

**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**  
**Filière : Microbiologie**  
**Spécialité Biotechnologie microbienne**  
**Réf :.....**

**Mémoire de Fin de Cycle**  
**En vue de l'obtention du diplôme**  
**MASTER**

***Thème***

**Saccharification de la biomasse  
lignocellulosique par des enzymes fongiques  
produites par fermentation mixte**

Présenté par :

**NACERDDINE Yasmine**

Soutenu le : 13 juillet 2022

Devant le jury composé de :

Mr. BETTACHE Azzeddine  
Mme. BELHAMICHE Nabila  
Mme. AZZOUZ Zahra.

Professeur   Président  
MAA           Examinatrice  
MAB           Encadreur

**Année Universitaire : 2021-2022**

# *Dédicaces*

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quelque soient les termes employés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincères.

A mon papa, pour qui je dois ma réussite, merci pour tous ce que tu m'a apportés, merci de m'avoir aidée à me construire et d'être à mes côtés chaque jour merci de faire taire mes doutes en me serrant fort dans tes bras.

A toi ma maman chérie, celle qui a souffert sans me laisser souffrir, celle qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse. Dont seul honneur d'être leur fille me suffit que Dieu les protège

A mes adorables sœurs « Amina et Manel », mon frère « Adnane » qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et me soutenir tout au long de ma vie.

A mes petits amours« Lipton, Sushi, Minette, Clochette, Dezi » qui me comble de tout amour sincère.

A mes amies spécialement « Sara, Yasmine, Soraya, Sarah » pour leur amour, encouragement merci d'être là dans les moments difficiles et de me permettre d'être moi et de me sentir bien. A mon seul ami IDIR qui n'a cessais de m'aider et à me soutenir dans tous mon parcours merci d'être là.

Enfin, je dédie ce modeste travail à tous les gens qui m'ont soutenu et qui me connaissent de près ou de loin.

*Yasmine*

# Remerciements

*Je tiens à remercier en premier lieu DIEU, le tout Puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail.*

*Je tiens à remercier vivement tout ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation et la réussite de ce modeste travail.*

*Mes remerciements s'adressent en premier lieu à Mr. Kecha, professeur à l'université de Abderahman Mira directeur du laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.*

*A ma promotrice Mme AZZOUZ Zahra pour ses précieux conseils qu'elle a prodigués tout au long de ce stage de recherche, ainsi que son orientation et la confiance qu'elle m'a accordée, son aide pratique et son soutien moral. Je la remercie pour les efforts qu'elle a déployés avec beaucoup de sympathie et de patience sans oublier sa rigueur scientifique et sa rédaction pédagogique qui m'a aidé à mener ce modeste travail.*

*Je remercie également Mr BETTACHE A, professeur à l'université de Bejaia qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, ainsi que Mme. BELHAMICHE N, maitre-assistant à l'université de Bejaia, pour le temps qu'elle a bien voulu consacrer à lire et à juger ce travail en tant qu'examinatrice.*

*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'elles ont fournie. Ma profonde reconnaissance à Mlle Kenza, Mlle Narimane, pour leurs encouragements et leurs sympathies. La très bonne humeur et l'ambiance au sein du groupe nous a permis de mener nos travaux de recherche de façon très agréable. Un immense merci également aux ingénieurs du laboratoire.*

*Enfin, j'exprimons ma profonde reconnaissance à tous mes enseignants pour le savoir qui nous ont transmis tout au long de notre parcours d'apprentissage au sein de la faculté des sciences de la nature et de la vie.*

*Yasmine*

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure de la biomasse lignocellulosique.....	3
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique de la structure chimique de la cellulose.....	4
<b>Figure 3</b> : Structure de base du squelette $\beta$ -(1,4) d'hémicellulose.....	4
<b>Figure 4</b> : Représentation des différentes structures des hémicelluloses .....	5
<b>Figure 5</b> : Structure de la lignine.....	6
<b>Figure 6</b> : Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS1.....	13
<b>Figure 7</b> : Photographie des étapes de fermentation solide.....	19
<b>Figure 8</b> : Photographie de l'amicon Ultra-15 3kDa et les filtres de stérilisation.....	25
<b>Figure 9</b> : Photographie des étapes de réalisation de CCM.....	28
<b>Figure 10</b> : Principaux caractères cultureux des isolats sur milieu PDA et Observations microscopiques pour les souches <i>Trichoderma afroharzianum</i> isolat AZ 12 et <i>Aspergillus niger</i> strain BG.....	30
<b>Figure 11</b> : Solutions sporales de la souche <i>T. afroharzianum</i> et <i>A. Niger</i> .....	30
<b>Figure 12</b> : photographie des substrats de la fermentation mixte d' <i>A. niger</i> et <i>T. afroharzianum</i> sous SMF .....	31
<b>Figure 13</b> : Histogramme comparatif des activités cellulolytique, xylanolytique et ligninolytique dans les extraits enzymatiques produites à 28 °C et 32°C.....	32
<b>Figure 14</b> : Dégradation des hémicelluloses .....	34
<b>Figure 15</b> : Histogramme montrent les autre activités hemicellulolitiques.....	35
<b>Figure 16</b> : Histogramme montrant les résultats Activités cellulolytique et xylanolytique avant et après concentration de l'extrait enzymatique .....	35
<b>Figure 17</b> : Histogramme des résultats de la saccharification de la paille et de son de blé non-traité et traité.....	39
<b>Figure 18</b> : Analyse CCM de produit d'hydrolyse par le cocktail enzymatique produit par <i>Aspergillus niger</i> strain BG et <i>Trichoderma afroharzianum</i> isolat AZ 12 .....	42
<b>Figure 1</b> : Courbe d'étalonnage de xylose .....	Annexe II
<b>Figure 2</b> : Courbe d'étalonnage de glucose à 2g/L .....	Annexe II
<b>Figure 3</b> : Courbe d'étalonnage de glucose à 10g/L .....	Annexe II
<b>Figure 4</b> : Courbe d'étalonnage des protéines .....	Annexe II

## Liste des tableaux

<b>Tableau n° I.</b> Composition chimique et production mondiale des principaux déchets lignocellulolytiques (L.C) .....	7
<b>Tableau n° II.</b> Divers méthodes des prétraitements de la biomasse lignocellulolytiques .....	9
<b>Tableau n° III.</b> Prétraitements enzymatiques .....	11
<b>Tableau n° IV.</b> Conditions optimales pour la production de xylanases et CMCase proposées par le modèle BBD dans la fermentation mixte .....	18
<b>Tableau n° V.</b> Dosage de l'activité papier filtre .....	21
<b>Tableau n° VI.</b> Conditions de déroulement de la saccharification .....	26
<b>Tableau n° VII.</b> Compositions chimiques du son et de la paille de blé.....	40
<b>Tableau n° VIII.</b> Composition en sucre du son et de paille de blé désamidonné.....	41
<b>Tableau n° I.</b> Composition Gélose pomme de terre, dextrose, agar (PDA) .....	Annexe I
<b>Tableau n° II.</b> Compositions du milieu Mandels et Weber .....	Annexe I
<b>Tableau n° III.</b> Préparation du réactif de DNS .....	Annexe I
<b>Tableau n° IV.</b> Préparation de tampon citrate de sodium .....	Annexe I
<b>Tableau n° V.</b> Préparation du réactif de Bradford .....	Annexe I

## Liste des abréviations

- **BG** : *Aspergillus niger* strain BG
- **AZ 12**: *Trichoderma afroharzianum* isolat AZ 12.
- **CMC** : carboxymethyl cellulose.
- **CMCases** : Carboxymethyl cellulose.
- **DNS** : 3,5-acide dinitrosalicylique.
- **APFase** : activité papier filtre.
- **p/v** : poids par volume
- **v/v** : Volume par volume
- **LMA** : Laboratoire de Microbiologie Appliquée.
- **PDA** : Potato- Dextrose- Agar.
- **pH** : Potentiel Hydrogène
- **RSM** : Response Surface Methodology.
- **FMS** : Fermentation en Milieu Solide
- **UI** : unité internationale.
- **$\beta$ -XYL** :  $\beta$ -xylosidase
- **$\beta$ -GLU** :  $\beta$ -glucosidase
- **pNP-G** : p-nitrophényl- $\beta$ -D-glucopyranoside.
- **pNP-X** : p-nitrophényl- $\beta$ -D-xylopyranoside.
- **IUPAC** : Union internationale de chimie pure et appliquée
- **ABTs** : 2,2'-Azinobis [3-éthyl-2,3-dihydrobenzothiazole-6-sulfonate] de diammonium
- **CCM** : Chromatographie sur Couche Mince.
- **XOS** : Xylooligosaccharides

Liste des figures  
 Liste des tableaux  
 Liste des abréviations

# *Sommaire*

**INTRODUCTION**..... 1

## **CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

1. La biomasse lignocellulosique .....	3
1.1. Structure de la biomasse lignocellulosique .....	3
1.1.1. Cellulose.....	3
1.1.2. L'hémicellulose .....	4
1.1.3. Lignine.....	6
1.2. Source de la biomasse lignocellulosique.....	6
2. Dégradation de la biomasse lignocellulosique .....	8
2.1. Techniques de prétraitement de la biomasse lignocellulosique .....	8
2.1.1. Prétraitements physique ou chimique .....	8
2.1.2. Prétraitement par des micro-organismes lignocellulolytiques.....	10
2.1.3. Prétraitement enzymatique .....	11
3. Biodégradation de la biomasse lignocellulosique par fermentation solide .....	12
4. Fermentation mixte.....	13
5. Saccharification et la bioconversion de la biomasse .....	14

## **CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

1. Matériel biologique .....	16
1.1. Remise en culture et préparation de la solution sporale.....	16
2. Production des enzymes lignocellulolitiques par fermentation solide par culture mixte d' <i>A. niger</i> et <i>T. afroharzianum</i> 17	
2.1. Préparation de substrat de fermentation .....	17
2.2. Production des enzymes lignocellulolitiques par fermentation solide .....	17
2.2.1. Réalisation de la fermentation solide .....	18
2.2.2. Récupération des enzymes produites.....	18
2.3. Dosage des activités enzymatiques .....	19
2.3.1. Dosage des activités cellulolytiques.....	19

2.3.2.	Mesure des activités hémicellulolytiques.....	21
2.3.3.	Calcul des activités mesurées par la méthode DNS. ....	22
2.3.4.	Mesure des activités ligninasiqes .....	23
2.4.	Dosage des protéines.....	24
2.5.	Saccharification de la biomasse lignocellulolytique .....	24
2.5.1.	Prétraitement de la paille et de son de blé.....	24
2.5.2.	Concentration de l'extrait enzymatique brut.....	24
2.5.3.	Hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique .....	25
2.5.4.	Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des produits de saccharification de la paille et de son de blé .....	26

## CHAPITRE 3 : RESULTAT ET DISCUSSIONS

1.	Caractérisation macro et microscopique des souches <i>Trichoderma afroharzianum</i> isolat AZ 12 et <i>Aspergillus niger</i> strain BG .....	29
2.	Production d'enzymes lignocellulolytique avec fermentation mixte à base de paille et de son du blé.....	30
3.	Saccharification de la biomasse lignocellulosique .....	33
3.1.	Recherche d'autres enzymes auxiliaires.....	34
3.2.	Ultrafiltration de l'extrait enzymatique .....	36
3.3.	Délignification de la paille et du son de blé .....	37
3.4.	Hydrolyse enzymatique de la paille et son de blé traité et non traité.....	37
3.5.	Analyse des produits de saccharification .....	41
	<b>Conclusion</b> .....	44

### Références bibliographiques

### Annexes



---

# *Introduction*

---

L'exploitation des déchets et co-produits agricoles en vue d'une valorisation a bénéficié au cours de ces dernières décennies d'un regain d'intérêt pour des raisons économiques aussi bien qu'environnementales (**Khila, 2014**). L'importance de ces co-produits agricoles réside dans leur abondance, leur faible coût ainsi que dans le fait qu'ils représentent une source organique naturelle renouvelable, disponible dans le monde entier.

Aujourd'hui, l'industrie mondiale utilise moins de 10% de la biomasse végétale produite (**Liu et al., 2007**) et des quantités énormes des résidus d'agriculture sont brûlés chaque année, ce qui cause un problème environnemental sérieux(**Sun et Cheng, 2002**).

La quantité de biomasse produite sur les continents est estimée une production annuelle de 10 à 50 milliards de tonnes (**Sanchez et Cardona, 2008**). Elle constitue ainsi un réservoir renouvelable d'une vaste quantité de molécules aux propriétés diverses (molécules de structures, de réserve ou possédant une activité biologique). Aussi, un des leviers identifié pour la réduction des dommages environnementaux générés par les activités humaines qui réside dans la valorisation de cette biomasse (**Anastas et Warner, 2000**).

La biomasse lignocellulosique a naturellement fait l'objet au centre des recherches pour la production de carburants de substitution et même pour l'étude de nouveaux procédés de biotechnologie blanche comme la filière de bioraffineries en alternative à la pétrochimie. (**O'Donohue, 2013**). La biomasse lignocellulosique se compose de trois types de polymères, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine qui sont fortement imbriquées les uns contre les autres et liées chimiquement par des forces covalentes et non covalentes. La cellulose représente 40 à 60% de cette biomasse, par conséquent, c'est le biomatériau renouvelable le plus abondant sur la planète (**Dekker et Lindner, 1979**).

Les premiers procédés de conversion utilisés étaient surtout chimiques, ces procédés sont devenus, à l'heure actuelle, peu compétitifs en raison notamment des coûts des réactifs et de la génération de nombreux sous-produits et de composés non désirables. De tels composés peuvent nécessiter une étape importante de purification ou agir en tant qu'inhibiteurs rendant les hydrolysats peu fermentescibles, dans les procédés de production d'alcool à partir de substrats lignocellulosiques (**Woiciechowski et al., 2013**).

Ces procédés chimiques sont désormais concurrencés par les procédés enzymatiques, plus spécifiques et qui permettent une hydrolyse dans des conditions moins sévères. Cependant, vue sa structure complexe, la biomasse lignocellulosique n'est pas directement accessible aux enzymes. Elle nécessite une phase préalable de prétraitement afin d'améliorer

la susceptibilité de l'hydrolyse enzymatique aussi bien de la cellulose que de l'hémicellulose.

Ce prétraitement peut être mécanique, thermique ou chimique, ou bien la combinaison de deux ou trois de ces types d'action. La saccharification de cette biomasse permet la dégradation totale de la cellulose et l'hémicellulose en sucre simple telle que le glucose et le xylose.

Les cellulases, hémicellulase et ligninase sont essentiellement produites par des micro-organismes cellulolytiques, hémicellulolytiques et lignolytiques particulièrement les moisissures qui sont de plus en plus utilisées dans la production de métabolites en particulier ce type d'enzymes grâce à leur capacité à conquérir les substrats naturels avec une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé (**Breton, 1990 ; Collins et al., 2005 ; Yang et al., 2006**).

Dans ce cadre, les travaux réalisés au cours de ce mémoire ont porté sur la valorisation de la paille de blé et du son de blé, production des cellulase et xylanase par fermentation solide en culture mixte des souches d'*A. niger* strain BG et *T. afroharzianum* AZ12 et de la saccharification de cette biomasse par voie enzymatique pour l'obtention des sucres monomériques avec des rendements rentables à une échelle industrielle.

Notre étude est constituée de trois parties :

Le premier chapitre comporte une étude bibliographique approfondie concernant la structure et la composition chimique de la biomasse lignocellulosique, les mécanismes d'hydrolyse enzymatique des parois lignocellulosiques, le mode de production des enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques et la saccharification de la biomasse par hydrolyse enzymatique.

Le deuxième chapitre expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre pour la préparation du substrat et les souches fongiques, la production du complexe enzymatique de type lignocellulolytique par fermentation mixte et le procédé de la saccharification de la biomasse lignocellulosique.

Le troisième chapitre retrace et discute les résultats obtenus au cours de cette étude avant de finaliser par une conclusion et perspectives.

---

*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 recouvre 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).

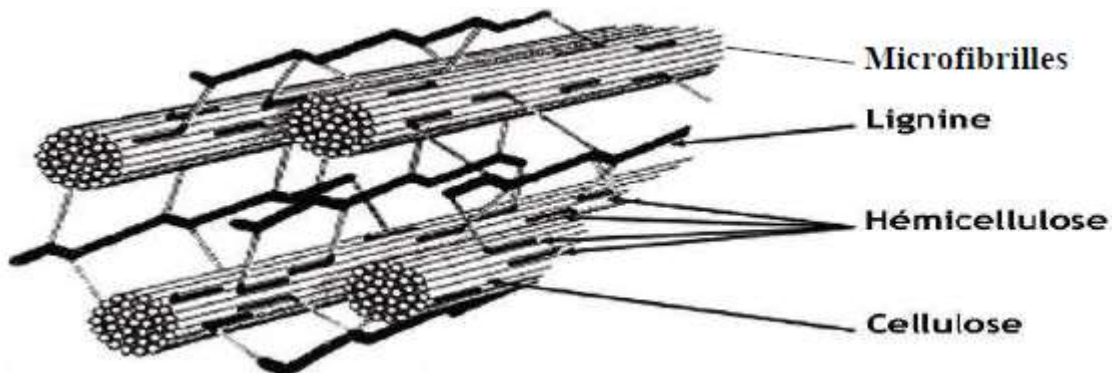


Figure 1 : Structure de la biomasse lignocellulosique (Van parijs et al., 2010).

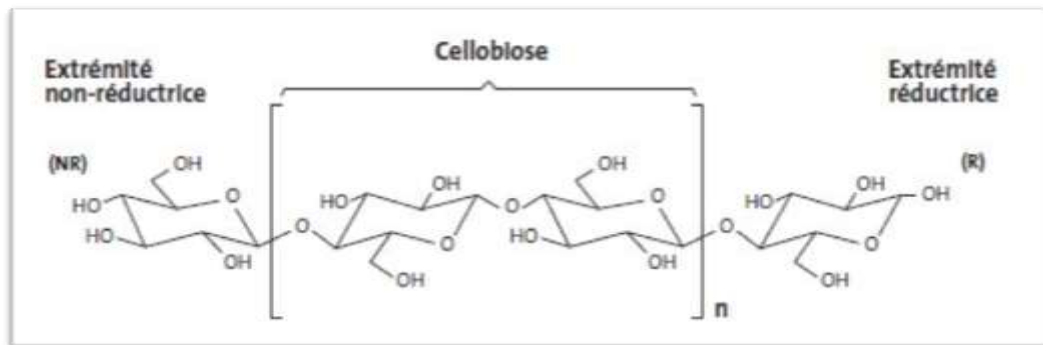
### 1.1. Structure de la biomasse lignocellulosique

La description moléculaire des parois lignifiées n'a pas encore été complètement déterminée, d'où la difficulté de prédire d'éventuels obstacles à la dégradation enzymatique de parois lignocellulosiques lors de la production de bioéthanol de deuxième génération. Ce complexe hétérogène s'organise autour de trois principaux biopolymères : la cellulose, les hémicelluloses et les lignines (Rubin, 2008).

#### 1.1.1. Cellulose

C'est la molécule organique la plus abondante sur terre (8) et le constituant principal des biomasses lignocellulosiques (40 à 60 %). La cellulose est un homopolymère non ramifié résultant de l'enchaînement d'unités  $\beta$ -D-glucose (Barnoud, 1980). Le nombre d'unités glucose constituant une chaîne de cellulose, appelé degré de polymérisation (DP), peut-être compris entre 100 à 14000 en fonction de l'origine botanique de la cellulose et de la strate pariétale. Le taux de polymérisation varie aussi en fonction des prétraitements physiques et chimiques appliqués lors des procédés de purification ou de traitement de la biomasse. Le DP de la cellulose dans les parois secondaires est de l'ordre de 13000 à 14000, alors qu'il est plus faible dans les parois primaires avec un DP variant entre 2000 et 6000 (Somerville et al.,

2004 ; O'Sullivan, 1997). Les monomères  $\beta$ -D-glucose sont reliés entre eux par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1,4). Le cellobiose, motif de base de la cellulose est formé par deux unités glucose. Sa longueur estimée est de 1,03 nm (Fig. 2). De multiples liaisons hydrogènes intrachaînes confèrent une linéarité à la chaîne de glucose. Les chaînes linéaires de cellulose sont associées entre elles par de nombreuses liaisons hydrogène ainsi que des interactions de type Van Der Waals, conduisant à la formation de microfibrilles dont le diamètre varie de 2 à 4 nm chez les plantes supérieures (Atalla et VanderHart ,1999).

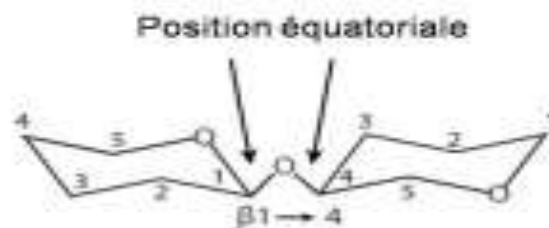


**Figure 2 :** Représentation schématique de la structure chimique de la cellulose (Brown, 2004).

### 1.1.2. L'hémicellulose

L'hémicellulose est la seconde source de polysaccharide non cellulosiques se distinguant de la cellulose par le fait qu'ils soient des polymères hétérogènes (hétéro-polysaccharides) à chaînes plus courtes et branchées de la biosphère et représente entre 15 et 35% de la matière sèche des parois cellulaires végétales et est le principal composant du son de blé, représentant près de 30 à 40% de la matière sèche (Wertz, 2011).

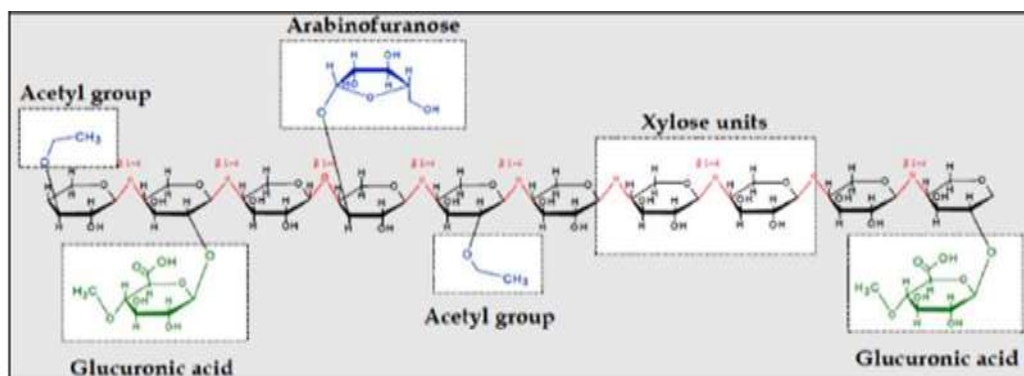
Les hémicelluloses regroupent un ensemble d'hétéro-polysaccharides représentant environ 20 à 40 % de la biomasse lignocellulosique (Saha, 2003). Ces polysaccharides ont un squelette composé des résidus  $\beta$ -(1,4)-D-pyranose où le C1 et le C4 sont en position équatoriale (Fig. 3).



**Figure 3 :** Structure de base du squelette  $\beta$ -(1,4) d'hémicellulose.

La chaîne principale peut être ramifiée par des substitutions ou de courtes chaînes latérales pour former des groupes de sucres hétérogènes. Les sucres monomères sont constitués de sucres neutres, de type pentose (xylose et arabinose) et hexose (galactose et mannose) ainsi que des acides uroniques (acide galacturonique et acide glucuronique) (Fig.4) (Scheller et Ulvskor, 2010).

Ces constituants vont donner naissance à des composés aux structures variables selon les espèces, des tissus et leur stade de maturité ainsi que les autres constituants pariétaux (Buchala et al.,1973).



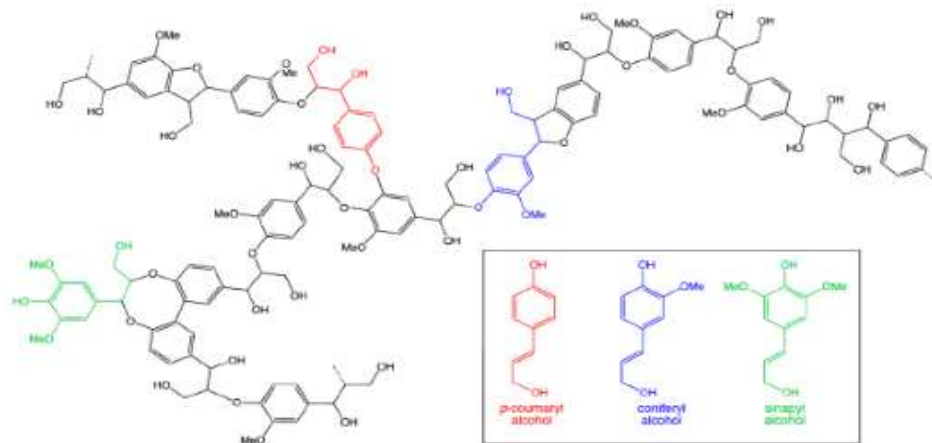
**Figure 4 :** Représentation des différentes structures des hémicelluloses (Mussatto et al., 2012).

Les hémicelluloses sont classés en quatre groupes principaux, à savoir ;

- **Les xyloglucanes :** Il s'agit de chaînes formées d'unités glucose reliées entre elles par des liaisons  $\beta$ -(1,4) et de courtes chaînes latérales de xylose. Les xyloglucanes sont principalement présents dans les parois primaires.
- **Les xylanes :** Ce sont des polymères linéaires dont la chaîne principale est constituée d'unités xylose liée en  $\beta$ -(1,4) et ramifiée par des substituants en proportion variable (arabinose, arabinose féruloyle, groupes acétyles, acides glucuronique et son dérivé 4-O-méthyle). Les xylanes sont majoritaires de l'hémicellulose.
- **Les mannanes :** Ils sont formés d'unités mannose et glucose liées en  $\beta$ -(1,4) et sont absents chez les graminées et présents en faible proportion chez les Angiospermes.
- **Les  $\beta$ -glucanes :** Ils sont formés d'unités D-glucose reliées entre elles par des liaisons  $\beta$ -(1,3) ou  $\beta$ -(1,4), ce sont des constituants minoritaires des tissus lignocellulosiques.

### 1.1.3. Lignine

La lignine est le troisième composant principal de la lignocellulose, représente 15 à 30% de la matière organique. La lignine, du latin «lignum» qui signifie bois, constitue la fraction non saccharidique, c'est le terme générique utilisé pour désigner des composés polyphénoliques réticulés résultant de la condensation radicalaire de trois alcools phénylpropène ou monolignols: l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique, formant une structure amorphe non soluble dans l'eau (**Taherzadeh et Karimi, 2008**).



**Figure 5 :** Structure de la lignine.

## 1.2. Source de la biomasse lignocellulosique

Les déchets lignocellulosiques sont produits en grande quantité par divers secteurs tels que la sylviculture, la papeterie, l'agriculture et l'industrie alimentaire, en plus de divers déchets ménagers (Tableau I). Ces déchets représentent le potentiel le plus important en biomasse et constituent actuellement un enjeu considérable. 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; Yuan et al., 2008**).



**Tableau n°I.** Composition chimique et production mondiale des principaux déchets Lignocellulolytiques (L.C) (Sanchez, 2008 ; Dashtban et al., 2009 ; Moor et al., 2011)

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

La paille et le son de blé semblent être les substrats les plus pertinents pour leurs valorisations par voie biologique en composés d’intérêt industriel. La structure précise de leur biomasse lignocellulosique est difficile à établir, toutefois leurs compositions moyennes peuvent être déterminées.

#### ➤ **Paille de blé**

La fraction la plus importante de la paille de blé est la cellulose, suivie par l’hémicellulose. La somme de ces deux fractions dite holocellulose représente plus de 66% ± 11% de la masse sèche de la paille de blé, ce qui en fait un substrat intéressant pour sa valorisation en molécules plateformes dérivées de cellulose et d’hémicellulose. Comme nous avons pu le mentionner précédemment, il n’existe pas un propre lignocellulose mais une vaste diversité de biomasses lignocellulosiques différenciables par leur composition et leur structure physique et chimique. Aux vues de la variabilité de composition d’échantillons de paille de blé, il semble qu’il existe aussi une diversité de paille de blé, potentiellement expliquée par l’âge des plantes, leurs conditions et environnement de culture et de stockage. La composition biochimique de la paille de blé comprend de 37.6% de cellulose, de 28.8% d’hémicellulose dont 19.5% sont des xylanes, de 14.5% de lignine, et de 3.8% de protéines (Lazuka, 2018).

#### ➤ **Le son de blé**

Le son de blé représente entre 11 et 15% de la masse totale du grain de blé et son rôle est de protéger la graine. La composition biochimique du son de blé industriel comprend de 22 à 25% de (glucurono) arabinoxylanes, de 14 à 17% de protéines, de 7 à 11% de cellulose, de 3 à

10% de lignine, des  $\beta$ -glucanes à liaisons mixtes et de 11 à 30% d'amidon résiduel selon le mode de fractionnement. Au total, les polysaccharides hors amidon représentent environ 46% du son de blé industriel, dont près de 70% sont des (glucurono) arabinoxylyanes (**Hemery et al., 2007; Kabel et al., 2006; Maes et Delcour, 2001**).

## **2. Dégradation de la biomasse lignocellulosique**

Les trois composés de la lignocellulose sont assemblés dans des structures complexes et très récalcitrantes. L'organisation de la cellulose en couches de microfibrilles, la structure complexe de la lignine et la grande diversité et l'hétérogénéité de l'hémicellulose renforcent la protection de la lignocellulose face aux attaques enzymatiques (**Bomble et al., 2017**). Sa dégradation implique un cocktail enzymatique, qui vont se compléter et agir en synergie. Ces enzymes se classent toutes parmi les «*Carbohydrate-Active enZymes* » ou communément appelées CAZymes (**Lombard et al., 2014**). La base de données CAZy (<http://www.cazy.org/>) regroupe les enzymes connues capables de dégrader, modifier ou créer des ponts glycosidiques.

### **2.1. Techniques de prétraitement de la biomasse lignocellulosique**

Le prétraitement de la biomasse lignocellulosique a pour but de déstructurer la rigidité macroscopique de la biomasse, de réduire la barrière physique au transfert de masse des agents chimiques ou enzymatiques et de lever les limitations dues à la structure physicochimique et à la nature des composés de la biomasse.

#### **2.1.1. Prétraitements physique ou chimique**

De nombreux types de prétraitements peuvent être utilisés (Tableau II) dans le procédé de conversion par voie biochimique dont le choix variera en fonction de la matière première et de l'intégralité du procédé (efficacité du prétraitement et coût relatif à l'économie de production).

**Tableau n° II.** Divers méthodes des prétraitements de la biomasse lignocellulolitiques (Kumar et al., 2008; Saratale et al., 2008; Zhang et al., 2009)

Procédés de prétraitement	Type	Source	Avantage	Limite et inconvénients
<i>Prétraitement physique</i>	Mécaniques	Fraisage, broyage, extrusion, pressage.	Réduit la cristallinité de la cellulose.	La consommation d'énergie est généralement plus élevée que l'énergie inhérente.
	Auto - hydrolyse	Pression de vapeur, explosion de vapeur, hydrotermolyse, vapeur et cisaillement mécanique, pyrolyse, expansion thermique sèche, expansion thermique humide.	Provoque la dégradation de l'hémicellulose et la transformation de la lignine ; Rentable.	Destruction d'une partie de la fraction xylane ; Rupture incomplète de la matrice lignine-hydrate de carbone.
	Irradiation	Gamma, faisceau d'électrons, photo-oxydation.	Augmente la surface accessible, élimine dans une certaine mesure la lignine et hémicellulose.	Non efficace pour la biomasse à forte teneur en lignine.
<i>Prétraitement chimique</i>	Alkali	Hydroxyde de sodium, hydroxyde d'ammonium.	Hydrolyse l'hémicellulose en xylose et autre sucre ; Altère la structure de la lignine.	Long temps de séjour requis ; Formation de sel irrécupérables et incorporation dans la biomasse.
	Acides	Acide sulfurique dilué ou concentré/ Acide chlorhydrique, nitrique, phosphorique, acétique.	Elimination des hémicellulose et la lignine ; Augmentation de la surface accessible.	Cout élevé : corrosion des équipements ; formation de substances toxiques.
	Agents oxydants	Acide peracétique, hypochlorite de sodium, chlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène.	Augmente la surface accessible ; Elimine la lignine et hémicellulose dans une certaine mesure.	Couteux et peu efficace pour la biomasse.
	Solvants	(Organosolv) Méthanol, éthanol, butanol, phénol, éthylamine, éthylène glycol.	Hydrolyse la lignine et les hémicelluloses.	Les solvants doivent être drainés du réacteur, évaporés, condensés et recyclés ; Cout élevé.
	Gaz	Ammoniac, chlore, oxyde nitreux, ozone, dioxyde de soufre.	Réduit la teneur en lignine ; Ne produit pas de résidus toxiques ; Augmente la surface accessible rentable ; ne provoque pas la formation de composés inhibiteurs.	Ne modifie pas la lignine ni les hémicelluloses ; Grande quantité d'ozone nécessaire couteux.

### 2.1.2. Prétraitement par des micro-organismes lignocellulolytiques

Dans la nature, les champignons et les bactéries sont les principaux décomposeurs de la lignocellulose (**Bomble et al., 2017**) qui font d'eux la première source d'intérêt dans la recherche de nouvelles CAZymes.

Il existe trois groupes principaux de champignons: la pourriture blanche, la pourriture brune et les champignons de la pourriture molle. Pour les bactéries, il existe quatre classes : les actinomycètes, les  $\alpha$ -protéobactéries, les  $\beta$ -protéobactéries et les  $\gamma$ -protéobactéries. Quant aux enzymes on peut les classer en cellulases, hémicellulases, pectinases, et ligninases.

Les champignons filamenteux sont les principaux responsables de la dégradation de la matière organique végétale, La plupart sont lignocellulolytiques (**Mandels and Weber, 1969**). Ils sont aérobies, hétérotrophes, saprophytes ou parasites. Ils préfèrent un environnement acide, mésophile et se développent entre 5 et 37°C (**Madan and Thind, 1998**).

Les champignons filamenteux jouent un rôle important dans la production industrielle de protéines et d'enzymes. Ils sont utilisés 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 d'hémicelluloses (**Balan et al, 2013**).

Les champignons cellulolytiques sont regroupés en espèces de pourriture blanche, de pourriture brune et de pourriture molle ; Les champignons de la pourriture blanche peuvent métaboliser la lignine ; ceux de la pourriture brune dégradent les composants de la cellulose et hémicelluloses et exercent peu d'effets sur la lignine. Les espèces de la pourriture molle 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 Copinet, 2009**).

- **Le genre *Trichoderma*** : Le genre *Trichoderma* regroupe des champignons imparfaits saprophytes, produisent des quantités importantes d'exo-enzymes capables d'hydrolyser complètement la lignocellulose (**Makut et Godiya, 2010**).

- **Le genre *Aspergillus*** : Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont capables de produire des lignocellulases. Cependant, ces enzymes sont généralement riches en endoglucanase et  $\beta$ -glucosidases mais pauvres en cellobiohydrolase, par conséquent une action limitée sur la cellulose microcristalline.

### 2.1.3. Prétraitement enzymatique

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).

**Tableau n° III.** Prétraitements enzymatiques (Kumar et al., 2008; Saratale et al., 2008; Zhang et al., 2009).

Type de procédé	Source	Avantage	Inconvénient
<i>Enzymes cellulolitiques</i>	<b>Enzymes dégradant la cellulose</b>		En raison du cout des enzymes, le processus devient couteux
	-Endoglucanases (EC 3.2.1.4)	Augmente la surface accessible ; Ne provoque pas la formation de composés inhibiteurs.	
	-Exoglucanase (EC 3.2.1.91)	Hydrolyse de la cellulose en sucres fermentable pour la production de biocarburants.	
	-B-glucosidase (EC 3.2.1.21)	Faible besoin en énergie et conditions de réaction douces.	
	-Cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20)	Grande spécificité en substrat, rendement élevé en sucre et efficacité élevée de l'hydrolyse.	
	<b>Enzymes dégradant l'hémicellulose</b>		
	Endoxylanase (EC 3.2.1.8)	Dépolymérisation de l'hémicellulose en sucre monomère pour la production de biocarburants et d'autres produits chimiques précieux.	
	Exoxylanase (EC 3.2.1.37)	Augmentation de la surface accessible ; ne provoque pas la formation de composés inhibiteurs ;	
	Xylosidase (EC 3.2.1.37)	Faible besoin en énergie et condition de réaction douce, haute spécificité du substrat, rendement élevé en sucre et haute efficacité de l'hydrolyse.	
	$\alpha$ -L-arabino-furanosidase (EC 3.2.1.55)		
<b>Enzymes de dégradation de la lignine</b>			

	-Lignine peroxydase (EC 1.11.1.14)  -Manganèse peroxydase (EC1.11.1.13)  -Laccases (EC1.10.3.2)	Outil biologique utile pour la dégradation de la lignine. Pour la délignification du bois et des résidus agricoles afin d'en augmenter la digestibilité. Augmente la surface accessible ; Ne provoque pas la formation de composés inhibiteurs.	
--	---	--	--

### 3. Biodégradation de la biomasse lignocellulosique par fermentation solide

La bioconversion de la biomasse fait référence au processus de fermentation en milieu solide (SMF) pour qu'il n'y a pas besoin d'un apport d'oxygène, et il y a moins d'émission de dioxyde de carbone et une plus faible consommation d'eau et d'énergie dans la biodégradation à l'état solide. La SMF est l'un des plus anciens procédés biotechnologiques connus au monde et est sans aucun doute le premier procédé technologique. **(Prevot, 2013).**

La fermentation en milieu solide (FMS) est un procédé technique qui reproduit les conditions de vie naturelles des microorganismes, en particulier des champignons filamenteux et supérieurs, en leur permettant de se développer (adhérence) à la surface d'un support. **(Holker, 2005 ; Duchiron et Copinet, 2011).**

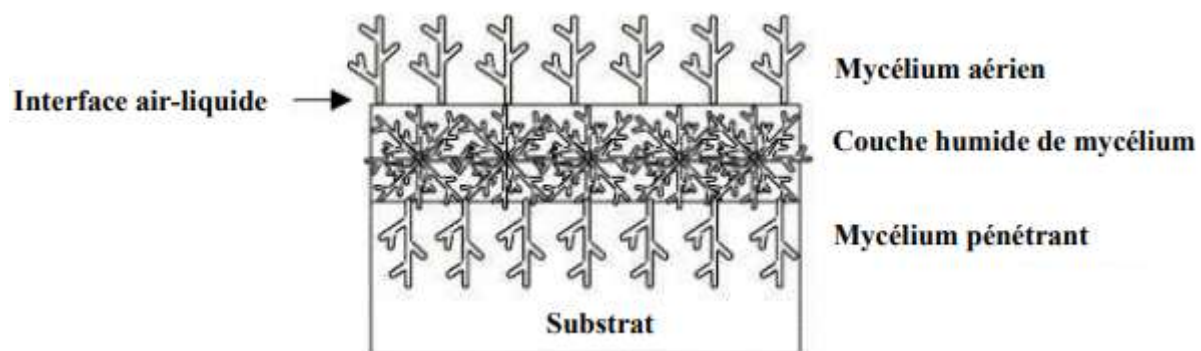
La FMS est donc constituée de trois phases : une matrice solide, une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. La capacité de rétention en eau des supports solides est variable et peut aller de 12 à 90%, soit 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 interparticulaires 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).



**Figure 6 :** Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS (Rahardjo et al., 2005).

#### 4. Fermentation mixte

La performance supérieure des cultures mixtes est basée sur le fait que dans la nature, la biodégradation de la biomasse lignocellulosique est réalisée par la coopération synergique d'une diversité de micro-organismes (Hu et al., 2011; Bader et al., 2010).

Les cultures mixtes en fermentation présentent de très bonnes performances, ce qui est essentiel pour la conversion microbienne. Des expériences à long terme et la mise en œuvre de la production de métabolites ont montré que de nombreux processus biochimiques importants doivent être réalisés par la co-culture de deux micro-organismes ou plus, ce que l'on appelle la fermentation mixte (Chen et Zhao 2006).

La fermentation mixte présente des avantages absolus, et de nouvelles substances seront produites au cours de cette fermentation, elle peut donc remplacer la production de SSF en culture pure dans de nombreux domaines. Ceci est notamment le résultat de l'effet synergique des micro-organismes mixtes. Parmi les micro-organismes, il existe différents

types d'effets synergiques, tels que ceux entre bactéries et bactéries, bactéries et champignons (**Yang et al. 2011**).

Cependant, il existe peu d'études sur les processus de la fermentation mixte. La production de cellulase par fermentation mixte est un moyen efficace pour l'utilisation des ressources naturelles en cellulose et des nombreux chercheurs se sont intéressés à la réalisation de cultures mixte qui est capables de transformer certains polymères comme la cellulose en sucres glucose et en méthane (**Zhao et al. 2012**).

L'application de cultures pures domine dans les processus biotechnologiques, mais grâce à l'application de cultures mixtes, le métabolisme combiné produit rendement plus élevé pour la production d'éthanol ; rendement plus élevé pour la production d'acide acétique ; augmentation de la teneur en vitamines dans les aliments fermentés (**Stoilova et al., 2005**).

Une étude particulière a été réalisée sur les cultures mixtes utilisées pour augmenter la production des enzymes tels que l'amylase, l'inulinase, la xylanase, l'endoglucanase et la B glucosidase.

La culture mixte en fermentation solide permet une plus grande capacité de pénétration du substrat et une vitesse de croissance plus lente, ce qui assure un équilibre optimal. La combinaison des cultures mixtes de champignons mycéliens permet une production encore plus élevée d'enzymes hémicellulases et cellulases, qui agissent en synergie, permettant de dégrader les déchets végétaux (**Stoilova et al., 2014**).

## **5. Saccharification et la bioconversion de la biomasse**

La lignocellulose peut être convertie en produits énergétiques, tels que l'éthanol, le méthane et l'hydrogène, par la fermentation de micro-organismes. Un bon processus de fermentation nécessite non seulement un microorganisme efficace mais aussi des conditions et un équipement optimaux pour exercer un potentiel de production suffisant. Les procédés de fermentation de l'éthanol carburant utilisant la lignocellulose comme matière première sont très différents de ceux de l'amidon et du sucre. Par exemple, l'hydrolysats de biomasse contient souvent des composants nuisibles aux micro-organismes de fermentation. De plus, l'hydrolysats contient davantage de xylose ( **Chen et al. 2008**). La lignocellulose doit être hydrolysée et fermentée après prétraitement pour obtenir de l'éthanol et d'autres produits biosourcés. Le premier processus est l'hydrolyse, puis la fermentation est utilisée, ce qui est appelé saccharification et fermentation séparées.



Lors de la saccharification industrielle, les sucres fermentescibles sont libérés de la biomasse lignocellulosique au cours d'un processus en deux étapes. La première étape consiste à utiliser des prétraitements physiques et/ou chimiques pour rendre les polysaccharides plus accessibles à l'hydrolyse enzymatique. La deuxième étape consiste à traiter la cellulose exposée avec des cocktails d'enzymes cellulolytiques commerciaux, généralement produits à partir de champignons filamenteux tels que *Trichoderma reesei*, qui dégradent ensuite la cellulose et les hémicelluloses en sucres simples **(Navarro et al., 2010)**.

L'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique implique l'adsorption des cellulases et hémicellulases à la surface des polysaccharides, la synergie entre les différentes enzymes et la libération des produits dans le liquide. Dans la littérature des nombreuses études pointent les paramètres structuraux comme les facteurs principaux de la biomasse lignocellulosique influençant l'hydrolyse enzymatique **(Zhao et al., 2012)**.

L'hydrolyse de la cellulose dans ces cocktails est généralement effectuée par un consortium d'endoglucanases, de cellobiohydrolases et de  $\beta$ -glucosidases **(Gilbert, 2010)**. La saccharification de la biomasse végétale en sucres fermentescibles représente le principal obstacle au développement de biocarburants cellulose compétitifs en termes de coûts. Ces coûts de transformation pourraient être réduits efficacement en produisant soit des enzymes plus efficaces, soit une biomasse végétale plus digestible.

L'une des grandes complexités de cette dégradation enzymatique est l'aspect synergique de la catalyse progressive de la cellulose. Ce modèle synergique est basé sur le cas le plus étudié des cellulases de *T. reesei*. Les endoglucanases découpent tout d'abord aléatoirement la cellulose dans les régions amorphes accessibles. Les exocellulases récupèrent les extrémités libres des polymères de cellulose afin de progressivement les hydrolyser sous forme de cellodextrines hydrosolubles. Enfin, les  $\beta$ -glucosidases achèvent la saccharification en catalysant la production de glucose à partir du cellobiose en solution **(Zhang et al., 2009)**. L'autre intérêt de cette synergie est aussi de progressivement dégrader les produits de catalyses antérieures afin de limiter l'effet d'inhibition lié à leur accumulation, en particulier sur les endo et exoglucanases.

---

*Chapitre II*  
*Matériel et Méthodes*

---

## 1. Matériel biologique

Les souches fongiques utilisées pour la production des complexes enzymatiques ont été isolées d'une parcelle forestière parsemée d'oliviers dans la région d'IGHRAM à Akbou, située à 83,5km de la ville de Bejaia, située au Nord-Est de l'Algérie, et appartenant à la collection de Laboratoire de Microbiologie Appliquée "LMA" (Université de Bejaia). Les isolats ont été identifiés sur la base des caractéristiques morphologiques, combinées aux données de séquence de leurs régions Intercalaires d'ADNr (Internal Transcribed Spacer; ITS), et ont été authentifiées comme étant *Aspergillus niger* strain BG et *Trichoderma afroharzianum* isolat AZ 12 (Azzouz et al., 2020a, 2020b).

Les colonies de moisissures caractérisées par leur aspect filamenteux sont repérées sur le milieu CMC-Agar-Gentamicine qui permet une croissance lente et graduelle, elles sont repérées dès leur apparition par leur aspect filamenteux caractéristique. Les repiquages successifs sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA, Thermo Fisher Scientific) additionné de gentamycine, permettent un développement optimal et une purification des souches qui sont ensuite incubées à 28 °C pendant 7 jours, puis stockées à 4 °C. Les souches pures sont été conservées sous forme de suspension de spores et de mycelium dans 25% (v/v) de glycérol stérile à -20 °C (Abu Bakar et al., 2010; Gautam et al., 2011).

### 1.1. Remise en culture et préparation de la solution sporale

La remise en culture des souches d'*Aspergillus niger* et *Trichoderma afroharzianum* a été systématiquement effectué à partir des cryotubes servant à l'inoculation d'une série de boîte de Pétri contenant le milieu gélosé PDA (Potato Dextrose Agar). Après 7 à 10 jours d'incubation à 28°C, des suspensions de conidies sont prélevées en aspergeant les milieux avec une solution de tween à 0,1% (v/v), puis en grattant la surface avec une pipette. Les spores sont recueillies dans des bouteilles stérilisées et ces suspensions ont ensuite utilisées pour inoculer les cultures en milieu solide. Le comptage des spores est effectué dans une cellule Malassez (Marienfeld, Allemagne) sous un microscope optique. La charge de l'inoculum est exprimée comme la quantité de spores par millilitre de solution sporale (Ang et al., 2015; Handa et al., 2014; Sandhu et al., 2013).

## **2. Production des enzymes lignocellulolitiques par fermentation solide par culture mixte d'*A. niger* et *T. afroharzianum***

### **2.1. Préparation de substrat de fermentation**

Les échantillons de paille et de son de blé sont les matières premières utilisées comme seul source de carbone dans cette étude, ils sont récoltés au niveau des minoteries et agriculteurs de la région d'Akbou. Tous les substrats sont lavés à l'eau distillée, séchés au four pasteur à 80°C pendant 48 heures (h) puis stockés à température ambiante dans des récipients étanches à l'air (Menezes et al., 2017). Ils sont ensuite broyés en petites particules à l'aide d'un mixeur (DAEWOO, France). Un tamisage est réalisé pour les substrats broyés afin d'obtenir respectivement de la poudre de son et de paille de blé, stockées à température ambiante dans des récipients étanches à l'air. (Narra et al. 2014, TAO et al., 2010 ).

Avant le lancement de la fermentation, Le taux d'humidité de la paille et du son de blé sont déterminées par dessiccation à l'aide d'un dessiccateur à infrarouge (MOC-120 H-, Shimadzu, France).

### **2.2. Production des enzymes lignocellulolitiques par fermentation solide**

Selon les résultats obtenus par AZZOUZ Zahra (2021), la paille et le son de blé sont valorisés pour produire des enzymes cellulosiques et xylanasiques par fermentation mixte avec les deux souches *A. niger* et *T. afroharzianum*. Cette fermentation est guidée par le biais de plusieurs paramètres à savoir la durée d'incubation, la température, l'humidité et la concentration du substrat (paille/son de blé).

De ce fait, l'optimisation de la production par la méthode one factor at a time suivie et l'utilisation de la méthodologie de la surface de réponse (RSM), via le plan d'expérience de Box-Behnken (BBD) sont réalisés, les valeurs optimales des variables sont déterminées à partir de bases de données générées avec le logiciel statistique (Design Expert 11.6.0). Les conditions optimales sont proposées en exécutant les 02 essais avec l'optimisation numérique dans les modèles (tableau 1). Les conditions optimales pour la production de xylanases et CMCases proposées par le modèle BBD dans la fermentation mixte sont présentées dans le tableau n° VI.

**Tableau n° VI.** Conditions optimales pour la production de xylanases et CMCases proposées par le modèle BBD dans la fermentation mixte.

Essai	Temps d'incubation (Jours)	Température d'incubation (°C)	Humidité (%)	Ration Paille/Son	Nombre d'essai
01	7 jours	32°C	94%	6g /4g	05
02	7 jours	28°C	85%	6g /4g	05

### 2.2.1. Réalisation de la fermentation solide

Les cultures sont effectuées dans 10 fioles d'Erlenmeyers de 500 mL à col large, contenant chacun 10 g de substrat (6g de paille de blé et 4 g de son d blé), humidifié les substrats à 94% (5 erlenes) et à 85% (5 erlenes) avec la solution minéral Mandel et Weber (MW) à pH 5 (Mandel and weber, 1969).

Les Erlen sont fermés avec du coton cadré suivi autoclavage à 121°C pendant 20 minutes. Une fois refroidies, ils sont inoculés à un taux de  $1.10^4$  spores/g de substrat ( $5.10^3$  spore/mL de *T.afroharsiunum* et  $5.10^3$  spore/ml d'*A. niger*), et l'ensemble est bien homogénéisé à l'aide d'une spatule stérile, les erlenes sont fermés avec du coton cardé et recouvert avec le papier aluminium. Les cultures sont ensuite incubées durant 7 jours à des températures mentionnées dans le tableau n° VI (28°C et 32 °C) (étuve, Muve incubator EN055, Turquie) afin de déterminer une meilleure température pour la production d'enzyme cellulolytique, hémicellulolytique, et lignolytique de la culture mixte des souches d'*A. niger* et *T. afroharzianum* sur la paille et le son de blé, nous avons incubé les erlenes de fermentation solide à deux températures différentes, à savoir 28°C et 32°C.

### 2.2.2. Récupération des enzymes produites

A la fin de l'incubation, les complexes enzymatiques produits ont été extraits en homogénéisant 10 g de substrat fermentés avec 100 mL d'eau distillée pour chaque erlen, l'homogénéisation est réalisée dans un mixeur (MOULINEX, France) pendant 2 min 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 hémicellulosique et cellulosique du substrat solide.

La suspension obtenue a ensuite été centrifugée (Rotina 380R, Allemagne) à 10 000 g et 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu constitue les extraits enzymatiques bruts qui sont conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure.

Les étapes de la SMF sont illustrées dans la figure 7.



**Figure 7** : photographie des étapes de fermentation solide, A ; Détermination d'humidité à l'aide d'un dessiccateur infrarouge, B ; Substrat paille/son de blé dans des Erlen de 500mL à col large et C ; Cultures de fermentation solide après stérilisation.

## 2.3. Dosage des activités enzymatiques

### 2.3.1. Dosage des activités cellulolytiques

L'hydrolyse de la cellulose fait intervenir trois types d'enzymes à savoir endoglucanase (CMCase), exoglucanase et  $\beta$ -glucosidase.

#### a. Dosage de l'activité endoglucanase (CMC ase)

Cette activité a été déterminée selon la méthode de **Bailey et al.,(1992)** avec les modifications suivantes : 0,1 mL de complexe enzymatique sont ajoutés à 900 ml de substrat carboxyméthyl cellulose (CMC) (Sigma Aldrich, USA) préparé à raison de 2% dans du tampon citrate (50 mM ; pH 5). Une cinétique d'hydrolyse a été réalisée à 50°C durant 10 min. 1,5mL de DNS (acide 3, 5-dinitrosalicylique) sont ajoutés au mélange réactionnel, suivi d'un chauffage à 100°C pendant 5 minutes. Pour déterminer les sucres réducteurs libérés, l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à  $\lambda_{\max}=540\text{nm}$  puis l'activité est calculée.

La concentration de glucose libéré est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage avec des concentrations variables en glucose à partir d'une solution mère de 2g/l. Une unité « glucose » est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une  $\mu\text{mole}$  de sucres réducteurs, de sucre réducteur équivalent au glucose par minute dans les conditions du test (**Miller, 1959**).

**b. Dosage de l'activité Exoglucanase (avicelase)**

Cette activité a été déterminée selon la méthode de Bailey (**Bailey et al., 1992**), avec quelque modification. La solution d'Avicel à 2% (p/v) est préparée dans un tampon citrate de sodium (50 mM ; pH 5) et l'activité exoglucanase est mesurée en suivant la même méthode que celle décrite dans l'activité CMCase en remplaçant la solution CMC par la solution Avicel.

La concentration de glucose est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage avec des concentrations variables en glucose à partir d'une solution mère à 2g/l. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540nm.

**c. Dosage de l'activité  $\beta$ -glucosidase**

Cette activité a permis de quantifier l'action des  $\beta$ -glucosidases et a été déterminée à partir du protocole de Norkrans (**Norkrans, 1957**). L'activité  $\beta$ -glucosidase a été déterminée en utilisant le p-nitrophényl- $\beta$ -D-glucopyranoside (pPN-G ; Sigma-Aldrich). La libération de p-nitrophénol ( $\epsilon_{410}=15,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) est mesurée par spectrophotométrie à 410nm. Le mélange réactionnel est composé de 100 $\mu$ l, de tampon citrate de sodium 50 mM (pH 5) contenant 3,5mM (0.2%) de pNPG et de 100 $\mu$ l de la dilution appropriée de l'extrait brut de culture. Les essais sont incubés à 50°C pendant 10 min et les réactions sont arrêtées par l'addition de 500 $\mu$ l de 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

La concentration en xylose est déterminée par la courbe d'étalonnage de glucose. Une unité «  $\beta$ -glucosidase » a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une  $\mu$ mole par minute selon les conditions réactionnelles.

**d. Dosage de l'activité total (papier filtre)**

Cette activité a permis de quantifier l'action globale du complexe cellulolytique et a été déterminée selon le protocole de l'IUPAC (**Ghose, 1987**). La méthode est décrite dans le tableau n° V.

**Tableau n° V.** Dosage de l'activité papier filtre (**Ghose, 1987**).

	<b>Gamme</b>	<b>Témoin enzyme</b>	<b>Enzyme</b>
Papier filtre (bandelette 1.0*3.0 cm soit 25 mg)	/	/	1
Tampon citrate de sodium (50 mM; pH 4.8) ( $\mu$ l)	500	500	500
EQUILIBRER à 50°C pendant 10 min			
Glucose ( $\mu$ l)	250	/	/
Enzyme ( $\mu$ l)	/	250	250
INCUBER pendant 60 min à 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 la pulpe			
PRELEVER 500 $\mu$ l de milieu réactionnel et ajouter 1.0 ml d'eau déminéralisée			
MESURER l'absorbance à 540 nm contre de l'eau minéralisée.			

### 2.3.2. Dosage des activités hémicellulolytique

#### a. Dosage de l'activité Endoxylanase

L'activité endoxylanase a été déterminée par dosage de sucres réducteurs libérés par la méthode de Miller (Miller 1959). En utilisant le même protocole décrit dans le dosage de l'activité CMCCase, en remplaçant le substrat CMC avec ce de xylane de bouleau, préparer dans un tampon citrate de sodium (50 mM- pH 5) à raison de 2% (p/v).

La concentration de glucose est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage avec des concentrations variables en xylane à partir d'une solution mère à 2g/L. L'absorbance est mesurée une longueur d'onde 540nm.

Une unité « xylanase » a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une  $\mu$ mole de sucres réducteurs, équivalent xylose, par minute selon les conditions réactionnelles.



### b. Dosage de l'activité $\beta$ xylosidase

L'activité  $\beta$  xylosidase est déterminée à l'aide du substrat p-nitrophényl- $\beta$ -D-xylopyranoside (pNP-X ; Sigma-Aldrich) et mesurée en suivant la même méthode décrite dans la mesure de l'activité  $\beta$  glucosidase, en remplaçant la solution pNP-Glucopyranoside à 0.2% par la solution pNP-Xylopyranoside à 0.2% et l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 410nm. La concentration en xylose est déterminée par la courbe d'étalonnage de xylose. Une unité d'activité  $\beta$ -xylosidase a été définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1  $\mu$ mol de pNPX par minute.

### c. Autre activité hemicellulolytique

Les activités  $\alpha$ -L -arabinofuranosidase,  $\beta$ -D-galactopyranosidase,  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase, B-D-arabinopyranosidase,  $\beta$ -D-fucopyranosidase,  $\beta$ -D-cellubiosidase,  $\alpha$ -D-galactopyranosidase,  $\alpha$ -D-glucopyranosidase,  $\alpha$ -D-xylopyranosidase, et  $\beta$ -D xylobiosase ont été testées avec les substrats nitrophényles : pNP-  $\alpha$ -L -arabinofuranoside, pNP- $\beta$ -D galactopyranoside, pNP- $\alpha$ -L rhamnopyranoside, pNP-B-D-arabinopyranoside, pNP- $\beta$ -D fucopyranoside, pNP- $\beta$ -D cellubioside, pNP- $\alpha$ -D galactopyranoside, pNP- $\alpha$ -D glucopyranoside, pNP- $\alpha$ -D xylopyranoside, et pNP- $\beta$ -D xylobiose, (Sigma-Aldrich), à une concentration finale de 3.5 mM et les activités ont été mesurées par la quantification du nitrophénol libéré dans chaque substrat.

#### 2.3.3. Calcul des activités mesuré par la méthode DNS

Les activités enzymatiques mesurées par dosage de sucres réducteurs libérés avec la méthode de Miller (**Miller 1959**) sont calculées comme suites :

-Absorbance= Absorbance enzyme - absorbance témoin enzyme

-Construction d'une droite d'étalonnage en utilisant les quantités absolues de glucose libéré, pour convertir les absorbances des échantillons en quantité absolues de glucose libéré puis l'activité enzymatique est calculée selon la formule suivante ;

$$\begin{aligned} \text{Activité Enzymatique} &= \left[ \frac{\text{quantité de glucose libéré (mg)}}{\text{masse molaire de sucre libéré}} \right] \times \frac{\text{volume de mélange réactionnel (mL)}}{\text{volume de l'enzyme (mL)} \times \text{temps d'incubation (min)}} \\ &= \mu \text{ mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \\ &= \text{U /ml} \end{aligned}$$

### 2.3.4. Dosage des activités ligninasiqes

#### a. Activité peroxydase

L'activité peroxydase est mesurée par deux méthodes ;

- Dosage avec le substrat Guaiacol :

Dans un tube a hémolyse, 0.1 mL de tampon citrate de sodium (50mM ; pH5) est mélangé avec 0.1mL de substrat guaiacol (Catechol monomethyl ether, 2-Methoxyphenol, Pyrocatechol monomethyl ether, G5502, Sigma-Aldrich, Allemagne), 0.2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 0.3mL d'eau distillée ensuite 0.2 mL de l'extrait enzymatique est ajouté au mélange réactionnel, l'absorbance est mesuré directement après l'ajout de l'enzyme à une longueur d'onde de 465nm ( **Sumiatiet al.,2022**).

- Dosage avec le substrat ABTs (L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique, Sigma-Aldrich ) :

Dans un tube a hémolyse, on mélange 850µl d'ABTs avec 100µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et 50µL de l'extrait enzymatique suivit directement par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 465nm.

#### b. Activité laccasique

L'activité laccase est mesurée en utilisant la méthode décrite par **Sumiatiet al., (2022)**. Dans un tube a hémolyse, le mélange réactionnel est constitué de 950µl de ABTs et 50µl de l'extrait enzymatique, une mesure de l'absorbance a été effectuée juste après contact de l'enzyme avec l'ABTs à une longueur d'onde de 436nm (**Sumiatiet al., 2022**).

#### c. Calcule de l'activité laccasique et peroxydase

Les activités enzymatiques ont été calculées par l'équation suivante avec une absorptivité molaire ( $\epsilon$ ) de 36 000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (**Yanto et al 2021**).

$$\text{Activité Enzymatique (U/mL)} = \frac{[(\text{Abs}(t \text{ min}) - \text{Abs}(0 \text{ min})) * \text{Volume total (mL)} * 10^3]}{[\epsilon * \text{volume enzyme (mL)} * t \text{ (min)}]}$$

Abs t (min) et Abs 0 (min) sont les absorbances a t=1min et t = 0min, 10<sup>3</sup> est le facteur de correction (µmol/mol).

## 2.4. Dosage des protéines

Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford en utilisant le réactif de Bradford et l'albumine de sérum bovin comme protéine (Bradford 1976), 200 µL de la solution de Bradford sont ajoutés à 800 µL de l'extrait enzymatique. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 595nm.

## 2.5. Saccharification de la biomasse lignocellulolytique

### 2.5.1. Prétraitement de la paille et de son de blé

L'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose native ne solubilise pas parfaitement la cellulose et l'hémicellulose. Des prétraitements sont généralement appliqués pour améliorer l'accessibilité des enzymes (Saha et al. 2005). Le peroxyde alcalin a été développé avec succès pour le prétraitement de la lignocellulose, et il s'est avéré efficace pour éliminer la lignine (Chen et al. 2008).

La paille et le son du blé sont les biomasses lignocellulosiques utilisées dans ce travail. Elles ont été séchées dans un four de laboratoire à 70 °C jusqu'à obtenir un poids constant. La biomasse séchée est broyée puis tamisée avec un diamètre de pore de 0.42mm.

Afin d'améliorer l'accessibilité des enzymes à la biomasse, un prétraitement à l'hydroxyde de sodium (NaOH) a été effectué selon la méthode de Silva et al. (2011). Brièvement, le résidu lignocellulosique est trempé dans une solution de NaOH à 0,5% (p/v) jusqu'à un rapport solide/ liquide de 1:20. Un traitement thermique est effectué ensuite à 50 °C dans un agitateur à 200 rpm pendant 1 h. Le matériau prétraité est refroidi dans un bain de glace, et le pH est ajusté à 5 par l'ajout d'une solution d'acide sulfurique à 72 %. Ensuite, la matière solide est séparée par centrifugation à 12.000 g et 4 °C/ 10 min suivie de trois lavages et centrifugation 12.000 g pendant 10 min. Cette matière première a été utilisée pour la saccharification.

### 2.5.2. Concentration de l'extrait enzymatique brut

Afin de procéder à la saccharification, l'extrait enzymatique est filtré avec papier Whatman N°1 puis l'extrait brut est concentré par ultrafiltration à l'aide d'appareils centrifuges Amicon Ultra-15 (figure 10) à un seuil de coupure de 3 kDa (Merck-Millipore).

Ce dernier est stérilisé par filtration en utilisant des membranes de 0,8, 0,45 et 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck-Millipore).



**Figure 8** : Photographie de l'Amicon Ultra-15 3kDa (a) et les filtres de stérilisation (b)

### 2.5.3. Hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique peut être convertie en sucres fermentescibles par l'action synergique d'enzymes comprenant des exo- et endoglucanases et des  $\beta$ -glucosidases. D'autres part les actions synergiques entre exo, endoxylanase et  $\beta$ -xylosidase sont nécessaires pour la dégradation du xylane et sont essentielles pour libérer de xylose, ainsi que d'autres enzymes auxiliaires (Guo, et al. 2018).

La capacité de l'extrait enzymatique de culture mixte à saccharifier la biomasse lignocellulosique a été évaluée par mesure de glucose libéré de la paille et du son de blé traités et non traités. L'extrait enzymatique produite par fermentation mixte des deux souches fongique *A. niger* et *T. afroharzianum* a été utilisés comme catalyseurs C'est un mélange contenu des activités cellulase et hémicellulase.

La biomasse lignocellulosique (5g) traité et non traitée a été saccharifiée dans des Erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL d'une solution enzymatique (1 U/mL provenant de la  $\beta$ -glu) dans un tampon citrate de sodium (50 mM), pH 5.0 (tableau n° VI). Les Erlenmeyer sont stérilisés à 121°C pendant 20 min, après refroidissement sont inoculés avec l'extrait enzymatique concentré, l'extrait enzymatique est ajouté a chaque Erlenmeyer par rapport à la capacité de 1U/mL de  $\beta$ -glucosidase à saccharifier la biomasse lignocellulosique.

Les réactions ont été effectuées dans un Shaker à 50 °C et à 180 rpm (Aissata Ousmane

**Kane, et al, 2022)** pendant 3h, 6h, 9h 12h, 24 h, 48h et 72 h. Le glucose libre a été mesuré à différents temps de réaction mesurant les sucres réducteur libérés.

**Tableau n° VI.** Condition de déroulement de la saccharification.

	Masse des substrats(g)		Quantité de tampon (ml)	Temps (Heure)	Température (°C)	Volume complexe enzymatique ajouté (µl)
	Paille de blé	Son de blé				
Non traité	5g	/	100ml	72h	50°C	244µl
	/	5g	100ml	72h	50°C	244µl
	3g	2g	100ml	72h	50°C	244µl
Traité	5g	/	100ml	72h	50°C	244µl
	/	5g	100ml	72h	50°C	244µl
	3g	2g	100ml	72h	50°C	244µl
Témoin non traité	5g	/	100ml	72h	50°C	/
	/	5g	100ml	72h	50°C	/
	3g	2g	100ml	72h	50°C	/
Témoin traité	5g	/	100ml	72h	50°C	/
	/	5g	100ml	72h	50°C	/
	3g	2g	100ml	72h	50°C	/

La concentration en sucres réducteurs a été estimée avec la méthode de Miller (Miller 1959). Pour cela, 50 µL d'échantillon ont été ajoutés à 450 µL d'eau distillé avec 750µL de réactif DNS, puis homogénéiser au vortex et mis à chauffer à 100°C pendant 5 minutes. Après refroidissement dans un bain d'eau glacée, une lecture de l'absorbance à 540 nm est effectué à l'aide un spectrophotomètreà 540nm. Une solution de glucose a servi de référence pour la réalisation d'une gamme d'étalonnage allant de 0 à 2 g/L.

#### **2.5.4. Analyse chromatographie sur couche mince (CCM) des produits de saccharification de la paille et de son de blé**

Les produits d'hydrolyse de la paille et de son de blé obtenus par association avec l'extrait enzymatique, sont analysés par CCM en utilisant des plaques de CCM

(POLYGRAM® SIL G/UV254, Macherey-Nagel, Allemagne) pour confirmer la présence de monosaccharides et d'oligosaccharides.

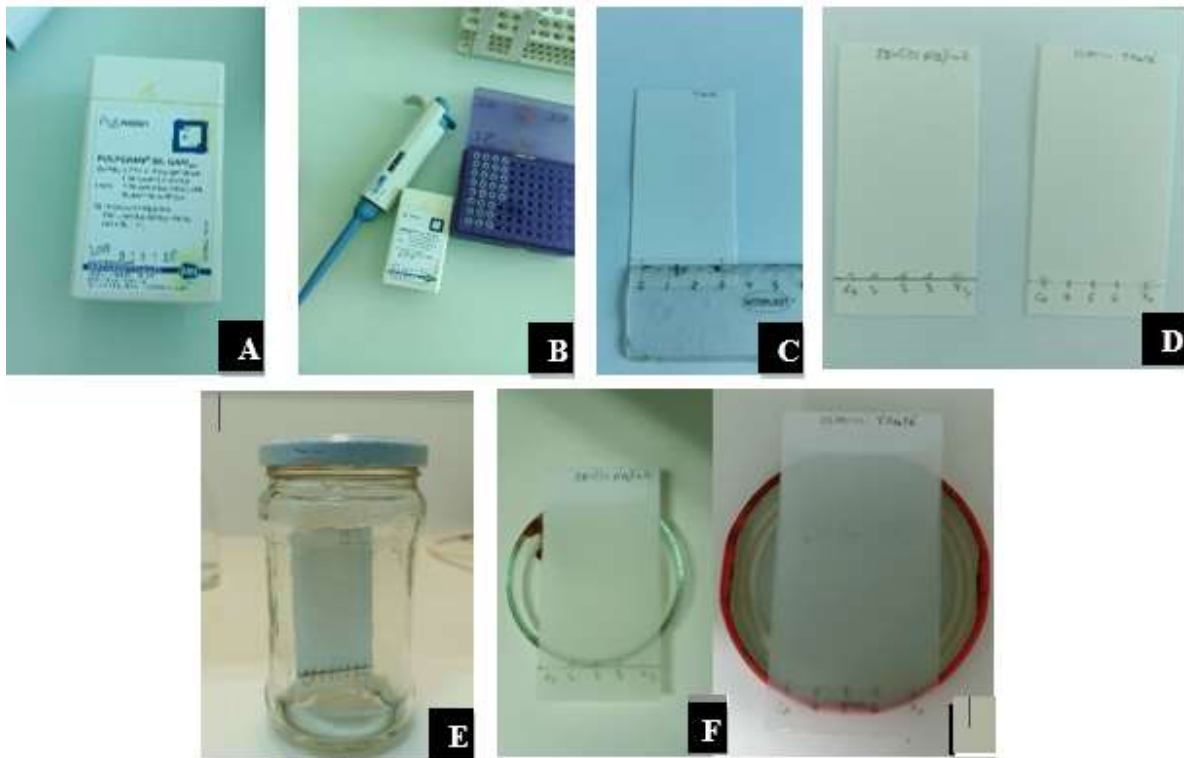
- A 1cm du bord inférieur de la plaque, on trace soigneusement une ligne (ligne de dépôt) avec un crayon, puis des lignes aux points des échantillons à déposer, en gardant 1cm entre chaque point et l'autre.

- On dépose avec une micropipette de 10  $\mu$ l sur les points des deux côtes de la plaque 5  $\mu$ l de la solution de xylooligosaccharide (xylose, xylobiose, xylotriose, xylo tétraose et xylopentaose) et cellooligosaccharide (glucose, cellobiose, cellotriose, cello tétraose et cellopentaose) est utilisée comme standard. Et pour chaque échantillon, 5  $\mu$ L du mélange d'hydrolyse sont déposés.

-Les plaques sont misent dans une cuve contenant la phase mobile butanol/acide acétique/eau (3:1:1, v/v/v) pour une séparation par capillarité.

-La cuve doit être fermée de manière à ce qu'elle soit saturée en vapeur d'éluant et placée sous la haute.

-Les plaques CCM sont séchées à l'air pendant 15 à 30 minutes et visualisées par pulvérisation de méthanol/acide sulfurique (95:5, v/v), suivie d'un chauffage à 110 °C pendant 10 minutes.



**Figure 9** : Photographie des étapes de la CCM ;(A) : Plaque a CCM. (B) : Matériel utilisé pour effectuer la CCM ; (C) : tracé la ligne de départ de la migration et l'emplacement des échantillons ;(D) : dépôts des échantillons ;(E) : mettre la plaque dans la phase mobile ;(F) : après 15min récupérer les plaque et laissé sécher a l'air libre

---

*Chapitre III*  
*Résultats et Discussion*

---



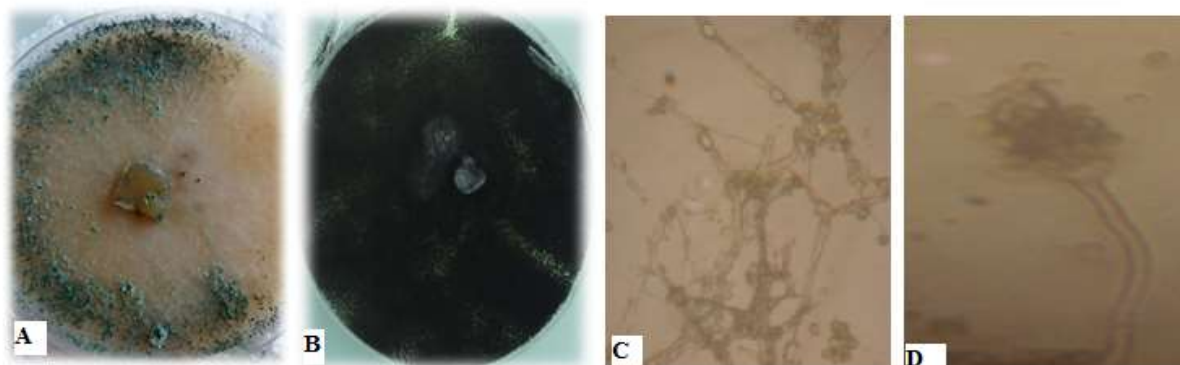
## 1. Caractérisation macro et microscopique des souches *Trichoderma afroharzianum* isolat AZ 12 et *Aspergillus niger* strain BG

L'analyse des caractères morphologiques des deux souches est réalisée après 7 jours d'incubation sur le milieu PDA, le plus communément utilisé. Les principaux caractères culturels des colonies à savoir : la vitesse de croissance des colonies, sur l'observation de la pigmentation au revers des boîtes se révèlent comme suit ;

- La souche *Trichoderma afroharzianum* isolat AZ présente ; une croissance très rapide et le mycélium envahit facilement le milieu. Le mycélium aérien est cotonneux blanc puis vert olive après sporulation (Fig. 10-A).
- La souche *Aspergillus niger* strain BG présente ; une croissance rapide, Un mycélium d'aspect velours, blanc cotonneux au départ devenant poudreux avec l'apparition de spores noires (Fig. 10-B).

L'observation microscopique a permis d'analyser les mycelia et les organes de fructification sans altérer leurs structures tel que les zoospores, les basidiospores et les sporangiospores ;

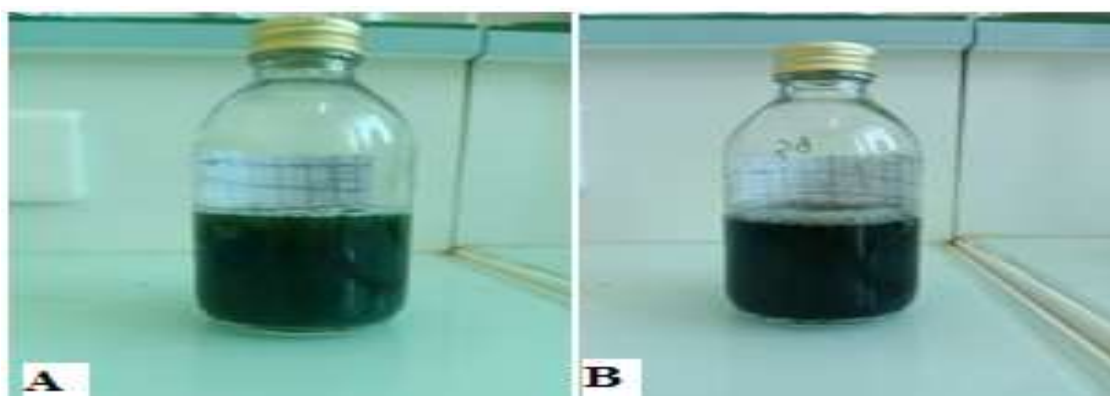
- *Trichoderma afroharzianum* isolat AZ ; Mycélium composé d'hyphes, septés, ramifiés. Des phialides ovoïdes et ellipsoïdales atténuées au sommet directement insérées sur le conidiophore et des conidies de couleur verte (Fig. 10-C).
- *Aspergillus niger* strain BG ; Le mycélium cloisonné est formé d'hyphes cloisonnées qui s'élargissent pour donner naissance à des conidiophores perpendiculaire à l'hyphe, forment un renflement à son extrémité appelé vésicule. Celle-ci porte les phialides qui donnent naissance aux spores mitotiques appelées conidies ou conidiospores (Fig.10-D).



**Figure 10 :** Principaux caractères cultureux des isolats sur milieu PDA (A et B) et Observations microscopiques (C et D) pour les souches *Trichoderma afroharzianum* isolat AZ 12 et *Aspergillus niger* strain BG respectivement.

- **Préparation de la solution sporale**

Après 7 jours d'incubation sur le milieu PDA, les spores des deux souches fongiques sont récupérées, puis un comptage est effectué sous microscope optique à l'aide de la cellule de Malassez, la concentration de la solution sporale obtenue est de  $5.7 \cdot 10^7$  spores/mL pour la souche *A. niger* et  $5.2 \cdot 10^8$  spores/mL pour *T. afroharzianum*.



**Figure 11 :** Solutions sporales de la souche *T. afroharzianum* (A) et *A. Niger* (B).

## 2. Production d'enzymes lignocellulolytique avec fermentation mixte à base de paille et du son de blé

L'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique nécessite la production d'enzymes lignocellulolytiques et la viabilité de ce procédé sur le plan économique. Beaucoup de travaux

rappellent la production des enzymes de type lignocellulolytique à partir de matières lignocellulosiques (Soni et al., 2010; Goldbeck et al., 2013; Bano et al., 2013 ; Azzouz et al., 2021). Les champignons couramment utilisés dans l'industrie de production des enzymes appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Trichoderma* et *Penicillium* en raison de leurs grandes capacités de production et de sécrétion. Par exemple, la souche de *Trichoderma reesei* peut atteindre des rendements de production de cellulases de 40 g/L (Moor et al., 2011).

L'état des érlens dans la fermentation mixte des souches d'*A. niger* et *T. afroharzianum* obtenu après 7 jours d'incubation sous la fermentation solide de paille et de son de blé sont représenté dans la figure 12 :



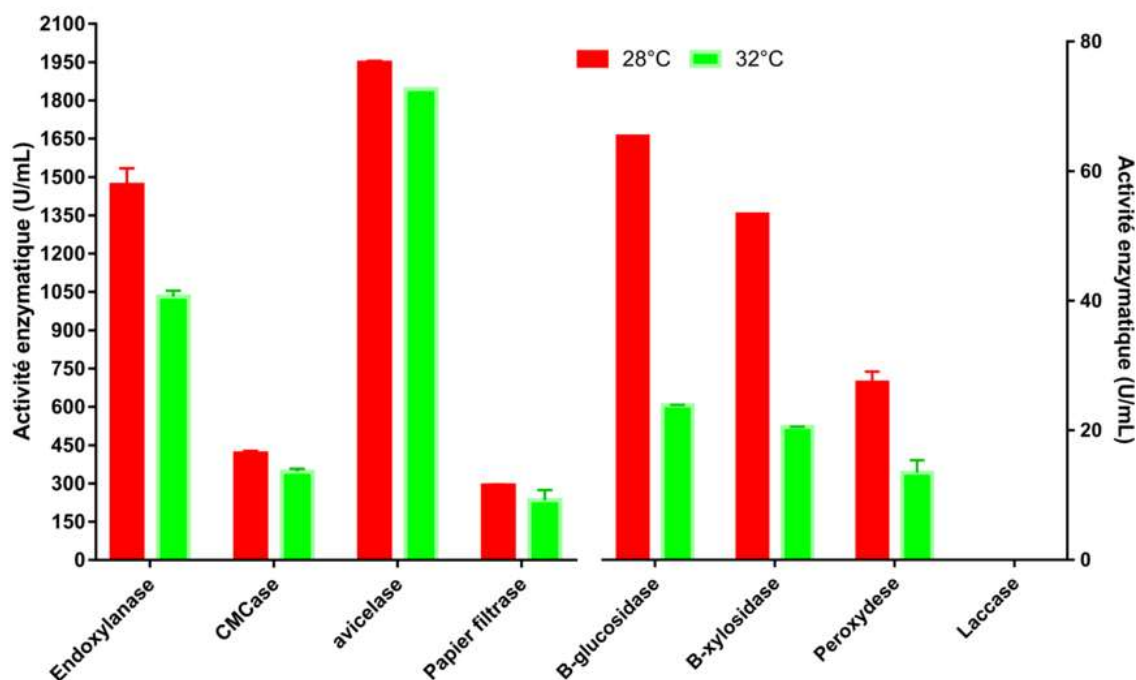
**Figure 12 :** Photographie des substrats de la culture mixte d'*A. niger* et *T. afroharzianum* sous SMF.

Le son et la paille de blé ont été utilisés pour la production d'enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques, ces dernières étant considérées comme des substrats de choix pour la fermentation en milieu solide en raison de leur haute valeur nutritionnelle, de leur porosité élevée et de la consistance requise pour permettre aux enzymes de s'ancrer et d'être excrétées. (Kar et al. ; 2013).

Jorgensen et al. (2007) ont montré que la composition des enzymes produites variait en fonction du substrat lignocellulosique sur lequel le micro-organisme se développe.

Après 7 jours d'incubation, des activités cellulolytiques de type ;  $\beta$ -1,4-Endoglucanase (CMC ase), l'activité total, Exoglucanase (avicelase) et  $\beta$ -glucosidase, activité xylanase de type endoxylanase,  $\beta$ -xylosidase, et l'activité ligninase tel que l'activité peroxydase et laccase,

ont été enregistrées avec les deux températures d'incubation 28°C et 32°C et les résultats obtenus sont représentés dans la Fig.13.



**Figure 13 :** Histogramme comparatif des activités cellulolytique, xylanolytique et ligninolytique dans les extraits enzymatiques produits à 28 °C et 32°C.

En comparant les différentes activités enzymatiques des extraits bruts produits à 28°C et 32°C, on constate que l'extrait enzymatique produit à 28°C présente de meilleures activités par rapport à l'extrait brut produit à 32°C (Fig.13).

Après 7 jours d'incubation, des activités xylanase, CMCCase, avicelase, activité papier filtrase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase et activité peroxydases ont été enregistrées avec la température d'incubation 28°C, elles sont de 1469,6 U/mL, 418,2U/mL, 1948U/mL, 292.6U/mL, 65,3U/mL, 53,3U/mL, 27,3U/mL respectivement. Par contre, l'extrait enzymatique produit à 32°C présente des activités de 1032U/mL, 346,2U/mL, 1844U/mL, 234.6U/mL, 23.8U/mL, 20.51U/mL et 13,4U/ml respectivement les activités xylanase, CMCCase, avicelase, activité papier filtrase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase et activité peroxydases. Une L'absence d'activité laccase est enregistrée pour les deux extraits enzymatiques.

La température d'incubation est un facteur important qui affecte la production des xylanases et cellulase en FMS avec la fermentation mixte BG et AZ 12 à base de paille et de son de blé.

À une température basse, la production d'enzyme diminue en raison d'un transfert plus faible des substrats dans la membrane cellulaire tandis qu'une température élevée pourrait induire une réduction de la croissance en raison de la dénaturation des enzymes. Ceci entraîne une conservation plus élevée de l'énergie pour la croissance cellulaire et une génération plus faible de métabolites (**Pal et Khanum, 2010**). La majorité des champignons sont des mésophiles et capables de se développer entre 5 et 35 °C avec l'optimum situant souvent entre 25 et 30 °C, mais il existe certaines moisissures dites thermophiles, thermotolérantes ou psychrophiles (**Kinsey., 2003**). Les résultats obtenus dans cette étude coïncident avec plusieurs travaux similaires indiquant que la température 28°C est favorable pour la croissance des genres *Aspergillus* et *Trichoderma*.

Selon les résultats obtenus, nous avons opté à poursuivre les travaux de cette étude avec l'extrait enzymatique produit à 28°C.

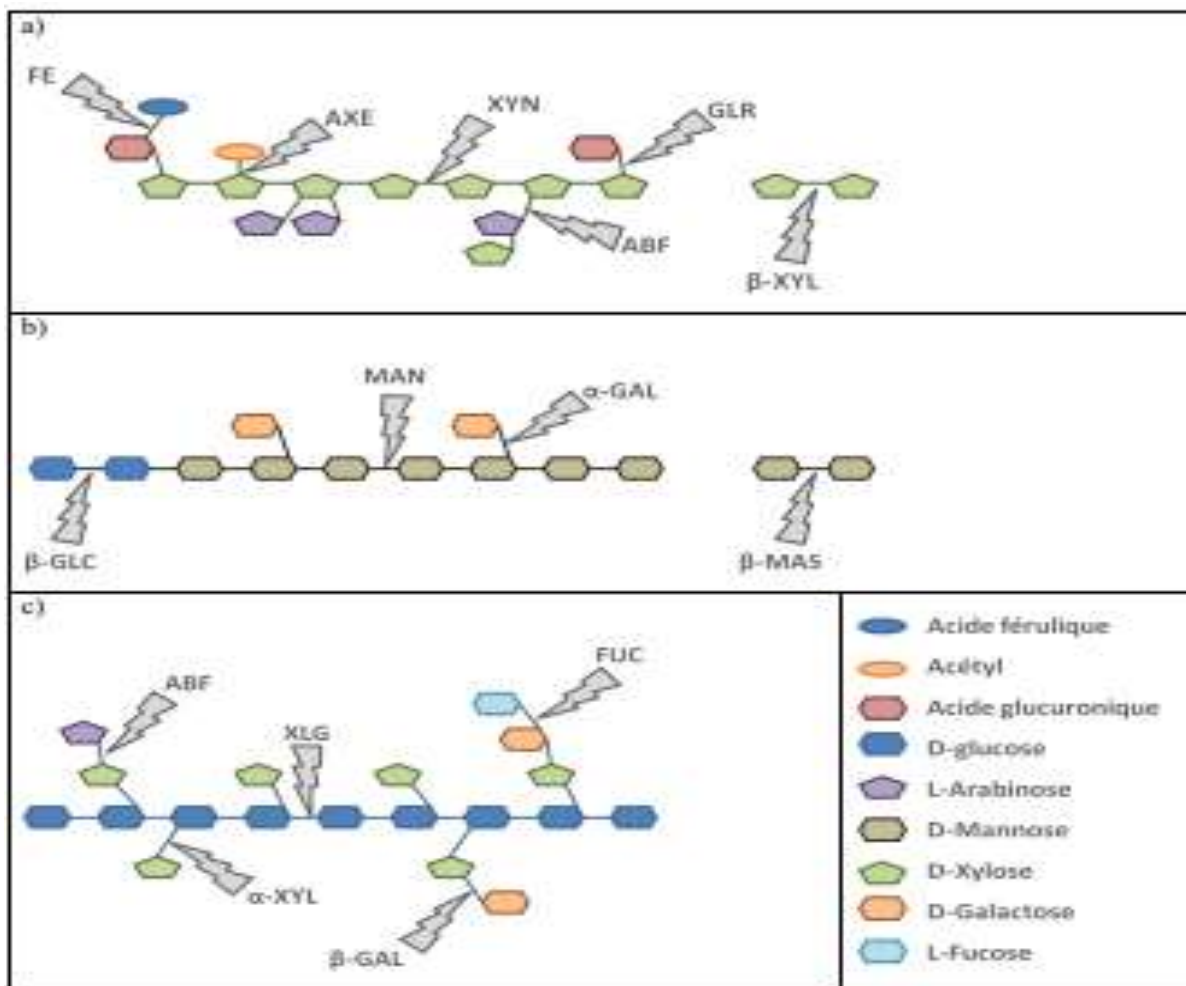
### **3. Saccharification de la biomasse lignocellulosique**

La biomasse lignocellulosique est principalement composée de parois cellulaires qui contiennent une grande proportion de polysaccharides cellulosiques et hémicellulosiques. Cette biomasse peut être convertie en sucres fermentescibles par l'action synergique d'enzymes comprenant des exo- et endoglucanases et des  $\beta$ -glucosidases, des exo- et endoxylanase et des  $\beta$ -xylosidase ainsi que d'autres enzymes auxiliaires (**Guo, et al.,2018**), ce processus appelé "saccharification", constitue une voie intéressante pour produire des biocarburants et des matériaux biologiques.

Pour tester l'efficacité de la saccharification de la biomasse lignocellulosique à l'échelle du laboratoire, un protocole de saccharification a été établi. L'hydrolyse totale de la paille et son de blé est catalysée par des enzymes lignolytiques (peroxydase et laccase), cellulases et hemicellulolytiques.

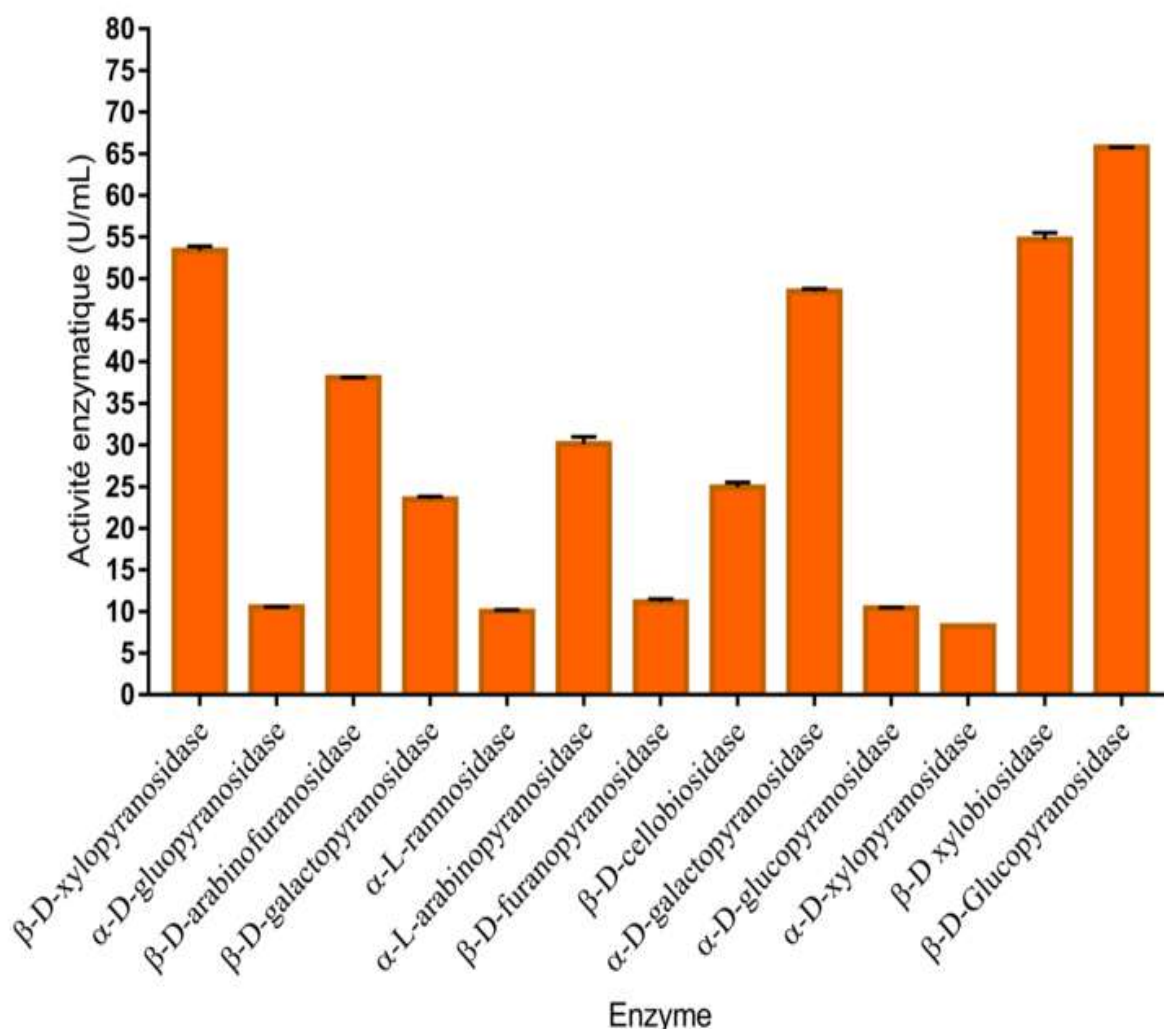
### 3.1. Recherche d'autres enzymes auxiliaires

L'hémicellulose sont des polymères a structure branchée constitués de différentes unités de sucres neutres présents à différentes proportions et avec différents substituants. Les sucres monomères majeurs sont le D-xylose, L-arabinose, D-glucose, D-galactose, D-mannose, acide glucuronique, acide 4-O-méthyl-D-glucuronique, acide galacturonique et a plus faible proportions, le L-rhamnose, L-fucose et une variété de sucres neutres O-méthyles (Sun et al.,1996) et la dégradation des hémicelluloses nécessite l'intervention des enzymes auxiliaires tel que L-arabinofuranosidase, glucuronidase, acétyl estérase, féruloyl estérase, mannanase,  $\beta$ -mannosidase,  $\alpha$ -galactosidase, xyloglucanases,  $\alpha$ -xylosidase,  $\beta$ -galactosidase, fucosidase et autre (Fig.14).



**Figure14** :Dégradation des hémicelluloses.a) Enzymes hydrolysant les xylanes : **XYN** = xylanase,  **$\beta$ -XYL** =  $\beta$ -xylosidase, **ABF** = L-arabinofuranosidase, **GLR** = glucuronidase, **AXE** = acétyl estérase,**FE** = féruloyl estérase.b) Enzymes hydrolysant les mannanes : **MAN** = mannanase,  **$\beta$ -MAS** =  $\beta$ -mannosidase, **$\beta$ GLC** =  $\beta$ -glucosidase,  **$\alpha$ -GAL** =  $\alpha$ -galactosidase.c) Enzymes hydrolysant les xyloglucanes : **XLG** = xyloglucanases, **ABF** =L-arabinofuranosidase,  **$\alpha$ -XYL** =  $\alpha$ -xylosidase,  **$\beta$ -GAL** =  $\beta$ -galactosidase, **FUC** = fucosidase.

Afin d'étudier d'autres enzymes dans l'extrait enzymatique produit par la fermentation mixte d'*A.niger* et *T.afroharzianum* permettant une dégradation totale de la paille et du son de blé, on a mesuré diverses activités enzymatiques dans l'extrait brut produit à 28 °C et les résultats atteints sont illustrés dans la figure 15.



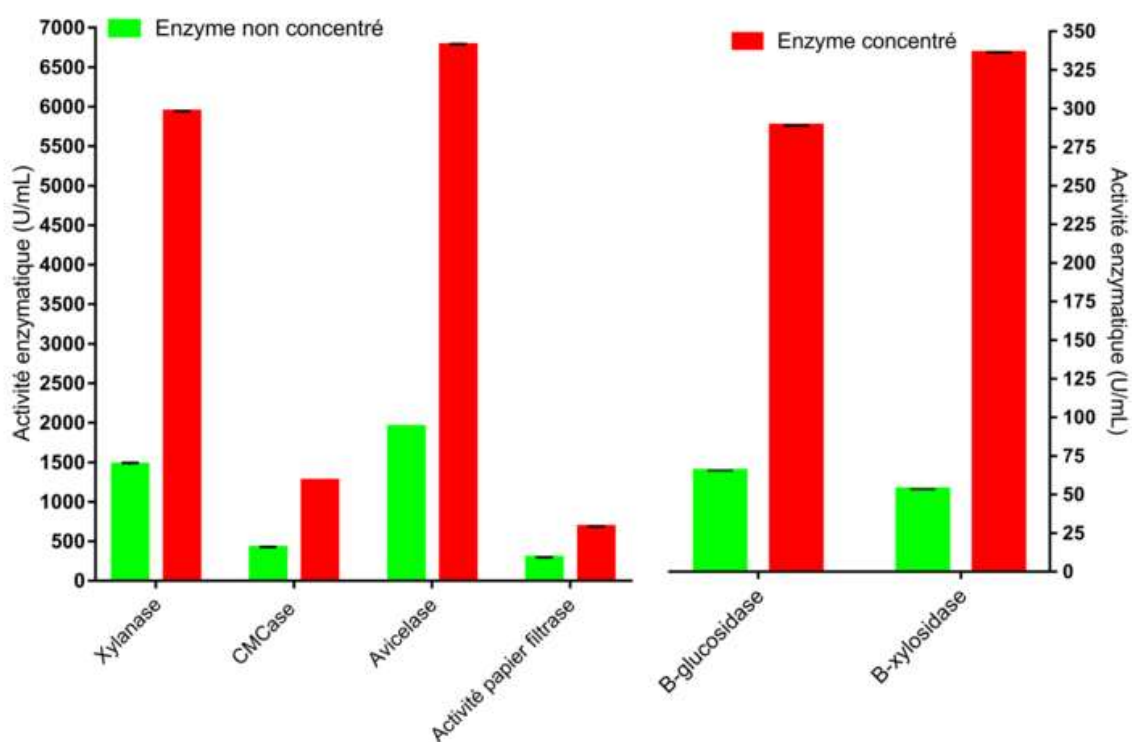
**Figure 15** : Histogramme mentant les autre activités hemicellulolitiques.

Les résultats obtenus révèlent que la majorité des enzymes ont montré une activité modéré supérieurs à 40U/mL ce pendant les ente activité en montré une activité remarquable supérieur à 5U/mL.

Les résultats illustrés dans la Fig.15, révèlent que l'extrait enzymatique est riche en enzymes hemicellulolytique parmi ces dernieres : β-D xylobiosidase, α-D galactopyranosidase, β-D cellobiosidase, et β-D-arabinofuranosidase et autre....

### 3.2. Ultrafiltration de l'extrait enzymatique

Les surnageant de culture sont concentrés par ultrafiltration, les impuretés ayant ainsi une masse moléculaire égale ou inférieure à 3 kDa sont éliminées. Le taux de protéines est augmenté de 0.71mg/ml à 3.02 mg/mL. Les activités enzymatiques pour CMCase, Xylanase, Avicelase, activité total,  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Xylosidase, et peroxydase après ultrafiltration sont respectivement de 1265.70U/mL, 5938,37U/mL, 6780.23U/mL, 682.07U/mL, 288.87U/mL, 336U/mL, et 30.2 U/mL.



**Figure 16 :** Histogramme montrant les résultats Activités cellulolytiques et xylanolytiques avant et après concentration de l'extrait enzymatique

D'après les résultats illustrés dans la Figure 16, nous avons conclu que l'étape de l'ultrafiltration a montré une efficacité dans l'accentuation des différentes activités enzymatique.



### 3.3. Délignification de la paille et son de blé

La saccharification des substrats lignocellulosiques nécessite des cocktails d'enzymes et des prétraitements les plus efficaces, en fonction de chaque matière première. La paille et le son de blé sont les résidus agricoles les plus importants au monde.

Le prétraitement est utilisé pour éliminer une grande partie de la lignine, et pour rendre la cellulose de cette biomasse plus accessible. Le prétraitement alcalin avec NaOH améliore la digestibilité de la cellulose en réduisant fortement la teneur en lignine (**van Munster et al. 2014**) qui est solubilisée puis éliminée, laissant ainsi une fraction solide enrichie en polysaccharides.

Il a été signalé que la lignine pouvait déclencher une inactivation irréversible de la cellulase, même lorsque la biomasse lignocellulosique est prétraitée. Ceci est possible soit en formant une barrière physique qui empêche l'accès aux enzymes ou en liant de manière non productive les enzymes cellulolytiques (**Chaabouni et al. 1994 ; Méndez-Liter et al. 2020**). La liaison non productive des enzymes à la lignine est reconnue comme un problème à surmonter pour améliorer l'efficacité de la saccharification de la biomasse lignocellulosique prétraitée.

### 3.4. Hydrolyse enzymatique de la paille et son de blé traité et non traité

Le complexe enzymatique produit par la fermentation mixte d'*Aspergillus niger* et de *Trichoderma afroharzianum* a été examiné pour déterminer sa capacité de produire des monosaccharides en utilisant la cellulose et l'hémicellulose de la paille et du son de blé comme substrat d'hydrolyse.

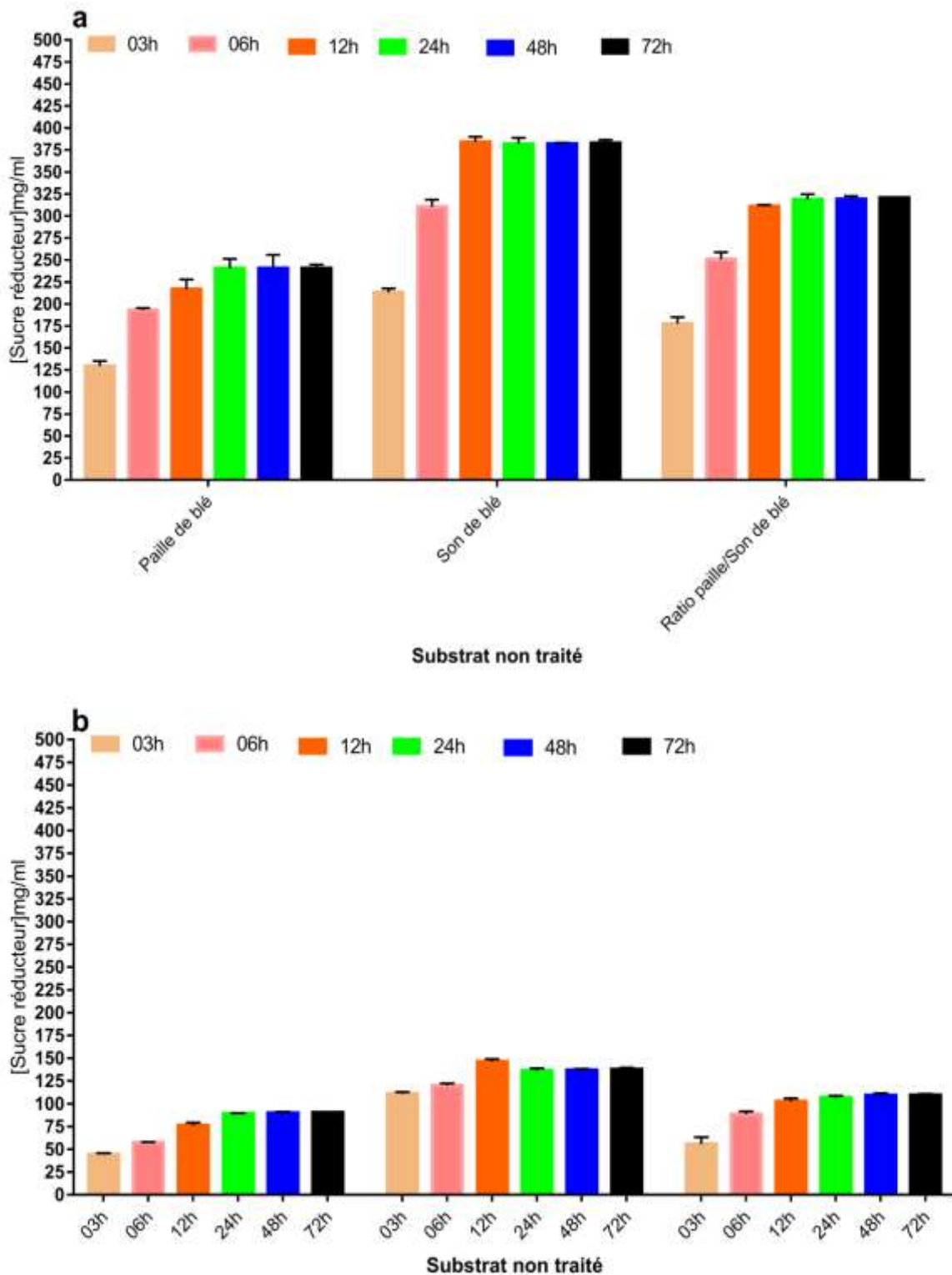
Afin de tester l'efficacité de l'extrait enzymatique produit dans la culture mixte, des cinétiques de saccharification ont été réalisées sur la paille et le son de blé non-traités et traités.

La figure 17 représente le taux de sucre réducteur mesuré après la saccharification de la biomasse lignocellulosique (paille et son de blé) non-traité (Fig.17-a) et la paille et le son de blé traité (Fig.17-b) dans un intervalle de temps allant de 3h jusqu'à 72h. La cinétique présente une évolution progressive débute à 3h et se stabilise à partir de 12h et cela s'implique pour les deux substrats traité et non traité (Fig.17).

Le son de blé est le substrat le mieux dégradé par l'extrait enzymatique avec un taux de sucre réduit de 384,24mg/mL pour le substrat non traité et 146.34mg/mL pour le substrat

traité. Contrairement à la paille de blé qui présente un rendement moins en sucre réducteur pour les substrats non traité et traité avec 240,09mg/mL et 89.01mg/mL respectivement.

Concernant la combinaison des deux substrats paille/son de blé avec un ratio de 60%, présente un rendement remarquables en sucre réducteurs avec 311.12mg/mL et 102.57mg/MI respectivement pour le substrat non traité et traité (Fig.17).



**Figure 17:** Histogramme des résultats de la saccharification de la paille et de son de blé non-traité (a) et traité (b).

Selon **Kinnarinen et Häkkinen (2014)**, l'hydrolyse enzymatique a pour effet de fragmenter la matrice de manière légère pour cela la saccharification débute peu de temps après l'adjonction du cocktail enzymatique (étude faite sur du carton)

La cinétique atteint son optimum à partir de 12 heures, ce qui se traduit par la digestion de la cellulose microcristalline, que l'on caractérise par une diminution de la taille des particules, en particulier au cours de la première phase de l'hydrolyse (les 20 premières heures, ceci indépendamment de l'allomorphe de cellulose étudié ou de la nature du cocktail enzymatique que ce soit de *Trichoderma reesei*, ou *Aspergillus niger* (**Ciolacu et al., 2011**).

Le son de blé présent le meilleur rendement cela s'explique à ce que, les sons de blé peuvent présenter des compositions très variables. Les hémicelluloses fortement substitués par des groupements arabinose sont plus facilement extractibles par les solutions alcalines diluées que les hémicelluloses les moins ramifiés (**Bergmans et al., 1996**). Cela permet d'expliquer les différences entre les quantités de sucre réducteur extraite à partir du son et de la paille pour une même concentration en NaOH, les hémicelluloses du son sont très branchées en résidus d'arabinoses alors que celles de la paille possèdent plutôt des structures xylaniques linéaires peu substituées.

Aussi, les travaux recensant la composition chimique des sons de blé présentent une hétérogénéité forte (Tableau V).

**Tableau n° VII.** Compositions chimiques de son et paille de blé (**Maréchal, 2001**)

	<b>Son</b>	<b>Paille</b>
<b>Cellulose</b>	18,7%	40,3%
<b>Hémicellulose</b>	62,3%	31,5%
<b>Lignine</b>	3,8%	10%

Les hémicelluloses sont les constituants majoritaires des sons de blé. Elles sont principalement constituées d'arabinoxylanes, comme en témoigne la composition en sucres simples présentée au Tableau n° VIII .

**Tableau n° VIII .** Composition en sucre du son et de paille de blé désamidonné (Hromádková et al., 2008;Pan et al., 2005).

Sucre simple	Son	Paille
Xylose	39,2%	34,6%
Arabinose	25,2%	5,6%
Mannose	0,9%	1,5%
Galactose	2,1%	2,7%
Glucose	32,6%	55,4%

L'objectif principal de tout prétraitement est de rendre la biomasse accessible à l'action des enzymes, en déstructurant la matrice lignocellulosique afin d'augmenter le nombre de sites actifs pour les cellulases. Cet objectif peut être atteint par élimination de la lignine, solubilisation partielle ou totale des hémicelluloses et/ou par réduction de la structure cristalline de la cellulose (Imane Semhaoui., 2019).

Selon les résultats enregistrés dans la Fig.17, le rendement estimé en sucre simple libre pour les substrats non traités est meilleur que celui des substrats traités. Ceci est dû au prétraitement alcalin qui gonfle la paroi cellulaire et élimine la plupart des hémicelluloses et des lignines de la paille et du son de blé ( Sun et al.,2018).

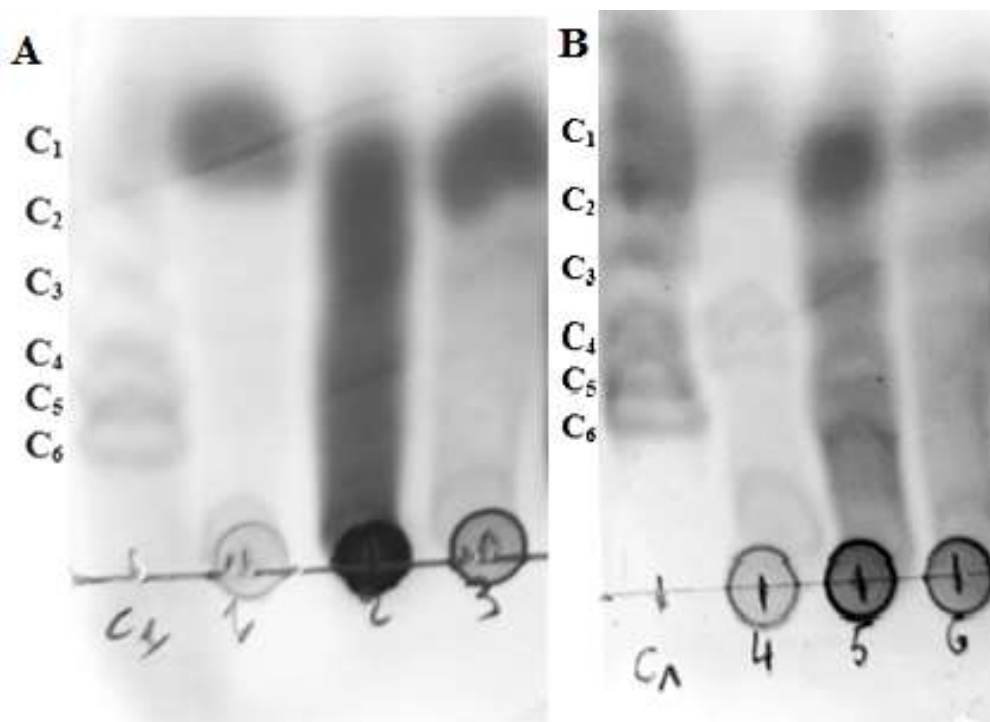
### 3.5. Analyse des produits de saccharification

L'analyse qualitative des produits d'hydrolyse de la paille et du son de blé a été menée par CCM. La figure 20 montre les produits d'hydrolyse de la paille et du son de blé après 12 h de saccharification dans lesquels des xylooligosaccharides et des glucooligosaccharides sont apparus dans différents substrats testé.

L'examen par CCM des produits d'hydrolyse de la paille et du son de blé non traités fait apparaître une forte concentration de sucres simples et d'autres oligosaccharides et une grande concentration de sucres réduits est enregistrée avec le son de blé (Fig. 18 A-2). En revanche, les produits d'hydrolyse des substrats traités révèlent l'apparition de sucres simples et d'oligosaccharides avec des concentrations plus basses par rapport aux substrats non traités (Fig. 18-B). Ces résultats confirment ceux obtenus lors de la quantification des sucres réducteurs par hydrolyse enzymatique de la paille et du son de blé traités et non traités.

L'extrait enzymatique produit en culture mixte par *Aspergillus niger* et *Trichoderma afroharzianum* hydrolyse entièrement la paille et le son de blé en sucres fermentescibles en comparaison avec le cocktail cellulolytique disponible dans le commerce produit par

*Trichoderma reesei* tel que Celluclast 1.5ml supplémenté et NS-50010 analysés par **Azzouz et al., (2021)**.



**Figure 18 :** Analyse CCM de produit d’hydrolyse par le cocktail enzymatique produit par *Aspergillus niger* et *Trichoderma afroharzianum*. **(A)** ; Produit d’hydrolyse des substrats non traité (1 :paille de blé,2; son de blé,3: ratio paille/son), **B**: Produit d’hydrolyse des substrats traité (4:paille de blé, 5; son de blé, 6: ratio paille/son). **C**: Marqueurs (C<sub>1</sub> ;Glucose, C<sub>2</sub> ; Cellubiose, C<sub>3</sub> ; Cellutriose, C<sub>4</sub> ; Cellutetraose, C<sub>5</sub> ; Cellupentose, C<sub>6</sub> ; Celluexose).

L'extrait enzymatique produit en culture mixte par *Aspergillus niger* et *Trichoderma afroharzianum* hydrolyse entièrement la paille et le son de blé en sucres fermentescibles en comparaison avec le cocktail cellulolytique disponible dans le commerce produit par *Trichoderma reesei* tel que Celluclast 1.5ml supplémenté et NS-50010 analysés par **Azzouz et al., (2021)**.

En conséquence, il a été démontré que l'utilisation de cocktails enzymatiques produits à partir d'une souche microbienne permet une meilleure dégradation de la biomasse par rapport aux préparations enzymatiques classiques (**Jorgensen et al., 2004**).

Les conditions douces et écologiques utilisées pour la production enzymatique de oligosaccharides et la spécificité des biocatalyseurs rendent les méthodes enzymatiques plus

pratiques que les procédures chimiques (**Tan et al. 2008**), ce qui constitue une alternative raisonnable et fiable pour produire les grandes quantités requises, par exemple, dans l'aquaculture et l'industrie avicole (**Aachary and Prapulla 2011**).

Les xylooligosaccharides remplissent les conditions pour être classés comme prébiotiques et présentent même des effets plus importants que les oligosaccharides, à l'activité prébiotique bien connue (**Moure et al. 2006**).

Les xylooligosaccharides (XOS) sont qualifiés de molécules antidiabétiques, anti-hypercholes-térolémiques ou anti-apoptotiques (**Kim et al. 2006**). Ils ont été également rapportés comme composés prébiotiques pour les humains (**Nieto-Domínguez et al. 2017**), ils ne sont pas dégradés par les enzymes digestives humaines, et sont fermentés dans le tractus gastro-intestinal (**Amorim et al. 2019**).

Des tests in vitro ont montré que les XOS permettent d'augmenter plus efficacement la quantité de Bifidobactéries en comparaison avec d'autres oligosaccharides (**Moure et al. 2006**). D'autres tests in vivo ont montré que l'administration de XOS augmente la quantité de Bifidobactéries dans le TGI chez le rat et est utilisé par les bactéries intestinales chez l'Homme (**Vázquez et al. 2012**).

---

# *Conclusion*

---



Les biotechnologies industrielles font partie des technologies essentielles pour le développement économique futur. Elles exploitent les microorganismes et les enzymes pour fabriquer divers produits. Le développement des bioraffineries requiert une valorisation de l'ensemble de la composition lignocellulosique des plantes, à savoir une transformation et une valorisation simultanées de la cellulose, de la lignine et d'hémicellulose.

L'objectif de ce travail est de développer des biocatalyseurs lignocellulosique naturelles produites par fermentation fongique sur substrat solide. A cet effet, la paille et le son de blé qui sont utilisées en alimentation animal, peuvent être transformé en sucre fermentescible. Pour cela, deux souches fongiques ont été utilisées pour la production de cellulases, d'hémicellulases et ligninases par fermentation solide de la paille et son de blé.

Des fermentations au milieu solide sont réalisées par une culture mixte d'*Aspergillus niger* strain BG et *Trichoderma afroharzianum* AZ 12 avec un ratio paille/ son de blé comme seul source de carbone incubés à deux températures différente (28°C et 32°C), afin de produire un complexe enzymatique qui va être capable de dégradé complètement les celluloses et l'hémicelluloses en sucre simple.

Les résultats de la SMF montre que les deux souches d'*A.niger* et *T.afroharzianum* présentent une meilleure production de xylanase (1469,6 U/mL), CMCCase (418.2U/mL), avicelase (1948U/mL), activité total (292,667 U/mL),  $\beta$ -glucosidase (65,3U/mL),  $\beta$ -xylosidase (53,3 U/mL) et peroxydase (27.3 U/mL) au bout de 7 jours d'incubation à 28°C, de ce fait, la saccharification de la paille et son de blé est réalisée avec l'extrait enzymatique obtenu après 7 jours d'incubation à 28°C avec un ratio de paille/son 60% et un taux d'humidité de 85%.

L'ultrafiltration de l'extrait enzymatique révèle une augmentation des activités xylanase (5938,37U/mL), CMCCase (1265.70U/mL), avicelase (6780.23U/mL), activité total (682,07U/mL),  $\beta$ -glucosidase (2051,0U/mL), et  $\beta$ -xylosidase (2385,6U/mL).

La  $\beta$ -glucosidase et  $\beta$ -xylosidase catalysent l'hydrolyse des disaccharides. Elles sont plus intéressantes puisqu'elles sont également capables dans une certaine mesure d'hydrolyser les oligosaccharides. La  $\beta$ -1-4 Endoglucanase et l'endoxyylanase produites par *Aspergillus niger* et *Trichoderma afroharzianum* ont été évaluées pour leur capacités à produire des oligo-monosaccharides en utilisant la cellulose et l'hémicellulose de la paille et son de blé.

Afin de tester une synergie entre les complexes enzymatiques de type cellulase, hémicellulase ainsi que les peroxydases, une cinétique de saccharification est réalisée sur la paille et le son de blé traité et non traité. Les résultats montrent généralement que la quantité en sucre réducteurs produite par le substrat non traité est meilleure que celle du substrat traité spécifiquement le son de blé, qu'il est le substrat le plus dégradé par le complexe enzymatique avec un taux de sucre réducteur de 384,24mg/mL pour le substrat non traité, et de 146,34mg/mL pour le substrat traité.

Une CCM a été réalisée pour une analyse qualitative des produits d'hydrolyse de la paille et du son de blé, cette dernière a permis de confirmer les résultats de la cinétique et que l'extrait enzymatique d'*Aspergillus niger* et *Trichoderma afroharzianum* produisent des oligosaccharides et des sucres fermentescibles par saccharification de biomasse lignocellulosique. Ces résultats suggèrent que les enzymes pourraient être intéressantes pour les processus biotechnologiques.

A travers ces résultats intéressants, il est essentiel de poursuivre les investigations de recherche et exploitation de complexes enzymatiques produites dans les processus biotechnologiques.

Ce procédé a le mérite d'être à la fois dépolluant, car il réduit énormément la quantité de déchets solides et valorisant par la production des substances simples qui peuvent être considérées comme une très bonne forme d'énergie renouvelable, propre et ne génère pas de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) supplémentaire dans l'atmosphère.

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

- ✓ Tester les différentes applications potentielles de ces extraits enzymatiques.
- ✓ Envisager des recherches plus approfondies pour la mise au point d'un procédé de valorisation de milliers de tonnes de matière lignocellulosique produite par les industries agroalimentaires et de transformations des plantes. Aussi améliorer les revenus des unités industrielles des pays producteurs de déchets et permettre le développement d'activités industrielles propres qui créeraient des opportunités d'emploi et offriraient une meilleure compétitivité sur le marché international.

---

*Références  
bibliographiques*

---

# A

**Abu Bakar, N.K., Abd-Aziz, S., Hassan, M.A., Ghazali, F.M., Abu Bakar, N K., Hassan, M.A., Ghazali, F.M. (2010).** Isolation and Selection of Appropriate Cellulolytic Mixed Bunch. *Biotechnology* 9, 73-78.

**Amorim, C., Silvério, SC, Prather, KL et Rodrigues, LR. (2019).** Des résidus lignocellulosiques à la commercialisation : production et potentiel commercial des xyloligosaccharides. *Progrès de la biotechnologie*, 37 (7), 107397.

**Anastas, PT et Warner, JC (1998).** Chimie verte : théorie et pratique Oxford University Press. *New-York*, 30

**Ang, SK, Yahya, A., Abd Aziz, S., & MdSalleh, M. (2015).** Isolement, criblage et identification de producteurs cellulolytiques et xylanolytiques potentiels pour la biodégradation du tronc de palmier à huile non traité et son application à la saccharification des feuilles de citronnelle. *Biochimie préparative et biotechnologie*, 45 (3), 279-305.

**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*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(2).

**Atalla. (1999).** Celluloses. *Comprehensive natural products chemistry*.

**Azzouz, Z., Bettache, A., Boucherba, N., Amghar, Z., Benallaoua, S. (2020b).** Optimization of xylanase production by newly isolated strain *Trichoderma afroharzianum* isolate az 12 in solid state fermentation using response surface methodology. *Cellul. Chem. Technol.* 54, 451-462.

**Azzouz, Z., Bettache, A., Boucherba, N., Prieto, A., Martinez, M.J., Benallaoua, S., de Eugenio, L.I. (2021).** Optimization of B-1,4-Endoxylanase Production by an *Aspergillus niger* Strain Growing on Wheat Straw and Application in Xylooligosaccharides Production. *Molecules* 26, 2527.

**Azzouz, Z., Bettache, A., Djinni, I., Boucherba, N., Benallaoua, S. (2020c).** Biotechnological production and statistical optimization of fungal xylanase by bioconversion of the lignocellulosic biomass residues in solid-state fermentation. *Biomass Convers. Biorefinery* 1-13.

## B

**Bader, J., Mast Gerlach, E., Popović, MK, Bajpai, R., & Stahl, U. (2010).** Pertinence des fermentations de coculture microbienne en biotechnologie. *Tourillon de microbiologie appliquée* , 109 (2), 371-387.

**Bailey, M.J., Biely, P., Kaisa, P., Bailey, J.M., Biely, P., Poutanen, K., Bailey, M.J., Biely, P., Kaisa, P.,** 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23, 257–270

**Balan, V., Jin, M., Culbertson, A. et Uppugundla, N. (2013).** L'étape de saccharification : souches hyper productrices de cellulase de *Trichoderma reesei*. Dans *Conversion de la lignocellulose* (pp. 65-91). Springer, Berlin, Heidelberg.

**Bomble, YJ, Lin, CY, Amore, A., Wei, H., Holwerda, EK, Ciesielski, al., (2017).** Déconstruction de la lignocellulose dans la biosphère. *Opinion actuelle en biologie chimique* , 41 , 61-70.

**Bano, S., Qader, SAU, Aman, A., Syed, MN et Durrani, K. (2013).** Production élevée d'endo-1, 4- $\beta$ -D-glucanase dégradant la cellulose en utilisant la bagasse comme substrat de *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Polymères glucidiques*, 91 (1), 300-304.

**Barnoud F (1980)** La cellulose. In : Les polymères végétaux (B Monties, ed), Gauthier-Villars, 67-86

**Barnoud, F. (1980).** Les polymères végétaux; Polymères pariétaux et alimentaires non azotés: La cellulose. 66-86.

**Boucherba, N., Said, B., Estelle, C., LHakim, H., Duchiron, F., 2011.** Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process Biochem.* 46, 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.003>

**Braaksma, M., van den Berg, RA, van der Werf, MJ et Punt, PJ (2010).** Une approche descendante de la biologie des systèmes pour l'identification de cibles pour la souche fongique et le développement de processus. *Biologie cellulaire et moléculaire des champignons filamenteux*, 25-35.

**Bradford, M.M., 1976.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding 254, 248–254.

**Breton A. (1990).** Principes et méthodes d'étude des moisissures, dans : Botton B. et al. Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2ème édition Masson. *Collection Biotechnologies*, Paris, 11-32p.

**Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Guy, P. H., Larpent, J. P., & Veau, P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.

**Brown Jr, RM (2004).** Structure et biosynthèse de la cellulose : que nous réserve le XXIe siècle. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* , 42 (3), 487-495.

**Buchala, AJ, et Wilkie, KCB (1973).** Hémicelluloses totales de blé à différents stades de croissance. *Phytochimie*, 12 (3), 499-505.

## C

**Chaabouni, SE, Hadj-Taieb, N., Mosrati, R., et Ellouz, R. (1994).** Évaluation préliminaire de la cellulase de *Penicillium occitanis* : un autre système utile. *Technologie enzymatique et microbienne*, 16 (6), 538-542.

**Chen, H., Han, Y. et Xu, J. (2008).** Saccharification et fermentation simultanées de paille de blé explosée à la vapeur prétraitée au peroxyde alcalin. *Biochimie des procédés* , 43 (12), 1462-1466.

**Ciolacu, D., Gorgieva, S., Tampu, D. et Kokol, V. (2011).** Hydrolyse enzymatique de différentes formes allomorphes de cellulose microcristalline. *Cellulose* , 18 (6), 1527-1541.

**Collins, T., Gerday, C. et Feller, G. (2005).** Xylanases, familles de xylanases et xylanases extrêmophiles. *Revue de microbiologie FEMS* , 29 (1), 3-23.

## D

**Dashtban, M., Schraft, H. et Qin, W. (2009).** Bioconversion fongique des résidus lignocellulosiques ; opportunités et perspectives. *Journal international des sciences biologiques*, 5 (6), 578.

**Dekker, R. F. H., & Lindner, W. A. (1979).** Bioutilization of lignocellulosic waste materials- A review. *South African journal of science*, 75, 65-71.

**Da Silva Delabona, P., Pirota, RDB, Codima, CA, Tremacoldi, CR, Rodrigues, A., et Farinas, CS (2012).** Utiliser les champignons de la forêt amazonienne et les résidus agricoles comme stratégie pour produire des enzymes cellulolytiques. *Biomasse et bioénergie*, 37 , 243-250.

**Duchiron, F., et Copinet, E. (2011).** Fermentation en milieu solide (FMS). *Biomédical-Pharma, Médicaments et produits pharmaceutiques, Technique de l'ingénieur BIO620*.

## ***F***

**Florencio, C., Cunha, FM, Badino, AC, Farinas, CS, Ximenes, E., et Ladisch, MR (2016).** Analyse du sécrétome de *Trichoderma reesei* et *Aspergillus niger* cultivés par des procédés de fermentation submergée et séquentielle : production d'enzymes pour l'hydrolyse de la bagasse de canne à sucre. *Technologie enzymatique et microbienne* , 90 , 53-60.

## ***G***

**Gautam, A., Kumar, A., Dutt, D. (2015).** Production of Cellulase-Free Xylanase by *Aspergillus flavus* ARC- 12 Using Pearl Millet Stover as the Substrate Under Solid-State Fermentation. *J. Adv. Enzym. Res.* 1, 1-9.

**Gilbert, HJ (2010).** La biochimie et la biologie structurale de la déconstruction de la paroi cellulaire végétale. *Physiologie végétale* , 153 (2), 444-455.

**Goldbeck, R., Ramos, MM, Pereira, GA et Maugeri-Filho, F. (2013).** Production de cellulase à partir d'une nouvelle souche *Acremonium strictum* isolée du biome brésilien à l'aide de différents substrats. *Technologie des bioressources* , 128 , 797-803.

**Ghose.T.K. (1987).** Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59(2). 257–268.:<http://www.iupac.org/publications/pac/59/2/0257/>

**Guo, H., Chang, Y. et Lee, DJ (2018).** Saccharification enzymatique de la bioraffinerie lignocellulosique : axes de recherche. *Technologie des bioressources* , 252 , 198-215.

## ***H***

**Handa, CL, Couto, UR, Vicensoti, AH, Georgetti, SR et Ida, EI (2014).** Optimisation des paramètres de fermentation de la farine de soja pour produire de la  $\beta$ -glucosidase pour la bioconversion en aglycones. *Chimie alimentaire* , 152 , 56-65.

**Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C., &Abecassis, J. (2007).** Procédés secs pour développer des fractions de blé et des produits à qualité nutritionnelle améliorée. *Journal of cerealscience* , 46 (3), 327-347.

**Hölker, U., & Lenz, J. (2005).** La fermentation à l'état solide, y a-t-il des avantages biotechnologiques. *Opinion actuelle en microbiologie*, 8 (3), 301-306.

**Howard, RL, Abotsi, ELJR, Van Rensburg, EJ et Howard, S. (2003).** Biotechnologie de la lignocellulose : enjeux de la bioconversion et de la production d'enzymes. *Journal africain de biotechnologie* , 2 (12), 602-619.

**Hromadkova, Z., et Ebringerova, A. (2003).** Extraction par ultrasons de matières végétales étude de la libération d'hémicellulose des coques de sarrasin. *Sonochimieultrasonique* , 10 (3), 127-133.

**Hu, HL, Van den Brink, J., Gruben, BS, Wösten, HAB, Gu, JD et De Vries, RP (2011).** Amélioration de la production d'enzymes par la co-culture d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus oryzae* et avec d'autres champignons. *International Biodeterioration and Biodegradation* , 65 (1), 248-252.

## ***I***

**Semhaoui, I. (2019).** Etude de la bioconversion de la chènevotte (*cannabis sativa*) et de l'alfa (*stipa tenacissima*) par prétraitement thermomécanique en présence d'un catalyseur acide ou alcalin (Doctoral dissertation, Université de La Rochelle; Université Sidi Mohamed ben Abdellah (Fès, Maroc)).



## J

**Johnson, E. (2016).** La production intégrée d'enzymes réduit le coût de l'éthanol cellulosique. *Biocarburants, bioproduits et bioraffinage*, 10 (2), 164-174.

**Jørgensen, H., Mørkeberg, A., Krogh, KB et Olsson, L. (2004).** Croissance et production d'enzymes par trois espèces de *Penicillium* sur des monosaccharides. *Journal de biotechnologie*, 109 (3), 295-299.

**Jordan, DB, & Li, XL (2007).** Variation de la spécificité relative du substrat de la  $\beta$ -d-xylosidase/ $\alpha$ -l-arabinofuranosidase bifonctionnelle par des mutations à site unique : rôles de la distorsion et de la reconnaissance du substrat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1774 (9), 1192-1198.

## K

**Kabel, MA, Van der Maarel, MJ, Klip, G., Voragen, AG et Schols, HA (2006).** Les tests standards ne prédisent pas l'efficacité des préparations commerciales de cellulase vis-à-vis des matières végétales. *Biotechnologie et bioingénierie*, 93 (1), 56-63.

**Kane, AO, Pellergini, VO, Espirito Santo, MC, Ngom, BD, García, JM, Acevedo, A., ...&Polikarpov, I. (2022).** Évaluation du potentiel des chaumes des variétés de canne à sucre et de canne à énergie cultivées en Argentine pour la production d'éthanol de deuxième génération. *Valorisation des déchets et de la biomasse*, 13 (1), 329-343.

**Kar, S., SonaGauri, S., Das, A., Jana, A., Maity, C., Mandal, A., ... &Mondal, KC (2013).** Optimisation du procédé de production de xylanase à l'aide d'un substrat solide bon marché par *Trichoderma reesei* SAF3 et étude sur l'altération des propriétés comportementales de l'enzyme obtenue à partir de SSF et SmF. *Génie des bioprocédés et des biosystèmes*, 36 (1), 57-68.

**Khila, Z. (2014).** Analyse de cycle de vie émergétique de système de valorisation de biomasse (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

**Kim, KH, Kim, YW, Kim, HB, Lee, BJ et Lee, DS (2006).** Activité anti-apoptotique des polysaccharides de laminarine et de leurs oligosaccharides hydrolysés enzymatiquement de *Laminaria japonica*. *Lettres de biotechnologie*, 28 (6), 439-446.

**Kinnarinen, T. et Häkkinen, A. (2014).** Influence de la charge enzymatique sur l'hydrolyse enzymatique des déchets de carton et distribution granulométrique des résidus de fibres résultants. *Technologie des bioressources*, 159, 136-142.

**Kumar, R., Singh, S. et Singh, O. V. (2008).** Bioconversion de la biomasse lignocellulosique : perspectives biochimiques et moléculaires. *Journal of industrial microbiology and biotechnologie*, 35 (5), 377-391.

## **L**

**Lambertz, C., Garvey, M., Klinger, J., Heesel, D., Klose, H., Fischer, R. et Commandeur, U. (2014).** Défis et avancées dans l'expression hétérologue des enzymes cellulolytiques : une revue. *Biotechnologie pour les biocarburants*, 7 (1), 1-15.

**Lazuka, A. (2018).** Production de synthons par des consortia microbiens à partir de paille de blé: approches macrocinétique, enzymatique et métaprotéomique (Doctoral dissertation, Toulouse, INSA).

**Liu, C. F., Sun, R. C., Qin, M. H., Zhang, A. P., Ren, J. L., Xu, F., ... & Wu, S. B. (2007).** Modification chimique de la bagasse de canne à sucre prétraitée aux ultrasons avec de l'anhydride maléique. *Cultures et produits industriels*, 26 (2), 212-219.

## **M**

**Maes, C., & Delcour, J. A. (2001).** Extraction au peroxyde d'hydrogène alcalin des polysaccharides non amyliques de son de blé. *Journal of Cereal Science*, 34 (1), 29-35.

**Makut, M., & Godiya, E. (2010).** Une enquête sur les champignons mésophiles cellulolytiques dans l'environnement du sol de la métropole de Keffi, dans l'État de Nasarawa, au Nigéria. *Afr J Microbiol Res*, 4, 2191-2195.

**Mandels, MARY, Weber, J., (1969).** The Production of Cellulases, *Food Microbiology*.

**Méndez-Líter, J. A., Nieto-Domínguez, M., de Toro, B. F., Santana, A. G., Prieto, A., Asensio, J. L., ... et Martínez, M. J. (2020).** A glucotolerant b-glucosidase from the fungus *Talaromyces amestolkiae* and its conversion into a glycosynthase for glycosylation of phenolic compounds.

**Miller, GL (1959).** Utilisation du réactif acide dinitrosalicylique pour la détermination des sucres réducteurs. *Chimie analytique*, 31 (3), 426-428.

**Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. P. J. (2011).** 21st Century Guidebook to Fun. *21st Century Guidebook to Fun*.

**Moure A., Patricia G., Herminia D., et Parajó J-C.,(2006).** Progrès dans la fabrication, la purification et les applications des xylo-oligosaccharides comme additifs alimentaires et nutraceutiques

**Mussatto, SI, Ballesteros, LF, Martins, S. et Teixeira, JA (2012).** Utilisation des déchets agro-industriels dans les procédés de fermentation à l'état solide. *Déchets industriels*, 274 .

## N

**Narra, M., Dixit, G., Divecha, J., Kumar, K., Madamwar, D. et Shah, AR (2014).** Production, purification et caractérisation d'une nouvelle endoglucanase de la famille GH 12 d'*Aspergillus terreus* et son application dans la dégradation enzymatique de la paille de riz délignifiée. *International Biodeterioration & Biodegradation* , 88 , 150-161.

**Navarro, D., Couturier, M., Damasceno da Silva, GG, Berrin, JG, Rouau, X., Asther, M., & Bignon, C. (2010).** Dosage automatisé pour le criblage de la libération enzymatique de sucres réducteurs à partir de biomasse micronisée. *Fabriques de cellules microbiennes* , 9 (1), 1-12.

**Nieto-Dominguez, M., de Eugenio, L.I., York-Durán, M.J., Rodriguez-Colinas, B., Plou, F.J., Chenoll, E., Pardo, E., Codoñer, F., JesúsMartínez, M., 2017.** Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwoodxylan by a novel fungal GH11 xylanase. *Food Chem.* 232, 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.149>

**Norkrans, B. (1957).** Études des enzymes de fractionnement des  $\beta$ -glucosides et de la cellulose de *Polyporus annosus* Fr. *PhysiologiaPlantarum* , 10 (1), 198-214.

## O

**Ollivier, B. (1987).** Fermentation méthanique par des cultures mixtes définies de bactéries thermophiles (Doctoral dissertation, Aix-Marseille 1).

**O'sullivan, A. C. (1997).** Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4(3), 173-207.

## P

**Pal, A., &Khanum, F. (2010).** Optimisation de la production et de l'extraction de la xylanase d'*Aspergillus niger* DFR-5 par fermentation à l'état solide. *Technologie des bioressources*, 101 (19), 7563-7569.

**Pan, X., &Sano, Y. (2005).** Fractionnement de la paille de blé par procédé à l'acide acétique atmosphérique. *Technologie des bioressources*, 96 (11), 1256-1263.

**Pandey, A. (2003).** Fermentation à l'état solide. *Revue de génie biochimique*, 13 (2-3), 81-84.

**Prevot, V. (2013).** Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide (Doctoral dissertation, Reims).

## R

**Rahardjo, YS, Tramper, J., &Rinzema, A. (2006).** Modélisation des phénomènes de conversion et de transport en fermentation à l'état solide : bilan et perspectives. *Progrès biotechnologiques*, 24 (2), 161-179.

**Rubin EM.(2008)** Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*; 454:841.

## S

**Scheller, H. V., &Ulvskov, P. (2010).** Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61, 263-289.

**Saha, C.-B. (2003).** Bioconversion de l'hémicellulose. *Journal de microbiologie industrielle et de biotechnologie*, 30 (5), 279-291.

**Sanchez, JO et Cardona, CA (2008).** Tendances de la production biotechnologique d'éthanol carburant à partir de différentes matières premières. *Technologie des bioressources* , 99 (13), 5270-5295.

**Sandhu, SK, Oberoi, HS, Babbar, N., Miglani, K., Chadha, BS et Nanda, DK (2013).** Optimisation statistique du milieu en deux étapes pour la production accrue de cellulase par fermentation à l'état solide par *Aspergillus niger* HN-1 nouvellement isolé et application du consortium de cellulase brute dans l'hydrolyse de la paille de riz. *Journal de chimie agricole et alimentaire* , 61 (51), 12653-12661.

**Saratale, G. D., Chen, S. D., Lo, Y. C., Saratale, R. G., & Chang, J. S. (2008).** Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation—a review.

**Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., et al. (2004).** Vers une approche systémique pour comprendre les parois cellulaires végétales. *Sciences* , 306 (5705), 2206-2211.

**Soni, R., Nazir, A. et Chadha, BS (2010).** Optimisation de la production de cellulase par une souche polyvalente d'*Aspergillus fumigatus fresenius* (AMA) capable d'un désencrage efficace et d'une hydrolyse enzymatique des floes Solka et de la bagasse. *Cultures et produits industriels* , 31 (2), 277-283.

**Stoilova, I. S., Gargova, S. A., et Krastanov, A. I. (2005).** Production of enzymes by mixed culture from micelial fungi in solid-state fermentation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19(1), 103-108.

**Sumiati, T., et Suryadi, H. (2022).** Isolement des champignons de la pourriture blanche du bois pourri du jardin botanique de Bogor en Indonésie et son activité d'enzymes ligninolytiques. *Journal de pharmacognosie*, 14 (1).

**Sun, Y., & Cheng, J. (2002).** Hydrolyse des matériaux lignocellulosiques pour la production d'éthanol : un bilan. *Technologie des bioressources* , 83 (1), 1-11.

## T

**Taherzadeh, MJ, & Karimi, K. (2008).** Prétraitement des déchets lignocellulosiques pour améliorer la production d'éthanol et de biogaz : un bilan. *Revue internationale des sciences moléculaires*, 9 (9), 1621-1651.

**Tan, SS, Li, DY, Jiang, ZQ, Zhu, YP, Shi, B., & Li, LT (2008).** Production de xylobiose à partir de la liqueur d'explosion d'autohydrolyse d'épis de maïs à l'aide de *Thermotoga maritima* xylanase B (XynB) immobilisée sur Eupergit C. *Bioresource Technology* chélaté au nickel, 99 (1), 200-204.

**Tao, YM, Zhu, XZ, Huang, JZ, Ma, SJ, Wu, XB, Long, MN et Chen, QX (2010).** Purification et propriétés de l'endoglucanase d'une souche hydrolysante de bagasse de canne à sucre, *Aspergillus glaucus* XC9. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (10), 6126-6130.

## V

**Van Parijs, FR, Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. et Merks, RM (2010).** Modélisation de la polymérisation de la lignine. I. Modèle de simulation des polymères de déshydrogénation. *Physiologie végétale*, 153 (3), 1332-1344.

**Van den Brink, J., Maitan-Alfenas, GP, Zou, G., Wang, C., Zhou, Z., Guimarães, VM, & de Vries, RP (2014).** Effet synergique des ensembles d'enzymes *Aspergillus niger* et *Trichoderma reesei* sur la saccharification de la paille de blé et de la bagasse de canne à sucre. *Revue de biotechnologie*, 9 (10), 1329-1338.

**Van Munster, J.M., Daly, P., Delmas, S., Pullan, S.T., Blythe, M.J., et al. (2014).** The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet. Biol.* 72, 34-47. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.04.006>

**Vazquez-Angulo, JC, Mendez-Trujillo, V., Gonzalez-Mendoza, D., Morales-Trejo, A., Grimaldo-Juarez, O., & Cervantes-Diaz, L. (2012).** Une méthode rapide et peu coûteuse pour l'isolement de l'ADN total de *Trichoderma* spp (Hypocreaceae). *Génétique et recherche moléculaire : GMR*, 11 (2), 1379-1384.

## W

**Wertz, JL (2011).** Les hémicelluloses. *Note de synthèse, ValBiom* .

**Woiciechowski, AL, SouzaVandenberghe, LPD, Karp, SG, Letti, LAJ, Carvalho, JCD, Medeiros, ABP, et al. (2013).** L'étape de prétraitement dans la conversion de la biomasse lignocellulosique : systèmes actuels et nouveaux systèmes biologiques. Dans *Conversion de la lignocellulose* (pp. 39-64). Springer, Berlin, Heidelberg.

## Y

**Yanto, DHY, Auliana, N., Anita, SH et Watanabe, T. (2019, novembre).** Décoloration de colorants textiles synthétiques par la laccase de *Trametes hirsuta* EDN084 nouvellement isolé médiée par l'acide violurique. Dans *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 374, No. 1, p. 012005). Édition IOP

**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

**Zhang Percival, YH, Berson, E., Sarkanen, S. et Dale, BE (2009).** Séances 3 et 8 : prétraitement et récalcitrance de la biomasse : fondamentaux et avancées. *Biochimie appliquée et biotechnologie*, 153 (1), 80-83.

**Zhao, X., Zhang, L. et Liu, D. (2012).** Récalcitrance de la biomasse. Partie I : les compositions chimiques et les structures physiques affectant l'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose. *Biocarburants, bioproduits et bioraffinage* , 6 (4), 465-482.

---

# *Annexes*

---



## Milieux de culture et réactifs

**Tableau n° I.** Composition du milieu PDA. (Saint-Germain, 2013)

<b>Composant</b>	<b>Quantité</b>
Pomme de terre	200 g
Dextrose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée.	1 litre
pH	5.0
<b>Stérilisation</b>	121°C /20 min

**Tableau n° II.** Composition Milieu Mandels et Weber (Mandels et Weber, 1969)

<b>Composant</b>	<b>Quantité</b>
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	1% de CMC
pH	5

**Tableau n° III.** Préparation du réactif de DNS (Ghose, 1987)

<b>Composant</b>	<b>Quantité</b>
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.

**Tableau n° IV.** Préparation du tampon citrate de sodium (0.1M, pH 5) (Zhang et *al.*, 2009)

Composant	Quantité	Concentration
Citrate de sodium dihydraté (MM: 294,10 g/mol)	25.703 g	0,0874 M
Acide citrique (MM : 192,12 g/mol)	2.421g	0,0126 M
Préparer 800 ml d' eau distillée dans un récipient approprié.		
Ajouter 25,703 g de citrate de sodium dihydraté à la solution.		
Ajouter 2,421 g d' acide citrique à la solution.		
Ajuster la solution au pH final de 5 en utilisant HCl ou NaOH		
Ajouter de l'eau distillée jusqu'à ce que le volume soit de 1 L.		

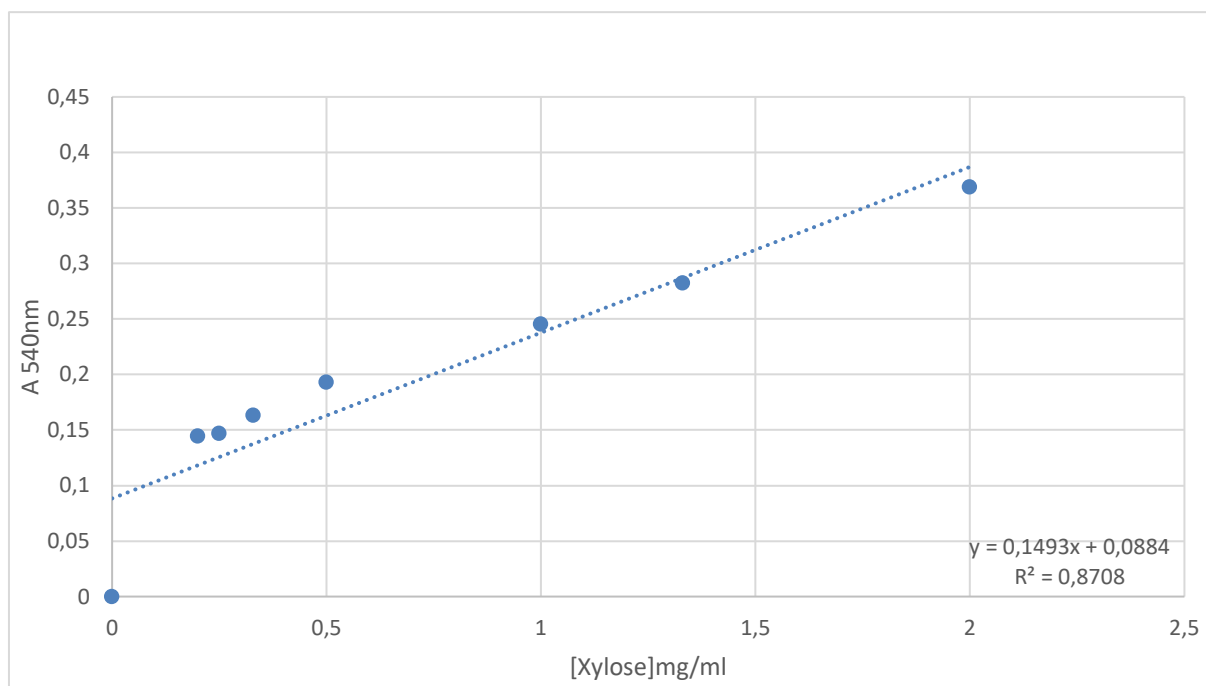
**Tableau n° V.** Préparation du réactif de Bradford

Composant	Quantité
bleu brillant de Coomassie G-250	50 mg
Méthanol	50 ml
Acide phosphorique à 85 % (p/v) (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	100 ml
Eau distillée	850 ml

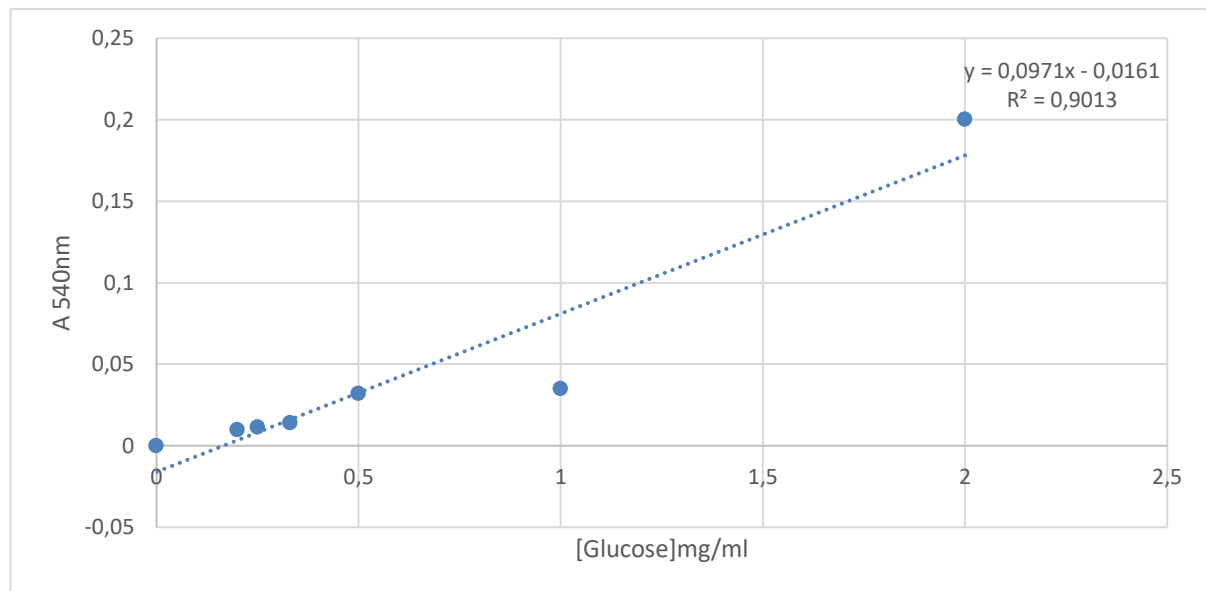
Remarque : n'ajoutez pas de H<sub>2</sub>O dans la solution acide

- Filtrez en utilisant le papier Whatman N°1 pour enlever les précipités juste avant l'utilisation.
- Conserver dans une bouteille sombre à 4 °C.

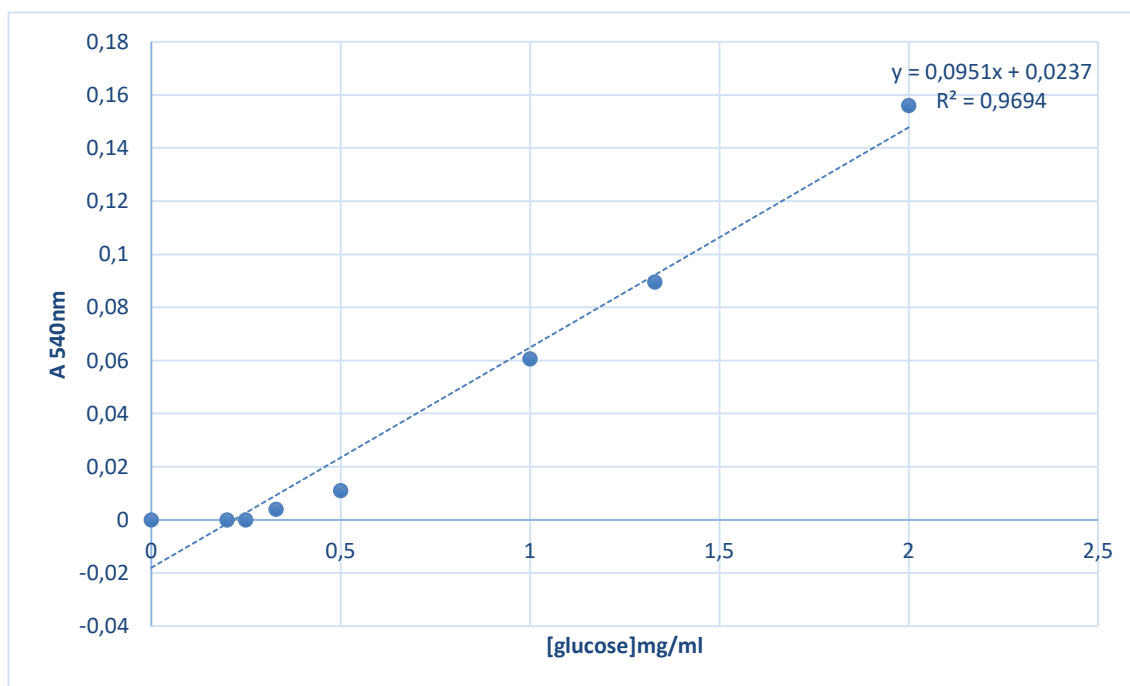
## Courbe d'étalonnage



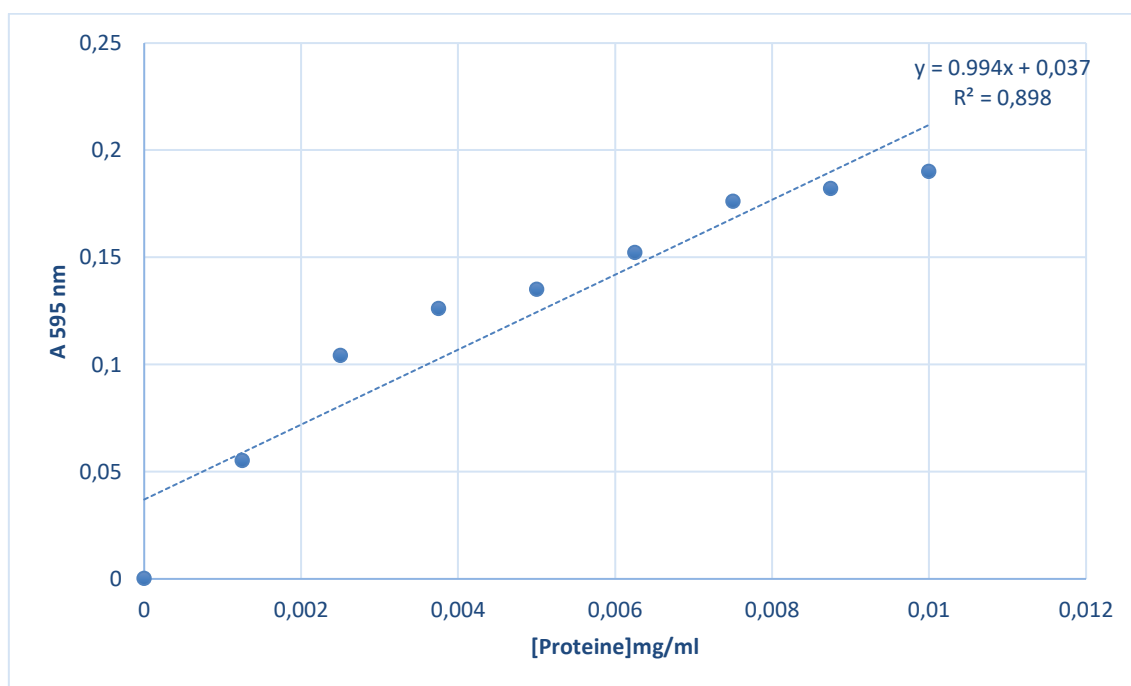
**Figure 1 :** Courbe d'étalonnage de xylose.



**Figure 2 :** Courbe d'étalonnage de glucose à 2g/L.



**Figure 3 :** Courbe d'étalonnage de glucose à 10g/L



**Figure 4 :** Courbe d'étalonnage des protéines

## Résumé

La biomasse lignocellulosique est la principale ressource de carbone renouvelable au monde. Sa valorisation s'est concentrée traditionnellement sur l'utilisation de la cellulose et de l'hémicellulose, qui sont les polysaccharides les plus courants sur la planète. Les principales enzymes impliquées dans la dégradation de ces polysaccharides sont les glycosyl hydrolases, et les champignons filamenteux sont de très bons producteurs de ce type d'enzymes. La saccharification de la biomasse lignocellulosique par des enzymes fongiques produites avec la fermentation mixte dans fermentation à l'état solide (SMF) est un bioprocédé qui peut être utilisé comme une technologie révolutionnaire pour réduire le coût des catalyseurs biologiques utilisés dans la conversion de la biomasse lignocellulosique telle que le son de blé et la paille. Ce travail est consacré à produire un extrait enzymatique contenu des enzymes cellulases et d'hémicellulases par une culture mixte d'*Aspergillus niger* strain BG et *Trichoderma afroharzianum* AZ12 dans le cadre d'une fermentation en milieu solide en utilisant la paille et le son du blé comme unique source de carbone. Au cours de ce procédé les activités xylanase, CMCase, avicelase, activité total,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase atteints respectivement 1469,6 U/mL ; 418,2 U/mL ; 1948U/mL ; 292,6 U/mL ; 65,3 U/mL ; 53,3 U/mL après 7 jours d'incubation à 28°C avec un ratio paille/son de 60% humidifié à 85%. Une cinétique de saccharification de la paille et son de blé traité et non traité a été effectué avec l'extrait enzymatique produite sous SMF et les résultats de saccharification montrés qu'elle était capable de libérer des mono et des oligosaccharides issue de la dégradation de la cellulose et l'hémicellulose de la paille et son de blé le plus spécifiquement le son de blé qui donné des taux de sucres réducteur de 384,24mg/mL pour le substrat non traité et 146.34mg/mL pour le substrat traité. L'analyse des produits d'hydrolyse avec la chromatographie sur couche mince (CCM) a permis de la présence des monosaccharides et des oligosaccharides. L'efficacité de la saccharification de la paille et le son de blé par l'extrait enzymatique d'*A. niger* et *T. afroharzianum* est obtenue par synergie enzymatique entre les complexes enzymatiques de type cellulases, hémicellulases et les peroxydases.

**Mots Clés:** Biomasse lignocellulosique, Cellulases, Xylanases, Fermentation, Saccharification.

## Abstract

Lignocellulosic biomass is the world's main renewable carbon resource. Its valorisation has traditionally focused on the use of cellulose and hemicellulose, which are the most common polysaccharides on the planet. The principal enzymes involved in the degradation of these polysaccharides are called glycosyl hydrolases, the filamentous fungi being very good producers of these enzymes. Saccharification of lignocellulosic biomass by fungal enzymes produced by mixed fermentation in solid state fermentation (SSF) is a bioprocess that can be used as a revolutionary technology to reduce the cost of biological catalysts used for conversion of lignocellulosic biomass like wheat bran and straw. This work focuses on the production of an enzymatic extract that contains cellulase and hemicellulase enzymes by a mixed culture of *Aspergillus niger* strain BG and *Trichoderma afroharzianum* AZ12 in a solid state fermentation that uses straw and wheat bran as the sole carbon source. During this process, xylanase, CMCase, avicelase, total activity,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase reached 1469.6 U/mL ; 418.2 U/mL ; 1948U/mL ; 292.6 U/mL ; 65.3 U/mL ; 53.3 U/mL after 7 days of incubation at 28°C with a 60% straw to bran ratio moistened to 85%. Saccharification kinetics of treated and untreated wheat straw and bran were carried out with the enzymatic extract produced under SSF and the saccharification results showed it was able to produce mono- and oligosaccharides derived from the degradation of cellulose and hemicellulose of wheat straw and bran, specifically wheat bran, which yielded reducing sugars of 384.24mg/mL for the untreated substrate and 146.34mg/mL for the treated substrate. Analysis of the hydrolysis products with thin layer chromatography (TLC) indicated the occurrence of monosaccharides and oligosaccharides. The efficiency of wheat straw and bran saccharification by the enzymatic extract of *A. niger* and *T. afroharzianum* was obtained by enzymatic synergy between the cellulase, hemicellulase and peroxidase enzyme complexes.

**Key words:** Lignocellulosic biomass, Cellulases, Xylanases, Fermentation, Saccharification.

## ملخص

الكتلة الحيوية النباتية هي المورد الرئيسي للكربون المتجدد في العالم. ركز تمييزه تقليدياً على استخدام السليلوز وهيميسليلوز ، وهما أكثر السكريات شيوعاً على هذا الكوكب. الإنزيمات الرئيسية المشاركة في تحلل السكريات هذه هي الجليكوزيلهايدرولازات ، والفطريات الخيطية منتجة جداً لهذا النوع من الإنزيم. تسكر الكتلة الحيوية اللجنوسليلوزية بواسطة الإنزيمات الفطرية المنتجة مع التخمر المختلط في تخمير الحالة الصلبة (SMF) هي عملية حيوية يمكن استخدامها كتنقية اختراق لتقليل تكلفة المحفزات البيولوجية المستخدمة في تحويل الكتلة الحيوية النباتية مثل نخالة القمح والقش. هذا العمل مكرس لإنتاج مستخلص إنزيمي يحتوي على إنزيمات السليلولاز والهيميسليلولاز بواسطة مزرعة مختلطة من سلالة *Aspergillus niger* BG و *Trichoderma afroharzianum* AZ12 في إطار التخمر في وسط صلب باستخدام القش ونخالة القمح كمصدر الكربون الوحيد. خلال هذه العملية، وصلت أنشطة xylanase و CMCase و avicelase و total و  $\beta$ -glucosidase و  $\beta$ -xylosidase على التوالي 1469,6 U/mL ; 418,2 U/mL ; 1948U/mL ; 292,6 U/mL ; 65,3 U/mL ; 53,3 U/mL بعد 7 أيام من الحضارة عند 28 درجة مئوية مع نسبة تين / نخالة 60% مرطبة عند 85%. تم إجراء حركية تكسير القش ونخالة القمح المعالج وغير المعالج باستخدام المستخلص الإنزيمي المنتج تحت SMF وأظهرت نتائج التكسير أنه قادر على إطلاق السكريات الأحادية والقليلة الناتجة عن تحلل السليلوز والهيميسليلوز من القش ونخالة القمح ، وبشكل أكثر تحديداً نخالة القمح ، والتي أعطت خفض مستويات السكر بمقدار 384.24 مجم / مل للركيزة غير المعالجة و 146.34 U/mL / مل للركيزة المعالجة. سمح تحليل منتجات التحلل المائي باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) بوجود السكريات الأحادية والسكريات قليلة الكثافة. يتم الحصول على كفاءة تسكر القش ونخالة القمح عن طريق المستخلص الإنزيمي لنبات *A. niger* و *T. afroharzianum* عن طريق التآزر الإنزيمي بين المركبات الأنزيمية من السليلولاز ، والهيميسليلولاز ، ونوع البيروكسيداز.

**الكلمات الدالة:** الكتلة الحيوية النباتية، Cellulases، Xylanases، التخمر، التسكر