $\beta$ -D-mannose,  $\beta$ -D-glucose,  $\alpha$ -D-galactose) et ou des acides uroniques ( $\alpha$ -D-glucuronique,  $\alpha$ -D-4-O-méthylgalacturonique et  $\alpha$ -D-galacturonique) et à plus faible proportion,  $\alpha$ -L-rhamnose,  $\alpha$ -L-fucose et une variété de sucres neutres O-méthylés (Schulze,1891 citée par Boucherba, 2011).

L'hémicellulose est composée de résidus  $B$ -(1,4)-D-pyranose, Les pyranoses peuvent être glucose, mannose ou xylose et les hémicelluloses sont alors appelées xyloglucanes, mannanes ou xylanes, respectivement ( Chávez Montes, 2010).

Les xylanes sont composés d'un squelette de résidus de D-xylose unis en B-(1,4), qui peut être substitué par des résidus de D-glucuronate en  $\alpha$ -(1,2). Cette molécule peut être O-méthylée en position 4; glucuronoxylane, par des résidus de L-arabinose en  $\alpha$ -(1,2) ou  $\alpha$ -(1,3) (arabino-xylanes) ou par les deux (glucuronoarabinoxylanes) (Chávez-Montes, 2010).



La principale hémicellulose est le xyloglucane. Le xyloglucane est composé d'un squelette de D-glucose en B-(1,4), et ces glucoses peuvent être substitués en  $\alpha$ -(1,6) par des résidus de D-xylose. Les xyloglucanes ont été particulièrement étudiés car ils sont essentiels pour déterminer l'expansibilité de la paroi. L'expansion des parois est un des sujets fondamentaux de la recherche sur les parois végétales. Un autre type d'hémicellulose que l'on trouve dans les parois est le mannane. Le mannane peut avoir un squelette de D-mannose en B-(1,4) ou un squelette de D-mannose et de D-glucose, également unis en B-(1,4). Ils sont alors appelés glucomannanes. Ces deux types de mannanes peuvent être substitués en  $\alpha$ -(1,6) par des résidus de D-galactose, et on parle alors de galactomannanes ou galactoglucomannanes. Les mannanes particulièrement abondants dans les graines et sont supposés être des polysaccharides de réserve (Chávez-Montes, 2010).

A cause de cette hétérogénéité de leurs constituants chimiques, les hémicelluloses, dans leur état natif, sont de nature amorphe non cristallisable. Ce sont des polymères branchés à faible poids moléculaire avec un degré de polymérisation qui varie de 80 à 200 ce qui rend leur hydrolyse relativement plus facile que celle de la cellulose. Différentes structures d'hémicelluloses sont retrouvées dans la nature, après hydrolyse ils sont composés de plusieurs monomères (Girio *et al.*, 2010 citée par Boucherba, 2011).

En termes d'applications industrielles, les hémicelluloses sont essentiellement utilisées pour la production d'oses. En effet, en milieu acide, l'hydrolyse des hémicelluloses conduit aux monomères constitutifs tels que le xylose, le glucose et l'arabinose, La fermentation alcoolique ou enzymatique des oses ainsi formés, les transforme en alcools (éthanol, butanol) et en acides organiques (butyrique, acétique, lactique ...) (Jacquinot *et al.* 1989 cité par Bettache, 2013).

Le nombre des ramifications, leur répartition le long de l'axe et la longueur des chaînes latérales conduisent à une grande variété de macromolécules, aux propriétés différentes (Vincken *et al.*, 1995).

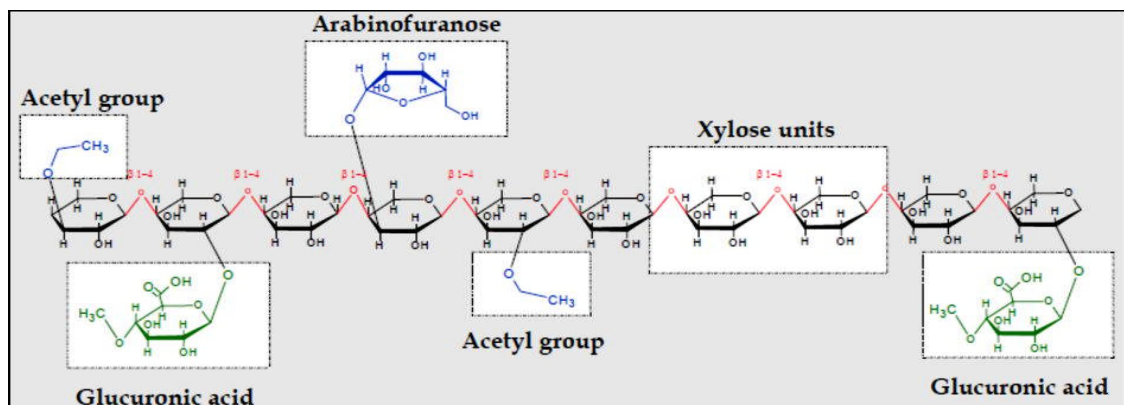


Figure n°6 ; Structure hypothétique d'un hémicellulose (Mussatto *et al.*, 2012).

### 1.3. La lignine

La lignine est le dernier composant principal de la lignocellulose, elle représente 15 à 30% de la matière organique. La lignine constitue la fraction non saccharidique la plus importante des fibres végétales. La molécule de la lignine est un complexe d'unités de phénylpropane, formant une structure amorphe non soluble dans l'eau (Taherzadeh *et Karimi*, 2008).

Les lignines sont des polymères hautement condensés, formés par la déshydrogénation et la polymérisation de trois alcools à noyaux phénylpropane C6-C3 : les alcools trans-coumarylique, transconiférylique et transsinapylique. Elles s'incrémentent dans tout l'espace disponible dans les parois en association étroite avec les différents polysaccharides et confère aux parois végétales des propriétés d'imperméabilité et de résistance aux attaques microbiennes. La lignine constitue le principal obstacle à la disponibilité des glucides pour les microorganismes (Kögel-Knabner, 2002).

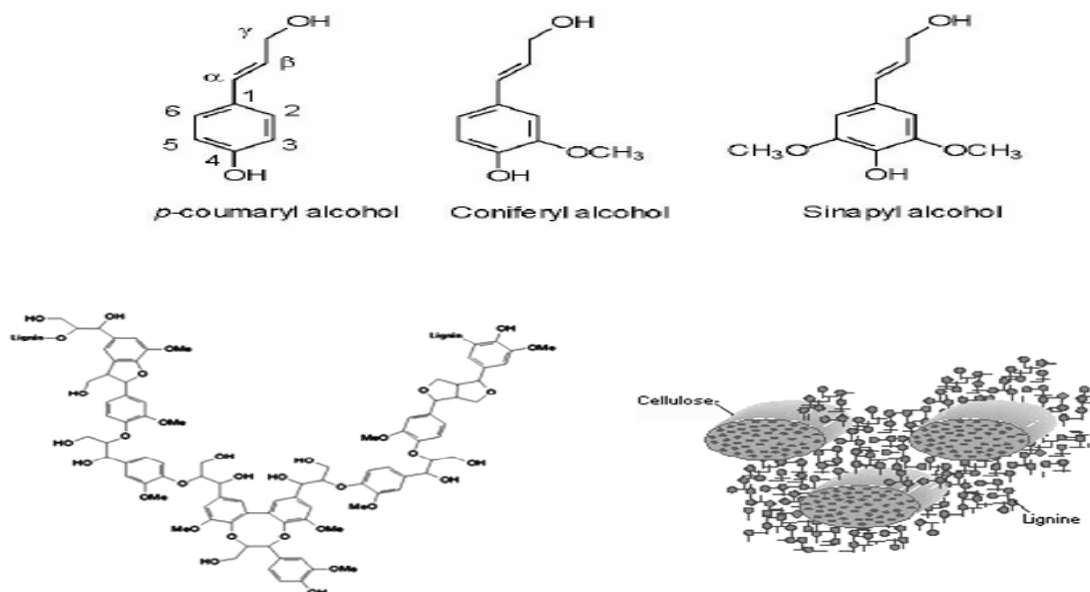


Figure n°7 : Structure de la lignine (Mussatto et al., 2012).

#### 1.4. Les principaux déchets et coproduits lignocellulosiques

Les déchets lignocellulosiques sont produits en grandes quantités par les différents secteurs comme la foresterie, la papeterie, l'agriculture et l'agroalimentaire, en plus de divers déchets ménagers (Tableau N° I). L'accumulation de grandes quantités de cette biomasse dans la nature constitue une source de pollution organique qui nuit à l'environnement (Howard et al., 2003).

Ces déchets représentent le potentiel le plus important en biomasse et constituent actuellement un enjeu considérable, compte tenu de leur niveau de production élevé et de leur impact sur l'environnement (Yuan et al., 2008).

**Tableau I** : Composition chimique et production mondiale des principaux déchets Lignocellulolytiques (L.C) (Sanchez, 2009 ; Dashtban et al., 2009 ; Moor et al., 2011)

Résidus L.C	Composition			Production mondiale (tonne/an
	Cellulose	Hémicellulose	Lignine	
Bagasse de canne sucre	32-44	27-32	19-24	317 – 380.10 <sup>6</sup> (2005)
Paille de blé	29-35	26-32	16-21	154 -185 .10 <sup>6</sup> (2006)
Paille d’orge	31-34	24-29	14-15	35 – 42 .10 <sup>6</sup> (2006)
Paille de riz	31	24	18	157 - 188 .10 <sup>6</sup> (2005)
Résidus de banane	13,2	14,8	14	13 - 15 .10 <sup>6</sup> (2007)
Rafle de maïs	45	35	15	159 – 191.10 <sup>6</sup> (2005)
Coque d’arachide	45-55	25	28-30	9,5. 10 <sup>6</sup> (2011)
Noyaux de datte	42	17,5	11	938 .10 <sup>3</sup> (2011)
Pulpe de café	40-55	25-40	18-30	/
Papier journal	35	46,3	18,8	/

la biomasse lignocellulosique peut être répartie en 2 grandes catégories ; La biomasse sèche et La biomasse humide (Didderen et al., 2008).

#### 1.4.1. La biomasse sèche

Elle comprend le bois et ses sous produits mais également les sous produits de l’industrie papetière et les déchets ménagers (Didderen et al., 2008).

- **Produits et coproduits forestiers** ; Dans l’industrie forestière, et plus particulièrement au sein des scieries, de nombreux coproduits (écorces, sciures et copeaux) sont générés en quantités importantes. La plupart sont utilisés au niveau des industries de trituration pour la production de pâte à papier et de panneaux de bois ou comme source énergétique pour le chauffage.
- **Sous produits de l’industrie papetière** : Les rognures de papier et le papier non conforme constituent une source de biomasse non négligeable dont la valorisation peut être intéressante du moment où elle ne nécessite pas de traitements spéciaux.
- **Déchets urbains** ; Ils sont très variés, dans le cadre de la valorisation biologique, seuls les composés de type lignocellulose seront envisagés à savoir les journaux, le papier carton et les déchets ménagers compostables.

### 1.4.2. La biomasse humide

Regroupe les coproduits des industries agroalimentaires et les déchets d'origine agricole. Les principaux coproduits sont la paille des céréales, rafles et épis de maïs, balles de riz et d'avoine, son de blé et de riz, bagasse de canne à sucre, bagasse de manioc, différents tourteaux des graines et fruits oléagineux (soja, arachide, Coprah), pulpes de fruit, etc.... **(Mussatto et al., 2012).**

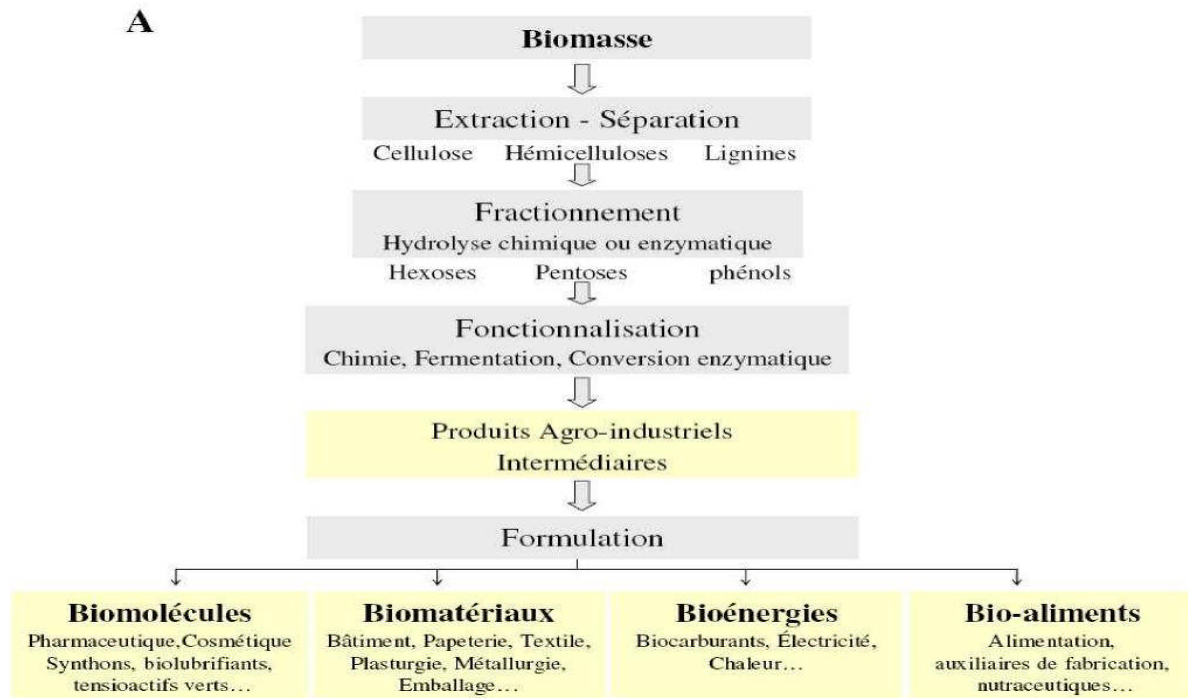
D'autres produits peuvent être issus de l'activité agricole, notamment des élevages (litières animales). En effet environ 50% des coproduits agricoles ne sont pas utilisés dans le monde, ils constituent une source non négligeable de biomasse lignocellulosique **(Sanchez, 2009).**

### 1.4.3. Valorisation de la biomasse.

Certains coproduits peuvent être utilisés comme complément en alimentation animale, la fertilisation des sols et la production d'énergie par combustion. Toutefois, leur valorisation pourrait être améliorée par de nouveaux procédés permettant une exploitation plus approfondie de l'énergie potentielle que représente cette biomasse cellulosique. Ceux-ci nécessitent la disponibilité des sucres simples obtenus par hydrolyse chimique ou enzymatique de la cellulose. Les cellulases capables de réaliser cette hydrolyse, peuvent être obtenues par la croissance de microorganismes sélectionnés, sur les substrats L.C **(Roussos et Hannibal, 1984 ; Howard et al., 2003).**

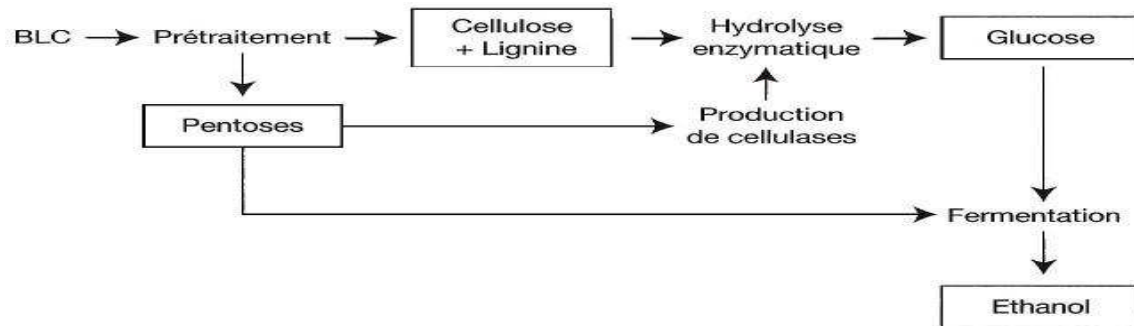
L'utilisation du jus de canne à sucre et d'amidon de maïs comme principaux substrats pour la production industrielle des carburants de substitution de première génération comme l'éthanol a causé des problèmes de famine dans le monde **(Dashtban et al., 2009).**

A ce titre, la bioconversion de la cellulose offre une alternative intéressante pour fournir des carburants de substitution de deuxième génération, des protéines microbiennes ou des métabolites à haute valeur ajoutée tels que les enzymes et les antibiotiques. Cependant, la rentabilité économique de toutes ces transformations biologiques est étroitement liée à la production de cellulases ainsi que les technologies enzymatiques de la saccharification de la cellulose **(Roussos, 1987).**



**Figure n°8** : Schéma global du concept de bio-raffinerie (Bettache, 2013).

Les champignons de la pourriture molle sont généralement utilisés dans la technique de prétraitement biologique afin de dégrader la lignine et l'hémicellulose dans les déchets. Faible apport d'énergie, aucun ajout de produits chimiques et des conditions douces sont les principaux avantages du prétraitement biologique (Subhedar et Gogate, 2013)



**Figure n°9** : Technologies de prétraitement dans la production du bioéthanol (Subhedar et Gogate, 2013).

## 2. Les enzymes lignocellulolytiques

Ces enzymes sont capables d'hydrolyser les chaînes linéaires ainsi que les chaînes de ramification. Les exo-hydrolases clivent les liaisons terminales et libèrent des unités de monosaccharides à partir des extrémités réductrices et non réductrices, alors que les endo-hydrolases attaquent les liaisons de façon aléatoire ou à des positions



spécifiques. Les endo-enzymes provoquent une diminution initiale dans le degré moyen de polymérisation du substrat avec formation de courtes chaînes d'oligosaccharides solubles qui sont dégradées à leur tour par les exo-enzymes (**Boucherba, 2011**).

## 2.1. Les cellulases

L'hydrolyse complète de la cellulose nécessite l'action synergique de trois types de cellulases (**Lynd et al., 2002**). Elles sont classées en fonction de l'endroit où elles agissent au niveau de la fibre cellulosique. Les endoglucanases commencent l'hydrolyse, les exoglucanases agissent au niveau des extrémités générées par les endoglucanases, suivie par les  $\beta$ -glycosidases qui agissent sur le produit de catalyse des exoglucanases, pour libérer enfin des monomères de glucose (**Pimentel et al., 2014**).

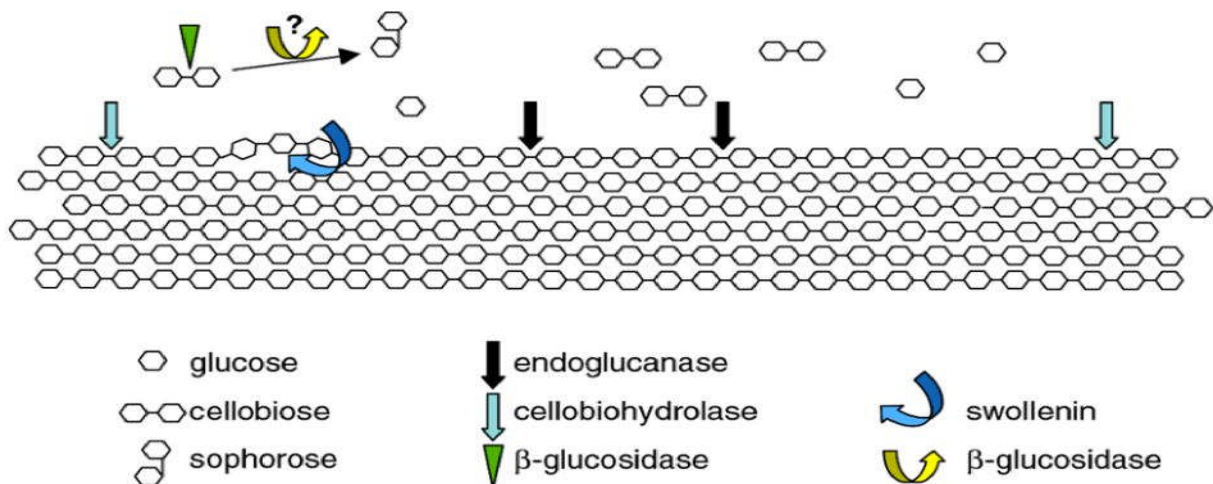


Figure n°10 : Enzymes de la dégradation de la cellulose (**Alarcón-Gutiérrez, 2007**).

### 2.1.1. Structure des cellulases

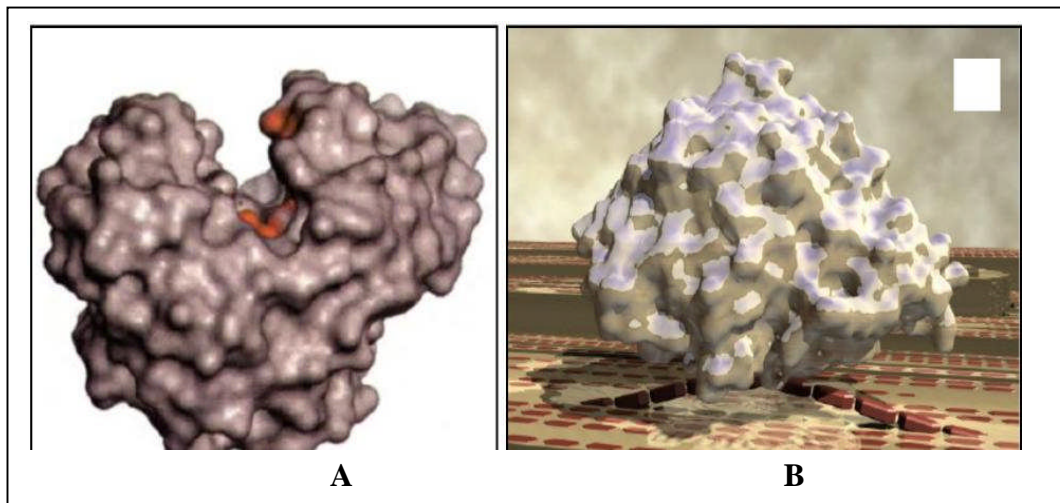
Les Cellulases sont composées d'unités structurellement et fonctionnellement distinctes, appelées domaines ou modules (**Henrissat et al., 1998**). Le plus souvent, les cellulases sont constituées d'un domaine catalytique (CD) et d'un module de fixation au substrat (CBM), qui est généralement reliée au CD via un peptide de liaison relativement long souvent glycosylé (de 30 à 44 AA). Les enzymes qui n'ont pas de CBM, c'est à dire avec un seul domaine catalytique, conservent leur capacité d'absorber la cellulose, mais souvent avec une affinité plus faible par rapport à l'enzyme complète (**Karlsson et al., 2002**).

Les linkers représentent des charnières flexibles entre les deux domaines facilitant leur fonction indépendante. Le rôle du peptide de liaison de *T. reesei* CBH I sur l'interaction

et l'hydrolyse consécutive de la cellulose cristalline a été étudié par Srisodsuk et al. (1993). Ils concluent que la séparation spatiale suffisante des deux domaines (CD et CBM) est nécessaire pour la fonction efficace de l'enzyme. La tyrosine joue un rôle important dans la fixation du substrat par une interaction hydrophobe (Linker et Teeri, 1996).

**a. Les Endoglucanases ou 1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohydrolases (EG)**

Les endoglucanases sont connues pour hydrolyser aléatoirement les liaisons osidiques, principalement dans les zones amorphes. Ils sont donc les premiers responsables de la diminution du degré de polymérisation des substrats cellulotiques (Boisset et al., 2000). Cependant elles n'ont qu'une action extrêmement limitée sur la cellulose cristalline, la fibre de coton ou l'Avicel. Les substrats sur lesquels agit ce types d'enzymes sont les celluloses modifiées ou amorphes, solubles telles que la Carboxymethylcellulose (CMC), la swollen cellulose (acide ou basique). Le substrat d'essais le plus souvent préconisé est la CMC, on parle alors d'activité CMCcase., L'étude de la structure des EGs, révèle la présence de courtes lèvres formant une fente à l'intérieur de laquelle se place la chaîne de cellulose (Figure n° 11) (Davies et Henrissat, 1995).



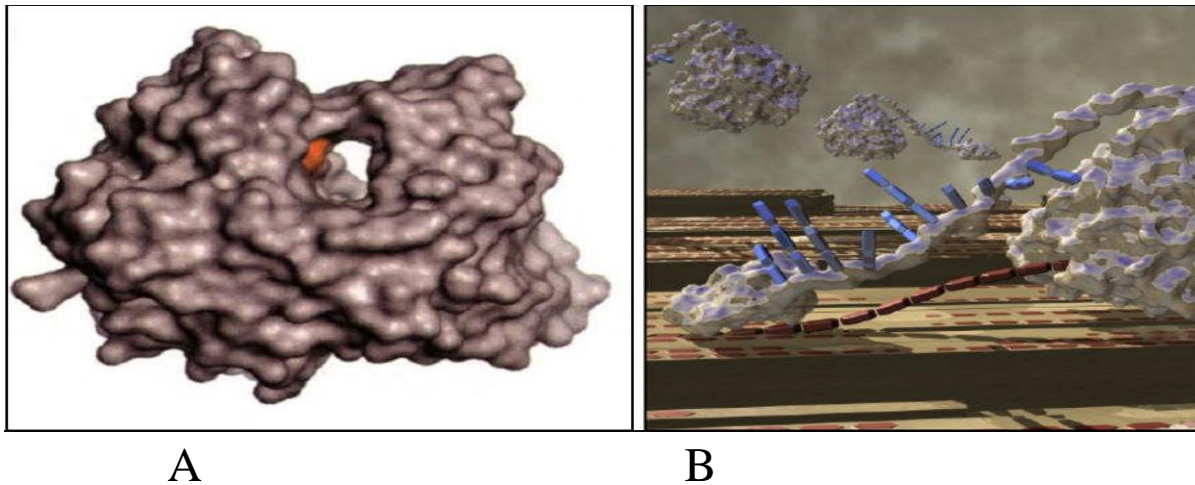
**Figure n°11:** Structure moléculaire des endoglucanases (A) Site actif à l'intérieur de la fente caractéristique des endoglucanases, (B) Animation d'une EG active sur une chaîne de cellulose (Davies et henrissat, 1995).

**b. Les exoglucanases ou 1,4- $\beta$ -D glucan cellobiohydrolases**

Les cellobiohydrolases (CBHs) agissent de façon progressive à partir des extrémités non réductrices ou réductrices des chaînes de cellulose, libérant des molécules de cellobiose. Une propriété importante des enzymes cellulolytiques est leur organisation en domaines ayant des fonctions distinctes. Les cellobiohydrolases possèdent deux domaines

fonctionnels, un site catalytique (CD) qui permet la réaction d'hydrolyse et un autre qui permet la liaison au substrat appelé Cellulose Binding Domain' (CBD) (Teeri *et al.*, 1998).

Ces deux modules sont reliés par une chaîne peptidique et sont de tailles nettement différentes: 50 kDA pour le CD et 3 kDA pour le CBD .Les structures des domaines catalytiques des cellobiohydrolases sont résolues et se présentent sous la forme de tunnel .Le rôle du CBD n'est pas totalement compris mais il aurait comme première fonction de permettre l'adsorption des enzymes à la surface de la cellulose et par conséquent d'augmenter la concentration en enzymes liées sur la cellulose. Il permettrait également de libérer l'accès aux chaînes de glucose de la cellulose en disloquant les liaisons hydrogènes entre les chaînes de polymères à la surface des structures de cellulose ( Ting *et al.*, 2009).



**Figure n° 12** : Structure moléculaire des exoglucanases, A ; Site actif à l'intérieur du tunnel caractéristique des exoglucanases, B ; Animation d'une exoglucanase active à l'extrémité d'une chaîne de cellulose. (Davies et henrissat, 1995).

### c. $\beta$ -glucosidases ou $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase (BGs)

Elles hydrolysent le cellobiose en glucose, la réaction d'hydrolyse est effectuée en phase liquide, plutôt que sur la surface des particules insolubles de cellulose, ce qui est le cas pour les cellulases «vraies» (EGs et CBHS). Les EG et CBHS sont soumises à l'inhibition par le produit de l'hydrolyse. le Cellobiose est montré pour son effet inhibiteur plus fort que le glucose (Holtzapple *et al.*, 1990), par conséquent, l'élimination du cellobiose est une étape importante du processus d'hydrolyse enzymatique. Deux BGs ont été isolées à partir du surnageant de culture de *T. reesei*, cependant, les études sur plusieurs espèces de Trichoderma ont montré qu'une grande partie de ces enzymes restent fixées sur la paroi cellulaire, ce qui explique la forte concentration en glucose au voisinage de la paroi fongique (Chen *et al.*, 1992).

### 2.1.2. Synergie des cellulases

La synergie entre les cellulases est un phénomène essentiel lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Elle se produit lorsque l'action combinée de deux ou plusieurs enzymes conduit à une activité supérieure à la somme des activités des enzymes séparées. On exprime souvent le degré de synergie (DS) comme le ratio de l'activité du mélange d'enzymes sur la somme des activités des enzymes utilisées séparément. Deux types de synergies ont été mis en évidence dans la littérature: (**Medve et al., 1998; Nidetzky et al., 1994**)

- La synergie entre les cellobiohydrolases et les endoglucanases appelée synergie Exo-Endo,
- La synergie entre deux cellobiohydrolases appelée synergie Exo-Exo.

La synergie Exo-Endo s'exprime facilement car l'attaque aléatoire par les endoglucanases conduit à la libération de nouveaux bouts de chaînes de cellulose qui deviennent disponibles pour l'attaque par les cellobiohydrolases. La synergie Exo-Exo est également observée mais aucun mécanisme n'est clairement établi pour expliquer ce phénomène et plusieurs théories sont proposées. **Tomme et al., (1990)** ainsi que **Kim et al., (1998)** l'expliquent par la formation en solution d'un complexe CBHI/CBHII qui aurait pour les premiers une activité catalytique importante et permettrait pour les seconds d'augmenter l'affinité d'adsorption des enzymes. Plusieurs paramètres semblent influencer la synergie à savoir :

- La concentration totale en enzymes :
- L'influence du ratio de chaque enzyme
- Les propriétés morphologiques du substrat

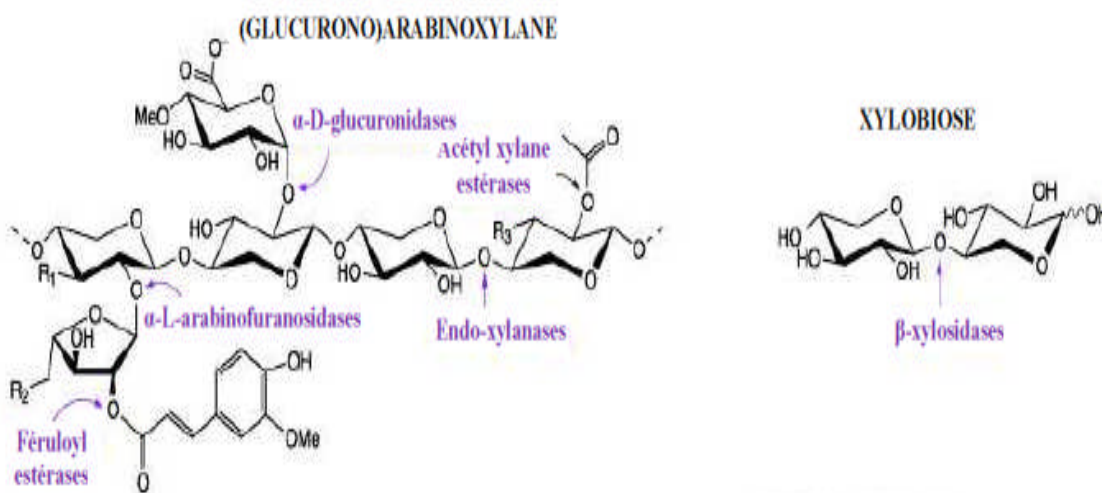
## 2.2. Les xylanases

Ces enzymes catalysent la rupture de la liaison glycosidique reliant deux résidus xylooses de la chaîne principale des xylanes, ce qui engendre une réduction du degré de polymérisation du substrat. Le xylane n'est pas aléatoirement hydrolysé mais les liaisons sélectionnées pour l'hydrolyse dépendent de la nature du substrat tel que la longueur de la chaîne, le degré de ramification et la présence de substituant (**Li et al., 2000**).

A un stade plus tardif, des petites molécules comme les mono-, di- et trisaccharides de  $\beta$ -D-xylopyranosyl sont produites. Bien que les endoenzymes agissent seulement au niveau des séquences ininterrompues, il existe des endoxylanases qui hydrolysent la chaîne principale seulement à proximité d'une région contenant une ramification (**Polizeli et al., 2005 citée par Boucherba, 2011**).

Ces xylanases libèrent le substituant comme produit libre qui peut être nécessaire pour l'orientation du substrat dans le site actif. Certaines endoxylanases hydrolysent la chaîne principale après la libération de l'arabinose, ce qui explique l'existence d'endoxylanases débranchantes qui libèrent l'arabinose et des endoxylanases non débranchantes (**Corral et Villaseñor-Ortega, 2006 citée par Boucherba, 2011**).

Les endoxylanases d'origine bactériennes et fongiques sont presque toutes des enzymes monomériques ayant une masse moléculaire comprise entre 8,5 à 85 kDa et un point isoélectrique qui varie entre 4,0 et 10,3 et la plupart de ces enzymes sont glycosylées (**Corral et Villaseñor-Ortega, 2006 citée par Boucherba, 2011**).



**Figure n°13:** Action des principales hémicellulases nécessaires à l'hydrolyse des glucurono arabinoxylanes (**Prevot, 2013**).

### 2.3. Les ligninases

Les ligninases sont généralement des métallo-enzymes qui oxydent les phénols composant les chaînes ramifiées des lignines. Elles sont classées en deux catégories:

- 1- Les phénols oxydases ou laccases. Ce sont des oxydoréductases glycosylées à cuivre qui utilisent l' $O_2$  pour oxyder divers composés aromatiques et non aromatiques (**Prevot, 2013**).

2- Les peroxydases à hème (**Prevot, 2013**):

➤ Les lignines peroxydases (LiP) ou diarylpropane peroxydases. Ce sont des glycoprotéines contenant un groupement hème et qui jouent un rôle crucial dans la biodégradation de la lignine. Elles catalysent la réaction générale, dépendante du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de dépolymérisation oxydante de composés non phénoliques.

➤ Les manganèse-peroxydases (MnP). Ce sont des glycoprotéines à groupe hémique qui dépolymérisent la lignine conjointement avec les lignines peroxydases. Elles catalysent la réaction, dépendante du manganèse,

➤ Les peroxydases versatiles (VP).Elles constituent un groupe d'enzymes capables d'oxyder le Mn (II) en Mn (III), comme les manganèse-peroxydases, mais présentent aussi les activités des lignines peroxydases.

### **3. Les Champignons lignocellulolytiques**

#### **3.1. Généralités sur les champignons**

Les champignons filamenteux représentent un groupe de microorganismes aérobies, hétérotrophes, saprophytes ou parasites . Ils préfèrent un environnement acide, mésophile et se développent entre 5 et 37°C (**Madan et Thind, 1998**).

Les champignons sont les principaux responsables de la dégradation de la matière organique végétale, La plupart sont lignocellulolytiques (**Mandales et Weber, 1969**).

Trois phases interviennent lors du développement des moisissures : la germination, la croissance et la sporulation (**Moullarat et al., 2013**).

La caractéristique principale de champignons filamenteux est l'hyphe. La croissance des hyphes fournit les moyens pour la colonisation de substrats, la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, l'assimilation des nutriments, régulation de la morphogenèse, et la reconnaissance de signaux de l'environnement (**Roberson et al., 2010**).

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques à savoir , l'aspect, le relief, la taille , la couleur des colonies et les structures de fructification, Le thalle est siphonné ou septé (cloisonné) et Les spores sont soit endogènes (sporange) ou exogènes (conidies) (**Breton, 1990**).

#### **3.2. Activité lignocellulolytique des champignons**

Les champignons filamenteux jouent un rôle important dans la production industrielle de protéines et d'enzymes. Elles sont utilisées pour produire un grand nombre d'enzymes tel que cellulases, xylanases, chitinases, amylases, protéases, et autres (**Braaksma et al., 2010**).

Certaines de ces Souches industrielles produisent plus de 100 g/l de cellulases et hémicellulases (**Balan et al., 2013**).

Les Principaux genres des moisissures productrices de lignocellulases appartiennent au groupe des Ascomycètes et Basidiomycètes. Les champignons cellulolytiques sont regroupés en espèces de pourriture blanche, de pourriture brune et de pourriture molle, Les champignons de la pourriture blanche, environ 2000 espèces, principalement des Basidiomycètes peuvent métaboliser la lignine; ceux de la pourriture brune, environ 200 espèces de Basidiomycète également dégradent les composants de la cellulose et hémicelluloses et exercent peu d'effets sur la lignine. Les espèces de la pourriture molle (Ascomycètes) possèdent des capacités intermédiaires, elles sont capables de dégrader la cellulose et l'hémicellulose rapidement, mais la lignine plus lentement (**Moore et al., 2011**).

Les moisissures des genres *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* et *Phanerochaete* ont été rapportés comme étant les meilleurs producteurs de cellulases et les enzymes brutes produites par ces micro-organismes sont commercialisées (**Dashtban et al., 2009**).

### ➤ Le genre *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* appartient au grand groupe des champignons imparfaits. Les espèces de ce genre produisent des quantités importantes d'exoenzymes capables d'hydrolyser complètement la cellulose en glucose (**Makut et Godiya, 2010**). Les cellulases de *T. reesei* présentent l'avantage de posséder les trois classes d'enzymes, Les cellulases de *T. reesei* sont commercialisées par la firme NOVO ENZYME (**Ogier et al., 1999**).

### ➤ Le genre *Aspergillus*

Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont capables de produire des cellulases Cependant, ces cellulases sont généralement riches en EGs et  $\beta$ -glucosidases mais pauvres en CBHs, par conséquent une action limitée sur la cellulose microcristalline.

### ➤ Les pourritures blanches

Causées principalement par les *basidiomycètes* qui font partie des champignons les plus efficaces pour dégrader les différents constituants du bois. L'étude de l'action enzymatique de la pourriture fibreuse sur la cellulose a été effectuée la première fois sur la pourriture blanche *Sporotrichum pulverulentum* (**Hofrichter, 2002**). *Trametes versicolor* et *Phanerochaete chrysosporium* sont ubiquitaires des forêts subtropicales et tempérées, ils ont fait aussi l'objet de nombreuses études pour leurs capacités de production d'enzymes actives dans la dégradation de la cellulose et de la lignine, (**Enoki et al., 1988**).

### 3.2.1. Les cellulases fongiques

La dégradation de la cellulose par les moisissures cellulolytiques, telles que *Aspergillus*, *Schizophyllum*, *Penicillium*, *Trichoderma*, est assurée par des cellulases extracellulaires de trois types qui sont nécessaires à l'hydrolyse totale de la cellulose ( Endoglucanases, Exoglucanases et.  $\beta$ -glucosidases (**Moularat et al., 2013**). Ces enzymes fonctionnent de manière synergique, par création à chaque fois de sites nouvellement accessibles sur le substrat lignocellulosique afin que les autres agissent (**Inoue et al., 2014**).

La plupart des cellulases sont disponibles dans le commerce à ce jour. Des mélanges d'enzymes natives non-complexés en particulier issues des espèces de *Trichoderma* ou *Aspergillus* sont utilisés comme préparations enzymatiques (**Lambertz et al., 2014**).

Les cellulases fongiques sont fortement produites en extracellulaire et sont moins complexes que celles des bactéries, Le genre *Trichoderma* est connu pour ces cellulases à haute activité enzymatique par rapport à d'autres genres (**Tanveer et al., 2014**).

### 3.2.2. Les hémicellulases

Les hémicellulases d'origine fongique sont les mieux étudiées, parmi lesquelles celles d'*Aspergillus* et de *Trichoderma*. De même, les hémicelluloses sont hydrolysées par trois groupes d'enzymes : les endoxylanases, les exoxylanases et les B-xylosidases (**Boussarsar, 2008**).

### 3.2.3. Capacités ligninolytiques des champignons

La décomposition de la lignine dans la nature est principalement attribuée au métabolisme des basidiomycètes de pourriture blanche, puisqu'ils dégradent la lignine plus rapidement que d'autres micro-organismes, Ces mycètes produisent plusieurs enzymes de type laccases, peroxydases de manganèse, et peroxydases (**Woiciechowski et al., 2013**).

- Les laccases utilisent directement l'oxygène moléculaire,
- Les peroxydases utilisent le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , présent éventuellement dans le milieu. Elles appartiennent à deux groupes, peroxydases Mn-dépendantes et lignine peroxydases généralement Fe-dépendantes). (**Moularat et al., 2013**): Les ions Fe et Mn servent de récepteurs d'électrons. Les réactions de dégradation conduisent à une dépolymérisation au moins partielle de la lignine et consistent, dans un premier temps, à une oxydation des noyaux aromatiques les plus accessibles (**Moularat et al., 2013**). Ces mécanismes d'oxydation sont également mis en jeu par les moisissures dans la bio détérioration de la plupart des polymères



synthétiques retrouvés dans l'environnement intérieur (le nylon, le polystyrène, le polyuréthane, alcool polyvinylique, peinture, isolation thermique et acoustique, revêtements de sols...) (Moularat *et al.*, 2013).

#### **4. Fermentation de substrats solides (FMS)**

Pour la valorisation des substrats agricoles et des sous-produits de l'industrie agroalimentaire, les fermentations en milieu solide apparaissent comme une nouvelle voie biotechnologique peu exploitée mais prometteuse pour la fabrication d'enzymes, produits alimentaires, industriels ou pharmaceutiques (Batteche, 2013).

##### **4.1. Généralités et définitions**

La fermentation en milieu solide est un des plus anciens procédés biotechnologiques connus au monde, sans doute le premier procédé technologique fermentaire connu de l'histoire. Aujourd'hui elle est devenue la technologie la plus prometteuse qui peut utiliser globalement les ressources renouvelables.

La fermentation en milieu ou en phase solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelles des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux et des champignons supérieurs, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique. D'un point de vue fondamental, elle est définie comme une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou presque d'eau libre. Elle diffère de la fermentation en milieu liquide où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau et de la fermentation en milieu submergé où le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide. La principale différence entre ces procédés réside dans l'équilibre des phases solides, liquides et gazeuses (Holker, 2005 ; Duchiron et copinet, 2011).

La FMS est donc constituée de trois phases : une matrice solide, une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. La capacité de rétention en eau des supports solides est variable et peut aller de 12 à 90%, soit une activité de l'eau ( $A_w$ ) comprise entre 0,65 et 0,98. Ils doivent posséder une humidité relative, ou plutôt une activité de l'eau, suffisante pour permettre la croissance et l'expression du métabolisme des souches. Les champignons filamenteux sont particulièrement bien adaptés à ces cultures du fait de leur résistance à une faible  $A_w$  et à une pression osmotique élevée (Assamoi *et al.*, 2009 ; Duchiron et copinet, 2011).

Le développement des champignons filamenteux en FMS s’effectue par extension et ramification des filaments formant le mycélium. Après l’inoculation d’un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s’étend à la surface des particules solides. A partir de ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l’intérieur des particules ou dans les espaces inter particulaires à la recherche de composés nutritifs, notamment dans les pores remplis de liquide. A des taux normaux d’humidité, les espaces entre les filaments aériens sont remplis de gaz tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d’eau. Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l’intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (**Pandey, 2003 ; Rahardjo et al., 2006**).

**Tableau II : Historique du développement de la fermentation en milieu solide (Prevot. 2013).**

Date	Développement
2600 av. J.-C.	Fabrication de pain par les Egyptiens.
2500 av. J.-C.	Préservation du poisson, de la viande, par fermentation, avec ajout de sucre ou de sel. Procédé Koji.
Av. J.-C.	Fabrication de fromage par <i>Penicillium roquefortii</i> .
7 <sup>ème</sup> siècle	Le procédé Koji (fermentation de riz cuit à la vapeur avec <i>Aspergillus oryzae</i> ) passe de la Chine au Japon par l’intermédiaire des prêtres bouddhistes. Production de vinaigre à partir de marc de raisin.
18 <sup>ème</sup> siècle	Production d’acide gallique utilisé en tannerie, en impression,...
1860-1900	Traitement des eaux usées.
1900-1920	Production d’enzymes fongiques (principalement de diastases ou amylases, et d’acide kojique.
1920-1940	Production d’enzymes fongiques, d’acide gluconique, d’acide citrique. Développement du fermenteur à Tambour rotatif.
1940-1950	Développement des fermentations industrielles. Production d’antibiotiques (Pénicilline) par FMS et par fermentation en milieu submergé. Abandon progressif de la FMS en Occident.
1950-1960	Transformation de stéroïdes par les cultures fongiques.
1960-1980	Production de mycotoxines, enrichissement en protéines des aliments pour animaux.
1980 à nos jours	- Production de divers produits (alcool, acide gibbéréllique,....).

## 4.2. Applications de la fermentation en milieu solide

La fermentation en milieu solide est traditionnellement utilisée pour la fabrication de nombreux produits alimentaires dans les pays orientaux et africains. Ce procédé est principalement retrouvé en Asie pour la production traditionnelle de Koji, un substrat fermenté contenant des enzymes et servant de base pour la fabrication de produits alimentaires nécessitant une culture ultérieure en phase liquide. Cependant, la fermentation en milieu solide s'est développée progressivement à d'autres domaines d'applications autres que l'alimentaire (tableau III). La première production industrielle d'enzymes a été réalisée par Jokichi Takamine par fermentation de son de blé avec une souche de *Aspergillus oryzae* (Murooka et Yamshita, 2008).

## 4.3. Conduite des procédés

Le développement d'un bioprocédé de fermentation en milieu solide nécessite le choix minutieux d'une souche, d'un substrat et d'un système de réacteur afin d'optimiser les conditions de culture et de les maintenir constantes durant la fermentation. La conduite d'un procédé de fermentation en milieu solide est plus difficile que pour une fermentation en milieu liquide, principalement à cause de l'hétérogénéité de la culture et l'absence d'eau libre. La variation des paramètres de culture est fonction de la matrice, composition, résistance mécanique, porosité et de la capacité de rétention d'eau. De plus, la conception limitée et non optimisée des réacteurs et des systèmes de contrôle rend actuellement délicate la maîtrise des cultures (Prevot, 2013).

### 4.3.1. Les supports

Le support est l'un des paramètres les plus importants en milieu solide. Il doit être choisi avec attention en fonction de plusieurs facteurs comme la taille des particules, la porosité, la composition biochimique dans le cas d'un support organique. La capacité de rétention d'eau, celle à contenir les éléments nutritifs, sa disponibilité et son coût sont également des facteurs importants.

Ils sont classés en deux catégories, les supports inertes et organiques, et se présentent sous trois formes (Manpreet et al., 2005 ; Krishna, 2005) ;

- Forme de matériaux organiques naturels amylicés ou lignocellulosiques. Ce sont généralement des sources de polymères insolubles, complexes et hétérogènes tel que bagasses, pulpes de betterave, paille, bois, son de blé, manioc,...). Ils servent à la fois de substrat, de source de carbone et de support.

Tableau III : Principaux domaines d'applications de la fermentation en milieu solide (Prevot. 2013).

Domaines d'applications	Produits	Microorganismes
Alimentaire	Champignons supérieurs	<i>Agaricus bisporus</i> (Champignon de Paris) <i>Lentinus edodes</i> (Shiitaké) <i>Pleurotus ostreatus</i> (Pleurotes)
	Fromages à pâte persillée, fromages à croûte	<i>Penicillium roquefortii</i> <i>Penicillium camembertii</i> <i>Penicillium caseicolum</i>
	Pain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Acides organiques	Acide citrique .Acide lactique	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus oryzae</i>
Divers	Bioconversion de substrats agricoles (compostage, ensilage)	
	Biostimulation des plantes (ectomycorhizes)	
	Bioremédiation des polluants organiques dans le sol	
	Délignification de la biomasse	
	Détoxification biologique de composés toxiques et dangereux	
Production d'inoculum fromager (conidies de <i>Penicillium</i> )		
Enzymes	Amylases, glucoamylases, Cellulases, xylanases Pectinases	<i>Aspergillus spp.</i> <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Rhizopus oligosporus</i>
Enrichissement nutritif (protéines) des aliments	Canne à sucre, manioc, pulpe de betterave,...	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Trichoderma spp.</i>
Métabolites secondaires	Arômes	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Trichoderma spp.</i>
	Antibiotiques (pénicilline)	<i>Penicillium notatum</i>
	Hormones végétales	<i>Gibberella fujikuroi</i>
	Alcaloïdes (ergot)	<i>Claviceps purpurea</i>
Lutte biologique (biocontrôle/biopesticide)	Biofongicides, bioinsecticides,...	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Coniothyrium minitans</i>

- Forme de matériaux synthétiques (mousse de polyuréthane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif.
- Forme de matériaux minéraux : granulés d'argile, perlite, pouzzolane. Ils servent également uniquement de support et nécessitent également l'apport d'un milieu nutritif (**Durand, 1998**).

#### **4.3.2. Les facteurs environnementaux**

La conduite de la FMS est régie par des paramètres qui dépendent des conditions de croissance des différents micro-organismes mis en culture et de l'objectif fixé (production de biomasse, d'arômes, d'enzymes, de spores,...). Les paramètres de contrôle de la FMS, sont : la quantité d'inoculum, l'humidité, l'activité de l'eau, l'aération, le transfert d'oxygène, la régulation de la température et du pH.

- **La température**

La température est l'un des facteurs les plus difficiles à réguler en milieu solide. La faible conductivité thermique de l'air comparée à celle de l'eau, des supports et l'absence d'eau libre limite le transfert de chaleur et son élimination. Ceci favorise des élévations de température pouvant dépasser de 20°C la température d'incubation. Cette élévation de la température dépend du type de microorganisme, de la porosité, de la taille des particules et de la profondeur du support. Ce phénomène se produit surtout lors de la croissance de la souche et est directement proportionnel à son activité métabolique génératrice de chaleur, de l'ordre de 100 à 300 kJ par kg de masse cellulaire (**Pandey, 2003 ; Manpreet et al., 2005**).

Une mauvaise dissipation de la chaleur peut entraîner des gradients de température au sein du milieu de culture durant la fermentation et peut provoquer des variations métaboliques. D'autres effets sont signalés tel que l'assèchement du milieu, la dégradation des produits sécrétés, une diminution de la disponibilité des nutriments ou encore l'arrêt de la phase végétative au profit de la phase reproductive du champignon filamenteux (production de conidies) (**Duchiron et copinet, 2011 ; Manpreet et al., 2005**). Plusieurs possibilités existent pour limiter ou éliminer cette chaleur (**Assamoi et al., 2009**) :

- De manière passive: L'évaporation de l'eau entraîne une diminution de la disponibilité de celle-ci. L'utilisation d'une fine couche de support favorise également l'évacuation de la chaleur, contrairement aux couches profondes.

- De manière active: L'agitation mécanique modérée et intermittente du milieu de culture, la circulation d'eau froide à l'intérieur des plateaux dans le cas d'un réacteur à plateaux, l'aération forcée du milieu de culture avec de l'air humidifié et refroidi. Ce dernier s'avère le plus efficace, avec une dissipation de plus de 80% de la chaleur. Le contrôle de ce paramètre s'effectue généralement dans la couche solide et dans l'air entrant/sortant. avec des thermo-senseurs, des thermistances/thermistors ou des sondes métaboliques.

- **L'humidité relative et l'activité de l'eau**

En FMS, l'eau est présente sous forme d'eau complexée à l'intérieur de la matrice solide et sous forme d'une couche mince qui peut être absorbée à la surface des particules ou contenue dans les régions capillaires (**Raimbault, 1998**). La teneur en eau nécessaire pour les cultures est avant tout dépendante des souches utilisées, mais sa limite basse serait fixée à 12%, seuil en deçà duquel les activités métaboliques cessent et sa limite haute dépendrait principalement du support et de sa capacité de rétention ; elle serait de 90% pour les substrats lignocellulosiques (**Smith et al., 1983 ; Assamoi et al., 2009**).

Le contenu en eau, ou plutôt la quantité d'eau disponible est très important puisqu'une faible humidité limiterait l'hydrolyse du substrat, la solubilisation et la diffusion des nutriments. Une forte humidité réduirait la porosité, le volume des gaz et les échanges gazeux, tout en favorisant la contamination bactérienne. Le maintien d'une teneur en eau optimale est par conséquent essentiel. Cependant, des variations dues au développement du champignon à l'aération, à l'hydrolyse du substrat et à la production de chaleur métabolique peuvent provoquer un assèchement du milieu. Pour finir, la mesure de la teneur en eau dans le milieu ou humidité relative est généralement déterminée par dessiccation.. Cependant cette méthode ne permet pas de différencier l'eau disponible de l'eau liée (**Duchiron et copinet, 2011 ; Assamoi et al., 2009**).

- **L'aération**

L'aération est un facteur essentiel en fermentation en milieu solide puisqu'elle va permettre : l'oxygénation pour les organismes aérobies comme les champignons filamenteux, la dissipation de la chaleur métabolique et l'élimination des produits du métabolisme (**Duchiron et copinet, 2011 ; Raimbault, 1998**). Elle peut être passive ou de surface ou active, forcée par l'injection d'air humidifiée afin de ne pas assécher le milieu. Le choix d'un support poreux et la calibration de la taille des particules par broyage (de 1

mm à 1 cm) permet d'optimiser l'aération du milieu de culture en facilitant la circulation de l'air. Il faut cependant noter dans le cas des supports organiques qu'un changement dans la porosité du support peut se produire lors de la dégradation du substrat avec le risque d'un tassement ou d'une compaction des particules, provoquant ainsi la formation de chemins préférentiels et une réduction de l'apport d'oxygène (**Manpreet et al., 2005**).

- **Le pH**

Le pH est très difficile à homogénéiser et à contrôler en FMS. En effet, au cours de la culture, l'activité métabolique des souches va modifier le pH du milieu soit en l'acidifiant, par la production d'acides ou par l'absorption d'ions ammonium, soit en l'alcalinisant, par la libération d'ammoniac provenant de la dégradation de protéines, d'urée ou d'autres amines (**Manpreet et al., 2005**). Une régulation partielle de ce facteur au cours de la fermentation peut cependant être réalisée par l'ajout d'acide ou de base à l'eau utilisée pour ajuster le taux d'humidité du milieu. Un autre système de régulation passif consiste à utiliser des systèmes tampon, comme l'emploi de résidus agro-industriels présentant naturellement un excellent pouvoir tampon ou l'utilisation d'un mélange de sels d'ammonium et d'urée (**Raimbault, 1998; Sandhya et al., 2005**). Le suivi de ce paramètre de culture s'effectue indirectement par la mesure d'un pH standard après mise en suspension d'un échantillon homogène dans de l'eau déminéralisée (**Assamoi et al., 2009**).

- **La biomasse**

L'estimation de la biomasse pour le suivi des cinétiques de la croissance est délicate car les microorganismes sont presque inséparables du support. Il existe cependant (**Assamoi et al., 2009 ; Raimbault,1998**):

- Des méthodes d'estimation directes. Elles sont très difficiles et consistent en une séparation de la biomasse dans le cas uniquement des organismes unicellulaires ou en une suppression de la matrice solide organique .
- Des méthodes d'estimations indirectes. Elles se font soit par le dosage de composés spécifiques de la biomasse (protéines, acides nucléiques, glucosamine, ergostérol), soit par le suivi de l'activité métabolique de la biomasse (respirométrie : oxygène consommé ou CO<sub>2</sub> produit, production d'ATP, d'enzymes extracellulaires).

#### 4.4. Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et liquide (submergée)

Les premières applications non alimentaires de la FMS sont pour la production d'enzymes, essentiellement pour la production des enzymes hydrolysant les polymères végétaux. En effet, ces enzymes ne sont produites que par un système inductible où l'inducteur naturel est le polymère naturel. Ces polymères sont très peu solubles en phase aqueuse, ce qui implique de très grands volumes pour pouvoir les utiliser en fermentation liquide « fermentation submergée ». Alors qu'en phase solide, le substrat de base est lui-même l'inducteur, ce qui entraîne des réacteurs beaucoup moins volumineux pour obtenir les mêmes niveaux de production. Actuellement, les procédés en phase solide connaissent un regain d'intérêt avec la valorisation des coproduits agricoles pour la production d'enzymes, de nourriture animale et depuis peu pour la production de produits organiques (Bettache, 2013). Le tableau IV montre la différence entre la FML et la FMS.

**Tableau IV : Comparaison entre la FMS et FML (Sobal, 2002)**

<b>Facteur</b>	<b>Fermentation liquide</b>	<b>Fermentation solide</b>
<b>Substrats</b>	Substrats solubles (sucres)	Substrats polymères insolubles
<b>Conditions aseptiques</b>	Stérilisation par la chaleur/ asepsie contrôlée	Traitement à la vapeur, conditions non stériles
<b>L'eau</b>	Grands volumes d'eau utilisés et d'effluents pollués	Consommation limitée d'eau /peu d'effluent
<b>Chaleur métabolique</b>	Contrôle de la température facile	Faible capacité de transfert thermique
<b>Aération</b>	Limitée à l'oxygène soluble, haut niveau d'air requis	Aération simple et haute (échange d'air / substrat)
<b>Contrôle du pH</b>	Facile	Substrat solide tamponné
<b>Agitation mécanique</b>	Bonne homogénéisation	Conditions statiques
<b>Echelle</b>	Equipements industriels disponibles	Besoin de conception de nouveaux équipements
<b>Inoculation</b>	Inoculation simple/ procédé continu	Par spores ou mycélium
<b>Contamination</b>	Risques de contaminations	Risque ,notamment si le microorganisme pousse lentement
<b>Consommation d'énergie</b>	Consommation élevée	Faible consommation
<b>Volume de l'équipement</b>	Grand volume et grand coût	Petit volume et petit coût
<b>Effluents et pollution</b>	Grands volumes d'effluents pollués	Absence d'effluents, moins de pollution
<b>Concentration S/produits</b>	30-80/L	100-300/L



# **Chapitre II**

## **Matériel et méthodes**

Dans cette partie nous décrivons le matériel ainsi que les techniques utilisées relatives à notre travail expérimental. Nous avons d'abord effectué des isollements de souches de champignons à partir d'écosystèmes riches en matière organique, par la suite les souches isolées ont fait l'objet de criblage sur milieu solide et liquide afin de sélectionner les souches les plus performantes pour la production et la caractérisation de cellulases et d'endoxylanases.

### **1. Isolement de moisissures Cellulolytiques**

#### **1.1. Echantillonnage**

Pour isoler des champignons producteurs de cellulases, plusieurs prélèvements sont réalisés dans trois sites de la région d'Akbou (Algérie) : les sols riches en matière organique, la matière végétale en décomposition et la litière animale sont ciblés.

Les prélèvements sont réalisés à l'aide de dispositifs tubulaires métalliques de 6cm de diamètre, préalablement enveloppés dans du papier aluminium et stérilisés au four pasteur (HERAEUS) à 180°C pendant 30 min.

Les échantillons sont acheminés au laboratoire dans une glacière, puis stockés à 4°C. La durée entre l'échantillonnage et l'isolement varie de quelques jours à une semaine (**Hart et al., 2002**).

Nous avons collecté 03 lots d'échantillons qui correspondent à 03 sites différents, chaque lot comprend 03 Prélèvements de 03 endroits différents sur le même site.

A chaque prélèvement nous avons attribué un code en fonction du lieu et le numéro de prélèvement soit P1, P2 ou P3 pour les situer. Les caractéristiques des échantillons prélevés sont consignées dans le tableau V.

Tableau V: Informations relatives aux échantillons.

Prélèvements	Description Du site
P1 19/12/2014	Parcelle forestière, riche en oliviers dans la région d'IGHRAM à Akbou. Le sol est choisi pour son abondance en flore végétale et sa richesse en matières organiques en voie de décomposition.
P2 20/12/2014	Ferme dans la région de TAZAGHART à Akbou. Le sol est régulièrement amendé par des engrais naturels, et incorporé de bouse de vache moisie riche en paille de blé
P3 20/12/2014	Forêt de chêne liège dans la Région de TAZAGHART à Akbou. C'est Une litière végétale humide tapissant le sol d'une couleur brune noirâtre en voie de décomposition

## 1.2. Isolement et sélection des moisissures cellulolytiques

- **Principe :**

L'isolement est effectué sur un milieu gélosé à pH acide (**HANNA pH 210**) contenant un dérivé soluble de cellulose, la carboxyméthyl cellulose (CMC) (**Sigma Aldrich, USA**). Cette dernière est utilisée sous forme de poudre et comme seule source de carbone et d'énergie. Elle est susceptible d'induire des cellulases et hémicellulases. La composition de ce milieu est donnée en **annexe I**. Après autoclavage (**Muve steamart OT 185, Allemagne**), Le milieu en surfusion est additionné de 60ppm de gentamycine pour inhiber la croissance des bactéries capables de dégrader la cellulose (**Breton, 1990**).

Donc on réalise directement un isolement sur un milieu sélectif CMC-agar-gentamycine, ce milieu devrait permettre la croissance uniquement des champignons producteurs des cellulases pouvant dégrader la CMC (**Hart et al., 2002**).

- **Mode opératoire : (Herculano et al., (2011))**
  - 10g de chaque échantillon sont mis en suspension dans 90ml d'eau physiologique stérile, homogénéisés à l'aide de vortex (**VELP scientifica**) pendant 10 minutes puis laisser décanter. Cette préparation représente la solution mère. Une série de dilutions décimales jusqu'à  $10^{-6}$  est réalisée à partir de la solution mère dans de l'eau physiologique.
  - 1ml de chaque dilution est transféré dans des boîtes de Pétri vides et stériles en duplicate pour augmenter les chances d'isoler le maximum d'espèces différentes.
  - 12 ml du milieu sélectif en surfusion sont coulés par boîte et homogénéisés par mouvements circulaires.
  - Une fois le milieu solidifié, les boîtes de Pétri sont incubées à 28°C (**étuve, Muve incubator EN055**) et observées quotidiennement.

### **1.3. Purification**

La purification est réalisée sur gélose PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) (**Annexe I**) à raison de 15 ml par boîte.

Les colonies de moisissures caractérisées par leur aspect filamenteux sont repérées sur le milieu CMC-Agar-Gentamicine qui permet une croissance lente et graduelle. Les colonies de moisissures sont repérées dès leur apparition par leur aspect filamenteux caractéristique. Les repiquages successifs sur milieu PDA toujours supplémentés par la gentamycine, permettent un développement optimal et une purification des souches. La technique consiste à prendre un implant mycélien de la partie périphérique de la colonie et le déposer au centre de la gélose PDA, puis incubé à 28°C.

Les souches pures sont ensuite nommées et groupées en fonction de leurs sites de prélèvement.

### **1.4. Conservation des souches**

Les isolats sont conservés sur gélose PDA et MEA (gélose à l'extrait de malt) (**Annexe I**) en deux exemplaires. Beaucoup de mycètes sporogènes survivent pendant plusieurs mois, néanmoins le stockage des mycètes aux températures ambiantes, à 10°C ou plus, sur une longue durée n'est pas recommandé à cause de l'assèchement du milieu gélosé surtout pour les moisissures asporogènes (**Nakasone et al., 2004**).

La méthode de conservation des souches la plus communément utilisée car la plus simple, consiste à repiquer les souches en tube sur gélose inclinée, les cultures sont maintenues pendant 7 jours à 28°C, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (**Breton, 1990**).

## **2 . Criblage des isolats cellulolytiques performants**

L'objectif de cette étape consiste à sélectionner les souches de moisissures les plus productrices de cellulases et hémicellulases parmi les isolats de notre collection.

La mise en évidence de l'activité cellulolytique et xylanolytique des moisissures isolées est réalisée sur 02 types de milieux :

### **2.1. Criblage sur milieu gélosé « Qualitatif »**

Afin de sélectionner les souches cellulolytiques les plus performantes parmi les isolats de notre collection, nous évaluons dans un premier temps leur potentiel cellulolytique par la méthode au Lugol sur un milieu gélosé, la CMC étant l'unique source de carbone.

- **Milieu gélosé de criblage**

Le milieu de culture utilisé pour le criblage est celui cité par **Kasana et al., (2008)**. Il contient en plus des sels minéraux, une source d'azote minérale et une autre organique. D'après **Mandels et al., (1976)** cité dans **Hankin et Anagnostakis, (1977)**, la CMC qui est un dérivé soluble de la cellulose constitue un substrat de choix pour la recherche de cellulases du fait qu'il est rapidement dégradé par les microorganismes. L'agar à 17g/l permet une bonne diffusion des enzymes excrétées (**Annexe I**).

- **Protocole de criblage**

Les isolats de notre collection sont testés pour leur capacité à produire des cellulases sur milieu solide contenant de la CMC (**Herculano et al., 2011**).

- À l'aide d'un emporte pièce circulaire d'un diamètre de 5mm et d'une aiguille stérile un disque de gélose PDA est prélevé dans la partie périphérique de la colonie d'une culture de 7 jours où le mycélium du champignon est le plus jeune, puis transféré au centre des géloses de criblage en boîtes (en triplicata).

- Après 3 jours d'incubation à 28°C, Les boîtes sont inondées avec une solution de Lugol bactériologique (Iodo-iodure de potassium) (**annexe I**), pendant 3 à 5 mn, suivi d'un lavage avec une solution de NaCl 1M dans le but d'accentuer le contraste.
- Les diamètres des colonies et des zones d'hydrolyse sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.
- L'indice cellulolytique (IC) est exprimé par le rapport entre le diamètre de la zone d'hydrolyse sur le diamètre de la colonie fongique (**Hankin et Anagnostakis, 1977**).

## **2.2. Criblage en milieu liquide agité « quantitatif »**

- **Bouillon de criblage**

Le milieu de base adopté pour le screening est celui décrit par **Mandels et Weber modifié (1969) (Annexe I)**. Il est additionné de 0,3% (p /v) de CMC en tant qu'inducteur pour la production de cellulases. Le pH est ajusté à 5.

- **Mise en œuvre de la fermentation en milieu liquide**

La production de cellulases et xylanases extracellulaires est réalisée dans une culture submergée en milieu liquide ou tous les isolats sont testés. La souche de contrôle est une souche de référence productrice de cellulases et xylanases, *Trichoderma reesei* RUT C30 qui nous a été aimablement fournie par le laboratoire de microbiologie industrielle de l'université de Reims champagne-Ardenne en France.

Toutes les expériences sont réalisées dans des flacons de 250 ml, contenant 50 ml du milieu Mandels et Weber selon le protocole suivant (**Herculano et al., 2011** modifié):

- Les flacons sont fermés avec des bouchons puis stérilisés à 121°C pendant 20 min.
- Après refroidissement, l'inoculation est effectuée avec 2 disques de 5 mm de diamètre prélevés dans la partie périphérique d'une culture de 7 jours sur milieu PDA (**Lakshmikant, 1990**).
- Les cultures sont incubées et agitées à 28C° pendant 7 jours (Agitateur type **Heidolphe Vibramax x 100**).

- Les extraits enzymatiques bruts sont récupérés par centrifugation (**Rotina 380R, Allemagne**) à 10 000 g (4°C) pendant 15 min puis conservés à 4°C jusqu'au dosage des activités enzymatiques.

### 3. Mesure des activités cellulolytiques et xylanolytiques

#### 3.1. Activité papier filtre

L'activité papier filtre (APF ou activité totale) est déterminée selon la méthode de **Ghose, (1987)** et décrite dans le Tableau N° VI.

**Tableau VI** : Etapes du dosage de l'activité papier filtre (**Ghose, 1987**).

	Gamme	Témoin enzyme	Enzyme
Papier filter Papier Whatman N° 1 de 1cm x 3 cm ,25 mg	/	/	1
Tampon (µl) tampon citrate (50 mM; pH 4,8)	500	500	500
Equilibrer a 50°C pendant 10 min			
Glucose (µl)	250	/	/
Enzyme (µl)	/	250	250
Incuber pendant 60 min a 50 °C			
Arrêter la réaction en ajoutant 1.5 ml de DNS			
Placer 5 min à 100 °C			
Refroidir dans un bain d'eau glacée			
Attendre 20 min ou centrifuger afin d'éliminer les débris du papier filtre déchiqueté			
Prélever 500 µl de milieu réactionnel et ajouter 10 ml d'eau distillée.			
Mesurer l'absorbance à 540 nm contre de l'eau distillée (en triplicata).			

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose contenue dans les extraits. Cette concentration est déterminée par référence à un courbe étalonnage (**Annexe III, figure n°35**) établie avec des concentrations variables en glucose de 0,11 à 10 mg/ml à partir d'une solution mère à 10 g/l. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un Spectrophotomètre UV -visible (**Shimadzu UV mini. 1240**) à 540 nm.

Les absorbances des échantillons sont converties en concentration de glucose libéré à partir de la courbe linéaire d'étalonnage.

$$\text{APFase} = (\text{mg de glucose libéré} / 0.18016 \text{ mg}/\mu\text{mol}) / (0.25 \text{ ml} * 60 \text{ min})$$

$$= \mu \text{ mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$$

$$= \text{U /ml}$$

### 3.2 .Activité carboxyméthylcellulase (CMCase) ou endoglucanase

L'activité CMCase déterminée selon la méthode de **Ghose, (1987)** est décrite dans le tableau ci après :

**Tableau VII:** Etapes du dosage de l'activité CMCase ( **Ghose ,1987**).

	Gamme	Témoin enzyme	Enzyme
Substrat (μl)	250	250	250
Solution de CMC à 2% (p/v) dans tampon citrate (0,05 M - pH 4,8)			
Equilibrer à 50°C pendant 10 min			
Enzyme (μl)	/	/	250
Incuber pendant 30 min à 50 °C			
Arrêter la réaction en ajoutant 1.5 ml de DNS			
Tampon (μl)	/	/	/
Glucose (μl)	250	/	/
Enzyme (μL)	/	250	/
Placer 5 min à 100 °C			
Refroidir dans un bain d'eau glacée			
Mesurer l'absorbance à 540 nm contre l'eau déminéralisée (en triplicata)			

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose contenue dans les extraits. Cette concentration est déterminée par référence à une courbe étalon (**Annexe III, Fig n°34**) établie avec des concentrations variables en glucose (0,22 à 2 mg/ml) à partir d'une solution mère à 2 g/l. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm.



Absorbance = Absorbance de l'enzyme – Absorbance témoin enzyme

Les absorbances des échantillons sont converties en concentration de glucose libéré par à partir de la courbe d'étalonnage.

$$\begin{aligned} A_{CMCase} &= (\text{mg de glucose libéré} / 0.18016 \text{ mg}/\mu\text{mol}) / (0.25 \text{ ml} * 30 \text{ min}) \\ &= \mu\text{mol min}^{-1}\text{ml}^{-1} \\ &= U / \text{ml} \end{aligned}$$

L'unité (UI) d'une activité d'endoglucanase est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1  $\mu$ mole de glucose / min dans les conditions standard (**Tanveer et al., 2014**).

### **3.3. Activité xylanolytique**

L'activité xylanase est déterminée selon le même protocole de dosage d'activité CMCase (**Ghose,1987**) . Le substrat CMC est remplacé avec le xylane de bouleau préparé dans une solution tampon citrate. Le xylane de Bouleau est mis en suspension à raison de 2% (m /v) dans du tampon citrate de sodium (50 mM) à pH 4.8. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en xylose contenue dans les extraits. Cette concentration est déterminée par référence à une courbe étalon (**Annexe III.Fig n° 36**) établie avec des concentrations variables en xylose de 0,15 à 1.4mg/ml à partir d'une solution mère à 1.4 g/l. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm.

Une unité (U) d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1  $\mu$ mol de xylose à partir du substrat approprié par minute et par millilitre de filtrat brut. (**Tao et al., 2010**).

## **4. Observations macro et microscopiques des souches sélectionnées**

L'identification des moisissures est basée sur l'observation des caractères culturaux et morphologiques de l'espèce. Les critères morphologiques reposent sur les paramètres macroscopiques (aspect des colonies, couleur du revers) et microscopiques (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...)

### **4.1. Observations macroscopiques**

Pour toutes les cultures obtenues après 7 jours sur milieu PDA, l'aspect de la colonie est examiné à l'œil nu et sous une loupe binoculaire (**Suntex Reset Colony conter 570**). La lumière réfléchie est habituellement plus efficace que la lumière transmise. Pour déterminer les couleurs des colonies, on les examine à la lumière du jour.

L'identification est fondée sur l'examen des caractères suivant :

- L'aspect, le relief, la taille, la couleur des colonies
- Les structures de fructification.

#### **4.2. Identification microscopique**

C'est l'observation microscopique à l'aide d'un microscope optique (**CARL ZEISS**) de la morphologie du thalle et celle des structures sporifères par deux techniques :

- **Technique des frottis humides**

Pour préparer un frottis humide, une aiguille d'inoculation est utilisée pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon est prélevé sur la bordure de la colonie où les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. De plus, on choisit les structures qui peuvent renfermer les spores, près du centre de la colonie, où la probabilité de trouver des spores à maturité est la plus grande (**Garg et al., 2010**).

Le bleu de méthyle au lactophénol ou bleu coton (**Annexe I**) est un colorant acide ; il possède une affinité particulière pour les structures à caractère basique. C'est le colorant le plus adapté à la mycologie générale parce qu'il est spécifique de la callose, qui est un des principaux constituants de la paroi des hyphes de champignons. Il colore les membranes callosiques ainsi que le contenu cytoplasmique des hyphes (**Lachapelle, 2004**).

Les coupes d'échantillon posées sur une lame sont d'abord mouillées avec une goutte de Lactophénol puis une lamelle de couverture est posée. Le liquide en excès est épongé avec un papier absorbant. On procède ensuite à l'examen au microscope optique, généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (**Breton, 1990**).

- **Technique de culture sur lamelle**

Cette technique est appliquée essentiellement aux champignons dont la structure est particulièrement fragile, qui subissent alors un examen microscopique spécial qui consiste à préparer une culture observable directement au microscope (**Garg et al, 2010**).

- Une lamelle stérile est insérée délicatement dans un milieu gélosé de manière à former un angle de 45°.

- Une goutte de l'inoculum (suspension de spores) est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu.
- Après 5-7 jours d'incubation à 28°C, la lamelle est retirée délicatement de la gélose entraînant avec elle des fragments du mycélium.
- La lamelle est ensuite déposée à l'envers sur une lame, puis examinée au microscope optique.

L'examen microscopique suivant ces manipulations permet d'examiner les caractères suivants:

- Le thalle siphonné ou septé.
- Type et apparence du système sporal.

## **5. Mise en œuvre des fermentations liquides et solides avec les coproduits**

### **5.1. Préparation des substrats de fermentation**

La paille, le son de blé et le grignon d'olive ont été utilisés dans cette étude dans les fermentations solides et liquides. Les échantillons sont récoltés au niveau des minoteries, huileries et agriculteurs de la région. Les pailles sont d'abord séchées, coupées en petits morceaux, puis broyées en petites particules (**Tao et al ,2010**). Un tamisage est réalisé pour la paille et le grignon d'olive pour avoir une granulométrie comprise entre 5 et 10 mm.

Tous les substrats sont lavés à l'eau, séchés au four pasteur à 80°C pendant 24 heures puis stockés à température ambiante dans des récipients étanches à l'air (**Madhuri et al., 2014**).

- La veille de la fermentation, les taux d'humidité des substrats sont déterminés ;  $H (\%) = [(P_0 - P \text{ sec}) / P_0] \times 100$
- Le poids sec est déterminé après séchage des substrats au four Pasteur à 105°C jusqu'à poids constant.

$P_0$ : Poids frais
$P \text{ sec}$ : Poids sec

### **5.2. Tests préliminaires de criblage cellulolytique et xylanolytique par fermentation liquides des coproduits:**

Les Cellulases et xylanases sont produites en milieu liquide à partir des 04 souches sélectionnées et du témoin :

- AP ( *Trichoderma sp*)
- BG ( *Aspergillus sp* )
- AM et BD ( *Penicillium sp*)
- ST : *Trichoderma reesei* RUT C30. (souche témoin)

Les activités cellulases et xylanases sont déterminées selon le protocole **d’Herculano, (2011)**. Les cultures sont réalisées dans des flacons de 250ml contenant 50 ml de solution minérale Mandels et Weber avec 2% (p / v) de paille, de son de blé et de grignon d’olive comme source de carbone. Après traitement thermique à 121°C pendant 15 minutes, les milieux sont inoculés avec 2 disques de 5 mm de diamètre prélevés dans la partie périphérique d’une culture de 7 jours sur milieu PDA et mis sous agitation à 150 rpm pendant 7 jours à 28°C ( **Prevot, 2013**).

Des échantillons sont prélevés tous les jours jusqu’au septième jour, Les extraits enzymatiques sont ensuite obtenus par centrifugation à 10 000 g, 4°C pendant 15 minutes. Le surnageant récupéré est conservé à 4°C avant utilisation pour les dosages enzymatiques. (**Da Vinha et al., 2011**). La mesure des activités enzymatiques est répétée trois fois.

### **5.3. Production d'enzymes par Fermentation solide « SSF »**

Les Cellulases et xylanases sont produites par fermentation en milieu solide à partir des deux souches nouvellement sélectionnées dans la fermentation liquide à savoir la souche AP ( *Trichoderma sp* ) et BG ( *Aspergillus sp* ) . La paille et le son de blé sont utilisés comme seule source de carbone et la solution minérale de Mandel en tant qu'agent de mouillage (**Madhuri et al., 2014**).

Les souches sont cultivées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de PDA incubé à 28 C° pendant 7 jours. Après sporulation, chaque boîte est lavée avec 25 ml d'eau distillée stérile contenant 1% (v/v) de Tween-80 .Les spores sont recueillies dans des bouteilles stérilisées pour être utilisées comme inoculum pour la production d’enzyme. (**Sandhu et al., 2013 ; Ang et al., 2015**).

Toutes les cultures sont effectuées dans des Erlenmeyer de 500 ml contenant 10 g de substrat (paille ou son de blé). Les taux humidité de 40% et de 80% sont obtenus avec le milieu Mandel Weber (MW), Les Erlenmeyer sont stérilisés à 121 °C pendant 15 minutes, refroidi, puis inoculé avec la suspension de spores fongiques à raison de  $10^7$  spores/g de substrat. Ils sont incubés à 28 ° C dans une étuve durant sept jours (**Sandhu et al 2013**),

Pour établir les cinétiques de fermentation il est indispensable de préparer autant de fioles d'Erlen que de points souhaités (**Saucedo-Castaneda, 1991**). Une prise d'échantillons homogènes est effectuée toute les 24 heures jusqu'au huitième jour de la SSF.

Les échantillons prélevés sont traités comme suit : (**Saucedo-Castaneda, 1991 ; Roussos et al., 1994**).

- ✓ Les produits fermentés prélevés sont parfaitement homogénéisés à l'aide d'une spatule, les échantillons frais sont utilisés pour mesurer les poids sec (**SCOUT PRO**) et le pH
- ✓ Parallèlement 08 g de substrat fermenté sont mis en suspension dans 80 ml d'eau distillée. Afin de récupérer le maximum d'enzymes, l'homogénéisation est réalisée dans un mixeur (**MOULINEX**) pendant 2min par intermittence pour éviter l'augmentation de la température. L'action mécanique du mixeur est très importante pour récupérer le maximum d'enzymes qui adhèrent fortement à la fraction cellulosique du substrat solide.
- ✓ Le mélange est centrifugé à 10000g (4 °C) pendant 15 min. La filtration n'est pas nécessaire car le surnageant obtenu est clair (**Gassara et al., 2010**). Une température basse (4°C) est fortement requise lors de la centrifugation pour éviter la dénaturation des enzymes Le surnageant clair récupéré représente l'extrait enzymatique brut, il est conservé à 4°C (**Bansal et al., 2012**).
- ✓ Pour traiter tous les échantillons dans les mêmes conditions, les extraits enzymatiques sont conservés à 4°C au fur et à mesure des prélèvements. La mesure des activités enzymatiques est répétée trois fois.

### 5.3.1. Analyses physico-chimiques

#### A. Mesure de la matière sèche et de l'humidité

2g d'échantillons de matière fraîche sont pesés ( $P_0$ ) dans des creusets en porcelaine préalablement tarés, à l'aide d'une balance de précision (**OHOUS**). L'échantillon est mis à sécher à 105°C jusqu'à poids constant ( $P$  sec). Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche.

$$H (\%) = [(P_0 - P \text{ sec}) / P_0] \times 100$$

$P_0$  : Poids frais

$$MS (\%) = 100 - H (\%)$$

$P \text{ sec}$  : Poids sec

## **B. Mesure du pH**

Le pH est mesuré directement sur la suspension obtenue avec l'échantillon de fermentation solide à l'aide d'un pH mètre, l'étalonnage de l'appareil est réalisé au moyen des solutions tampon (Scholl-Gemte) de pH 4 et 7 à 25 C°.

### **5.4. Activités enzymatiques dans l'extrait brut de fermentation**

Une unité d'activité enzymatique (U) est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour produire une micromole de sucres réducteurs (équivalent en glucose, xylose) par minute, dans un ml d'extrait brut et dans les conditions expérimentales.

- **Activité endoglucanase (CMCase)**

L'activité endoglucanase est mesurée selon la méthode décrite par **Ghose, (1987)**. Le mélange réactionnel est constitué de 0,25 ml de 2% de CMC dans du tampon citrate de sodium à pH 4,8. La réaction est stoppée par addition de 1.5 ml de DNS dans l'eau bouillante. Après refroidissement, les absorbances sont lues à 540 nm.

- **Activité FPase**

L'activité FPase est déterminée selon la méthode de Ghose(1987). Dans un tube à essai, une bandelette du papier whatman N° 1 est équilibrée avec 0,5ml de la solution tampon citrate (50 mM, pH 4,8) à 50C° pendant 10 minutes, puis 0,25 ml de l'extrait enzymatique brut sont additionnés. Après incubation à 50C° pendant 60 minutes, La réaction est stoppée par addition de 1.5 ml de DNS dans l'eau bouillante. Après refroidissement, les absorbances sont lues à 540 nm (**Tanveer et al., 2014**).

- **Activité xylanase**

L'activité xylanase est déterminée dans des conditions similaires à celles décrites dans l'activité de CMCase, sauf qu'une solution de xylane de 2% est utilisée comme substrat à la place de CMC (**Tao et al., 2010**).

## 6. Caractérisation partielle des cellulases et xylanases dans le surnageant

### 6.1. Effet de la température

La température optimale de l'enzyme est déterminée en mesurant l'activité décrit ci-dessus à diverses températures : 28, 40, 50, 60, 70, 80 et 90 °C à pH 4,8 (Tao et al., 2010). Le pH de 4,8 est considéré comme idéal pour cellulases fongiques telles que celles produites par *T. reesei* et d'autres champignons filamenteux cellulolytiques, en conservant toutes les autres conditions telles que décrites dans le test standard. La réaction enzymatique est effectuée pendant 30 min (Ramos et Fontana, 2010 ; Almeida et al., 2013).

### 6.2. Effet du pH

Le pH optimum est déterminé par la mesure des activités enzymatiques à différents pH : 3,0, 4,0, 4,8, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 et 9,0 avec des tampons à 50mM suivant : le citrate de sodium pour les pH de 3,0 à 6,0, phosphate sodium pour les pH 6,0 et 7,0 et Tris-HCl pour les pH 8,0 et 9,0 (Da Vinha et al., 2011).

### 6.3. Thermostabilité

Pour la détermination de la stabilité thermique, les fractions enzymatiques sont incubées à des températures de 50, 60 et 70 °C. Les échantillons sont prélevés toutes les heures durant 07 heures puis refroidis dans de la glace pendant au moins 1 h. L'activité résiduelle est déterminée à la température optimale en utilisant le test standard (Almeida et al., 2013).

## 7. Analyse statistique.

L'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test HSD est utilisée pour déterminer les différences significatives à l'aide du logiciel statistique Excel STAT. Pour toutes les analyses, la différence est considérée comme étant significative lorsque  $p < 0,05$  pour un intervalle de confiance de 95%.

# **Chapitre III**

## **Résultats et discussion**



## 1. Isolement sur milieu sélectif

La qualité de la matière organique (MO) est un facteur physico-chimique important agissant sur les fonctions microbiennes des sols et des litières. Elle joue un rôle important dans la distribution spatiale des zones de forte activité biologique (Alarcón-Gutiérrez, 2007).

A partir des 03 Prélèvements collectés, 66 champignons sont isolés sur un milieu sélectif CMC-agar-gentamycine à pH acide (Figure n° 14).

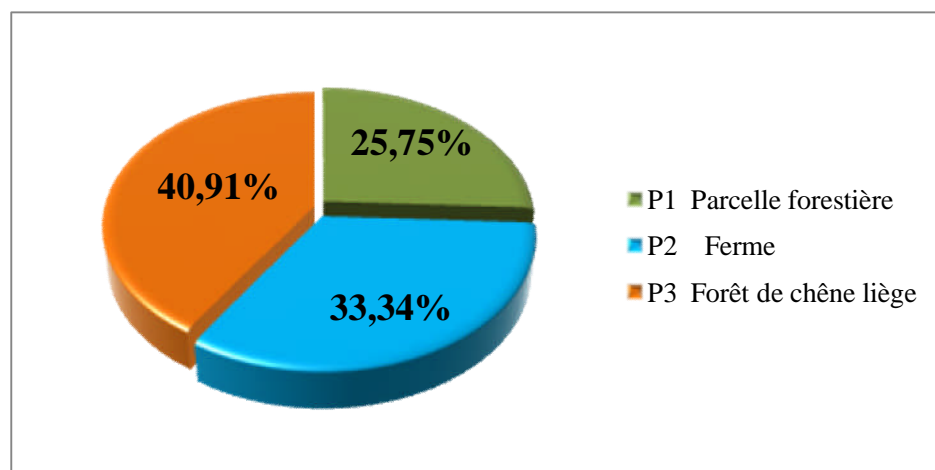


Figure n° 14 : Distribution des isolats en fonction des sites de prélèvement

Nous observons une forte prépondérance de souches fongiques dans le Prélèvement P3 plus de 40,91% des souches sont isolées. Ce résultat s'explique probablement par la richesse du foret de chêne de liège (litière végétale) en matière organique, apportée par les débris végétaux en décomposition.

Nous avons remarqué l'absence des colonies bactériennes lors d'isolement, Cette absence est due à la sensibilité de ces micro-organismes aux conditions imposées. Le tableau VIII révèle un total de 66 isolats à partir des prélèvements effectués. Les champignons sont isolés en cultures pures repartis et nommés en fonction des sites de prélèvement, du numéro d'échantillon et de la dilution. Les souches du même prélèvement, même échantillon et de la même dilution sont différenciées par des lettres alphabétiques.

Exemple :

**P<sub>1-3-3BM</sub>** : P<sub>1</sub> : Prélèvement 1, 3: Troisième échantillon, 3 : dilution « -3 »

**Tableau VIII:** Isolats fongiques des différents prélèvements

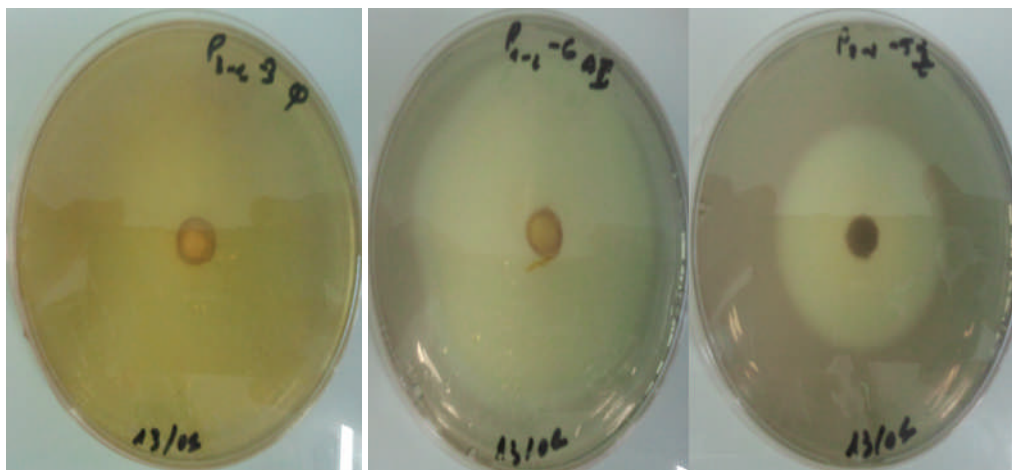
<b>Prélèvement 1 (17 souches )</b>	<b>Prélèvement 02 (22 souches)</b>	<b>Prélèvement 03 (27 souches)</b>
<b>P<sub>1-3-3BM</sub></b>	<b>P<sub>2-2-5Z</sub></b>	<b>P<sub>3-1-3BL</sub></b>
<b>P<sub>1-3-4BE</sub></b>	<b>P<sub>2-2-6T</sub></b>	<b>P<sub>3-1-4AT</sub></b>
<b>P<sub>1-2-3BS</sub></b>	<b>P<sub>2-3-4AD</sub></b>	<b>P<sub>3-3-3BD</sub></b>
<b>P<sub>1-1-5AP</sub></b>	<b>P<sub>2-3-4AZ</sub></b>	<b>P<sub>3-2-5BF</sub></b>
<b>P<sub>1-2-6AI</sub></b>	<b>P<sub>2-1-6BP</sub></b>	<b>P<sub>3-2-5BC</sub></b>
<b>P<sub>1-2-6BA</sub></b>	<b>P<sub>2-3-6BB</sub></b>	<b>P<sub>3-3-6AY</sub></b>
<b>P<sub>1-2-4BR</sub></b>	<b>P<sub>2-1-5BK</sub></b>	<b>P<sub>3-2-4AN3</sub></b>
<b>P<sub>1-2-2AJ</sub></b>	<b>P<sub>2-2-5V</sub></b>	<b>P<sub>3-2-4AN1</sub></b>
<b>P<sub>1-3-4M</sub></b>	<b>P<sub>2-3-6P</sub></b>	<b>P<sub>3-3-5BN</sub></b>
<b>P<sub>1-2-4E</sub></b>	<b>P<sub>2-1-3R</sub></b>	<b>P<sub>3-2-3AG</sub></b>
<b>P<sub>1-3-4L</sub></b>	<b>P<sub>2-2-4Y</sub></b>	<b>P<sub>3-2-3AF</sub></b>
<b>P<sub>1-3-3G</sub></b>	<b>P<sub>2-3-5W</sub></b>	<b>P<sub>3-1-4F</sub></b>
<b>P<sub>1-3-3I</sub></b>	<b>P<sub>2-3-4S</sub></b>	<b>P<sub>3-1-4B</sub></b>
<b>P<sub>1-3-3A</sub></b>	<b>P<sub>2-2-5K</sub></b>	<b>P<sub>3-1-2J</sub></b>
<b>P<sub>1-1-5AP</sub></b>	<b>P<sub>2-1-6O</sub></b>	<b>P<sub>3-1-1AK</sub></b>
<b>P<sub>1-1-4BG</sub></b>	<b>P<sub>2-3-2AB</sub></b>	<b>P<sub>3-2-5D</sub></b>
<b>P<sub>1-3-6KK</sub></b>	<b>P<sub>2-2-2H</sub></b>	<b>P<sub>3-2-4N</sub></b>
	<b>P<sub>2-3-2AM</sub></b>	<b>P<sub>3-1-3Q</sub></b>
	<b>P<sub>2-1-6X</sub></b>	<b>P<sub>3-1-3AC</sub></b>
	<b>P<sub>2-1-1AE</sub></b>	<b>P<sub>3-2-6C</sub></b>
	<b>P<sub>2-3-4BT</sub></b>	<b>P<sub>3-1-3AL</sub></b>
	<b>P<sub>2-2-5AR</sub></b>	<b>P<sub>3-2-5AH</sub></b>
		<b>P<sub>3-2-3AS</sub></b>
		<b>P<sub>3-1-3G</sub></b>
		<b>P<sub>3-3-3KI</sub></b>
		<b>P<sub>3-1-3KZ</sub></b>
		<b>P<sub>3-1-3BL</sub></b>

## 2. Criblage des isolats

La quantification et l'obtention des lignocellulases fongiques sont des objectifs difficiles à atteindre (Decker *et al.*, 2003). De ce fait, deux criblages différents ont été mis au point pour permettre une sélection primaire des souches lignocellolytiques parmi les 66 isolats.

### 2.1. Criblage qualitatif sur milieu gélosé

Pour le criblage qualitatif, les 66 Souches des mycètes sont incubées pendant 3 jours dans le milieu CMC-Agar pour observer leur niveau de production d'enzymes cellulolytiques. Toutes les espèces montrent des zones d'hydrolyse de CMC après traitement avec lugol. (Figure n° 15).



**Figure n°15 :** Photos du screening sur milieu gélosé représentant les zones d'hydrolyses des isolats.

Les colonies apparaissent entourées d'une zone claire avec différents diamètres selon les isolats. Le lugol interagit rapidement avec la cellulose native, il forme un complexe marron foncé mais pas avec la cellulose hydrolysée. Ceci révèle une zone distincte (halo) de couleur claire autour des colonies fongiques productrices de cellulases, qui correspond à la zone d'hydrolyse de la cellulose (Yeoh *et al.*, 1985).

L'Indice cellulosique « IC » entre le diamètre d'halo et celui de la colonie est proportionnel à la quantité de cellulases extracellulaires secrétées par les champignons, Tous les isolats (100%) produisent l'enzyme carboxyméthyl cellulase (Figure n°16),

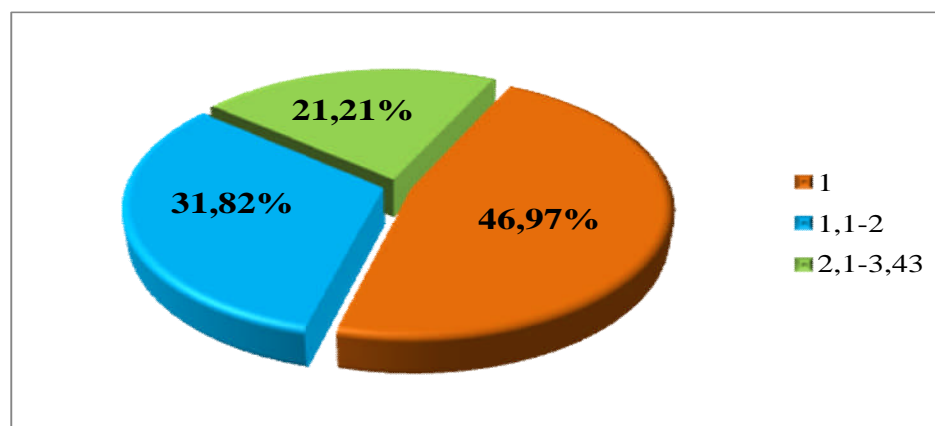


Figure 16 : Indices cellulolytiques des 66 isolats sur milieu CMC-Agar.

Les souches sont réparties en 3 groupes, en fonction de IC :

- 46,97% des souches ont un IC de **1,0**. Les colonies envahissent la totalité de la boîte ce sont des moisissures à taux de croissance très élevé dites envahissantes.
- 31,82% des souches ont un IC entre **1,1-2**.
- 21,21% des souches ont un IC entre **2,1-3,43**.

Le test de screening solide est assez sensible pour un screening primaire des micro-organismes cellulolytiques, mais la taille de la zone d'hydrolyse n'est pas toujours significative de l'activité cellulosique. Une étude a montré que, parmi 77 isolats microbiens cultivés sur milieu CMC, l'isolat à activité enzymatique la plus élevée était celui qui présente la zone claire la moins large (**Bettache, 2013**).

Le teste ANOVA a montré que l'isolat P<sub>2-3-4AZ</sub> possède le plus grand IC parmi les 66 isolats de notre collection avec une moyenne de **3,43** avec une différence hautement significative ( $p < 0,0001$ ).

## 2.2. Criblage quantitatif en milieu liquide agité

Le premier passage de la collection de champignons sur un milieu sélectif nous a permis de les classer en fonction de leur aptitude à former une zone d'hydrolyse mais cette évaluation reste toutefois semi-quantitative.

Dans un deuxième temps, une évaluation quantitative des activités cellulases de type APFase et CMCase et activité xylanolytique, est réalisée sur 57 isolats ayant un IC supérieur ou égal à **1,25** à l'exception des moisissures envahissantes. Ces souches sont sélectionnées pour une étude comparative de production de cellulases et xylanases sur milieu liquide agité Mandels et Weber [0, 3% CMC (p/v)],

Les résultats des activités APFase, CMCase et Xylanase des 57 souches sélectionnées sont présentées dans la **figure n°17**.

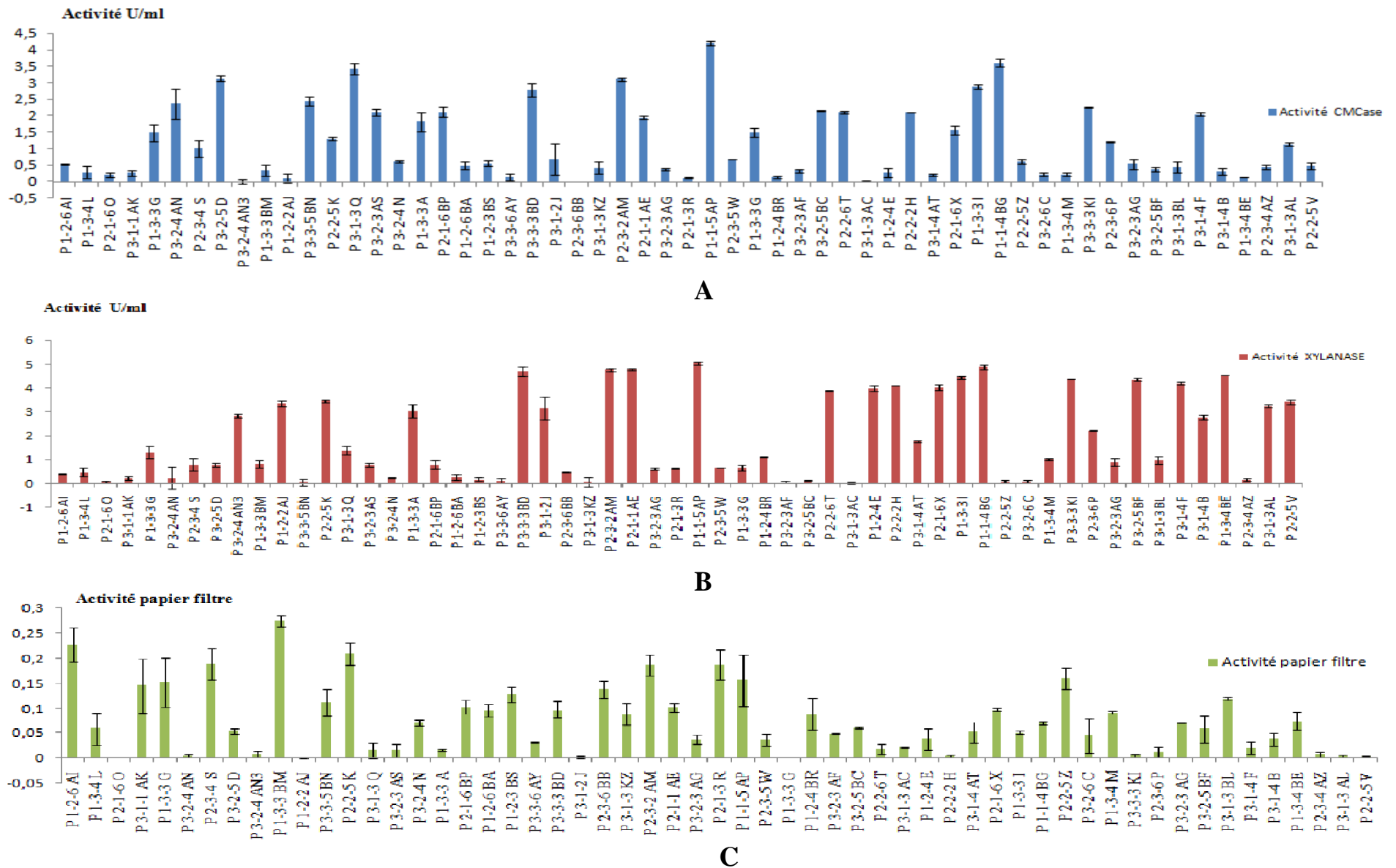


Figure n° 17: Activités CMCCase (A), Xylanase (B) et APFase (C) des 57 isolats en fermentation liquide sur milieu MW.

Les souches testées présentent des activités APFase entre **0,071-0,274**, CMCCase entre **1,175- 4,202** et xylanase entre **1,914-5,033**.

Nous remarquons que l'activité APFase ne corrèle pas toujours avec l'activité CMCCase la même remarque a été rapportée par **Shahriarinour et al., (2011)**.

L'analyse statistique a montré que l'isolat **AP** est le mieux équipé en exoenzymes parmi les 57 souches testées (CMCCase: **4.202** UI/ml et xylanase **5.033**UI/ml) avec une différence hautement significative ( $p < 0,0001$ ).

Le test ANOVA suivi de test HSD ont montré que les souches P<sub>1-1-5</sub> AP (**AP**), P<sub>1-1-4</sub> BG (**BG**), P<sub>2-3-2</sub> AM (**AM**), P<sub>3-3-3</sub> BD (**BD**) révèlent des activités CMCCase et xylanolytiques relativement importantes avec une différence hautement significative ( $p < 0,0001$ ) comme le montre le tableau IX.

**Tableau IX : Performances cellulolytiques et xylanolytiques des souches**

Souche	IC	CMCCase	Xylanase	AFPase
P <sub>1-1-5</sub> AP	1.000	4.202	5.033	0.157
P <sub>2-3-2</sub> AM	1.000	3.107	4.760	0.186
P <sub>1-1-4</sub> BG	1.000	3.603	4.874	0.069
P <sub>3-3-3</sub> BD	1.000	2.786	4.705	0.098

Ces résultats ont permis de choisir les souches AP, BG, AM et BD pour la production de cellulases et de xylanases par fermentation submergée avec des substrats lignocellulosiques. Par ailleurs, une étude morphologique est réalisée sur les 04 isolats sélectionnés.

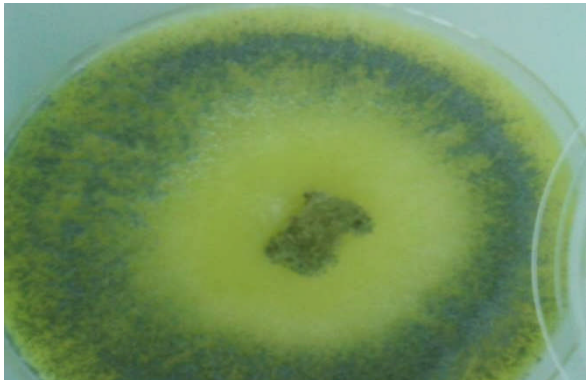
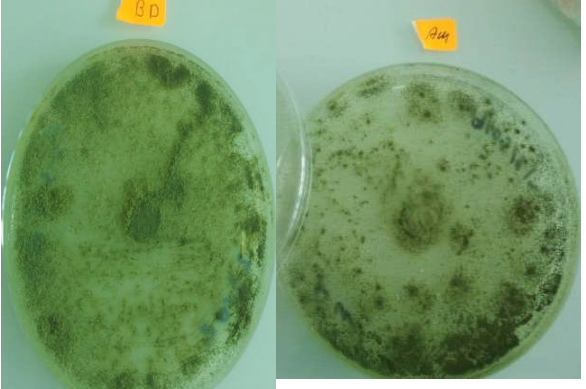
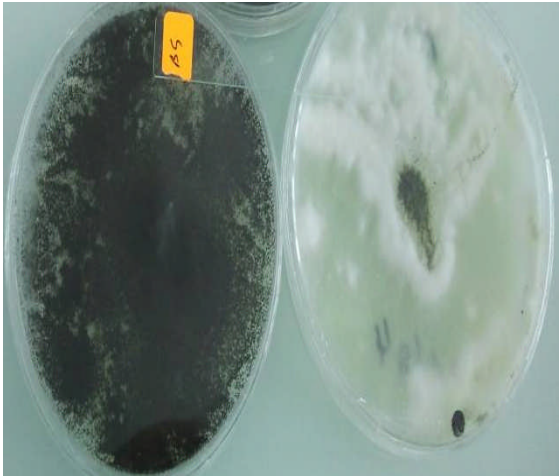
Ces résultats n'ont toutefois qu'une valeur indicative car toutes les souches sont testées selon des conditions standards, les conditions optimales pour chacune d'elles n'ayant pas été déterminées (**Roussos et Raimbault, 1982**).

### 3. Etude Morphologique des isolats sélectionnés

#### 3.1. Macromorphologie

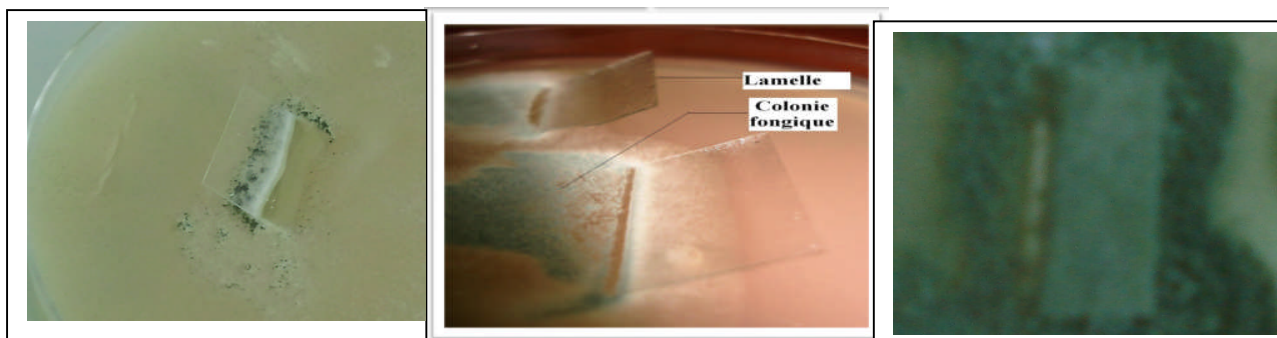
Les caractères macroscopiques des différentes souches sélectionnées sont étudiés sur le milieu PDA, le plus communément utilisé. Le **tableau X** résume les principaux caractères cultureux des colonies à savoir : l'aspect du mycélium, la surface des colonies ainsi que la couleur de la pigmentation au revers des boîtes.

**Tableau X:** Principaux caractères culturels des isolats sur milieu PDA.

Souche	Caractères morphologiques	Aspect de la boîte
<p>P<sub>1-1-5</sub> AP (AP)</p>	<p>-Une croissance très rapide et le mycélium envahit facilement le milieu.</p> <p>-Le mycélium est de couleur jaune puis vert olive après sporulation</p>	
<p>P<sub>2-3-2</sub> AM (AM) P<sub>3-3-3</sub> BD (BD)</p>	<p>-Une croissance rapide et le mycélium envahit la boîte après 3 jours d'incubation.</p> <p>-Les mycéliums sont de couleur vert foncé, devenant poudreux avec l'apparition de spores.</p> <p>-Absence de pigment</p>	
<p>P<sub>1-1-4</sub> BG (BG)</p>	<p>-Une croissance rapide.</p> <p>-Un mycélium d'aspect velours, blanc cotonneux au départ devenant poudreux avec l'apparition de spores noires.</p> <p>-Absence de pigments</p>	

### 3.2. Micromorphologie

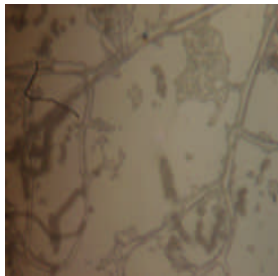
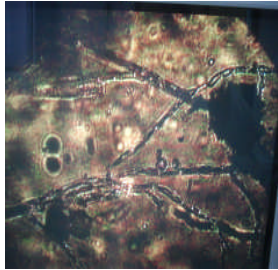
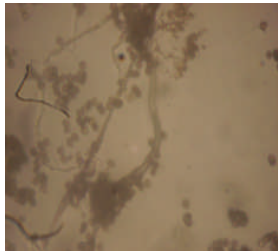
La figure n°18 présente l'aspect des lamelles après 7 jours d'incubation sur le milieu PDA ensemencé avec les isolats AP, BG, AM et BD.



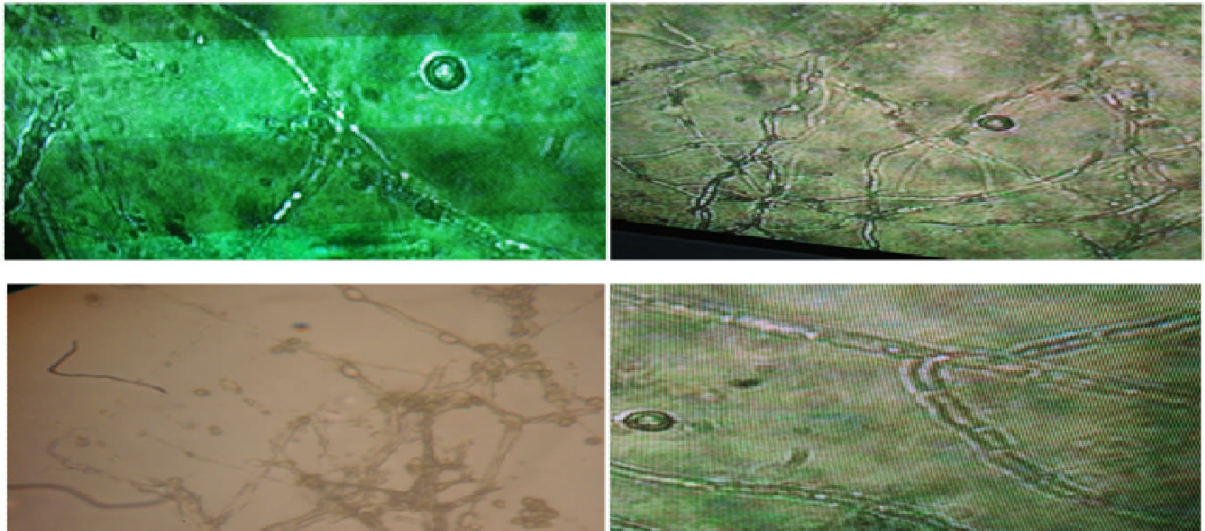
**Figure n° 18:** Observations fongiques par la technique des lamelles

L'observation au microscope optique des cultures sur lamelles de 7 jours au grossissement (x400), permet d'examiner les mycelia et les organes de fructification sans en altérer leurs structures ( **tableau XI**) et Les photos d'observation des souches AP, AM, BD et BG sont présentées dans les figures n° 19, 20 et 21.

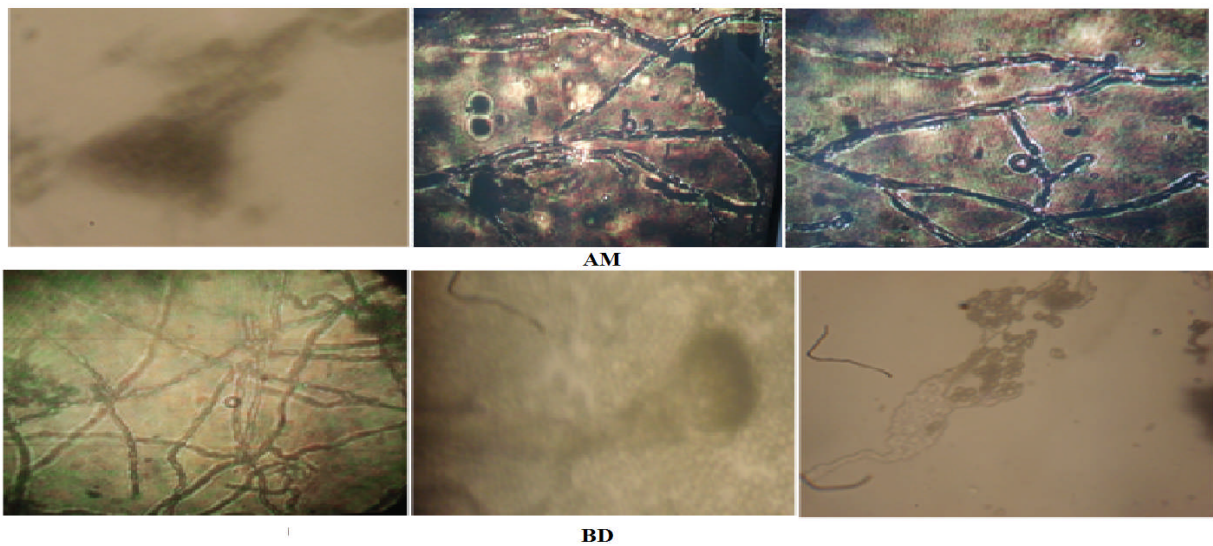
**Tableau XI :** Principaux caractères microscopiques des isolats dans le milieu PDA

Isolat	Caractères microscopiques	Genre	Photo
AP	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hyphes cloisonnés</li> <li>➤ Conidiophores très ramifiés, irrégulièrement verticillés avec des ramifications à angle droit.</li> <li>➤ Phialides ovoïdes et ellipsoïdales atténués au sommet directement insérées sur le conidiophore.</li> <li>➤ Conidies de couleur verte.( Figure n° 19).</li> </ul>	<b>Trichoderma</b>	
AM et BD	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hyphes cloisonnés</li> <li>➤ L'organe de fructification asexué est caractérisé par la présence des penicilli constituées de métules, et phialides.</li> <li>➤ Phialides branchées directement à l'extrémité du conidiophore surmontées par des chaînes de conidies. (Figure n° 20).</li> </ul>	<b>Penicillium</b>	
BG	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hyphes cloisonnés.</li> <li>➤ Conidiophores à extrémité enflé en une vésicule recouverte de métules qui portent les phialides.</li> <li>➤ Les chaînes de conidies sont portées par les phialides.</li> <li>➤ Phialides formées directement sur la vésicule. (Figure n° 21).</li> </ul>	<b>Aspergillus</b>	

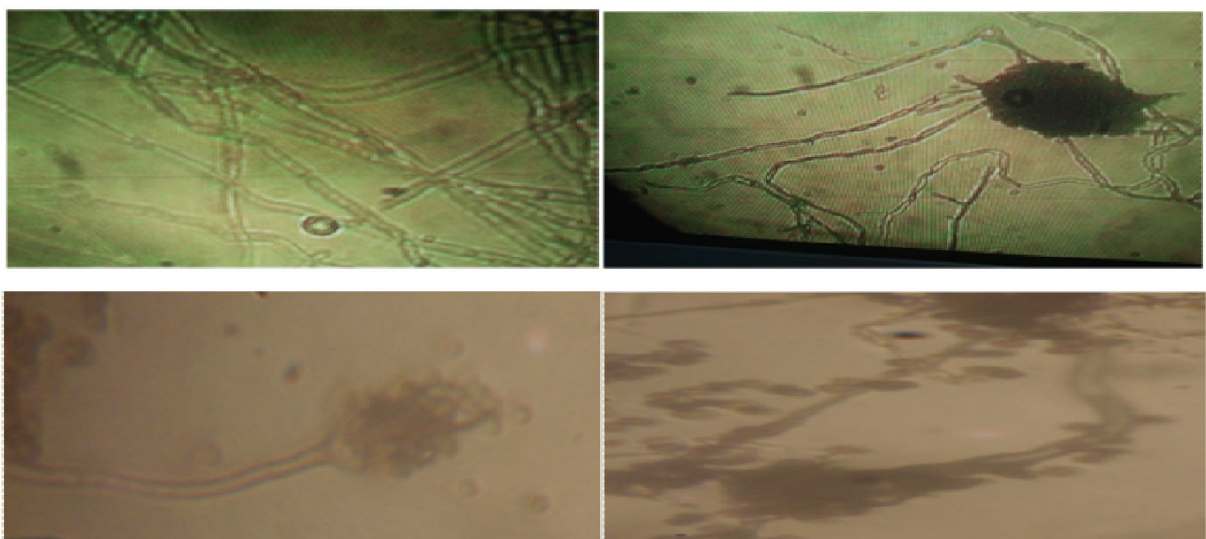




**Figure n°19:** Observations microscopiques de la souche **AP**.



**Figure n°20:** Observations microscopiques des souches **AM** et **BD**.



**Figure n°21:** Observations microscopiques de souche **BG**.

#### 4. Production de cellulases et de Xylanases par fermentation submergée de déchets lignocellulolytiques

La production de Lignocellulases est un facteur important dans l'hydrolyse de matières lignocellulosiques. Il est également essentiel de rendre le procédé économiquement viable. Beaucoup de travaux rapportent la production de lignocellulases à partir de matières lignocellulosiques (Soni et al., 2010; Goldbeck et al., 2013; Bano et al., 2013). Les mycètes les plus utilisés dans l'industrie de fabrication des enzymes appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Trichoderma* et *penicillium*. Ils présentent des capacités de production et de sécrétion élevés; *Trichoderma reesei* peut atteindre des rendements de cellulases de 40 g/l (Moor et al., 2011).

Le screening liquide nous a permis de sélectionner 04 souches dans les genres *Trichoderma* (AP), *Aspergillus* (BG) et *penicillium* (AM et BD). Elles sont les plus performantes parmi les 57 souches préalablement testées et caractérisées. Elles ont été choisies dans une première phase pour la production d'enzymes par fermentation liquide de déchets lignocellulolytique tel que le grignon d'olive, la paille et le son de blé.

##### 4.1. Production d'endoglucanases (CMCcases)

La production de CMCcase par fermentation liquide est suivie du 2ème au 7ème jour avec des prélèvements toutes les 24 heures. La figure 22 représente la cinétique de production des 04 souches ainsi que la souche témoin «ST» avec les différents déchets lignocellulolytiques. On note les points suivants :

- Le maximum de production pour l'activité CMCcase correspond pour la plupart des souches au 6ème jour de la fermentation.
- Toutes les souches présentent une activité CMCcase inférieure à celle de la souche de référence (ST). *T. reesei* RUT C30 présente en effet les meilleures activités CMC case avec tout les substrats soit 5,291 , 5,713 et 0,99 UI/ml respectivement pour la paille, le son de blé et le grignon d'olive.

Parmi nos souches testées :

- La souche de *Trichoderma sp* (AP) présente de meilleures activités avec la paille de blé ou elle atteint 3,088 UI/ml. Avec le son de blé, elle affiche une activité 0,974 UI/ml et de 0,021 UI/ml avec le grignon d'olive. Ce genre est connu parmi les souches fongiques les plus productrices d'enzymes cellulolytiques Elles sont capables de produire au moins 5 endoglucanases (Kubicek et Pentilla, 1998). Roussos et Raimbault, (1982) rapportent

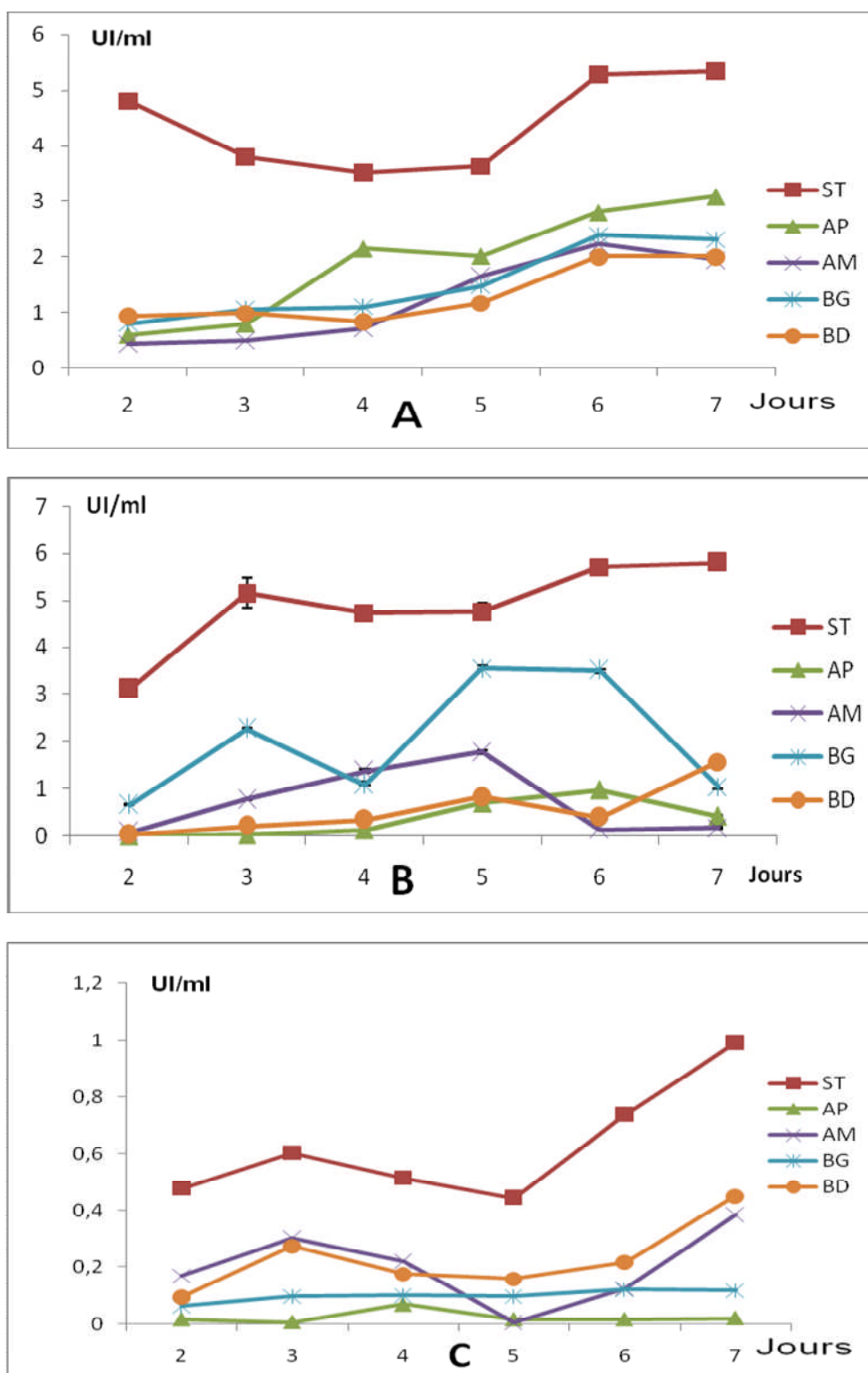


Figure n° 22 : Cinétique des activités CMCases des 04 isolats et ST par Fermentation liquide : (A) Paille de blé, (B) : Son de blé, (C); Grignon d'olive.

une activité de **1,229** UI /ml. avec une souche de *Trichoderma reesei* sur milieu MW. Selon (Ang et al., 2015), le niveau de productivité des enzymes chez des souches de *Trichoderma* cultivées sur le grignon d'olive est suffisant pour la croissance sur la cellulose mais ne permet pas la saccharification in vitro de cette dernière .

- L'*Aspergillus sp* (BG) présente une activité **2,385UI/ml** avec la paille de blé, Alors que sur le son de blé elle atteint **3,549 UI/ml** , mais une faible activité de **0,120UI/ml** est observée avec le grignon d'olive.
- Les souches de *penicillium* présentent des activités relativement importantes avec le grignon d'olive comparées aux genres précédents avec des activités de **0,385** et **0,451 UI/ml** pour **AM** et **BD** respectivement. Par ailleurs, on relève des CMCases de **2,226** et **2,004 UI/ml** avec la paille de blé, de **1,774** et **1,570 UI/ml** avec le son de blé. **Herculano et al., (2011)** rapportent des activités CMCases respectives de **2,36** et **2,57** UI/ml chez des souches de *Rhodotorula aurantiaca* et *Eurotium chevaliere*.

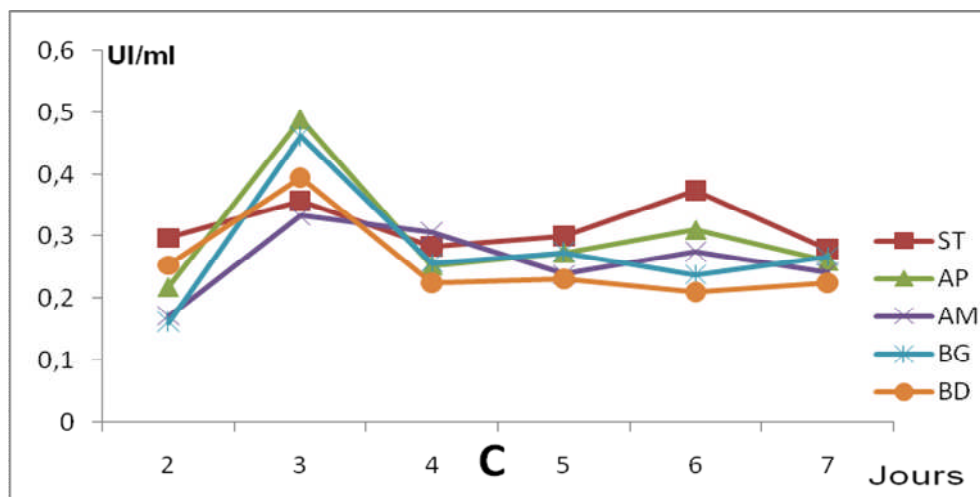
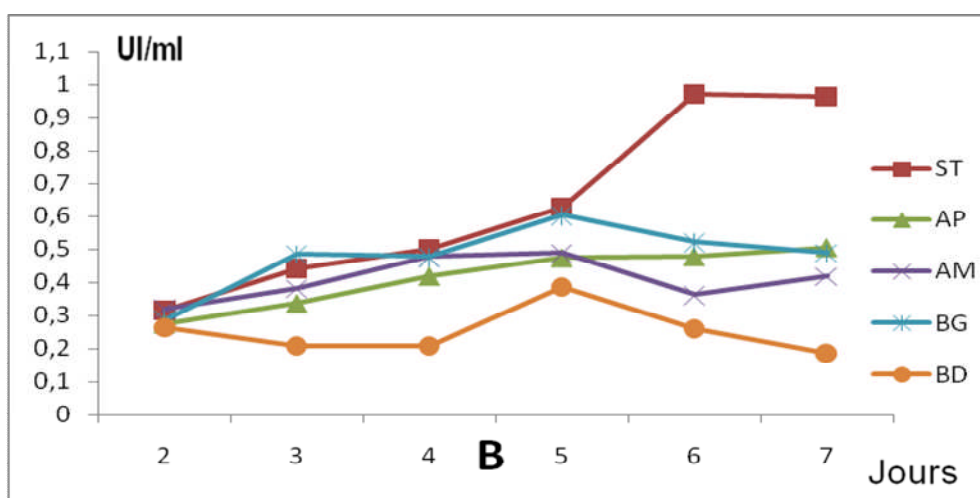
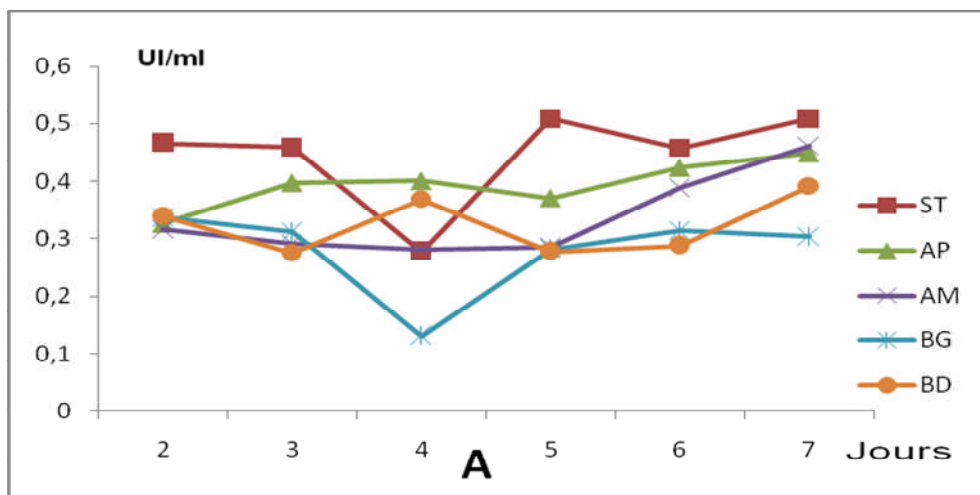
Concernant l'activité CMAases, on peut conclure que la souche AP produit une activité appréciable avec la paille de blé par rapport aux autres genres. La souche BG présente une meilleure activité avec le son de blé, par contre les souches AM et BD produisent des activités relativement importantes avec le grignon d'olive comparable au souches AP et BG.

#### **4.2. Production de papier filtrase**

La culture en milieu liquide est également prélevée toutes les 24 h du 2ème au 7ème jour. La **figure 23** représente la cinétique de production d'APFase des 04 Souches et du témoin « **ST** » avec les différents déchets.

On relève ce qui suit :

- le maximum de production d'activité APFase correspond pour la plupart des souches au : 7ème jour de fermentation pour la paille de blé, 6ème pour le son de blé et 3ème pour le grignon d'olive .
- La plupart de nos souches présentent une activité APFase inférieure à celle de la souche de référence (**ST**) *T reesei* RUT C30 avec des activités de **0,508** , **0,961** et **0,373 UI/ml** dans la paille, le son de blé et le grignon d'olive respectivement



**Figure n° 23** : Cinétique de l'activité APFase des 04 isolats et ST par fermentation liquide (A); Paille de blé, (B) :Son de blé,(C): Grignon d'olive

- *Trichoderma sp* (AP) révèle de meilleures activités avec **0,448 et 0,505 UI/ml** en présence de paille et de son de blé respectivement. Avec le grignon d'olive elle présente également une activité de **0,489UI/ml** supérieure à celles des autres souches y compris de la souche de témoin. Ce résultat se rapproche de celui rapporté par **Kader et al., (1999)** avec une souche locale de *Trichoderma sp* sur milieu Mandels avec une APfase de **0.40** UI/ml.
- L'*Aspergillus sp* (BG) présente une meilleure activité avec le son de blé. Les activités maximales observées chez cette souche sont de **0,314, 0,602, 0,462 UI/ml** avec respectivement la paille, le son de blé et le grignon d'olive. Dans une étude similaire, **Saradouni (1994)**, a sélectionné une souche locale appartenant au genre *Aspergillus*, avec une APfase maximale de **0.3** UI/ml sur milieu MW.
- Les souches de *penicillium* (AM et BD) présentent des activités APFase relativement élevées. elles sont de **0,460 et 0,391 UI/ml** avec la paille de blé, de **0,488 et 0,386 UI/ml** avec le son de blé et de **0,333 et 0,395 UI/ml** avec le grignon d'olive.

#### 4.3. Production de xylanases

La **figure n°24** représente la cinétique de production de xylanases chez les 04 souches Sélectionnées et la souche de témoin « **ST** ». Les prélèvements sont effectués chaque jour du 2ème au 7ème jour.

Nous remarquons dans la figure n° 24 :

- le maximum de production d'activité xylanase varie pour la plupart des souches entre le 5ème, le 6ème et le 7ème jour de fermentation.
- Toutes les souches présentent des activités xylanases supérieures à celle de la souche de référence(ST) *T reesei* RUT C30 dont les activités maximales sont de **4,609, 3,448 et 0,515 UI/ml** respectivement avec la paille, le son de blé et le grignon d'olive
- *Trichoderma sp* (AP) révèle une activité xylanase importante de **4,851 UI/ml** avec la paille de blé par rapport aux autres souches y compris la souche de témoin. Elle présente également des activités maximales de **4,979 et 0,087 UI/ml** avec le son de blé et le grignon d'olive.

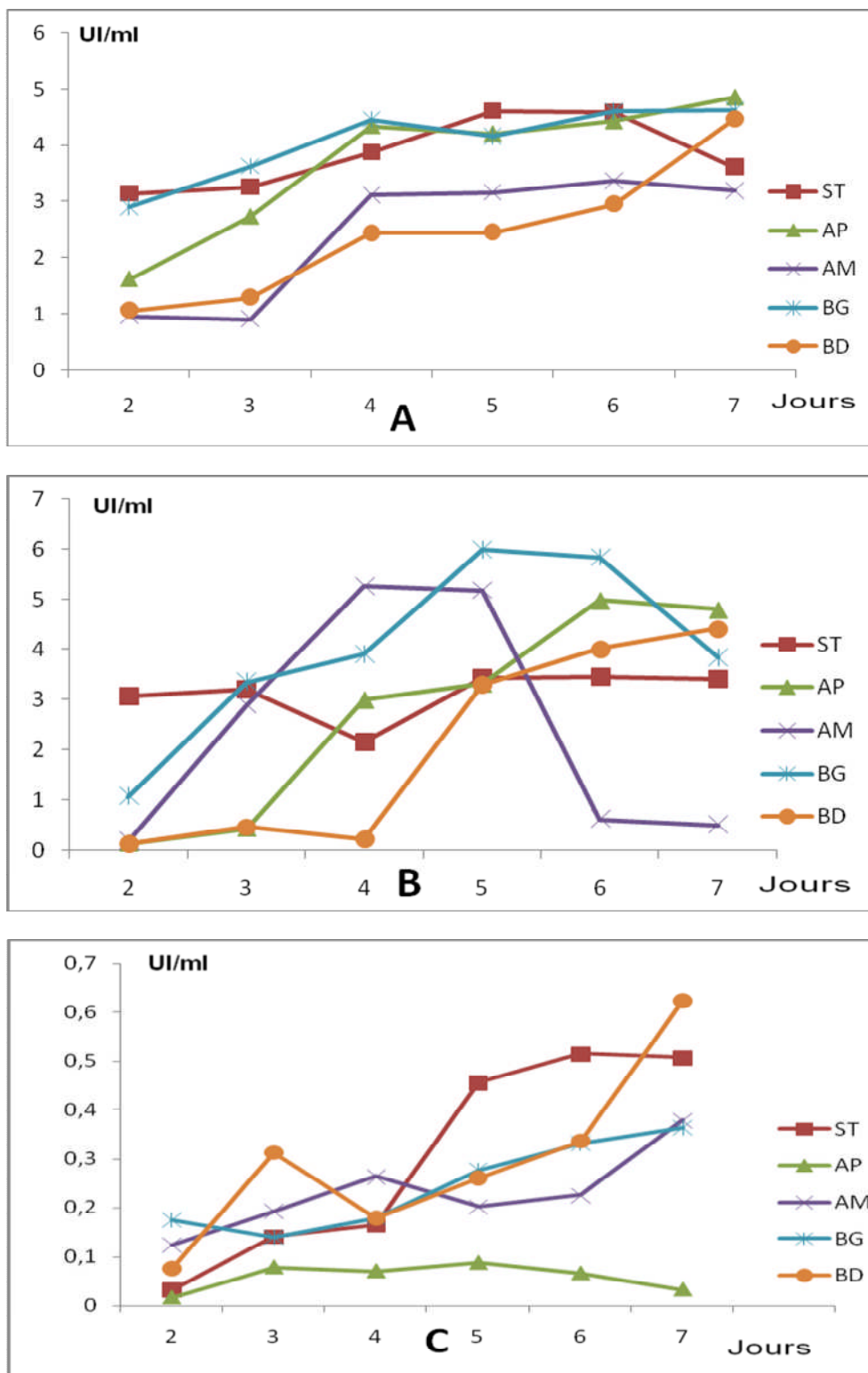


Figure N° 24 : Cinétique de l'activité xylanase des 04 isolats et ST par fermentation liquide. (A) ; Paille de blé, (B): Son de blé, (C): Grignon d'olive

- L'*Aspergillus sp* (BG) révèle une activité de **6,000 UI/ml** avec le son de blé, supérieure aux autres souches et la souche témoin. Il présente également des activités maximales de **4,624 et 0,363UI/ml** avec la paille de blé et le grignon d'olive. Selon **Ang et al.,(2015)**, beaucoup d'études ont prouvé que plusieurs espèces d'*Aspergillus* sont caractérisées leur potentiel xylanolytique élevé dû à leur sécrétion élevée de xylanases.
- Les souches **AM et BD** présentent respectivement des activités de **3,362 et 4,465 UI/ml** avec la paille de blé, **5,259 et 4,410 UI/ml** avec le son de blé et **0,378 et 0,623 UI/ml** avec le grignon d'olive. A noter que la souche BD révèle une activité xylanase avec le grignon d'olive supérieure à celle de la souche témoin et celles des autres souches.

On remarque que dans l'ensemble les meilleures activités sont obtenues avec le son de blé, ce dernier semble induire la production de xylanases , plusieurs études ont rapporté son efficacité comme inducteur de xylanases (**Boucherba,2011**).

Le tableau XI synthétise les activités de nos souches en présence de son de blé et comparées avec celles rapportés par **Kobakhidze et al., (2012)**.

**Tableau XI:** Etude comparée de la production d'enzymes cellulolytiques par fermentation submergée en présence de son de blé.

souches	CMCase (U/mL)	FPA (U/mL)	Xylanase (U/mL)	Jour
ST	5.713	0.961	3,448	6-7-6
AP	0.974	0.505	4.979	6-7-6
BG	3.549	0.602	6.006	5-5-5
AM	1.774	0.488	5.259	5-5-4
BD	1.570	0.386	4.410	7-5-7
<i>Hyphoderma praetermissum</i> (Kobakhidze et al., 2012)	0.7	0.38	3.2	5-5-5
<i>Tubulicrinis glebulosus 26</i> (Kobakhidze et al., 2012)	0.3	0.04	1.3	8-5-5



## 5. Production de cellulases et de xylanases par fermentation solide avec de la paille et du son de blé

La culture solide en erlen repose sur une distribution homogène des spores de mycètes à l'intérieur des substrats lignocellulosiques. La préparation d'un substrat poreux est nécessaire pour assurer une bonne aération et une croissance rapide du mycélium. Le pH acide et une charge importante de l'inoculum sporal favorisent cette croissance. L'humidité joue également un rôle important dans la croissance des mycètes et la production des enzymes dans les SSF (**khushal, 2003**).

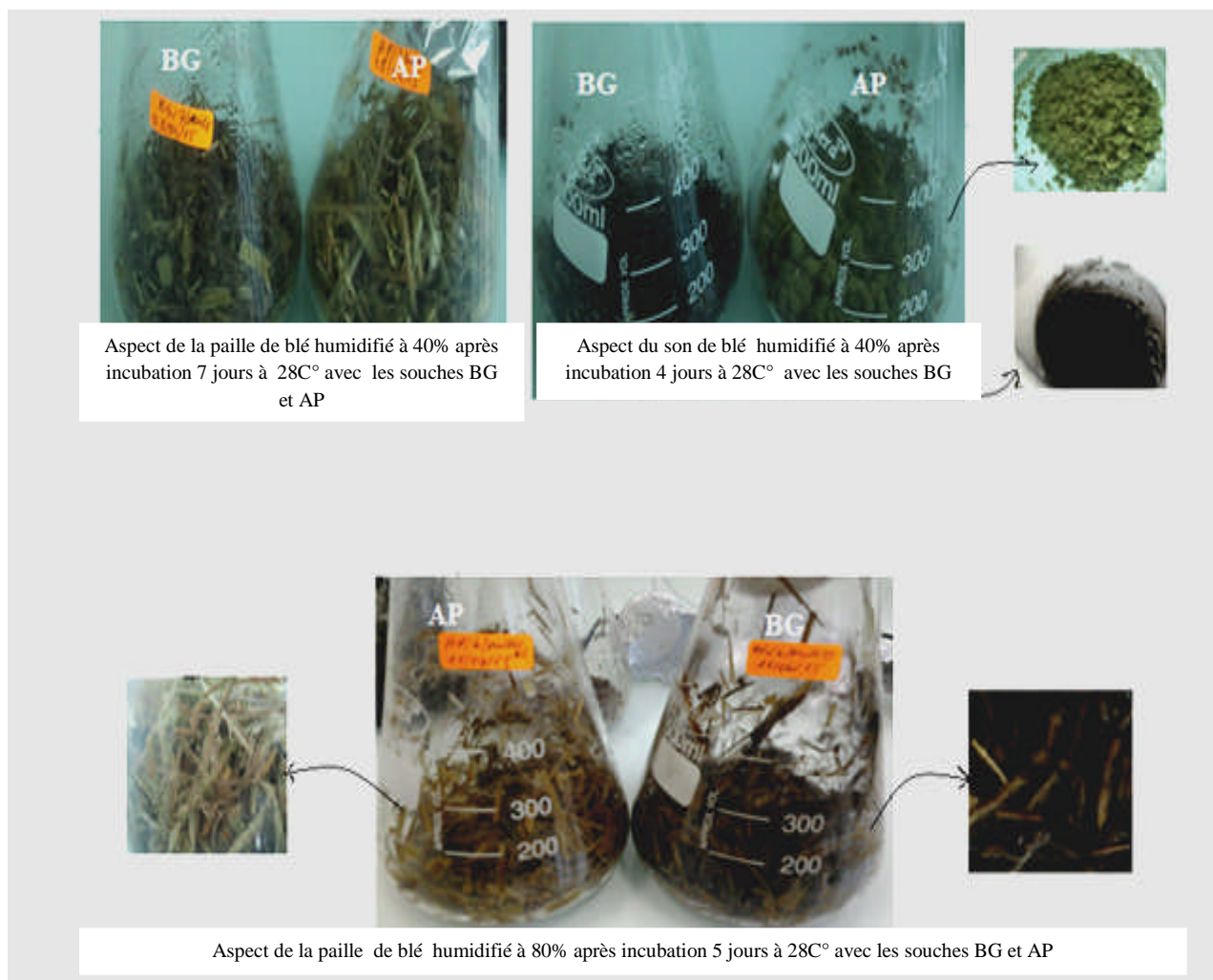
Avant humidification, l'humidité de nos substrats est de 10 % pour la paille de blé et de 12 % pour le son de blé. Le taux d'humidité requis pour la SSF est de 40% pour le son de blé, de 40% et 80% pour La paille. La capacité d'absorption de l'eau est due probablement à leur composition. L'humidité initiale des substrats évolue au cours de la fermentation à cause de l'évaporation et de l'activité métabolique. L'augmentation de l'humidité et de la disponibilité de l'eau provoque une augmentation du taux de croissance, de la production de biomasse et de la biosynthèse d'enzymes (**Lakhtar, 2009**).

Selon **Oriol, (1987)**, le rôle de l'eau dans le processus de FMS est multiple ; élément dominant dans la composition de la biomasse, l'eau sert à véhiculer les enzymes et les composés nutritifs, et facilite les échanges gazeux.

La quantité maximale de liquide présente dans la phase solide est fonction de la capacité de rétention d'eau du substrat ou du support solide. Toutefois, cette quantité de liquide doit être suffisante à la croissance des microorganismes sans détruire la structure solide ou réduire la porosité du substrat ou du support. Le développement microbien en FMS nécessite une humidité du substrat supérieure à 50 %, une humidité très élevée dans le substrat provoque une diminution de la porosité du substrat, une baisse de la diffusion d'oxygène et une augmentation de cette humidité provoque un risque de contamination (**Lakhtar, 2009**).

### 5.1. Culture et croissance des souches

La fermentation liquide avec le grignon d'olive, la paille et le son de blé nous a permis de sélectionner 02 souches les plus performantes à savoir *Trichoderma sp* (**AP**) et *Aspergillus sp* (**BG**). Elles sont caractérisées par leurs capacités de production de cellulases et de xylanases sur la paille et le son de blé. L'aspect des cultures fongiques étudiées sur milieu solide à base de son et de paille de blé est représenté dans la figure n° 25.



**Figure n° 25 :** Aspect des cultures de *Trichoderma sp* (AP) et *Aspergillus sp* (BG) après fermentation solide de la paille et du son de blé

A 40% d'humidité, La croissance d'*Aspergillus sp* et *Trichoderma sp* débutent à partir de 24h sur le son de blé ; ce dernier demeure plus ou moins humidifié. Pour la paille de blé humidifié à 40%, la croissance nécessite au moins 48 h; le substrat apparaît sec et déshydraté. Par contre pour les cultures avec de la paille de blé humidifiée à 80%, la croissance débute à 24h chez *Aspergillus sp*. Nishlo et al., (1979), rapportent une augmentation de la vitesse spécifique de croissance de la biomasse et de la synthèse d'enzymes chez *Aspergillus niger* sur son de blé, lorsque l'humidité initiale augmente de 32% à 56%.

La taille des particules constitue également un facteur critique dans la fermentation solide. Selon Attyia et Ashour (2002), la surface de croissance des microorganismes est plus importante quand la porosité entre les particules est faible. Ces deux facteurs opposés, faible surface et forte porosité influent probablement sur la croissance et la production d'enzyme.

## 5.2. Evolution de la matière sèche et du pH au cours de la FMS

### 5.2.1. la matière sèche

En fermentation solide, il est indispensable de suivre l'évolution de la matière sèche du substrat solide au cours de la fermentation. En effet, l'eau produite lors de la respiration, de même que la perte de poids due à la dégradation des substrats carbonés conduisent à des variations importantes de l'humidité au cours de la fermentation. Le suivi de la perte en poids sec du substrat de fermentation permet de suivre l'évolution de la croissance du champignon, car ses deux paramètres sont fortement corrélés ( **Saucedo-Castaneda, 1991 ;Terebiznik et Pilosof, 1999**).

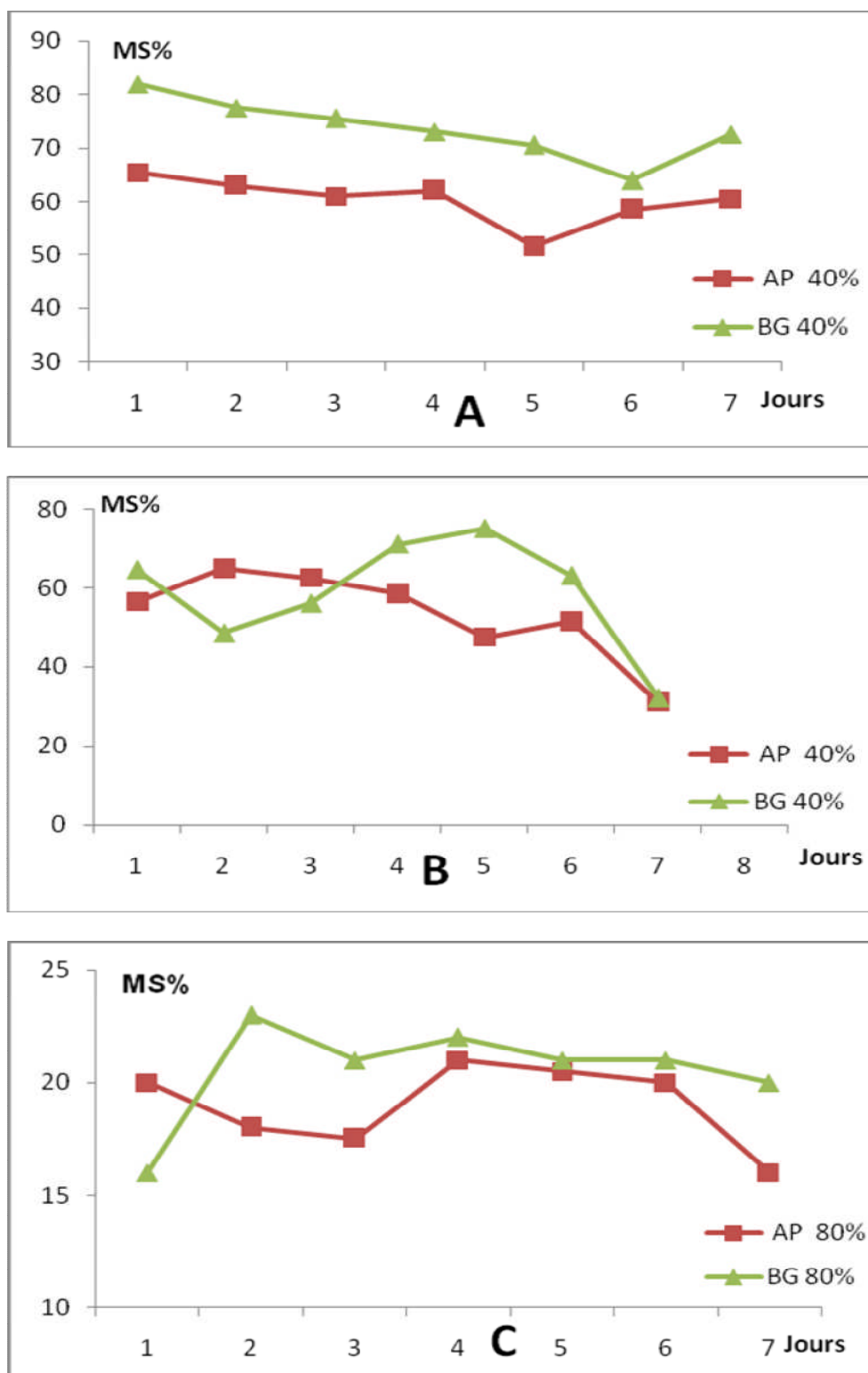
En FMS avec les moisissures, il est difficile de déterminer directement la biomasse, car il est pratiquement impossible de séparer la biomasse du substrat de fermentation. La perte en poids sec du substrat de fermentation est hautement corrélée à la biomasse et que cette dernière peut être estimée par la détermination de la perte en poids sec. (**Raimbault ,1989 ; Terebiznik et Pilosof, 1999**).

Le taux de matière sèche est mesuré toutes les 24 heures d'incubation durant la fermentation sur les deux souches cultivées sur la paille et le son de blé, les résultats obtenus sont représentés sur la **figure n° 26**.

Dans le cas de la paille de blé humidifiée à 40% (figure A), nous enregistrons une diminution du taux de MS pour les deux souches jusqu' au 5<sup>ème</sup> jour pour la souche **AP** et 6<sup>ème</sup> jour pour la souche **BG**. On observe une légère augmentation à partir du 7<sup>ème</sup> jour chez les deux souches. Cette chute du taux de MS correspond à une croissance rapide du champignon et une dégradation rapide du substrat de fermentation (**Weng et Sun, 2006 ; Tao et al., 2009**).

La figure B montre les résultats de la fermentation du son de blé à 40% d'H, pour la souche **BG**. On note une augmentation de MS du 2<sup>ème</sup> au 5<sup>ème</sup> jour d'incubation, **Vidaud et al., (1982)** précisent que le broyage rompt une partie des molécules de cellulose, augmentant ainsi le nombre de fonctions réductrices libres et provoquant la formation de polysaccharides de faible poids moléculaire facilement hydrolysables. Par contre pour la souche **AP** on a enregistré une diminution de MS tout long de la fermentation.

**Hamaili et Benkerrou (2012)**, ont rapporté une croissance significative dès le 1<sup>er</sup> jour avec *Trichoderma reesei* cultivée sur son de blé; cela est due probablement à la composition du son de blé qui est variable notamment plus riche en vitamines, et en sels minéraux. ,



**Figure n° 26** : Evolution de la MS des souches AP et BG au cours de la fermentation solide  
 (A) : Paille de blé à 40% d'humidité, (B) : Son de blé à 40% d'humidité, (C) : Paille de blé à 80% d'humidité

Pour la souche **AP**, dans le cas de la paille de blé humidifiée à 80% (figure C), on enregistre une diminution de MS jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour. Au 4<sup>ème</sup> on observe une légère augmentation puis une diminution jusqu'au dernier jour de fermentation. Pour la souche **BG** on a enregistré dès le 3<sup>ème</sup> jour, une diminution de la matière sèche jusqu'au dernier jour de fermentation. Selon **Leonowicz et al., (1999)**, la croissance des champignons s'effectue au début de l'incubation au dépend des fractions facilement assimilables à faible masse moléculaire, il s'agit d'oligosaccharides présents naturellement dans le substrat ou libérés lors des différents traitements physiques tel que le broyage et la stérilisation.

#### 5.2.2. Le pH de milieu

Le pH du milieu évolue durant la fermentation avec la croissance du microorganisme et la production des enzymes extracellulaires. Cette variation du pH est fonction des activités métaboliques des micro-organismes, mais elle est également caractéristique de la teneur faible en eau du substrat (**Roussos et Annibal, 1984 ; Chen, 2013**). Il semble donc important de mesurer ce paramètre afin de suivre indirectement la croissance et de contrôler la production des cellulases en milieu solide.

Le pH est suivi au cours de la fermentation après la mise en suspension du substrat fermenté dans de l'eau distillée. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **figure n° 27**.

Avec la souche *Trichoderma sp* cultivée sur paille de blé humidifiée à 40%, on observe une augmentation du pH les deux premiers jours de fermentation suivie d'une légère diminution jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour pour remonter dans le 7<sup>ème</sup> jour. Selon **Oriol, (1987)**. Une augmentation de pH durant les premières heures de la croissance est attribuable à l'hydrolyse de l'urée et à la libération d'ions  $\text{NH}_4^+$ . A 80% d'H, le pH augmente légèrement jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour d'incubation puis diminue au 6<sup>ème</sup> puis remonter dans le dernier jour de fermentation. Selon **Roussos et Raimbault, (1982)**, l'augmentation du pH au début de fermentation est due à la germination des spores et au début de la croissance du mycélium tandis que la diminution rapide du pH est liée à la croissance active du mycélium.

Pour *Aspergillus sp*, une diminution progressive du pH a été observée avec la paille de blé humidifiée à 40% et 80% jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour, au-delà le pH se stabilise.

Selon **Larpent, (1990)**, la diminution du pH est peut être due à la production et libération de métabolites acidogènes tels que l'acide citrique et acétique qui acidifient le milieu de culture.

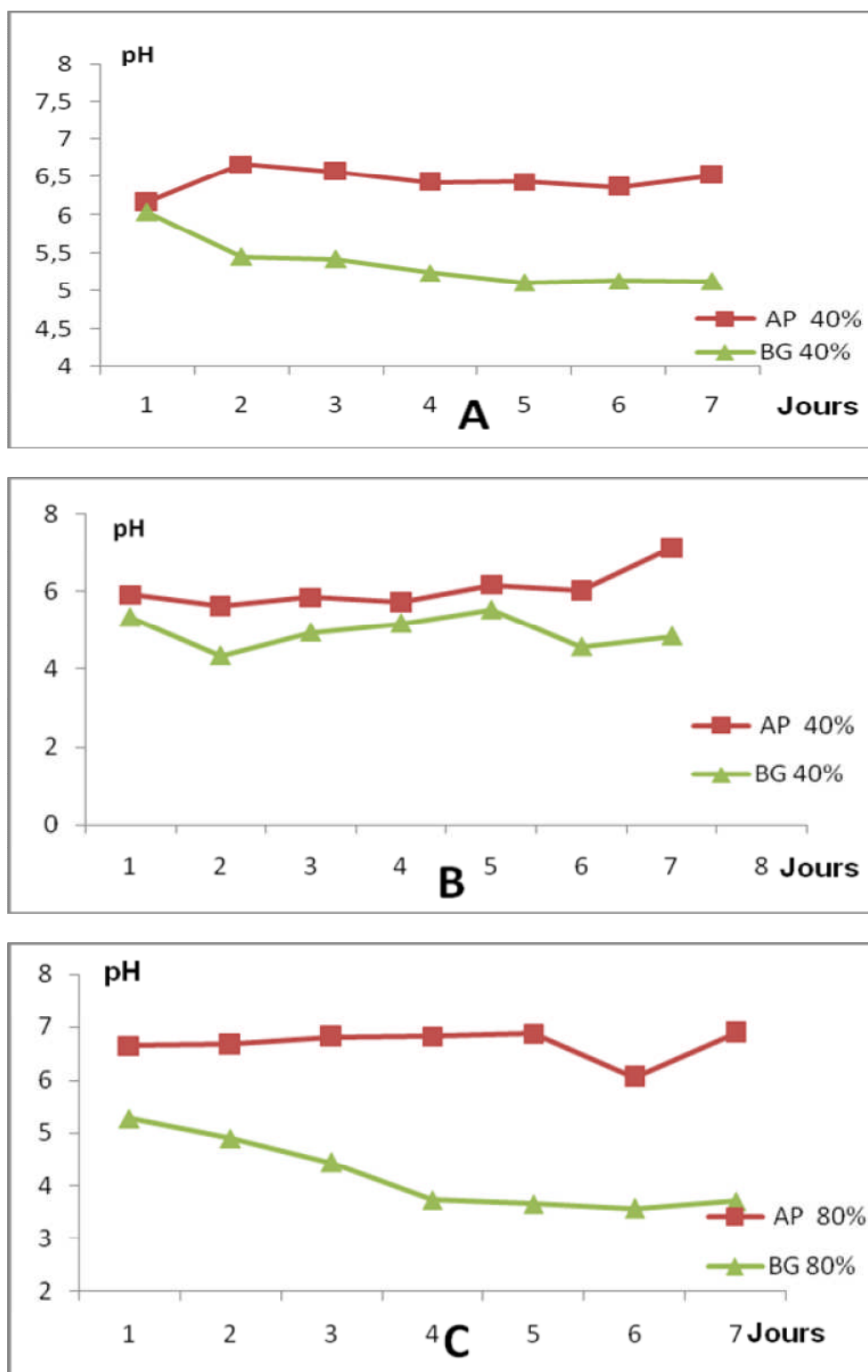


Figure n° 27 : Evolution du pH au cours de la fermentation solide

(A) : Paille de blé à 40% d'humidité, (B) : Son de blé à 40% d'humidité, (C) : Paille de blé à 80%

Avec le son de blé, les deux souches **AP** et **BG** révèlent une diminution de pH au cours du 2<sup>ème</sup> jour de fermentation suivie d'une augmentation jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour. Le 6<sup>ème</sup> jour on observe encore une diminution, puis une augmentation le 7<sup>ème</sup> jour. L'arrêt de la croissance active du mycélium dû à l'épuisement des nutriments du milieu est suivie d'une autolyse du mycélium au cours de laquelle les protéines sont solubilisées et dégradées par des protéases. **Tang et al., (2004)**, ont émis l'hypothèse que les ions ammonium NH<sub>4</sub><sup>+</sup> libérés durant cette étape contribueraient à l'augmentation du pH.

L'étude rapportée par **Ouali et Tidjet, (2012)** mentionne une augmentation de pH avoisinant 8,55 au 8<sup>ème</sup> jour de culture chez une souche de *Trichoderma reesei* cultivée sur son d'orge; au delà, le pH diminue. Le même profil de pH a été rapporté par **Roussos (1987)**, avec une souche de *Trichoderma harzianum* cultivée sur son de blé.

Une baisse de pH est souvent due à une libération d'acides organiques qui acidifient progressivement le milieu, la hausse par contre est souvent imputable à la dégradation des protéines et des acides aminés qui libèrent de l'ammoniaque (**Botton et al., 1990 ; Leclerc et al., 1995**).

Selon **Raimbault, (1998)**, la variation du pH du milieu dépend fortement du micro-organisme. Dans le cas d'*Aspergillus sp*, *Penicillium sp*. et *Rhizopus sp*, Il peut diminuer fortement et atteindre des valeurs en dessous de 3,0 en particulier dans le cas de *A. niger*. En revanche, d'autres types de mycètes alcalinisent le milieu, c'est le cas de *Trichoderma harzianum* (**Roussos, 1987**).

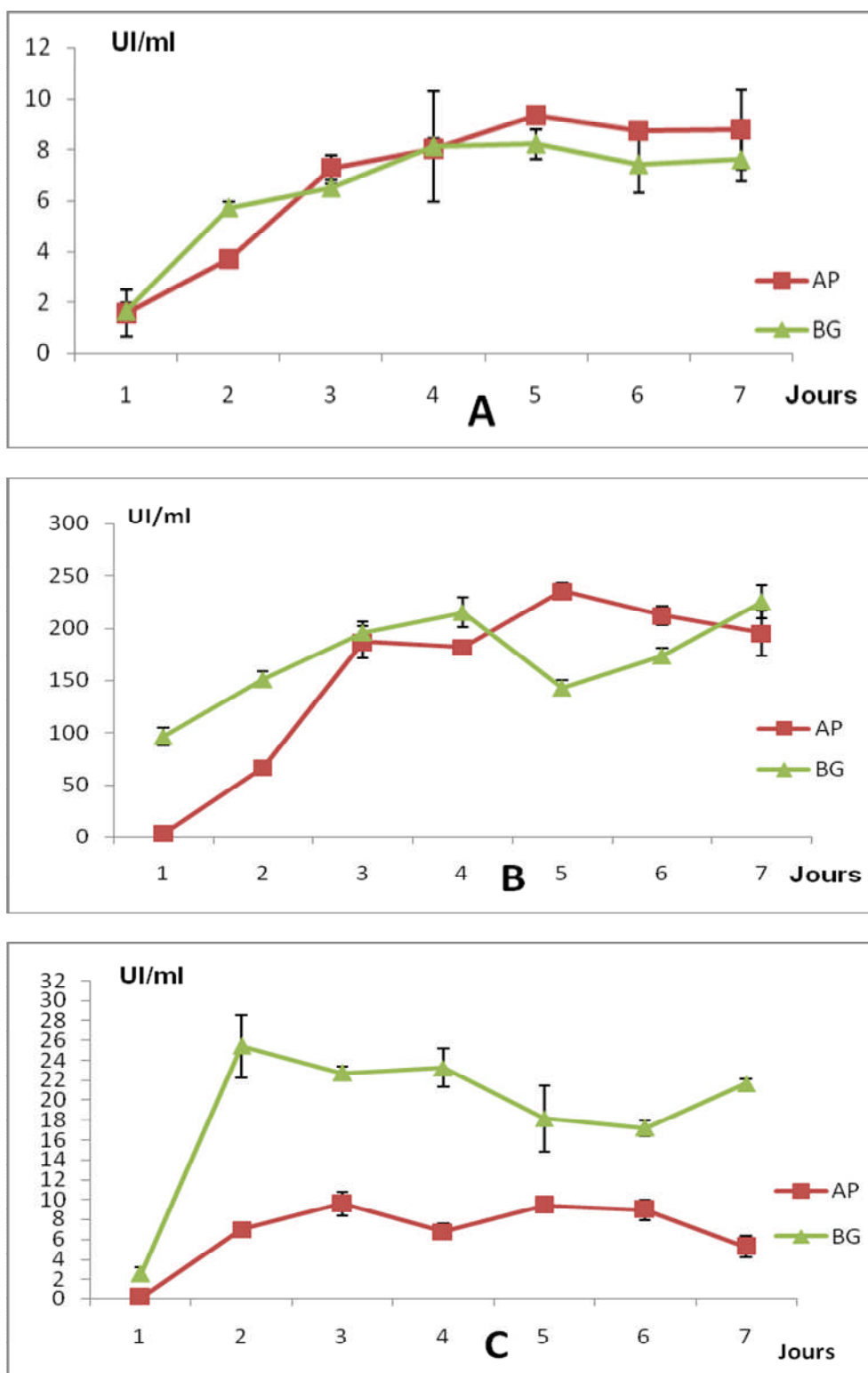
La nature du substrat influence fortement la variation du pH, ceci est dû à l'effet tampon des matériaux lignocellulosiques. La diminution du pH au cours de la culture en milieu solide est compensée par le pouvoir tampon élevé du substrat, il n'est donc pas nécessaire de réguler le pH au cours de ce procédé (**Raimbault, 1998**).

Selon **Roussos et Annibal, (1984)**, l'évolution du pH est en relation avec la croissance du microorganisme et la production des cellulases.

### **5.3. Activités enzymatiques des extraits**

#### **5.3.1. Activités endoglucanases (CMCase)**

Les activités CMCases obtenues avec la paille et le son de blé à différentes humidités sont représentées sur la **figure n° 28**.



**Figure n° 28** : Evolution des activités CMC ases au cours de la fermentation solide  
**(A)** : Paille de blé à 40% d'H, **(B)** : Son de blé à 40% d'H, **(C)** : Paille de blé à 80% d'H.



La production des CMCases apparait à partir du 2<sup>ème</sup> jour de fermentation pour les deux substrats, puis cette synthèse s'accélère. Elle atteint des maximum d'activité de **9,358** et **8,223UI/ml** au 5<sup>ème</sup> jour respectivement chez AP et BG cultivées sur la paille de blé humidifiée 40 %. **Saradouni et al.,(1990)** ont rapporté de valeur 2,6 UI/ml au 7<sup>ème</sup> jour de fermentation d'*Aspergillus fumigatus* en milieu solide à base de paille d'avoine .

**Santos et al., (2011)** décrit également une lente production au début de la fermentation suivie par une accélération pour atteindre l'activité maximale. **Roussos (1998)**, mentionne des activités maximales au 7<sup>ème</sup> jour en FMS sur bagasse de canne à sucre avec une souche de *T. harzianum*. **Bansal et al., (2012)**, rapporte une activité CMCCase de **11,2** UI/g SPS avec une souche d'*Aspergillus niger* cultivée sur paille de blé non traitée et en absence d'une source d'azote exogène.

Dans le cas de la paille de blé humidifié à 80%, Le maximum d'activité CMCCase est atteint au 3<sup>ème</sup> et 2<sup>ème</sup> jour de la fermentation avec respectivement **9,566** et **25,442 UI/ml** pour la souche AP et BG, puis on observe une diminution jusqu'au 7<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> jour respectivement pour AP et BG.

Des cultures de pourritures blanches de *Bjerkandera adusta* et *Pycnoporus sanguineus* sur paille de blé ont montré des activités CMCases de **2.4 et 1.4** IU/mg SPS respectivement au 6<sup>ème</sup> jour et 8<sup>ème</sup> jour (**Quiroz-Castañeda , 2009**).

Pour le son de blé, le maximum d'activité a été enregistré au 5<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour pour atteindre des valeurs de **235, 133 et 225,241UI/ml** pour les souches AP et BG respectivement. Dans la littérature, il est mentionné que le son de blé est la principale source de carbone pour la production de CMCases avec *Aspergillus* et *Trichoderma* (**Bettache, 2013**).

Toutefois, il est difficile de comparer entre les résultats des activités cellulases rapportés par les différents auteurs en absence de conditions standards. En effet la production dépend de plusieurs facteurs, le microorganisme en question, les conditions de culture, les méthodes de dosage, etc...) (**Abo-State et al., 2010**).

Les endoglucanases comme la majorité des enzymes sont inhibées par les produits de leurs actions. **Macarron et al., (1993)** ont trouvé que l'hydrolyse des substrats chromophores n'était pas altérée par la présence de 200 mM de glucose tandis que 50 mM de cellobiose entraîne une diminution de 10 à 50 % de la vitesse d'hydrolyse selon le substrat.

On remarque que les activités enregistrées dans notre étude sont relativement importantes si l'on se réfère aux résultats rapportés par certains auteurs ; ces derniers ont en

effet utilisé des substrats celluloses ayant subi un prétraitement et/ou une supplémentation en sources d'azote qui améliorent la production d'enzymes.

La phase finale étant caractérisée par une diminution de la concentration du produit. En effet, à la différence des cellulases bactériennes qui sont produites de manière constitutive, les cellulases fongiques sont induites en présence de cellulose comme seule source de carbone. Il existe 3 étapes principales dans le mécanisme de régulation des cellulases (Manabu et fusao, 2001).

- L'expression à bas niveau : la cellulose insoluble est incapable de provoquer une induction directe des cellulases, la synthèse de faibles quantités de cellulases libère des oligosaccharides solubles responsables du phénomène d'induction.
- L'Induction translationnelle et sécrétion excessive : une fois les inducteurs internalisés, ils déclenchent une voie de médiation qui active la transcription des gènes cellulases.
- La répression catabolique : la dégradation de la cellulose libère du glucose facilement assimilable par le microorganisme, ce qui provoque une répression de la transcription. l'autre produit majeur de l'hydrolyse de la cellulose, le cellobiose, inhibe fortement la catalyse enzymatique par liaison aux cellulases provoquant un changement de conformation et un encombrement stérique (Zhao et al., 2003).

La diminution de l'activité cellulasiqye au-delà du pic peut être due aussi à l'arrêt de la croissance et de la production en réponse à l'appauvrissement nutritif du milieu de culture (Santos et al., 2011).

Selon Roussos et Raimbault (1982), la diminution de l'activité est due aussi à l'action des protéases libérées à la fin de la culture durant la phase d'autolyse du mycélium entraînant l'hydrolyse et la dénaturation des cellulases

#### 5.3.2. Activités papier filtre (APFase)

Les résultats de la production des activités APFases des deux substrats à différents taux d'humidités sont rapportés dans La figure n° 29. Ils montrent que la synthèse des activités APFase évolue sensiblement de la même façon.

Avec la paille de blé humidifiée à 40%, un maximum d'activité est atteint au 7<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> jour de fermentation respectivement pour les souches AP et BG avec **4,047** et **4,902** UI/ml.

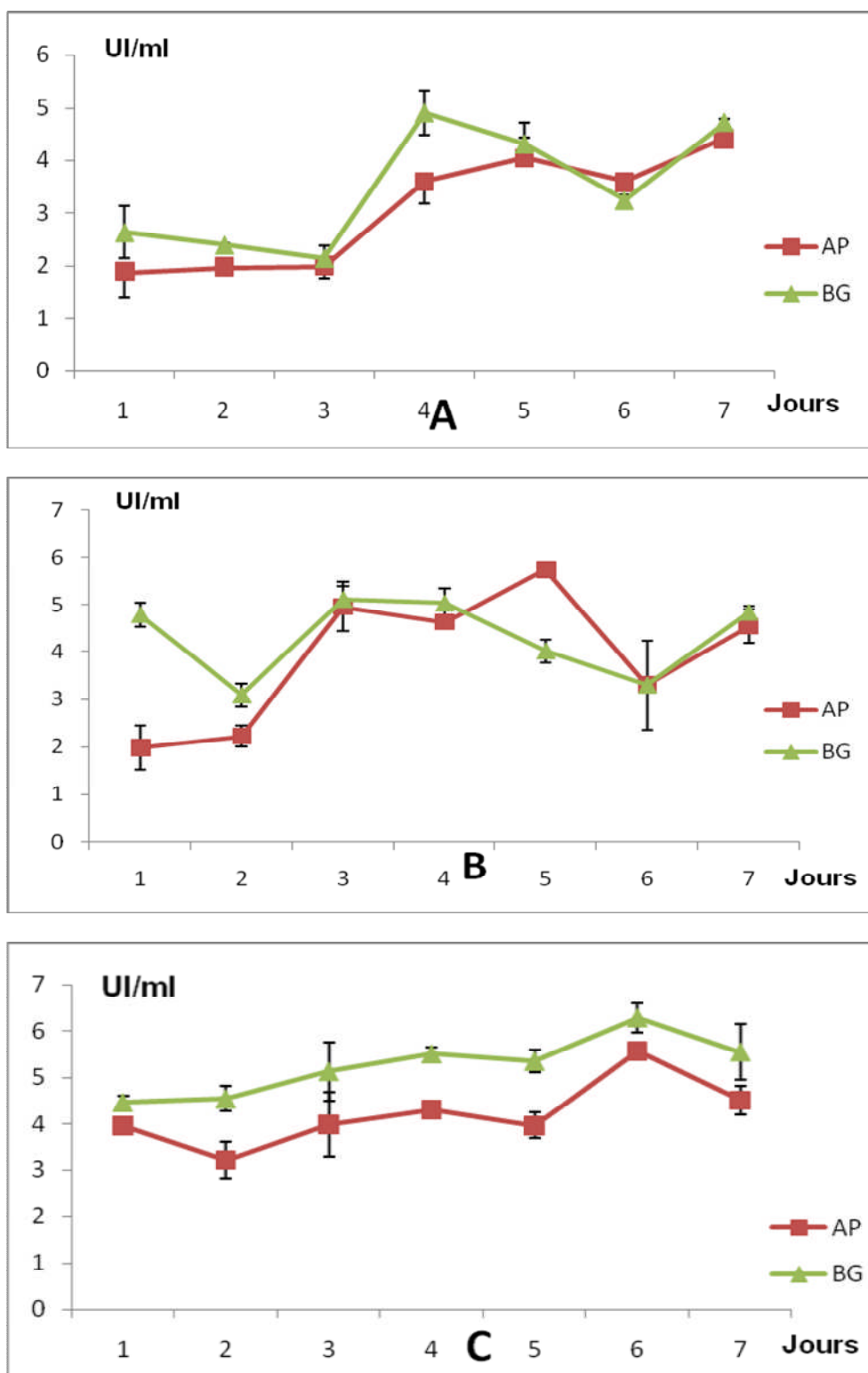


Figure n° 29 : Evolution des activités APFase au cours de la fermentation solide

(A) : Paille de blé à 40% d'H, (B): Son de blé à 40% d'H, (C): Paille de blé à 80% d'H

Une étude de **Santos et al., (2011)** rapporte une activité Pfase maximale de **2.55 UI/g** SPS à 4 jours de croissance avec une souche d'*Aspergillus niger* cultivée sur déchets solides de mangue non traités, humidifiés uniquement avec de l'eau distillée sans rajout de source d'azote. **Roussos, (1998)** a trouvé une activité maximale au 7<sup>ème</sup> jour chez une souche de *T. harzianum* cultivée en FMS sur bagasse de canne à sucre.

Par ailleurs, des activités maximales APFase de **5,559** et **6,275 UI/ml** sont enregistrées au 6<sup>ème</sup> jour de fermentation sur la paille de blé humidifié à 80% pour les souches **AP** et **BG** respectivement. Des travaux de **Kalra (1984)** avec *Trichoderma harzianum* cultivée sur paille de blé indiquent une activité PPhase de 0,26UI/ml. **Madamwar (1992)** rapporte une activité de 6,1UI/ml au 5<sup>ème</sup> jour de fermentation chez *Trichoderma reesei* avec de la bagasse.

Concernant le son de blé, On remarque que le maximum d'activité enzymatique PPhase est atteint au 5<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jour avec les souches **AP** et **BG** respectivement avec **5,744** et **5,109 UI/ml**. **Chandra et al., (2007)** ont rapporté une activité PPhase de **2,9UI/g**, le 3<sup>ème</sup> jour avec *Aspergillus niger* cultivé sur son de blé. Les fibres de fruit de palmier à huile (Oil Palm Empty Fruit Bunch, OPEFB) prétraités ont été également utilisées pour la production de PPhases. Des activités de 0,16 et 0,33 U/ml sont obtenues avec respectivement *T. asperellum* et *A.fumigatus* UPM2 à 5 jours fermentation à 30 ° C et à un pH initial de 5,5 (**Ibrahim et al., 2013**).

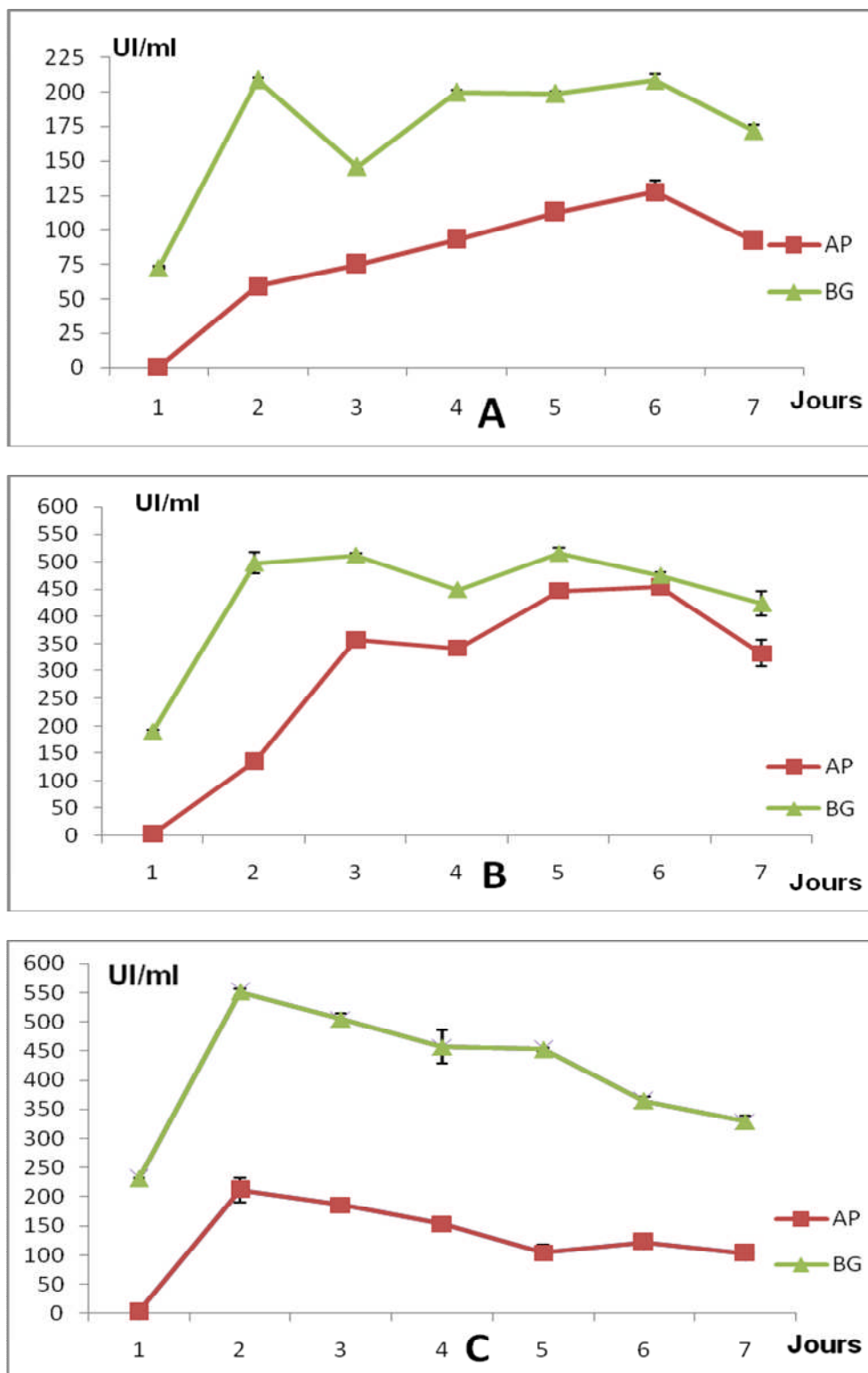
Sur les trois figures A, B et C on observe une diminution de l'activité PPhase suivie d'une augmentation. La diminution de l'activité est due à la répression catabolique causée par le cellobiose (**Zaldívar et al., 2001**). elle pourrait aussi être due à la dénaturation de l'enzyme, résultant de la variation du pH et du métabolisme cellulaire pendant la fermentation (**Liu et Yang, 2007**).

L'APPhase est soumise à l'inhibition par le produit de l'hydrolyse (cellobiose et glucose) et le cellobiose est connu pour son effet inhibiteur supérieur à celui du glucose (**Holtzapple et al., 1990**).

#### 5.3.3. Activité xylanase (endoxylanases)

Les cinétiques de production de xylanases sont illustrées dans la **figure n° 30**.

Avec la souche d'*Aspergillus sp (BG)*, la croissance débute rapidement et atteint le maximum au 2<sup>ème</sup> jour de culture sur les deux substrats. On enregistre des activités maximales respectives de **208,578**, **497,895** et **551,141 UI/ml** pour la paille et le son de blé humidifié à 40% et la paille de blé humidifié à 80%.



**Figure n° 30** : Evolution des activités xylanases au cours de la fermentation solide  
**(A)** : Paille de blé à 40% d'H, **(B)** : Son de blé à 40% d'H, **(C)** : Paille de blé à 80% d'H.

Selon **Ang et al., (2015)**, *Aspergillus fumigatus* SK1 et *Aspergillus niger* sont classés comme des hyperproducteurs de xylanases, ils enregistrent en effet des activités atteignant 600 U/g .

D'autre part, la souche de *Trichoderma sp* (AP) révèle une activité maximale de **454,967 UI/ml** au 6<sup>ème</sup> jour pour le son de blé Humidifié à 40% et de **127,609, 211,509 UI/ml** au 6<sup>ème</sup> et 2<sup>ème</sup> jour pour la paille de blé humidifié à 40% et à 80% respectivement.

Parmi des travaux similaires on note celui de **Shah et Madamwar, (2005)** qui rapporte une activité maximale de 210 UI/ml à 3 jours de fermentation avec une souche d'*Aspergillus foetidus* MTCC4898 cultivée sur du xylane de bouleau. **Gupta et al., 2009**, cité par **Boucherba, (2013)** a enregistré une activité de 78,32 UI/ml à 10 jours de fermentation de la paille de blé avec une souche de *Fusarium solani* F7.

Les travaux de **Farrel et al., (1996)** mentionnent une activité xylanase de **12.20UI/ml** au 5<sup>ème</sup> jour de fermentation avec une souche de *Penicillium idoeckeri* NRRL 1017 cultivée sur du xylane de bouleau. **Okek, (2014)**, rapporte une activité xylanase de 405,648 UI/ml avec souche de *Trichoderma sp.SG2* avec un milieu à 10g de cellulose commerciale. L'activité d'endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase fongique est la plus importante dans la dégradation des hémicelluloses en libérant du xylose et des oligomères ( **Da Vinha et al., 2011**).

## **6. Effet du pH et de la température sur les activités cellulases et xylanases d'*Aspergillus sp* (BG)**

Les résultats qui précédent ont révélé de meilleures activités endoglucanases et xylanases avec la souche *Aspergillus sp* (BG) après 2 jours d'incubation sur la paille et le son de blé. Les extraits enzymatiques de cette souche ont fait l'objet d'une étude de l'effet du pH et de la température.

### **6.1. Effet du pH**

Les endoglucanases, papier filtre et xylanases révèlent une activité sur une large gamme de pH (3.0 - 9.0). Les profils de stabilité de ces enzymes sont déterminés par mesure de l'activité résiduelle. La figure n° 31 montre les effets du pH sur l'activité de ces enzymes. L'activité endoglucanase est maximale à pH 3.0, L'activité APFase est stable sur une large gamme de pH allant de 3.0 jusqu'à 9.0, On observe un pH optimum de 4.0 et une activité relative de 79.28% à pH 9,0, Beaucoup de travaux sur l'effet du pH sont rapportés par certains auteurs ; **Dar et al., (2013)**, ont montré que 75% de l'activité CMCase est stable entre pH 4.0-7.0 avec une activité maximale à pH 5.6 et des résultats similaires sont rapportés par **Tao et al., (2010)**.

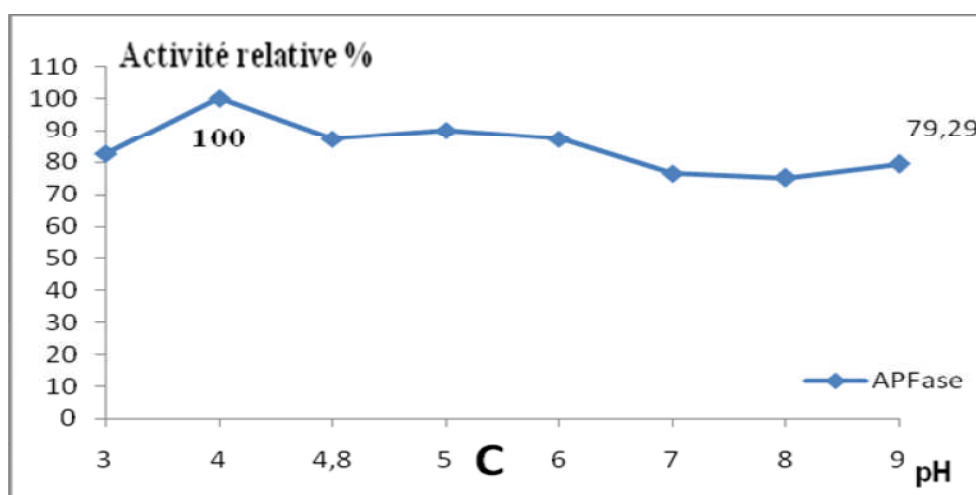
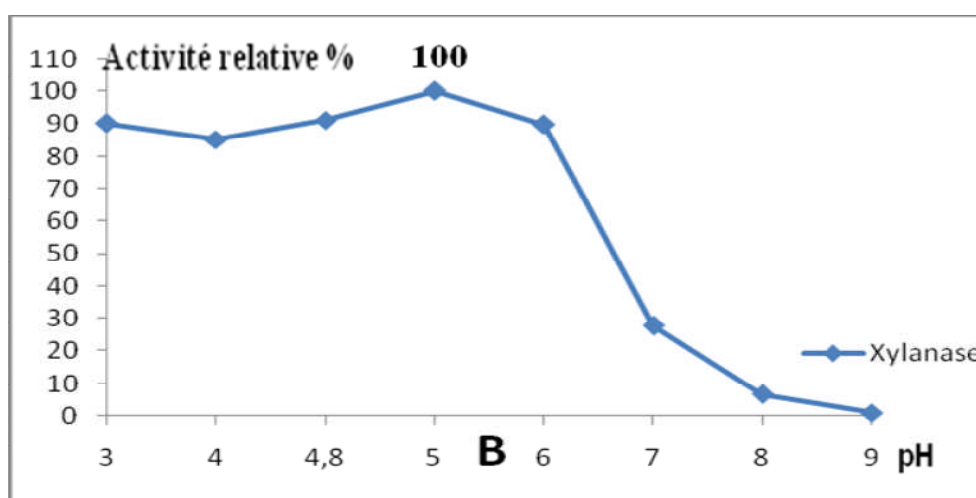
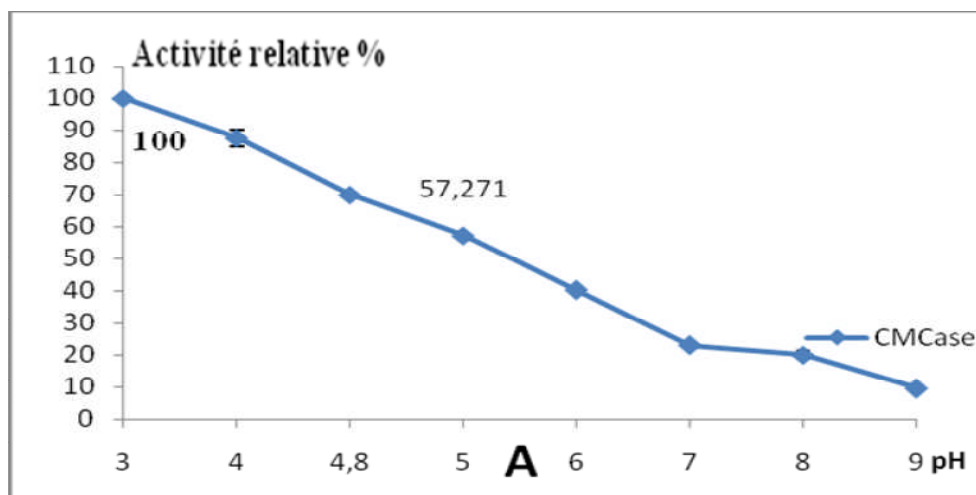


Figure n° 31 : Effet du pH sur l'activité Endoglucanase (A), Xylanase (B) et Papier filtre (C)

Les endoglucanases d'*Aspergillus niger* et *Trichoderma viride* décrites par **Hurst et al., (1977)** ; **Li et al., (2009)** sont actives à pH 4.0 et 5,0 respectivement. **Roza et Ur-Rehmane, (2008)**, décrivent une souche de *Chaetomium thermophile* avec des activités CMCCase maximales à 6 et 7.5. Ces résultats diffèrent avec ceux de **Domingues et al., (2000)**, qui obtient des activités cellulases maximales avec des pH variant de 4.8 à 6 sur des souches fongiques.

Cependant, la plupart des préparations cellulolytiques étudiées, présentent des pH optimum variant entre 3 et 7 (**Lynd et al., 2002**). Par ailleurs, la nature du substrat cellulosique intervenant dans la réaction modifie significativement la valeur du pH optimum de la cellulase. En effet l'utilisation de la cellulose cristalline révèle un pH de 5 pour la cellulase produite par *Trichoderma reesei* et un pH de 4 pour la cellulase produite par la même souche avec de la CMC (cellulose amorphe) . Ceci signifie une différence entre les systèmes cellulases mis en jeu dans les deux cas (**Sandgren, 2004**).

Les travaux rapportés à ce sujet montrent différents profils de pH ; **Da Vinha et al., ( 2011)** , montrent des activités CMCCase maintenue à 60% entre pH 3.0 et 8.0, avec un optimum à pH 5.0. Il y a très peu de rapports dans la littérature décrivant des activités CMCCase sur une large gamme de pH. C'est une caractéristique particulière et intéressante vu que la plupart des rapports citent des activités CMCases dans la gamme alcaline.

Concernant l'activité xylanase est importante entre pH 3.0 et 6.0, avec un optimum à pH 5.0. L'étude de **Boucherba, (2011)**, mentionne une activité xylanolytique importante entre pH 6,0 et 9,0 avec un optimum à pH 7 avec une souche de *Jonesia denitrificans*. Ces résultats sont similaires avec ceux de **Bataillon et al., (2000)** sur des xylanases produites par la souche de *Bacillus sp.* SPS-0. Par ailleurs, un pH optimum de 6,0 et une activité détectée entre pH 4,5 et 8,0 ont été signalé par **Nascimento et al., (2002)**, avec une souche de *Streptomyces sp.* AMT-13.

## 6.2. Effet de la température

La figure n°32 rapporte l'influence de la température sur les enzymes CMCases, APFases et xylanases de la souche d'*Aspergillus sp.* Les températures utilisées dans le milieu réactionnel varient de 28 à 90 C°.



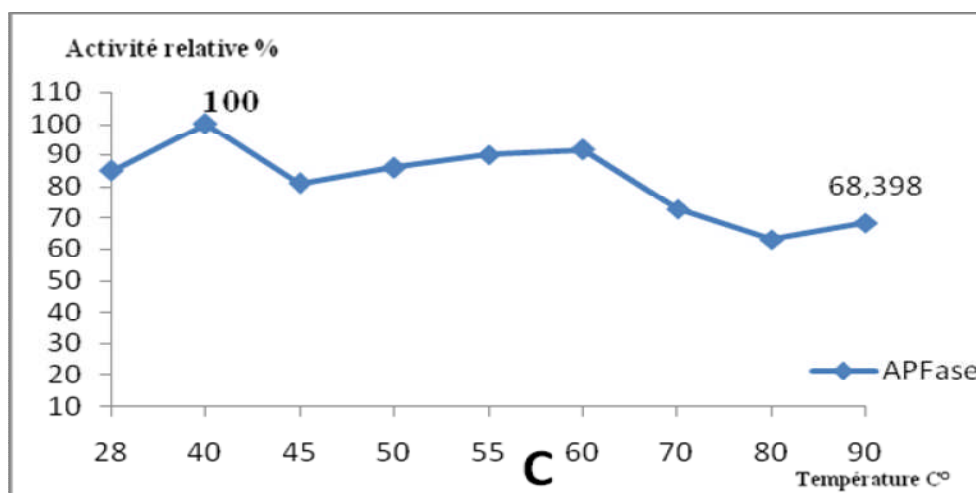
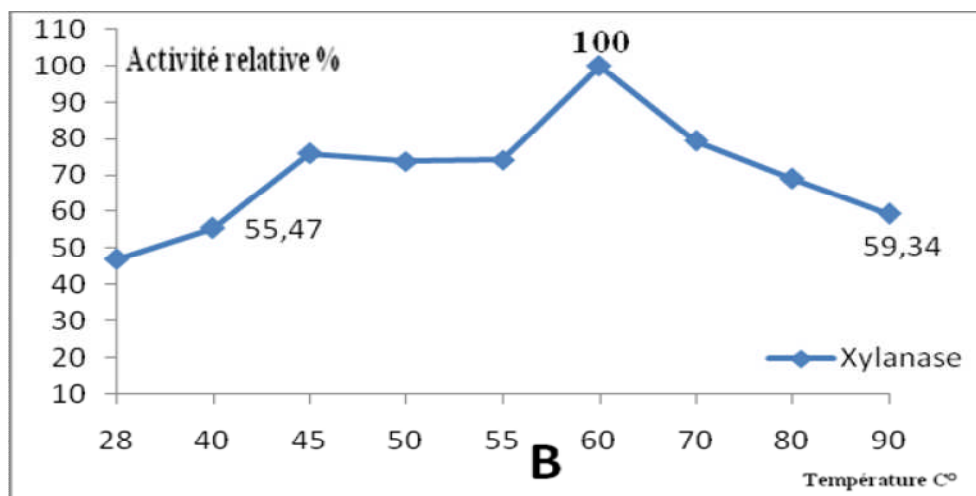
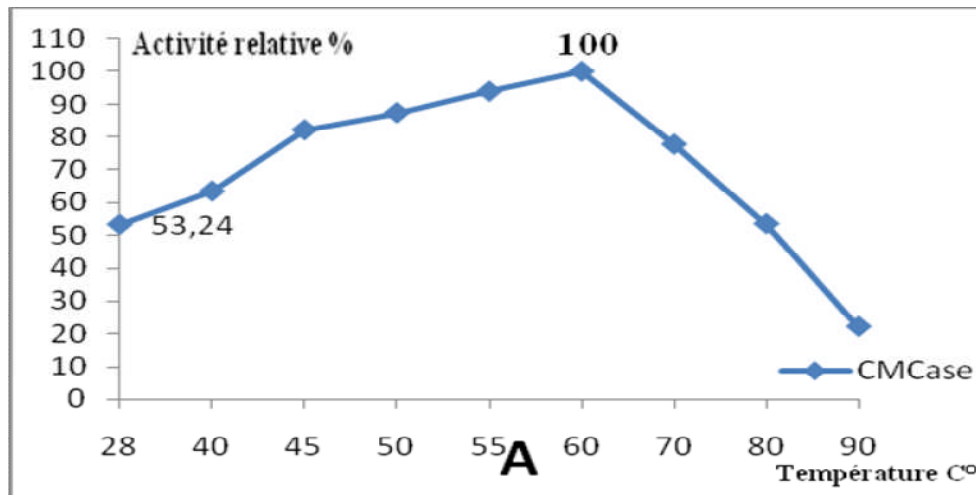


Figure n° 32 : Effets de la température sur l'activité Endoglucanase (A), Xylanase (B) et Papier filtre (C)

La température optimale des activités relatives d'endoglucanase et Xylanase est de 60°C, des activités relatives supérieures à 50% sont observées entre 28 et 80°C pour la CMCases et 40 à 90° C pour xylanase.

L'activité papier filtre est optimale à 40 °C, elle est stable sur une large gamme de température de 28C°à 90C° avec une activité relative supérieure 60%.

**Tao et al., (2010)**, ont classé les enzymes selon leur température optimale ,elles peuvent être mésophile de 40 à 60 C°, thermophile de 50 à 80C° et hyperthermophile >80C. Pour les mycètes, les températures optimales des CMCases varient habituellement entre 50 et 60C°.

D'autres recherches révèlent que la température varie en fonction de l'origine de l'enzyme et de la nature du substrat mis en jeu. En effet, la température optimale des cellulases fongiques varie entre 40 et 70 °C, alors que celle des bactéries varie entre 50 et 100°C (**Ando et al., 2002**). L'étude de **Sandgren, (2004)** a révélé des températures optimales de 58 et 54°C pour les cellulases produites par *Trichoderma koningii* et *Trichoderma Reesei* respectivement, alors que celles décrites par **Ortega et al., (2001)** avec *Trichoderma Reesei*. se situent entre 40 et 50°C.

Concernant les bactéries, **Bakare, (2005)**, décrit des cellulases de *Sinorhisobium fredii* et *Pseudomonas fluorescence* avec une température optimale de 35°C. Pour les cellulases produites par des actinomycètes, on note celles rapportées par **Da Vinha et al., (2011)**, qui décrit des activités CMCases stables entre 40° et 60°C avec une souche de *Streptomyces malaysiensis* et celle de **Boucherba, (2011)** avec une température optimale de 50 C° avec des xylanases produites par *Jonesia denitrificans*

#### 6.3. Thermostabilité en absence du substrat

La figure n°33, montre la thermostabilité de l'extrait enzymatique brute incubé à des températures de 50, 60 et 70C° pendant 07 heures.

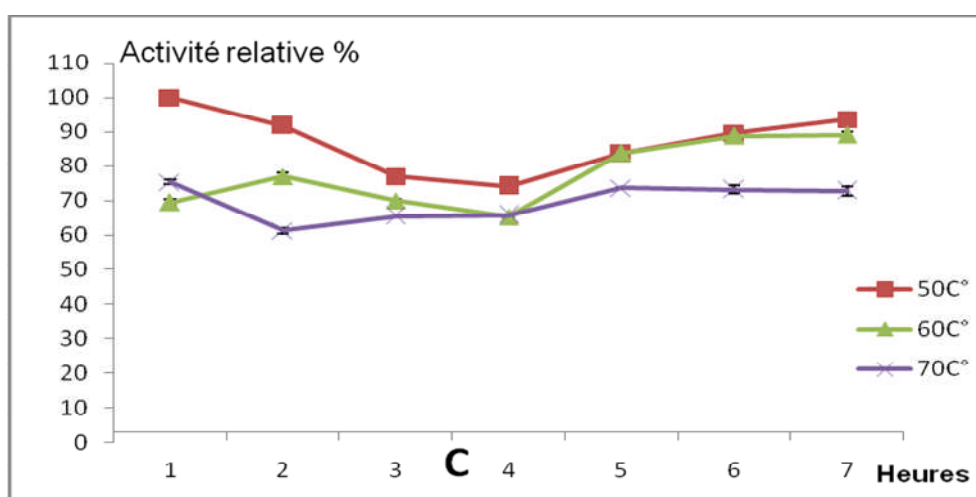
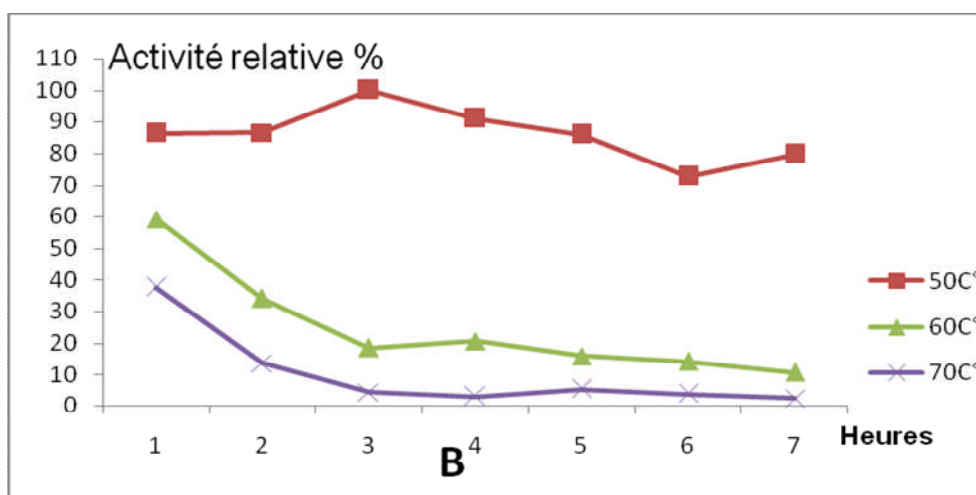
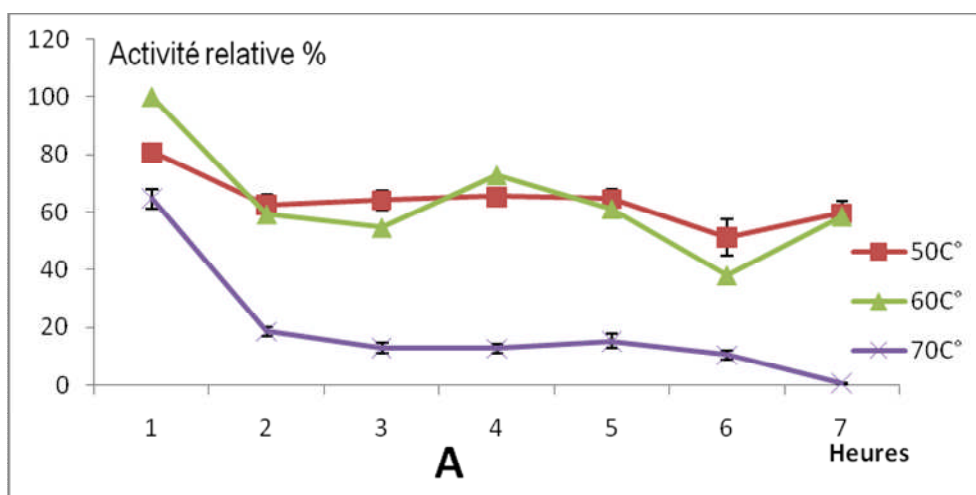


Figure n° 33 : Thermostabilité de l'extrait enzymatique en absence du substrat.

(A): Endoglucanase, (B): Xylanase, (C): Papier filtre.

A 50°C, l'activité est très stable, il n'y pas de diminution significative de l'activité relative des enzymes pendant 7 heures. Toutes les activités relatives sont supérieures à 50%. Après 7 heures d'incubation, les activités relatives sont de 70%, 79,74% et 93.65% pour la CMCase, xylanase et APFase respectivement.

À 60°C, les activités CMCases et APFases sont stables durant 7 heures et les activités relatives mesurées sont respectivement de 58.52 et 89.19% ; par contre l'activité xylanase présente une stabilité après une heure seulement, l'activité relative est de 10,60% après 7 heures d'incubation.

A 70 C°, L'enzyme APFase est stable, avec une activité relative de 72.76% après 7 heures. Les endoglucanases et xylanases ne sont pas stables à 70°C, des activités relatives de 10.44 et 3,56% seulement sont observées après 6 heures d'incubation.

La stabilité thermique de nos cellulases se révèle largement supérieure à celles rapportées par plusieurs auteurs avec d'autres souches fongiques. On signale celle rapporté par **Leghlimi, (2004)** qui révèle une activité de 50% conservée pendant 10 minutes à 90 °C pour la souche d'*Aspergillus niger* ATTC 1644004 ou encore une activité de 41.2 % conservée 5 minutes pour la souche *Aspergillus niger* (**Coral et al., 2002**).

Concernant les enzymes bactériennes, des études rapportent des thermostabilités variables mais en général les cellulases bactériennes sont plus thermorésistantes que les cellulases fongiques (**Ando et al., 2002**). Ces auteurs décrivent une cellulase hyperthermostable produite par une Archea *Pyrococcus horikoshii* qui conserve 80% de son activité après 3 heures d'incubation à 97°C. Il est de même pour la cellulase de *Thermotoga neapolitana* qui garde 73% de son activité à 100°C pendant 4 heures (**Bok et al., 1998**), et une cellulase animale de la Moule bleue *Mytilus edulis* qui résiste à 100°C pendant 10 minutes (**Xu et al., 2000**).

Cette thermostabilité s'explique très probablement par l'emplacement géothermique du site d'isolement de la souche. Ce milieu extrême favorise le développement d'un système enzymatique résistant par un renforcement des liens peptidiques en structures secondaires ou tertiaire avec des résidus aromatiques (**Sandgren, 2004**).

Les actinomycètes également sont des producteurs avérés de xylanases thermostables, La xylanase décrite par **Boucherba, (2011)** produite par une souche *Jonesia denitrificans* présente un temps de demi-vie de 7 heures à 50 °C. Elle s'est avérée plus thermostable que les xylanases de *Streptomyces sp. QG113* avec un temps de demi-vie de 1 heure à 50 °C. Cependant, des xylanases de souches de streptomyces décrites présentent des temps de demi-vie très variables aux différentes températures (**Boucherba, 2011**).

La thermostabilité des enzymes s'explique également par la présence de liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes, interactions ioniques, liaisons avec métaux et ponts dissulfures déterminées par des séquences particulières en acides aminés situés à des endroits stratégiques pour permettre aux enzymes de résister à la dénaturation thermique (**Scriban, 1999**). Par ailleurs, il a été démontré que la richesse en résidus cystéines et en glucides (glycosylation excessive) confère à la molécule enzymatique une grande intégrité structurale (**Vielle et Zeikus, 2001**) et une résistance aux températures élevées (**Xu et al., 2000**).

**Conclusion**

L'objectif de ces travaux de recherche était de développer des biocatalyseurs lignocellulolytiques naturels par fermentation fongique sur substrats solides et liquides. A cet effet, La paille et le son de blé traditionnellement utilisés en alimentation animale peuvent être transformés en sucres fermentescibles et servir de substrats pour la production de ces enzymes.

Cette étude et les résultats obtenus s'intègrent dans cette problématique ou une 1<sup>er</sup> partie expérimentale a été consacrée à l'isolement et au criblage de souches fongiques lignocellulolytiques performantes à partir de milieux naturels en Algérie.

Un milieu sélectif a été utilisé pour isoler 66 souches de moisissures lignocellulolytique suivi d'un criblage qui a permis de sélectionner 04 souches qui présentent des activités cellulases et xylanases appréciables sur milieu liquide.

Des examens macroscopiques et microscopiques approfondis sont effectués sur les 04 souches, elles sont réparties en 3 genres différents: *Trichoderma*(AP), *Aspergillus* (BG) et *Penicillium* (AM et BD)

Des fermentations submergées ont été effectuées avec les 04 souches sélectionnées, en utilisant le grignon d'olive, la paille et le son de blé comme seule source de carbone; le but est de sélectionner d'une part les souches à potentiel enzymatique élevé et d'autre part de déterminer le meilleur substrat de production de cellulases et de xylanases.

L'étape précédente, nous a permis de sélectionner 02 souches *Aspergillus sp* (BG) et *Trichoderma sp* (AP), qui révèlent de meilleurs activités endoglucanases papier filtre et de xylanases par fermentation à base de paille et de son de blé. Ces souches ont fait l'objet par la suite de fermentation solide avec ces déchets.

Les résultats de la FMS sur les deux substrats montrent que la souche *Aspergillus sp* (BG) présente une meilleure production d'endoglucanases (**225,241UI/ml**), AFPases (**6,275 UI/ml**) et de xylanases (**551,141 UI/ml**) au bout de 02 jours de fermentation avec de la paille et du son de blé par rapport à la souche *Trichoderma sp* (AP).

Une caractérisation physicochimique partielle est réalisée sur les cellulases et les xylanases dans le surnageant brut au 2<sup>ème</sup> jour de fermentation de la souche BG. L'étude de l'effet du pH montre que les endoglucanases, xylanases et papier filtre sont stables entre pH 3.0 à 5,0, pH 3.0 à 6.0 et pH 3.0 à 9.0 respectivement. La température optimale des activités relatives est de 60°C pour l'endoglucanase et la xylanase et de 40 °C pour le papier filtre . Concernant la thermostabilité, toutes les activités enzymatiques dosées sont stables durant 7 heures aux températures de 50 et 60°C à l'exception du xylanases qui présente une stabilité de

une heure seulement à 60°C, L'APFase demeurent stables après 7 heures à 70 °C par contre les cellulases redeviennent sensibles à cette température.

Les propriétés de thermostabilité et d'activités à pH acide sont recherchées par les industriels. La thermostabilité est en effet un des critères de sélection des enzymes destinées à la biotechnologie. Ces enzymes peuvent remplacer des catalyseurs chimiques dans différents domaines industriels, pharmaceutiques, chimiques, textiles, agroalimentaires et papeteries utilisant des températures dépassant les 60°C.

Enfin, ces résultats ouvrent d'autres perspectives qui consistent à :

- Optimiser le milieu de production : taux d'inoculation, humidité, pH initiaux et températures d'incubation, pour un meilleur rendement de production.
- Réaliser des prétraitements de substrats pour déstructurer le complexe Ligno-cellolytique.
- Rechercher d'autres activités enzymatiques du complexe lignocellulosique (ligninases).
- Réaliser des cultures mixtes de *Trichoderma sp.* avec *Aspergillus sp* productrice de  $\beta$ -glucosidase pour un système enzymatique complet
- Immobiliser les enzymes pour augmenter leur stabilité thermique.
- Purifier et caractériser les enzymes destinées notamment à un usage alimentaire ou pharmaceutique.



**Références**

**bibliographiques**

**A**

**-Abo-State. M.A.M., Hammad. A.I., Swelim. M., Gannam. R.B. (2010).** Enhanced production of cellulase by *Aspergillus spp.* isolated from agriculture wastes by solid state fermentation. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* **8**(4). 402-410.

**-Abu bakar. N.K., Abd-Aziz. S., Hassan. M.A., Ghazali. F.M.(2010).** Isolation and selection of appropriate cellulolytic mixed microbial cultures for cellulases production from oil palm empty fruit bunch. *Biotechnology.* **9**(1). 73-78.

**-Alarcón-Gutiérrez. E.(2007).**Influence de facteurs abiotiques sur la régulation des paramètres microbiens impliqués dans la dégradation de la matière organique d'une litière forestière méditerranéenne. Thèse de Doctorat .université Paul Cézanne. Aix-marseille III. France. 241.

**-Aleksandra. M., Karlheinz. F., Georg. S., Karl. G., Christoph. R., Andrea. C., Anton. G. (2013).**Thermostability improvement of endoglucanase Cel7B from *Hypocrea pseudo koningii*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* **103**.16-23.

**-Almeida. M.N., Falkoski. D.L., Guimarães .V.M., Ramos. H.J, Visser. E.M., Maitan-Alfenas. G.P., De Rezende. S.T.(2013).**Characteristics of free endoglucanase and glycosidases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. *Bioresource Technology.* **143**. 413-422.

**-Ando. S., Ishia. H., Kosugi. Y., Ishikawa. K.(2002).** Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Appl. Environn. Microbiol.* **68**(1). 430–433.

**-Andrianova .T.V, Aproot .A, Benny. G.L, Berndt. R, Kuyper .T.W, Pando .F, Roberts. P.J., Vanky. K.(2008).**Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. Edition: CAB international. *Wallingford. UK.* 29-36.

**-Ang .S.K., Suraini. A.Y., Madihah. A.A., Madihah. M.S.(2015).**Isolation, Screening and Identification of Potential Cellulolytic and Xylanolytic Producers for Biodegradation of Untreated Oil Palm Trunk and Its Application in Saccharification of Lemongrass Leaves. *Preparative Biochemistry & Biotechnology.* **45**. 279–305.

-**Arnubio.V., Analiza. P.A., Blair. D.(2013).**Molecular cloning and functional characterization of an endogenous endoglucanase belonging to GHF45 from the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Gene*. 513. 260–267.

-**Assamoi. A.A., Destain. J., Thonart. P.(2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* .13(2). 281-294.

-**Attyia .S.H., Ashour. S.M.(2002).**Biodegradation of agro-industrial orange waste under solid state fermentation and natural environmental conditions. *Egyptian Journal of Biology*.4.23-30.

## **B**

-**Bakare. M.K., Adewale. I.O., Ajayi. A., Shonukan. O.O. (2005).** Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Afri. J. Biotechnol.*4. 898–904.

-**Balan.V., Jin. M., Culbertson. A., Uppugundla. N.(2013).**The Saccharification Step: *Trichoderma Reesei* Cellulase Hyper Producer Strains. **In; Faraco.V.** Lignocellulose Conversion Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production. Ed; Springer. New York. U.S.A. 65-92.

-**Balat. M. (2011).** Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energ. Conver. Manag.* 52. 858–875.

-**Bano. S., Qader. S.A.U, Aman. A., Syed. M.N., Durrani. K. (2013).** High production of cellulose degrading endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase using bagasse as a substrate from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Carbohydr. Polym.* 91.300–304.

-**Bansal. N., Tewari. R., Soni. R., Soni. K.S.(2012).** Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management.* 32.1341–1346.

-**Bauchop. T.(1979).**Rumen Anaerobic Fungi of Cattle and Sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 38(1).148-158.

-**Bettache. A.(2013).** Isolement et sélection d'actinomycètes producteurs d'enzymes cellulolytiques. Thèse de doctorat. Université A.MIRA-BEJAIA. Algérie .191.

- Bisaria. V.S., Ghose.T. (1981).** Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Techno.*3. 90-104.
- Boisset. C., Frascini. C., Schulein. M., Henrissat .B., Chanzy. H.(2000).** Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbio.* 66 . 1444-1452.
- Bok. J.D., Yrnool. D.A., Eveleigh. D.E.(1998).** Purification, characterisation and molecular analysis of thermostable cellulases Cel A and Cel B from *Thermotoga neapolitana*. *Applied and Environmental Microbiology.* 64 (12). 4774-4781.
- Botton. B., Breton. A., Fevre. M., Gauthier. S., Guy. P.H., Larpent. J.P., Reymond. P., Sanglier. J.J., Vayssier. Y., Veau. P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. 34-428.
- Boucherba. N. (2011).** Production, purification et caractérisation d'une endoxylanase produite par une souche de *Jonesia denitrificans*.Thèse de doctorat. Université A.MIRA BEJAIA. Algérie .181.
- Boussarsar. H.(2008).**Application de traitements thermiques et enzymatiques de solubilisation et saccharification de la fraction hémicellulosique en vue de la valorisation de la bagasse de canne à sucre. Thèse de doctorat. Université de Reims champagne-ardenne.France.191.
- Braaksma. M., Van Den Berg. R.A., Van Der Werf. M.J., Punt. P.J.(2010).** A Top Down Systems Biology Approach for the Identification of Targets for Fungal Strain and Process Development. **In; Borkovich. k.a., Ebbole. d.j.** Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fung. Ed; ASM Press. Washington. U.S.A. 25-35.
- Breton. A. (1990).** Principes et méthodes d'étude des moisissures, In: Botton B. et *al.*, Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2ème édition Masson. Collection Biotechnologies. Paris. 11-32.
- Brown. M.R.J. (2004).** Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21<sup>st</sup> Century. *J. Polym. Sci.* 42. 487-495.

## C

- Chávez-Montes. R.A. (2010).** Caractérisation de mutants et transformants d' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse III-Paul Sabatier. France. 135.
- Chen .H., Hayn. M., Esterbauer. H.(1992).**Purification and characterization of two extracellular betaglucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochem. Biophys.Acta*.1121.54-60.
- Chen. H. (2013).** Modern Solid State Fermentation Theory and Practice. *Springer Dordrecht Heidelberg*. New York. 332.
- Chianga .C.J., Chenb. P.T., Yehc. C.Y., Chaoc.Y.P.(2013).**Statistical optimization of one step immobilization process for recombinant endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *Process Biochemistry*. 48.1886-1892.
- Cho .K.K., Kim .S., Woo. J.H., Bok .J.D., Choi. Y.J.( 2000).**Molecular cloning and expression of a novel family A endoglucanase gene from *Fibrobacter succinogenes* S 85 in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 27. 475–481.
- Coral. G., Arikan. B., Unaldi. M.N., Guvenmenz. H. (2002).** Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 Wild-type strain. *Turk.J. Biol.* 26.209-213.

## D

- Dar. R.A., Saba. I., Shahnawaz. M., Sangale. M.K., Ade.A.B., Rather. S.A., Qazi. P.H. (2013).**Isolation, purification and characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from endophytic *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin. *Advances in Enzyme Research*. 1(4). 91-96.
- Dashtban .M., Schraft. H., Qin. W.(2009).** Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*. 5(6).578-595.
- Davies. G., Henrissat. B.(1995).**Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3 (9). 853-859.

**-Da-Vinha. F.N.M., Gravina-Oliveira. M.P., Franco. M.N., Macrae .A., Da-Silva-Bon. E.P., Nascimento. R.P., Coelho. R.(2011).** Cellulase Production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 Using Lignocellulosic Biomass as Inducer Substrate. *Appl Biochem Biotechnol.*164. 256–267.

**-Didderen. I., Destain. J., Thonart. P.(2008).** Le bioéthanol de seconde génération: la production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Les presses agronomiques de Gembloux.*20.

**-Domingues. F.C., Queiroz. J.A., Warren. A., Kilburn. D.(2000).** Non hydrolytic distribution of cellulose fibers by binding domain of a bacterial cellulase. *Bio&Technology.* 9. 1096-1099.

**-Duchiron. F., copinet. E. (2011).** Fermentation en milieu solide. Document (Doc. BIO 620) université de Reims.1-16.

**-Durand. A. (1998).** La fermentation en milieu solide. *Biofutur.* 181. 41-43.

## **E**

**-El-Said .A.H.M., Saleem. A., Maghraby .T.A., Hussein .M.A.(2014).** Cellulase activity of some phytopathogenic fungi isolated from diseased leaves of broad bean. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection.* 47 (17). 2078-2094.

**-Elvan. H., Ertunga. N.S., Yildirim. M., Colak. A.(2010).** Partial purification and characterisation of endoglucanase from an edible mushroom, *Lepista flaccida*. *Food Chemistry.* 123.291–295.

## **F**

**-Farinasa. C.S., Vitcosquea. G.L., Fonseca. R.F., Neto. V.B., Couri. S.(2011).** Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. *Industrial Crops and Products.* 34. 1111-1186.

## **G**

**-Gaikwad. A., Chakraborty. S.(2013).** Mixing Effects on the Kinetics of Enzymatic Hydrolysis of Avicel for Batch Production of Cellulosic Ethanol. *American Chemical Society Ind. Eng. Chem. Res.* 52. 3988–3999.

-**Garg. N., Garg. K.L., Mukerji. K.G.(2010)**. Microscopic examination of yeast and moulds, In: Laboratory manual of food microbiology. *I. K. International Publishing house pvt.* New Delhi. India. 104-106.

-**Gassara. F., Brar. S.K., Tyagi. R.D., Verma. M., Surampalli. R.Y.(2010)**. Screening of agroindustrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*. 49.388–394.

-**Ghose.T.K.(1987)**.Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem*. 59(2). 257–268.

-**Goldbeck. R., Ramos. M.M., Pereira. G.A.G., Maugeri-Filho. F.(2013)**. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. *Bioresource. Technol.***128**. 797–803.

-**Gupta. V.K., Gaur. R., Gautam. N., Kumar. P., Yadav. I.J., Darmwal. N.S.(2009)**. Optimization of xylanase production from *Fusarium solani* F7. *J. Food Technol World*. 4(1).20-29.

## **H**

-**Hankin. L., Anagnostakis. S. L. (1977)**. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of micro organisms. *Journal of General Microbiology*. 98(1).109–115.

-**Hart. T.D., De-Leij. F.A.A.M., Kinsey. G., Kelley. J., Lynch. J.M.(2002)**. Strategies for the isolation of cellulolytic fungi for composting of wheat straw. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 18. 471–480.

-**Henrissat. B., Teeri. T.T., Warren. R.A.J. (1998)**.A scheme for designating enzymes that hydrolyze the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett*. 425. 352-354.

-**Herculano. P.N., Lim. D.M.M., Fernandes. M.J.S., Neves. R.P., Souza-Motta. C.M. (2011)**. Isolation of Cellulolytic Fungi from Waste of Castor (*Ricinus communis*). *Curr Microbiol*. 62. 1416–1422.

-**Hofrichter.M.(2002)**.Lignin conversion by manganese peroxidase. *Enzy. Microbiol. Techno*. 4 (30). 454-466.

**-Holker. U.L.J.(2005).** Solid-state fermentation are there any biotechnological advantages?. *Current Opinion in Microbiology.* 8(3). 301-306.

**-Holtzapple. M., Cognata. M., Shu. Y., Hendrickson. C. (1990).** Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **36.** 275-287.

**-Holtzapple.M., Cognata. M., Shu. Y., Hendrickson. C.(1990).** Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 36. 275-287.

**-Howard. R.L., Abotsi. E., Jansen-van-Rensburg. E.L., Howard. S.(2003).** Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology.* 2(12). 602-619.

**-Hyde. K.D., Jones.E.B.G., Leano.E., Pointing. S., Poonith.A.D.,Vridjmoed .LL.P.(1998).** Role of fungi in marine ecosystems. *Biodiversity and conservation.* **7.** 1147-1161.

## **I**

**-Ibrahim. M.F., Razak. M.N.A., Phang. L.Y., Hassan. M. A., Abd-Aziz. S.(2013).** Crude Cellulase from Oil Palm Empty Fruit Bunch by *Trichoderma asperellum* UPM1 and *Aspergillus fumigatus* UPM2 for Fermentable Sugars Production. *Appl Biochem Biotechnol.*16.

**-Inoue. H., Decker.S.R.,Taylor.L.E.,Yano.S.,Sawayama. S.(2014).**Identification And Characterization Of Core Cellulolytic Enzymes From *Talaromyces Cellulolyticus* (Formerly *Acremonium Cellulolyticus* )Critical For Hydrolysis Of Lignocellulosic Biomass. *Biotechnology For Biofuels.*7.151.

**-Ivanen. D.R., Rongjina.NL., Shishlyannikov. S.M., Litviakova. G.I., Isaeva-Ivanova. L.S., Shabalin. K.A., Kulminskaya. A.A.(2009).** Novel precipitated fluorescent substrates for the screening of cellulolytic microorganisms. *Journal of Microbiological Methods.*76.295–300.

## **J**

**-Jacquinot. B., Raymond. B., Frontere. L.(1989).** Procédé Bertin d'hydrolyse acide des matériaux lignocellulosiques. *Biomass. Energy. Industry. 5th E.C Conference.*282–288.



## **K**

- Karlsson. J., Siika-aho. M., Tenkanen .M., Tjerneld .F.(2002).**Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.*99.63-78.
- Karnchanatat. A., Petsom.A., Sangvanich. P., Piapukiew. J., Whalley. J.S., Reynolds. C.D., Gadd. G.M., Sihanonth. P.(2008).**A novel thermostable endoglucanase from the wood decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *Enzyme and Microbial Technology.* 42 .404-413.
- Kasana. R.C., Salwan. R., Dhar. H., Dutt. S., Gulati. A.(2008).** A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Curr Microbiol.* 57. 503–507.
- khushal. b.(2003).**Solid state fermentation of soybean hulls for cellulolytic enzymes production: physico-chemical characteristics, and bioreactor design and modeling. Thèse de doctorat. University delhi. Inde. 185.
- Kim. D.W., Jang. Y.H., Jeong. Y.K.(1998).** Adsorption kinetics and behaviour of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27:97–102.
- Kobakhidze. A., Elisashvili. V., Irbe. I., Tsiklauri. N., Andersone. I., Andersons. B., Isikhuemhen. O.S. (2012).** Lignocellulolytic Enzyme Activity of New Corticoid and Poroid Basidiomycetes Isolated from Latvian Cultural Monuments. *Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology.* 1(1). 16–21.
- Kögel-Knabner. I.(2002).** The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry.* 34. 139-162.
- Krishna. C.(2005).** Solid-State Fermentation System-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology* .25(2). 1-30.
- Kubicek .C.P, and Penttila. M. E. (1998).** Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*, In: **Harman. G. E., Kubicek C.P.** Edition 2.*Taylor & Francis Ltd.* London. United Kingdom. 49-72.

## L

- Lachapelle. J. (2004).**Microscopie, méthodes d'examen, colorations .*Revue du Cercle de Mycologie de Bruxelles* .4. 35 – 71.
- Lakhtar .H.(2009).**Culture du *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide : Transformation des polyphénols des margines.Thèse de doctorat. Université paul cézanne. Aix Marseille III.184.
- Lakshmikant. D.(1990).**Cellulose degradation and cellulase activity of five cellulolytic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 6. 64-66.
- Lambertz C., Garvey. M., Klinger. J., Heesel. D., Klose. H., Fischer. R., Commandeur. U.(2014).**Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. *Biotechnology for Biofuels*. 7.135.
- Larpent. J.P. (1990).** Moisissures utiles. In : **Botton B. et al.**, Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2ème édition Masson. Collection Biotechnologies. Paris. 292-314.
- Leclerc .H., Gaillard. J.L., Simonet. M.(1995).** Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien. Edition Doin, Paris. 119-133-134-194.
- Lekounougou. S.T.(2008).**Evaluation et Compréhension des Mécanismes fongiques impliqués dans la dégradation du bois. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy I. 186.
- Leonowicz. A., Mastuszewska. A., Luterek. J., Ziegenhagen. D., Wojtas-wasailewska M., Cho. N., Hofrichter. M., Rogalski. J. (1999).** Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal genetics and biology*. **27**. 175-185.
- Li. K.C., Azadi. P., Collins. R., Tolan. J., Kim .J.S., Eriksson. K.E.L.(2000).** Relation ships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme Microb Technol*. 27(2). 89–94.
- Li. W., Zhang. W.W., Yang. M.M., Chen. Y.L (2009).** Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol*. 40. 195–201.

-**Linder. M., Salovuori. I., Ruohonen. L., Teeri. T.T.(1996)**. Characterization of a double cellulose binding domain Synergistic high affinity binding to crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* **27(1)**. 21268–21272.

-**Linker. M., Teeri.T.(1996)**. The cellulose binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proc.Nat. Acad. Sci.*93. 12251-12255.

-**Liu. J., Yang. J. (2007)**. Cellulase production by *Trichoderma koningii* AS3.4262 in solid-state fermentation using lignocellulosic waste from vinegar industry. *Food Technol. Biotechnol.* 45. 420–425.

-**Lynd. L.R., Weimer. P.J., Van-Zyl. W.H., Pretorius. I.S.(2002)**.Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3), 506-739.

## **M**

-**Macarron. R., Acebal. C., Castillon. M.P., Dominguez. J.M., Delamata. I., Pettersson. G., Tomme. P., Claeysens. M.(1993)**. Mode of action of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biochem .j.* 289. 867–873.

-**Madan. M., Thind. K.S.(1998)**.Physiology of fungi. Edition: *A.P.H publishing corporation*. New Delhi.57-99.

-**Madhuri. N., Garima. D., Jyoti. D., Kiran. K., Datta. M.,Amita. R.S. (2014)**. Production, purification and characterization of a novel GH12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 88.150-161.

-**Makut. M.D., Godiya. E.M.(2010)**. A survey of cellulolytic mesophilic fungi in the soil environment of *Keffi Metropolis*, Nasarawa State, Nigeria. *African Journal of Microbiology. Research.* **4(21)**. 2191-2195.

-**Manabu. S., Fusao. T.(2001)**. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulose in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 92 (4). 305–311.

-**Mandels. M., Weber. J.(1969)**.The production of cellulases. In: **Hajny. G. et al.**, Cellulases and Their Applications, *Advances in Chemistry. American Chemical Society.*392.

-**Manpreet. S., Sawraj. S., Sachin. D., Pankaj. S., Banerjee. U.C.(2005)** Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*. 1(2). 1-9.

-**Mazza. M. (2009)**. Modification chimique de la cellulose en milieu liquide ionique et CO<sub>2</sub> super critique. Thèse de doctorat. Institut Nationale Polytechnique de Toulouse. France. 172.

-**Medve. J., Karlsson .J., Lee. D., Tjerneld. F.(1998)**. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: Adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnol. Bioeng* . 59(5). 621–634.

-**Moore. D., Robson. G.D., Trinci. A.PJ.(2011)**. 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press. New York. 706.

-**Moularat. S., Draghi. M., Lacaze. I., Moletta-Denat. M., Bousta. F., Oriol. G., Robine. E.(2013)**. Etude et compréhension de la dynamique de colonisation microbienne des supports : vers l'élaboration de nouveaux traitements préventifs adaptés aux environnements intérieurs. Programme PRIMEQUAL. Rapport final, Projet de recherche CSTB .France. 112.

-**Murashima. K., Doi. R.H.(2013)**. Selection of Heat-Stable *Clostridium cellulovorans* Cellulases After In Vitro Recombination, chapter 24. In: **Arnold. F.H., Georgiou. G.** Methods in Molecular Biology: Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods. *Humana Press Inc. Totowa. NJ*. 230. 231-237.

-**Murooka. Y., Yamshita. M.(2008)**. Traditional healthful fermented products of Japan. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35(8). 791-798.

-**Mussatto. S.I., Ballesteros. L.F., Martins. S., Teixeira. J.A.(2012)**. Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. *Industrial Waste*. 6-27.

## N

-**Nakasone. K.K., Peterson. S.W., Jong. S.C.(2004)**. Preservation and distribution of fungal cultures. In: **Gregory. et al.**, Biodiversity of fungi Inventory and Monitoring Methods. Edition: Elsevier Press, New York. 37-47.

-Nidetzky. B., Zachariae. W., Gercken. G., Hayn. M., Steiner. W.(1994). Hydrolysis of Cellooligosaccharides by *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases experimental data and kinetic modeling. *Enzyme. Microbial. Technol.*16. 43– 52.

-Nishlo. N., Tai. K., Nagal. S.(1979).Hydrolase production by *Aspergillus niger* .In. solid state cultivation .*European.J.Appl.Microbiol.Biotechnol.*8. 263-270.

## O

-Ogel .Z.B., Yarangumeli. K., Dundar. H., Ifrij. I.( 2001).Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. *Enzyme and Microbial Technology.* 28 .689–695.

-Ogier. J.C., Ballerini. D., Leygue. J.P, Rigal. L., Pourquoié. J.(1999). Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Oil, Gas Science and Technology.* 54(1). 67-94.

-Okek . B.C.(2014). Cellulolytic and Xylanolytic Potential of High  $\beta$ -Glucosidase Producing *Trichoderma* from Decaying Biomass. *Appl Biochem Biotechnol.* 18.

-Oriol. E. (1987). Croissance d'*Aspergillus niger* sur milieu solide : importance de l'eau et de l'activité de l'eau. Thèse de doctorat en microbiologie. Institut national des sciences appliquées de Toulouse. France. 189.

-Ortega. N., Busto. M.D., Perez. M.M.(2001). Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases . *Elsevier Science B.V. Spain.*15.

## P

-Pandey. A.(2003). Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 13 (3).81-84.

-Pérez. J., Muñoz-Dorado. J., De-La-Rubia. T., Martínez. J.(2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose. hemicellulose and lignin. *Inter. Microbiol.*5.53 – 63.

-Perez. S., Samain. D.(2010).Structure and ingeeniring of cellulose. *Advences in carbohy- drate chemistry and biochemistry.* 46. 26-100.

-Pimentel. P.S.S., Lima de Souza. A., Rosas Nascimento. A.T., Vaz de Andrade. E., AstolfiFilho. S., Silva-Nunes. C.G.(2014).Endo And exoglucanases produced by *Penicillium Citrinum* isolated from Amazon. *BMC Proceedings* .8.179.

-**Pitt. J.I., Hocking. A.D.(2009).**Fungi and food spoilage. Edition 3: Springer.New York.353.

-**Pouzet. D.(2011).** Production durable de biomasse: la lignocellulose des poacées. Edition Quae. Paris. 108.

-**Prevot.V.(2013).**Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de doctorat .Université de Reims Champagne-Ardenne. France.159.

## Q

-**Qingxin. L., Wei-Ting. N., Jin-Chuan. W.(2014).**Isolation, characterization and application of a cellulose-degrading strain *Neurospora crassa* S1 from oil palm empty fruit bunch. *Microbial Cell Factories*.13.157.

-**Quiroz-Castañeda. R.E., Balcázar-López. E., Dantán-González. E., Martínez. A., Folch-Mallol. J., Martínez-Anaya. C.(2009).** Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electronic Journal of Biotechnology*. 12(4). 1-8.

## R

-**Rahardjo. Y.S.P., Tramper. J., Rinzema. A.M.(2006).** conversion and transport phenomena in solid state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances*. 24(2).161-179.

-**Raimbault. M. (1998).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1 (3). 1-15.

-**Raimbault. M., Roussos. S.(1982).** Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. production de cellulases de *Trichoderma harizianum* par fermentation en milieu liquide. *Ann. Microbiol.*133. 465-474.

-**Raimbault.M.(1998).**General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1(3). 174-188.

-**Ramos. L.P., Fontana. J.D.(2010).** chapter 21.Enzymatic Saccharification of Cellulosic Materials. *Methods in Biotechnology: Environmental Microbiology: Methods and Protocols*. 219-233.

- Reguant. J., Rinaudo. M. (1999).** Etude bibliographique sur les matériaux issus de la biomasse végétale. Rapport CNRS. 1-164.
- Roberson. R.W., Abril. M., Blackwell. M., Letcher. P., Mclaughlin. D.J., Mouriño-Pérez. R.R., Riquelme. M., Chida. M.U.(2010).** Hyphal Structure. Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fung. *ASM Press*. U.S.A. 8-24.
- Romero. M.D., Aguado. J., Gonzalez. L., Ladero. M.(1999).** Cellulase production by *Neurospora* on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*.25. 244-250.
- Roussos, S. (1985).** Croissance de *T. harzianum* par FMS: physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse de Doctorat. Université Provence. Marseille France. 181.
- Roussos. S.(1985).** Croissance de *T. harzianum* par FMS: physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse de Doctorat. Université Provence, Marseille France. 18. 67.
- Roussos. S.(1998).** Sugar cane used in solid state fermentation for cellulases production. In: **Raimbault M., Soccol C.R., Chuzel G.** International training course on solid state fermentation. Montpellier . *ORSTOM*. 139-150.
- Roussos. S., Hannibal. L.(1984).** Valorisation biotechnologique de la bagasse par la production au niveau pilote d'enzymes de champignons filamenteux. Compte Rendu Final d'une Recherche. *ORSTOM*. 1-48.
- Roussos. S., Hannibal. L., Durand. A., Diez. M., Saucedo. G., Montet. D., Graille. J. (1994).** Enrichissement en protéines du tourteau de coprah: sélection de champignons filamenteux en FMS. *Oléagineux*. 49 (5). 235-247.
- Roussos. S., Raimbault. M. (1982).** Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. Screening des souches cellulolytiques. *Ann. Microbiol.* 133.455-464.

## S

- Saint-Germain. P.D.G. (2013).** Identification des champignons d'importance médicale stage de laboratoire. Institut national de santé publique. 1-55.
- Sánchez. C.(2009).** Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 27. 185–194.

- Sandgren. M., Stahlberg. J., Mitchinson. C.(2004). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability and ligand complexes. *Elsevier Review*.
- Sandhu. S.K., Oberoi. H.S., Babbar. N., Miglani. K., Chadha. B.S., Nanda. D.K. (2013). Two-Stage Statistical Medium Optimization for Augmented Cellulase Production via Solid-State Fermentation by Newly Isolated *Aspergillus niger* HN-1 and Application of Crude Cellulase Consortium in Hydrolysis of Rice Straw. *J. Agric. Food Chem.* 61. 12653–12661.
- Sandhya. C., Sumantha. A., Szakacs. G., Pandey. A.(2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 40(8). 2689-2694.
- Sangeeta. P., Jyoti. K., Rameshwar. T., Ram. K., Vishal. S.S., Lata. N., Anil. K.S.(2014). Cloning and expression of B 1-4 endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* isolated from soil long term irrigated with effluents of paper and pulp mill. *Microbiological Research*. 169.5.
- Santos. T.C., Cavalcanti-Renata. S.I., Bonomo I-Nivio. C.F., Marcelo-Franco. B.S. (2011). Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. *Ciência Rural*. 41 (12). 2210-2216.
- Saradouni. N., Pennick. X.M., Mohand-Oussaid. O., Benallaoua. S.(2004). Recherche d'un milieu optimal pour la production de B-glucosidase chez *Aspergillus fumigatus* mutant albino. *Revue des sciences et technologie*. 21.
- Sarlos. G., Haldi. P.A., Verstraete. P.(2003). Traité de Génie civil de l'EPFL. *Systèmes énergétiques*. 21.
- Saucedo-Castaneda. G.(1991). Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castellii* cultivé sur support solide. Thèse doctorat. Université Montpellier II. France. 213.
- Scriban. R.(1999). Biotechnologie, 5ème édition. Technique et documentation. Ed; Lavoisier. 149-157.
- Shah. A.R., Madamwar. D.(2005). Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem.* 40.1763–1771.



- Shahriarinour. M., AbdWahab. M.N., Ariff. A., Mohamad. R.(2011).**Screening isolation and selection of cellulolytic fungi from oil palm empty fruit bunch fibre. *Biotechnology*. 10 (1). 108-113.
- Smith. J.E., Berry. D.R., Kristiansen. B.(1983).**The Filamentous Fungi: Fungal Technology. Londres (Royaume-Uni).416.
- Sobal. M. (2002).** Physiologie de la croissance mycélienne de *Pleurotuso streatus* et dégradation des polyphénols de la pulpe et des coques de café. Thèse de doctorat, Université de Provence, Aix-Marseille I. 207.
- Soni. R., Nazir. A., Chadha. B.S. (2010).** Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus fresenius* strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. *Industrial. Crops.Prod.* 31. 277– 283.
- Subhedar. P.B., Gogate. P.R.(2013).** Intensification of Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose Using Ultrasound for Efficient Bioethanol Production. A Review. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52. 11816–11828.

## **T**

- Taherzadeh. M.J., Karimi. K.(2008).** Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International. J. Molecular .Scien.* 9. 1621– 1651.
- Tanveer. P., Shashank. G., Joginder. S., Ashish. V., Manish. K., Naseem. G., Madhu. B., Reiaz. R., Aji.t V., Vivek. K., Manoj. K.(2014).**Characterization of Actinomycetes and *Trichoderma spp.* for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. *Springer open journal.* 3(622).12.
- Tao. Y.M., Xu. X.Q., Ma. S.J., Liang. G., Wu. X.B., Long. M.N., Chen. Q.X.(2011).** Cellulase Hydrolysis of Rice Straw and Inactivation of Endoglucanase in Urea Solution . *J. Agric.Food Chem.* 59. 10971–10975.
- Tao. Y.M., Zhu. X.Z., Huang. J.Z., Ma. S.J., Wu. X.B., Long. M.N., Chen. Q-X.(2010).** Purification and Properties of Endoglucanase from a Sugar Cane Bagasse Hydrolyzing Strain. *Aspergillus glaucus* XC9. *J. Agric. Food Chem.* 58(10). 6126–6130.

-Teeri. T.T., Koivula. A., Linder. M., Wohlfahrt. G., Divne. C., Jones. T.A.(1998). *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose, *Biochemical. Society. Transactions.* 26. 173– 178.

-Terebiznik. M.R., Pilosof. A.M.R.(1999). Biomass estimation in solid state fermentation by modeling drymatter weight loss. *Biotechnology Techniques.* 3 (13). 215-219.

-Ting. C.L., Makarov. D.E., Wang. Z.G.(2009). A kinetic model for the enzymatic action of cellulase. *J. Physical. Chem B.* 113. 4970– 4977.

-Tomme. P., Heriban. V., Claeysens. M.(1990). Adsorption of 2 Cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei* to avicel evidence for Exo-Exo synergism and possible loose complex formation. *Biotechnol. Letters.* 12. 525– 530.

## V

-van parijs. .F.R.D., Moreel. K., Ralph. J., Boerjan. W., Merks. R.M.H.(2010). *Plant Physiol.*153. 1332.

-Vidaud. C., Rousses. S., Raimbault. M., Deschamps. F. (1982). Effet de divers prétraitements sur l'accessibilité de la cellulose de la paille de blé aux cellulases de *Trichoderma harzianum* . *O.R.S.T.O.M. sér. Biol.* 46. 17-23.

-Vincken. J.P., Keizer. A., Beldman. C., Voragen. A.G.J.(1995). Fractionation of Xyloglucan Fragments and Their Interaction with Cellulose. *Plant Physiol.* 108.1579-1585.

## W

-Watanabe. T.(2013). Introduction: Potential of Cellulosic Ethanol. **In: Faraco.V.** Lignocellulose Conversion Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production. Ed: Springer. New York. U.S.A. 1-20.

-Weng. X.Y., Sun. J.Y. (2006). Kinetics of biodegradation of free gossypol by *Candida tropicalis* in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 32 (3) . 226-232.

-Woiciechowski. A.L., de Souza-Vandenberghe. L.P., Karp. S.G., Letti. L.A.J., de Carvalho. J.C., Pedroni-Medeiros. A.B., Spier. M.R., Faraco.V., Soccol. V.T., Soccol . C.R.(2013). The Pretreatment Step in Lignocellulosic Biomass Conversion: Current Systems

and New Biological Systems. **In: Faraco.V.** Lignocellulose Conversion Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production. *Springer*. New York. U.S.A. 39-64.

-**Xu. B., Hellman. U., Ersson. B., Janson. J.C.(2000).** Purification, characterisation and amino acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- $\beta$ -1,4-glucanase from blue mussel. *Euro. J. Biochem.* 267. 4970-4977.

## **Y**

-**Yuan. J.S., Tiller. K.H., Al-Ahmad. H., Stewart. N.R., Stewart. J.C.N.(2008).** Plants to power: *Bioenergy to fuel the future Trends in Plant Science.* 13 (8). 421– 429.

## **Z**

-**Zaldívar. J., Nielsen. J., Olsson. L. (2001).** Fuel ethanol production from lignocellulose: A challenge for metabolic engineering and process integration. *App Microbiol. Biotechnol.* 56.17–34.

-**Zha. Y., Slomp. R., Groenestijn. J.v., Punt. P.J.(2012).** Preparation and Evaluation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysates for Growth by Ethanologenic Yeasts. chapter 16.**In: Cheng. Q.** Microbial Metabolic Engineering. *Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* 834. 245-259.

-**Zhang. P.Y.H., Hong. J., Ye. X.(2009).** Cellulase Assays **In: Mielenz.J-R.** Biofuels. *Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* 581. 213- 231.

-**Zhao. Y., Wu. B., Yan. B., Gao. P. (2004).** Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. *Science in China Ser. C. Life Sciences.* 47 (1).18-24.

**Annexes**

## Annexe I : milieux de culture

### 1. Gélose sélective d'isolement CMC-Agar (Abu bakar et al., 2010)

NaNO <sub>3</sub> .....	2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1g
MgSO <sub>4</sub> .....	1g
KCl.....	0,5g
CuSO <sub>4</sub> .....	0,001g
MnCl <sub>2</sub> .....	0,001g
ZnSO <sub>4</sub> .....	0,005
CMC.....	2,5g
Agar.....	16g
Eau distillée (qsp.).....	1 litre.
pH final .....	5

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

### 2. Gélose à l'extrait de malt (MEA) (Saint-Germain, 2013)

Extrait de malt.....	20 g
Peptone.....	1 g
Glucose.....	20g
Agar.....	20 g
Eau distillée (qsp.) .....	1 litre
pH final .....	5,6.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Ne pas stériliser plus longtemps, car ce milieu deviendra doux sur le chauffage prolongé ou répété.

### 3. Gélose Pomme de terre, dextrose, agar (PDA) (Saint-Germain, 2013)

Pomme de terre.....	200g
Glucose.....	20g
Agar.....	20g
Eau distillée (qsp.) .....	1 litre
pH final.....	5.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

**4. Milieu gélosé de criblage (Kasanaet *al.*, 2008)**

carboxymethylcellulose (CMC) sel de sodium.....	2g
NaNO <sub>3</sub> .....	2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.5g
KCl.....	0.5g
Peptone.....	0.2g
Agar.....	17g
Eau distillée (qsp.).....	1 litre
pH final .....	5

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

**5. Milieu Mandels et Weber (Mandels et Weber, 1969)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	1.4g
Urée.....	0.3g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O.....	0.3g
CaCl <sub>2</sub> .....	0.3 g
FeSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O.....	5.0mg
MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O.....	1.56mg
ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O.....	1.4mg
CoCl <sub>2</sub> .....	2.0mg
Eau distillée (qsp.).....	1 litre.
La source de carbone étant .....	1% de CMC
pH .....	5

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

## Annexe II : Réactifs et tampons

### 1. Bleu coton au lactophénol :

Phénol en cristaux .....	20 g
Acide lactique (commercial concentré) .....	20 g
Glycérine .....	40 g
Eau bidistillée .....	20 g
Bleu de méthyle .....	0,5 g

Les produits doivent être dissous dans l'ordre indiqué et en agitant modérément à l'aide d'une baguette de verre. La dissolution du bleu de méthyle peut prendre un certain temps (laisser reposer 24 h puis agiter à nouveau).

### 2. Réactif DNS (Ghose, 1987)

DNS.....	10g
NaOH.....	16g
Tartrate double de sodium et de potassium.....	300g
Eau distillée (qsp.).....	1 litre

Le tartrate est ajouté par petites quantités avec un Léger chauffage (50°C) si nécessaire pour éviter la formation des grumeaux insolubles. La solution est préparée dans l'obscurité puis filtrée et conservée à l'abri de la lumière dans un flacon couvert d'aluminium.

### 3. Tampon citrate de sodium (50 mM; pH 4.8) (Zhang et al., 2009)

#### ➤ Tampon citrate (1 M, pH 4.5) :

Acide citrique monohydraté.....	21g
NaOH (pour ajuster le pH à 4,5).....	5 à 6g
Eau distillée (qsp.).....	100 ml

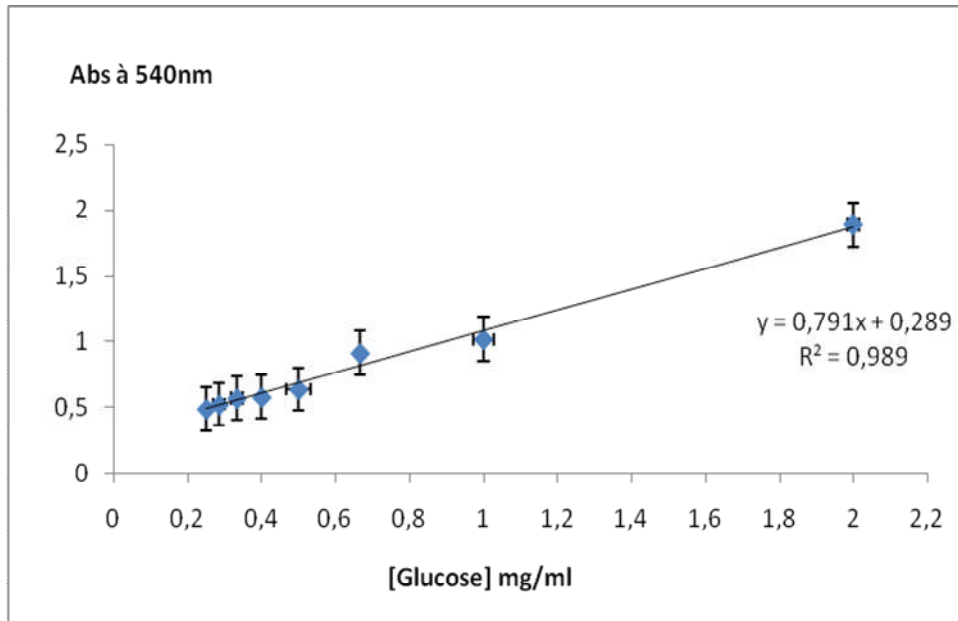
#### ➤ Tampon citrate (50 mM, pH 4.8):

Diluer le premier tampon (1 M, pH 4.5) par l'ajout de 19 fois le volume en eau distillé, ajuster le pH à 4,8 avec la soude si nécessaire.

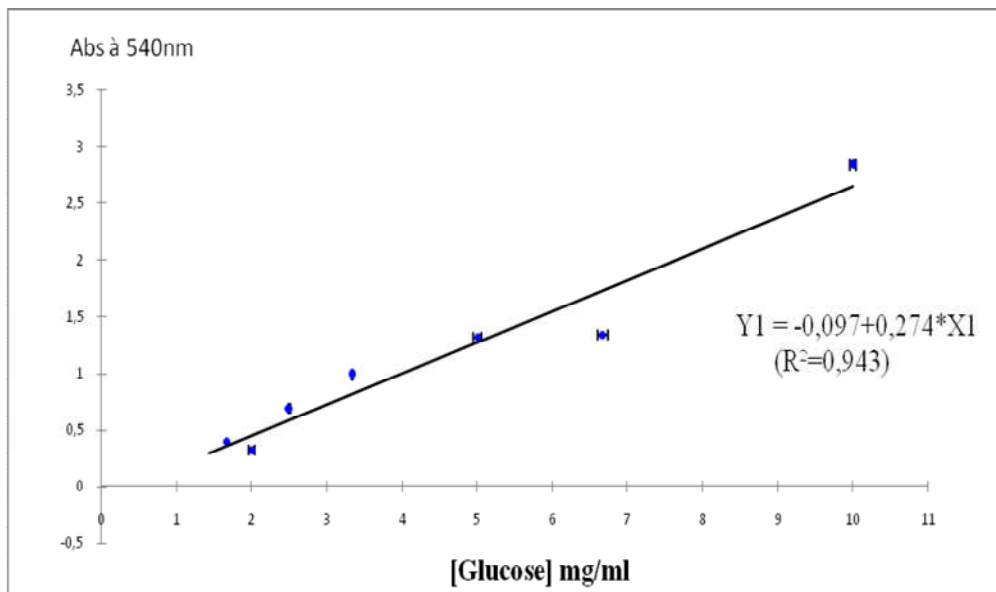
### 4. Solution de Lugol bactériologique (Iodo-iodure de potassium)

I <sub>2</sub> .....	1g
KI.....	2g
Eau distillée (qsp.).....	300 ml

## Annexe III : Courbes d'étalonnages

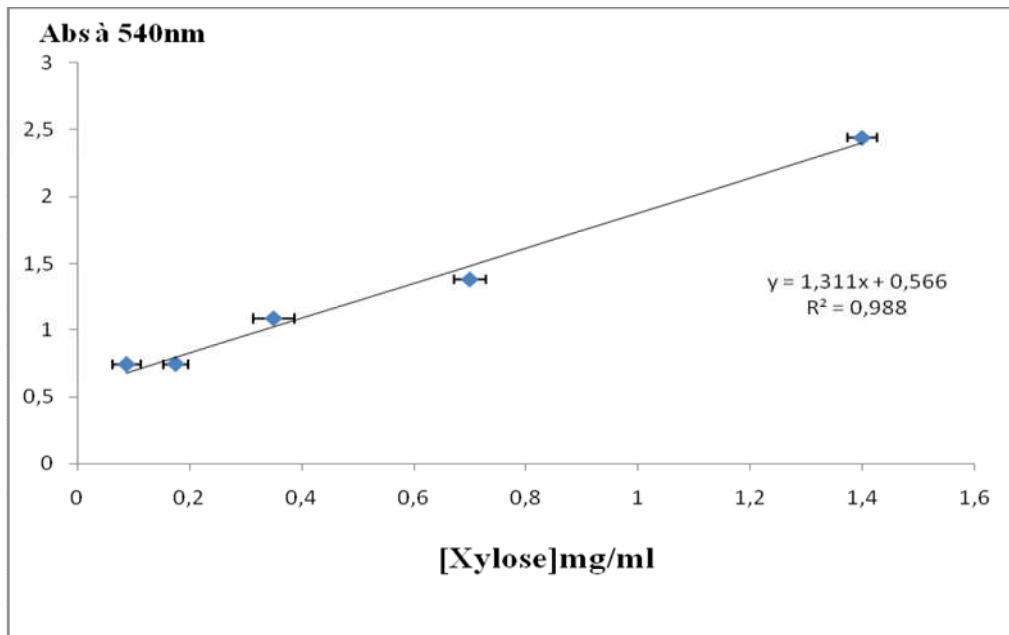


**Figure 34** : Courbe d'étalonnage du dosage du Glucose (CMC ase).



**Figure 35** : Courbe d'étalonnage du dosage du Glucose (APF ase).





**Figure 36** : Courbe d'étalonnage du dosage de Xylose

**Résumé:** La présente étude consiste à cribler des moisissures cellulolytiques performantes. 66 isolats capables de croître sur milieu gélosé en présence de CMC comme seule source de carbone et d'énergie sont soumis à un premier criblage qualitatif sur milieu gélosé (CMC-agar), cela a permis de les classer sur la base de leurs indices cellulolytiques. 57 isolats sont sélectionnés avec un IC supérieur ou égal à 1,25 à l'exception des moisissures envahissantes. Un deuxième criblage quantitatif sur milieu liquide a permis de sélectionner les isolats les plus performants, Toutes les souches testées présentent des activités APase entre 0,071 et 0,274, CMCase entre 1,175 et 4,202 et xylanase entre 1,914 et 5,033. Les souches AP, AM, BG et BD révèlent des activités CMCase, APase et xylanases relativement importantes. Ces résultats ont permis de choisir ces souches pour la fermentation submergée avec des substrats lignocellulosiques tel que le grignon d'olive, la paille et le son de blé. Une étude morphologique est réalisée sur ces 04 isolats sélectionnés et a permis de les rattacher aux genres *Trichoderma* (AP), *Aspergillus* (BG) et *Penicillium* (AM et BD). Des cinétiques de production des cellulases et xylanases sont réalisées en milieu liquide. Les résultats indiquent que les souches AP et BG présentent de meilleures activités avec la paille et le son de blé. Cela a abouti à la sélection de 2 souches de *Trichoderma sp* (AP) et *Aspergillus sp* (BG) pour réaliser une fermentation solide avec de la paille de blé humidifié à 40 et 80% et le son de blé humidifié à 40%. Certains paramètres de culture, pH et matière sèche sont suivis en même temps que la production de cellulases et de xylanases. Cette étude révèle qu'avec *Aspergillus sp*, la synthèse des enzymes atteint son maximum à 2 jours de fermentation avec la paille et le son de blé. Le maximum d'activité CMCase, APase et xylanase observé est de 25,442, 6,275, 551,141 UI/ml respectivement. Enfin une caractérisation partielle des cellulases et xylanases de la souche BG, est effectuée dans le surnageant de culture du 2ème jour de fermentation. Les enzymes sont stables entre pH 3 et 9 avec un optimum de 3.0, 5.0 et 4.0 respectivement pour l'endoglucanase, xylanase et PFase. La température optimale des activités relatives est de 60°C pour l'endoglucanase et la xylanase et 40°C pour le papier filtre. Ces enzymes montrent une stabilité à 50°C. A 60°C; une stabilité est enregistrée pour la CMCase et l'activité PFase, pour la xylanase est stable une 1 heure seulement. A 70°C; l'endoglucanase et la xylanase sont sensibles à cette température, tandis que APase est stable durant 7 heures. Ces caractéristiques de thermostabilité et de pH acide sont recherchées par les industriels.

**Mots clés :** Lignocellulose, *Aspergillus sp*, *Trichoderma sp*, FMS, Cellulase, Xylanase.

**Abstract:** The aim of this study is to screen efficient cellulolytic molds. 66 isolates able to grow on agar medium in the presence of CMC as sole source of carbon and energy are subject to an initial qualitative screening on agar medium (CMC-agar), this allowed to classify them on the basis of the ratio of cellulolytic enzymes. 57 isolates are selected with a ratio greater than or equal to 1.25 except for invasive molds. A second quantitative screening on liquid medium was performed to select the most efficient strains. All tested isolates have FPase activities between 0.071 and 0.274, CMCase between 1.175 and 4.202 and between 1.914 and 5.03 for xylanase. The strains AP, AM, BG and BD reveal CMCase, APase and xylanases activities relatively high. These results were used to select these strains for the submerged fermentation of lignocellulosic substrates such as olive waste, straw and wheat bran. A morphological study was performed on these 04 selected isolates and allowed to attach them to *Trichoderma* (AP), *Aspergillus* (BG) and *Penicillium* (AM and BD). Kinetic producing cellulases and xylanases are performed in liquid medium. The results indicate that the AP and BG strains have better activities with straw and wheat bran. This allowed the selection of two strains of *Trichoderma sp* (AP) and *Aspergillus sp* (BG) to realize a solid state fermentation with wheat straw moistened to 40 and 80% and wheat bran moistened to 40%. Some culture parameters, pH and dry matter are monitored at the same time as the production of cellulases and xylanases. This study reveals that with *Aspergillus sp*, enzyme production is highest at the second day of fermentation with straw and wheat bran. The maximum of CMCase, FPase and xylanase activities observed is 25.442, 6.275, 551.141 IU / ml, respectively. Finally partial characterization of cellulases and xylanases strain BG, is carried out in the culture supernatant of the fermentation on the second day. The enzymes are stable from pH 3 to 9 with an optimum of 3.0, 5.0 and 4.0 for the endoglucanase, xylanase and FPase, respectively. The optimal temperature of the relative activities is of 60°C for the endoglucanase and the xylanase and 40°C for the filter paper. These enzymes show stability at 50 °C. For CMCase and FPase activity are stable at 60 °C, for the xylanase activity is stable for one hour only. With 70°C, while the FPases is stable for seven hours. xylanase and endoglucanases are sensitive to the temperature of 70 °C. These characteristics, thermostability and acid pH are appreciated by the industrialists.

**Key words:** Lignocellulose, *Aspergillus sp*, *Trichoderma sp*, SSF, Cellulase, Xylanase.

**المخلص:** تعد هذه الدراسة لعزل فطريات ليفية ذات كفاءة لينوسيلولوزية. تم عزل 66 فطريات قادرة على النمو في وسط صلب في وجود CMC كمصدر وحيد للكربون والطاقة. خضعت العزلة الأولية لفطريات المجموعة على وسط صلب سمح بترتيبهم انطلاقاً من القدرة على تحليل مادة الكربوكسي ميثيل سليولوز وهذا يسمح لتصنيفها على أساس IC. في مرحلة ثانية من الدراسة تمكنا من انتقاء العزل في وسط سائل وتم اختيار 57 عزلات مع IC أكبر من أو يساوي 1.25 باستثناء فطريات ليفية ذات نمو سريع، تم استخدام الفحص الكمي الثاني على الوسط السائل لتحديد السلالات الأكثر كفاءة، جميع السلالات المختبرة لهم الأنشطة APase بين 0.071 و 0.274 وحدة دولية / مل CMCase بين 1,175 و 4,202 وحدة دولية / مل و xylanase بين 1.914 و 5.033 وحدة دولية / مل. سلالات AP, AM, BG و BD تكشف أنشطة CMCase و APase كبيرة نسبياً. واستخدمت هذه النتائج لتحديد هذه السلالات لتخمير المغفور من ركائز لينوسيلولوز مع ثقل الزيتون والقش ونخالة القمح. وقد أجريت دراسة مورفولوجية على هذه العزلات 04 المختارة وسمحت لضمها إلى الترايكوديرما (AP)، أسبيجيليوس (BG) والبسيلوم (AM و BD) تم إنتاج السليلوزات و xylanases في وسط سائل. وتشير النتائج إلى أن سلالات AP و BG تظهر نتائج عالية مع القش ونخالة القمح. وأدى ذلك إلى إختيار الترايكوديرما (PA) أسبيجيليوس (BG) لتوفير التخمر المتين مع نخالة القمح مرطب ب 40 و 80% مع القش القمح، ويتم متابعة رصد درجة الحموضة والمواد الصلبة في نفس الوقت إنتاج السليلوزات و xylanases كشفت هذه الدراسة أن مع أسبيجيليوس (BG) تم إنتاج إنزيمات مع أعلى نسبة في يومين من التخمر مع القش ونخالة القمح. أعلى إنتاج سؤجل مع xylanase، APase، CMCase تم ملاحظتها: 25.442، 6.275، 551.141 وحدة دولية / مل على التوالي. أخيراً توصيف جزئي للسليلوزات و xylanases مع سلالة BG، والتي إستعملن في استخراج انزيم اليوم الثاني من التخمر. وجدنا ان للنشاط الإنزيمي مستقر مع درجة الحموضة بين 3-9 ودرجة المثلثي هي 4.0، 3.0 و 5.0 على التوالي مع APase، endoglucanase و xylanase. كانت درجة الحرارة المثلى للنشاط الإنزيمي هي 60 °C مع endoglucanase و xylanase و 40°C مع APase. تظهر الإنزيمات APase و endoglucanase و xylanase الاستقرار عند 50 °C و 60 °C مع APase و endoglucanase أما النشاط الإنزيمي xylanase غير مستقر إلا لمدة ساعة واحدة، في حين أن APase مستقر لمدة سبع ساعات عند 70°C وحساسية مع xylanase و endoglucanases عند هذه الدرجة. إن هذه الخصائص من صمود للحرارة وحامضية له سعى من قبل الشركات المصنعة.

**كلمات مفتاح :** لينوسيلولوز، السيلولاز، xylanase، أسبيجيليوس، الترايكوديرما، تخمر على وسط صلب،