

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**  
**Spécialité Microbiologie Appliquée.**



**Réf :.....**

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

## **MASTER**

### *Thème*

**Production d'enzymes industrielles par  
cultures mixtes de *Trichoderma sp* et  
*Aspergillus sp***

Présenté par :  
**ALLOUCHE Dyhia & BENDJOUDI Sarra**  
Soutenu le : **24 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mr. TOUATI Abdelaziz.	Professeur	Président
Mr. BETTACHE Azzeddine.	MCA	Encadreur
Mme. SOUAGUI Samiha.	MAA	Examinatrice
Mlle. AZZOUZ Zahra	Doctorante	Invitée

**Année universitaire : 2017 / 2018**

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers parents qui m'ont guidé durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, ma mère qui a été à mes côtés et ma soutenu durant toute ma vie, et mon père qui a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis, merci infiniment je vous aime.*

*A mes très chères sœurs, chafia et mimi*

*A mes très chers frères syphax et aïssa*

*A ma très chère nièce mariem .*

*A Farid qui m'a soutenu jusqu'au bout.*

*A toute ma famille*

*A mon binôme Sarra BELDJOUDI et toutes sa famille.*

*A mes amies : Imane, Hayat, Soussou, Tatous, Fatma, Tissu, Kahina et Sabrina.*

*Merci infiniment*

*Dyhia*

## *Dédicaces*

*Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant, pour avoir guidé mes pas et de m'avoir donnée la volonté pour achever ce travail*

*Je dédie ce mémoire à*

*Mes chers parents que j'aime plus*

*Que tout au monde et à lesquelles je dois*

*Toute ma vie et toutes mes réussites, je*

*Vous dis merci et que le dieu vous*

*Protège.*

*A mes deux frères : Abed arahim ; Abed al Bakí.*

*A mes sœurs : Ahlam, Soumia, Asma, Manel ; auxquelles je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.*

*A mes très chères cousines : Siham, Assia, Kenza, Salma et Latifa.*

*A Karim qui m'a bien aidé durant mon parcours.*

*Ainsi qu'à mes chères amies ; Dyhia, Fatma, Taous, Thiziri, Warda et Souria ; et à tous les étudiants de ma promotion MA 2017/2018.*

*A tous ceux que j'aime.*

*Bendjoudi Sarra*

## *Remerciement*

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

*Mes remerciements s'adressent en premier lieu au Professeur Benallaoua S. directeur du laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) pour nous avoir accueillis au sein de son laboratoire.*

*A notre promoteur Mr Bettache Azzeddine qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger cette étude, qui a fait preuve d'une grande patience, pour ses précieux conseils, sa gentillesse et ces compétences On est très honorée d'avoir pu bénéficier de vos remarques et de vos compétences. Votre encadrement était exemplaire.*

*A Azzouze Zahra qui nous a aidés et orientés pour la réalisation d'une partie de ce travail. Merci pour votre gentillesse, votre confiance et de votre générosité.*

*Nos remerciements vont aussi à Mr.Touati, d'avoir eu l'aimabilité d'accepter volontairement et aimablement de présider ce Jury.*

*Nous tenons à remercier également Mme Souagui, d'avoir acceptée, d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici nos sincères sentiments de gratitude et de respect.*

*Nos remerciement s'adresse également à toutes les personnes qui nous a apporté d'aide, de diverses façons et à différent moments pour achever ce modeste travail.*

## Liste des Tableaux

FIGURES	TITRES	PAGES
<b>Tableau I</b>	Compositions chimiques des pailles de blé relevées dans la littérature (en % de Matière Sèche)	07
<b>Tableau II</b>	Comparaison entre SSF et SmF	12
<b>Tableau III</b>	Différentes étapes du dosage de l'activité CMC <sub>Case</sub>	18
<b>Tableau IV</b>	Optimisation de la source de carbon	20
<b>Tableau V</b>	Différents niveaux des paramètres choisis pour l'optimisation	20
<b>Tableau VI</b>	Matrice d'expérience donnée par BBD	21
<b>Tableau VII</b>	Les principaux caractères microscopiques et macroscopiques de la souche (BG) et la souche (G).	23-24
<b>Tableau VIII</b>	Analyse de variance pour le modèle polynomial de l'activité CMC <sub>Case</sub> .	31
<b>Tableau IX</b>	Effet des facteurs linéaire, quadratique et l'effet des interactions.	33
<b>Tableau X</b>	Conditions optimales appliquées pour la production de CMC <sub>Case</sub> s proposées par le modèle BBD.	36
<b>Tableau XI</b>	Valeurs réelles et prédites.	36

### Liste des Tableaux dans l'annexe

**Tableau XII** : Gamme étalon pour le dosage de l'A CMC<sub>Case</sub>s (solution mère de glucose 2g/l)

**Tableau XIII** : Les valeurs réelles et prédites de BBD.

## Liste des figures

<b>Figures</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>Figure 1</b>	Composition typique de la biomasse lignocellulosique	<b>03</b>
<b>Figure 2</b>	Structure de la cellulose	<b>03</b>
<b>Figure 3</b>	Les trois principaux monolignols qui composent la lignine.	<b>05</b>
<b>Figure 4</b>	Enzymes intervenant dans la dégradation de la cellulose	<b>05</b>
<b>Figure 5</b>	Modèle de développement d'un champignon filamenteux en SSF	<b>10</b>
<b>Figure 6</b>	Ensembles des réponses qui correspondent à tous les points du domaine d'étude	<b>14</b>
<b>Figure 7</b>	Production de CMC <sub>ase</sub> dans la fermentation mixte sur milieu liquide et solide après 7 jours d'incubation.	<b>24</b>
<b>Figure 8</b>	Effet du temps d'incubation sur l'activité CMC <sub>ase</sub> de la culture mixte des souches BG et G.	<b>25</b>
<b>Figure 9</b>	Effet de la température sur l'activité CMC <sub>ase</sub> de la culture mixte de BG et G	<b>26</b>
<b>Figure 10</b>	Croissance de BG et G sur la paille de blé incubé à 30°C	<b>27</b>
<b>Figure 11</b>	Effet de l'humidité sur l'activité CMC <sub>ase</sub> de la culture mixte de (BG) et (G).	<b>28</b>
<b>Figure 12</b>	Croissance de BG et G sur la paille de blé humidifié à 85%.	<b>28</b>
<b>Figure 13</b>	Effet du ratio sur l'activité CMC <sub>ase</sub> de la culture mixte de souches (BG) et (G).	<b>29</b>

<b>Figure 14</b>	La croissance de BG et G sur un milieu contenant la paille de blé et son de blé avec un ratio de 6:4	<b>30</b>
<b>Figure 15</b>	Comparaison entre les valeurs réelles et prédites par BDD	<b>31</b>
<b>Figure 16</b>	Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour la production du CMCCase par les deux souches G et BG.	<b>32</b>
<b>Figure 17</b>	Courbe de surface de réponse indiquant l'interaction entre les variables sur la production de la CMCCase	<b>34</b>
<b>Figure 18</b>	Courbe de surface de réponse indiquant l'interaction entre les variables sur la production de la CMCCase	<b>35</b>

### Liste des figures dans l'annexe

<b>Figure 19</b>	courbe d'étalonnage du dosage de CMCases
------------------	--

## Liste des abréviations

- **BBD**: Box-Behnken Design-Expert.
- **BGs** : B-glucosidases.
- **CMC** : carboxymethyl cellulose.
- **CMCases** : activité carboxyméthylecellulase.
- **DNS** : 3,5-acide dinitrosalicylique.
- **DP** : degré de polymérisation.
- **EG** : Endoglucanases.
- **APFase** : activité papier filtre.
- **LMA**: Laboratoire Microbiologie Appliqué.
- **MW** : Mandels et Waber.
- **OFAT**: one factor at time.
- **P/S** : paille de blé /sang de blé.
- **p/v** : poids par volume.
- **PDA** : Potato- Dextrose- Agar.
- **pH** : Potentiel hydrogène
- **RSM** : plan de surface et de réponse.
- **SmF** : fermentation submergée.
- **Sp** : espèce.
- **SSF** : fermentation en milieu solide.
- **UI** : unité internationale



Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviation	

## Sommaire

Introduction général.....	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
I. Biomasse lignocellulosique.....	3
I.1.Cellulose.....	3
I.2.Hémicellulose.....	4
I.3.Lignine .....	4
II. Enzymes cellulolytiques .....	5
II.1.Cellulases .....	5
II.2.xylanases .....	6
II.3.Ligninases .....	6
III. Les déchets lignocellulosiques .....	7
III.1. Paille de blé .....	7
IV. Les champignons lignocellulolytiques .....	8
IV.1. Généralité sur les champignons.....	8
IV.2. Activité lignocellulolytiques des champignons.....	8
IV.2.1.Genre Trichoderma.....	9
IV.2.2.Genre Aspergillus.....	9
V. La fermentation en milieu solide (SSF).....	9
VI. La fermentation submergée (SmF).....	11
VII. Comparaison entre la SmF et SSF .....	12
VIII. Fermentation mixte.....	12
IX. Plan d'expérience .....	14
IX.1. Définition .....	14
IX.2. Plan de surface et de réponse(RSM) .....	14
IX.2. Plan de Box-Behnken.....	15
IX.3. Modèle mathématique .....	15

## **Chapitre II : Matériels et Méthodes**

I. Matériel analytique .....	16
II. Matériel biologique.....	16
II.1. Préparation du matériel biologique.....	16
II.1.1. Repiquage des souches .....	16
II.1.2. Observation macroscopique .....	16
II.1.3. Observation microscopique .....	16
II.1.4. Préparation des solutions sporale .....	16
II.2. Préparation de substrat de fermentation .....	16
II.3. Productions des enzymes cellulolytiques par fermentation mixte sur des milieux liquide et solide .....	17
II.3.1.Fermentation liquide.....	17
II.3.2.Fermentation solide .....	17
II.4. Dosage de l'activité endoglucanases (CMCase) .....	18
II.5. Optimisation des paramètres de la fermentation mixte sur milieu solide par one factor at time.....	19
II.5.1. Temps d'incubation .....	19
II.5.2. Humidité .....	19
II.5.3.Température.....	19
II.5.4. Ratio (paille de blé/ son de blé) .....	19
II.6. Analyse statistique.....	20
II.7. Optimisation de production d'endoglucanases par surfaces de réponse (RSM) .....	20

## **Chapitre III : Résultats et discussions**

I. Caractérisations des souches fongiques .....	23
II. Productions des enzymes cellulolytiques par fermentation mixte sur milieux liquide et solide .....	24
III. Optimisation des paramètres de la fermentation mixte sur milieu solide par la méthode classique (One Factor At Time) .....	25
III.1. Temps d'incubation.....	25
III.2. Température .....	26
III.3 Humidité.....	27
III.4.Ratio .....	29
IV. Optimisation par Plan d'expérience Box-Behnken.....	30

IV.1. Analyse de la variance (ANOVA) .....	31
IV.2. Coefficient de détermination $R^2$ .....	32
IV.3. Effet des facteurs .....	33
IV.3.1.Effet linéaire .....	33
IV.3.2.Etude des interactions.....	34
IV.4. Modèle mathématique .....	35
II. validation du modèle.....	36
Conclusion général .....	37
Références bibliographiques.	

Annexes.

# Introduction

Depuis des milliers d'années, les êtres humains se servent des microorganismes, bactéries et champignons pour fabriquer des produits alimentaires comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes, omniprésents dans notre environnement sont actuellement de remarquables agents de production de nombreuses molécules organiques obtenues par fermentation et utilisées pour leurs propriétés fonctionnelles dans des domaines extrêmement variés (Demain, 2000).

La quantité de biomasse produite sur les continents de la planète est estimée à 172 milliards de tonnes de matière sèche annuelle. Elle constitue ainsi le 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 réside dans la valorisation de cette biomasse (Anastas et *al.*, 2000). La biomasse lignocellulosique fut naturellement au centre des recherches pour la production des carburants de substitutions et même pour étudier de nouvelles filières de biotechnologie blanche (bio raffineries) étant présentée comme alternative à la pétrochimie (Roussos, 1985). 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 notre planète (Dekker et Lindner, 1979).

Les cellulases sont essentiellement produites par des micro-organismes cellulolytiques, particulièrement les moisissures grâce à leur capacité incomparable à conquérir les substrats naturels avec une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé (Breton, 1990). Les moisissures sont de plus en plus utilisées dans la production de métabolites en particulier les enzymes (Scriban, 1999).

Ce travail sert à utiliser les déchets agroalimentaire dans le but de les valorisées et de produire des enzymes cellulosiques. La production de ce dernier par la fermentation mixte est guidée par le biais de plusieurs paramètres à savoir la période d'incubation, la température, l'humidité et la concentration du substrat.

De ce fait, la nécessité d'optimisation de la production par la méthode one factor at time semble nécessaire pour déterminé les conditions optimaux de la production puis

l'utilisation de l'approche mathématique pour minimiser le nombre des essais et de réduire les expériences et cela se fait en appliquant la méthodologie de surface de réponse (RMS), par le plan d'expérience Box-Behnken (BBD).

Notre travail s'organise autour de trois parties :

La première partie est une synthèse bibliographique mettant au point la paille de blé et sa composition chimique les enzymes, les champignons cellulolytiques : *Aspergillus sp* et *Trichoderma sp* et de leurs capacités à produire des endoglucanases ainsi que des notions fondamentales sur les fermentations solides liquides et mixte et enfin on à parler un peu sur plans d'expérience et leurs diversités.

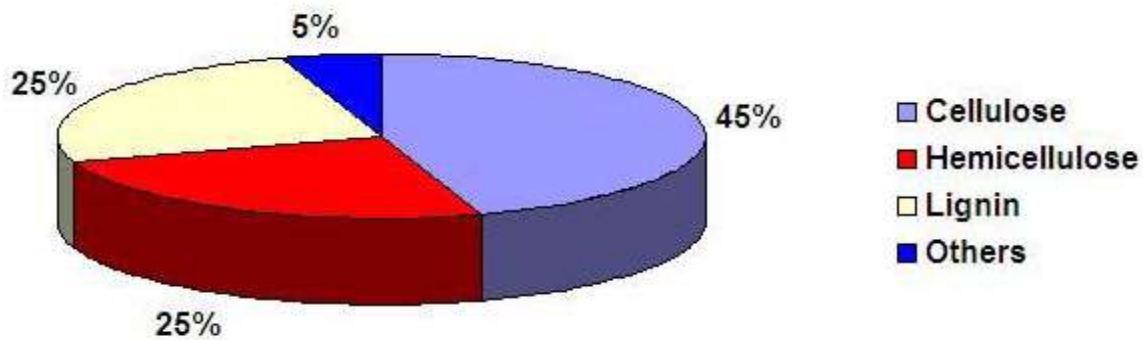
La deuxième partie expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre pour la préparation du sous-produit puis la détermination et l'optimisation des paramètres influençant cette production et les différents dosages biochimiques des activité enzymatique ainsi que la modélisation de l'activité endoglucanases par le biais de la méthode des plans d'expériences.

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

# Synthèse bibliographique

## I. Biomasse lignocellulosique

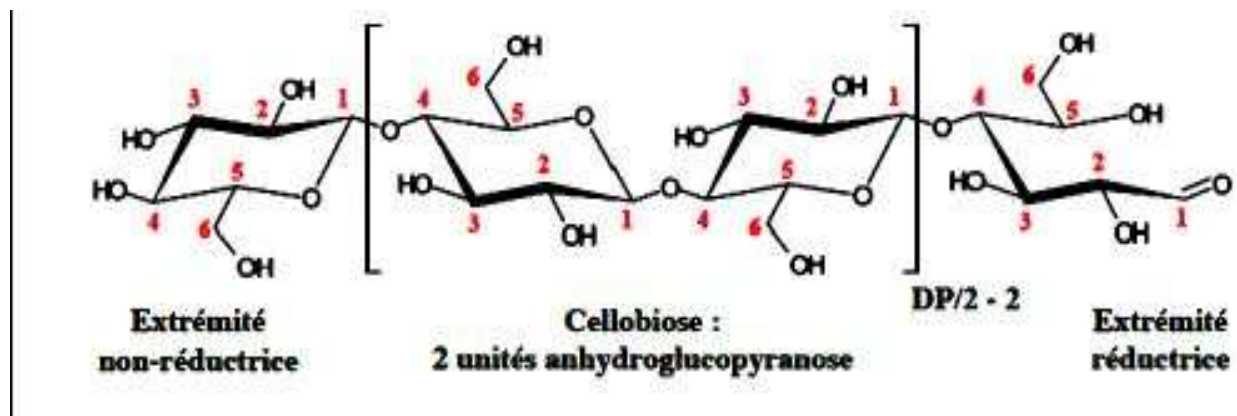
La biomasse lignocellulosique est constituée de trois composants majeurs: La cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Les arbres et les herbes représentent la grande majorité de la biomasse. En moyenne, la biomasse lignocellulosique contient 40-60 % de cellulose, 20-40% d'hémicelluloses et 10-25 % de lignine (Wertz, 2010).



**Figure 1:** Composition typique de la biomasse lignocellulosique (Wertz, 2010).

### I.1.Cellulose

La cellulose constitue la structure de base des cellules végétales. C'est un homopolymère linéaire de résidus glucose de configuration D reliées entre elles par des liaisons  $\beta$ -1,4 glucosidiques sa formule chimique est  $(C_6H_{10}O_5)_X$  (Serge Perez, 2000). Le degré de polymérisation (DP) moyen de la cellulose, correspond au nombre de motifs de  $\beta$ -Dglucopyranose, il varie de 8000-15 000 unités de glucose (Brown, 2004).



**Figure 2 :** Structure de la cellulose (Brown, 2004).



La cellulose existe sous deux états structuraux: la cellulose amorphe qui sont plus accessibles à la dégradation tandis que la cellulose cristalline qui n'est généralement pas accessible aux activités enzymatiques où les polymères s'organisent sous la forme d'une maille cristalline dont la cohésion est assurée par les liaisons hydrogène. La maille cristalline est constituée de plusieurs chaînes en parallèles (Xun, 2015).

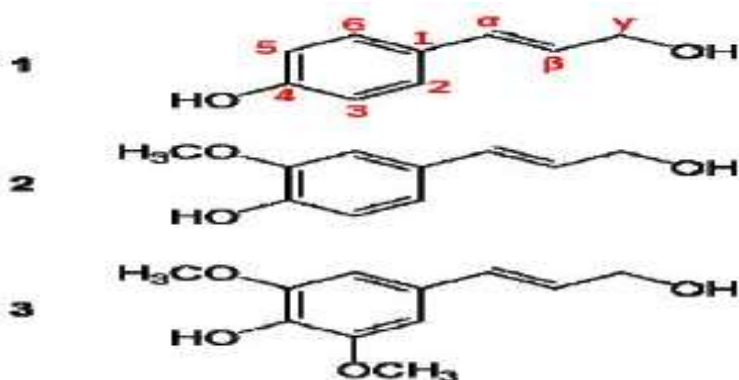
## **I.2.Hémicellulose**

Les hémicelluloses sont des polysaccharides non cellulosiques se distinguant de la cellulose par le fait qu'ils soient des polymères hétérogènes à chaînes plus courtes et branchées, principalement constitué de: D-xylose, D-mannose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, 4-O-méthylglucuronic, D-galacturonique et acide D-glucuronique. Les différents sucres sont liés principalement par des liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques, mais aussi avec des liaisons  $\beta$ -1,3 glycosidiques (Pérez et *al.*, 2002). Elle représente 33% de la biomasse non traitée. Après traitement, cette fraction est essentiellement constituée de pentose, xylose et glucose (Eloutassi, 2014).

Les hémicelluloses sont associés aux fibrilles de cellulose par des liaisons hydrogène. Ce sont des molécules facilement hydrolysables, qu'il est assez facile de séparer de la cellulose lors des traitements papetiers (Privas, 2013).

## **I.3.Lignine**

La lignine est le dernier composant principal de la lignocellulose qui est un polymère amorphe tridimensionnel de nature phénolique (Privas, 2013). Les lignines sont des polymères hautement condensés, formés par la déshydrogénation et la polymérisation de trois alcools à noyaux phénylpropane C6-C3: les alcools trans-*p*-coumarylique, transconiférylique et trans-sinapylique (Boulaouad, 2013).La lignine assure dans le bois et les végétaux ligneux la rigidité et la cohésion de la paroi cellulaire ainsi qu'une imperméabilité à l'eau. Elle est présente dans la paroi des fibres, dans la lamelle moyenne et les vaisseaux du xylème. Elle forme également une barrière physicochimique contre les attaques microbiennes (Mussatto *et al.*, 2007).



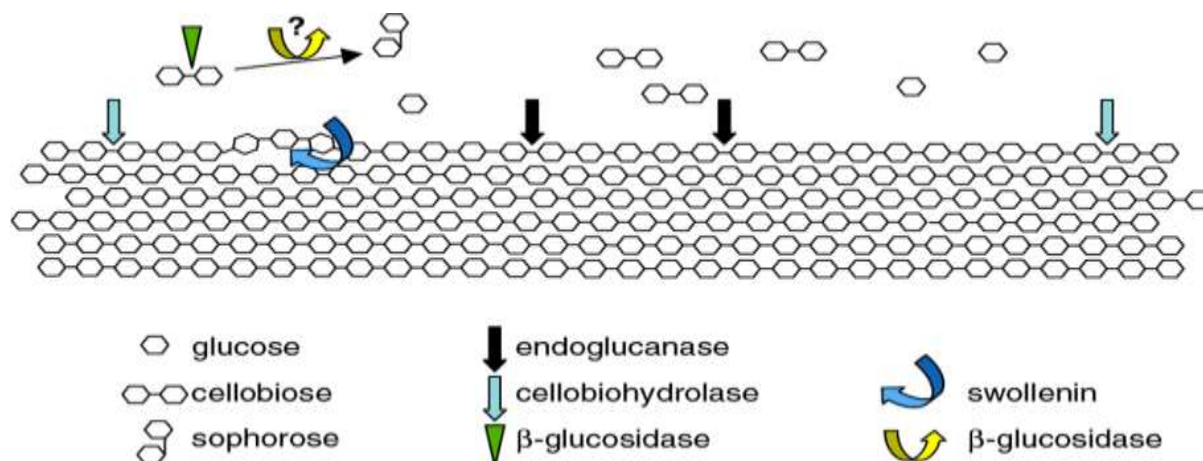
1 alcool p-coumarylique ; 2 alcool coniférylique ; 3 alcool sinapylique.

**Figure 3 :** Les trois principaux monolignols qui composent la lignine (Mussatto et al., 2007)

## II. Enzymes cellulolytiques

### II.1. Cellulases

Beaucoup de micro-organismes produisent des cellulases pour dégrader la cellulose afin de l'utiliser comme source de carbone. L'activité cellulolytique se traduit par l'action de trois types d'enzymes qui sont classées en fonction de l'endroit où elles agissent au niveau de la fibre cellulosique. Les endoglucanases commencent l'hydrolyse, les exoglucanases agissent au niveau des extrémités générés par les endoglucanases, suivie par les  $\beta$ -glucosidases qui agissent sur le produit de catalyse des exoglucanases, pour libérer enfin des monomères de glucose (Pimentel et al, 2014).



**Figure 4 :** Enzymes intervenant dans la dégradation de la cellulose (Alarcon-Gutiérrez, 2007).

**a- Les Endoglucanases** ou 1,4-  $\beta$ -glucanglucanohydrolases (EG) sont connues pour hydrolyser aléatoirement les liaisons osidiques, principalement dans les zones amorphes. Ils

sont les premiers responsables de la diminution du degré de polymérisation des substrats cellulotiques (Boisset et al, 2000). Ces enzymes n'agissent pas sur la cellulose cristalline.

L'attaque, au hasard, a pour effet de créer de nouvelles extrémités non réductrices qui deviennent à leur tour des sites réactifs pour les cellobiohydrolases (Hasper *et al.*, 2002).

**b- Les exoglucanases** ou 1,4.  $\beta$ -D glucanecellobiohydrolases qui agissent de manière processive et s'adsorbent sur la cellulose en hydrolysant à partir des extrémités réductrices ou à partir des extrémités non réductrices pour libérer du cellobiose. Ce sont les seules enzymes agissant sur la cellulose cristalline (Prevot, 2013).

**c-  $\beta$ -glucosidases** ou  $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase (BGs) qui hydrolysent le cellobiose ou les cello-oligosaccharides en glucose. Elles n'ont pas d'action sur la cellulose insoluble (Ballerini, 2011 ; Saddler *et al.*, 2010).

## II.2.xylanases

Les xylanases sont des glucosidases (O-glycoside hydrolases, EC 3.2.1.x) qui catalysent les liaisons 1,4-D-xylosidiques dans les régions non substituées des chaînes de xylanes pour aboutir aux xyloses (une source de carbone primaire nécessaire aux métabolismes cellulaires) (Holtz et al, 1991).

Elles constituent un complexe multi-enzymatique qui se trouve en particulier dans les bois (Kalogeris et al, 1998).

On peut distinguer les endo et les exoxyanases.

- Les endo-D-xylanases,  $\beta$ -D-(1,4) xylanexylanohydrolase (EC 3.2.1.8), dégradent leurs substrats par une attaque intramoléculaire. Les exo-D-xylanases,  $\beta$ -D-(1,4) xylanexylanohydrolase, (EC 3.2.1.37) hydrolysent les polymères de xylose par récurrence à partir de leur extrémité non-réductrice (Haberra, 2014).

## II.3.Ligninases

Les ligninases sont principalement produites par des champignons basidiomycètes de la pourriture blanche. Ce sont généralement des métallo-enzymes qui vont oxyder les phénols composant les chaînes ramifiées des lignines (Prevot, 2013).

Elles sont classées en deux catégories (Prevot, 2013) :

- Les phénols oxydases ou laccases. Ce sont des oxydoréductases glycosylées à cuivre qui utilisent l'O<sub>2</sub> pour oxyder divers composés aromatiques et non aromatiques.
- Les peroxydases à hème.

### III. Les déchets lignocellulosiques

La ressource de biomasse lignocellulosique provient aussi bien des résidus agricoles et forestiers ou des sous-produits de transformation du bois que de cultures dédiées, qu'il s'agisse de plantes ligneuses ou de plantes herbacées (Saidi, 2011).

#### III.1. Paille de blé

La paille de blé est constituée par la tige et des feuilles et l'épi ou rachis à son sommet, secs (Zeitoun, 2011).

La composition en hémicelluloses, lignine, cellulose, protéines et cendres de la paille de blé est très variable (Tableau I), d'une part à cause de la variabilité de la matière végétale fonction de la nature du sol, du climat et de l'état de maturité de la plante au moment de la récolte, et d'autre part, à cause des différentes méthodes d'extractions employées.

Cependant, quels que soit les auteurs, la cellulose constitue le composé majoritaire de la paille, suivie par les hémicelluloses. La lignine représente environ 14% de la masse de la matière sèche de la plante, ce qui fait de la paille une matière végétale peu lignifiée, par comparaison avec le bois. Les minéraux sont présents en plus faible quantité ( $\approx 5\%$ ) et les protéines sont un composé minoritaire (Zeitoun, 2011).

**Tableau I:** Compositions chimiques des pailles de blé relevées dans la littérature (en % de Matière Sèche) (Zeitoun, 2011).

Référence	Harper, 1981	Magro, 1995	Lawther et al., 1995	Markessini et al., 1997	Montane et al., 1998	Maréchal, 2001
Hémicelluloses	33.3	28.7	32.6 ( $\pm 2.3$ )	34	30.4	31.7 ( $\pm 1$ )
Lignine	14.6	12.7	14.1	14.1	17.1	10( $\pm 2.2$ )
Cellulose	41.8	43	37.8 ( $\pm 0.7$ )	38.1	33.7	40.8 ( $\pm 3$ )
Protéines	2.6	2.6	1.7	n.d	n.d	2.4 ( $\pm 0.4$ )
Cendres	7.2	3.2	7.9	6.4	8	5.9 ( $\pm 1$ )
Xylose/Arabinose	5.5	7.6	10.1	n.d	6.6	7

## IV. Les champignons lignocellulolytiques

### IV.1. Généralité sur les champignons

En 1863, Schacht a été le premier à mettre en évidence le rôle des champignons dans la pourriture du bois. Les travaux de Hartig (1878) (cité par Heitner *et al.*, 2010) ont permis de comprendre le mécanisme biologique de dégradation fongique du bois, et d'identifier différents types des champignons en fonction des caractéristique de la pourriture du bois.

Depuis les années 80, les champignons de pourritures de bois ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche non seulement pour comprendre les mécanismes biologiques mais également dans un objectif de les utiliser pour le prétraitement des biomasses lignocellulosiques (Schurz, 1978 ; Sun et Cheng, 2002).

Les Champignons décomposeurs du bois assurent leur nutrition par digestion enzymatique des constituants du bois (Rabinovich *et al.*, 2002; Sanchez, 2009), et leur action aboutit à une diminution des propriétés mécaniques et esthétiques du bois. Il existe plusieurs groupes écologiques de champignons se développant sur ou dans le bois, chacun ayant des propriétés d'attaque spécifiques observables à l'échelle macroscopique résultant de leur différentes activités enzymatique (Schwarze *et al.*, 2000).

### IV.2. Activité lignocellulolytiques des champignons

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

*Trichoderma* produit beaucoup d'enzymes extracellulaires. Il est utilisé dans le commerce pour la production de cellulase et d'autres enzymes dégradant les complexes polysaccharidiques (Reculeau, 2003).

La capacité de dégradation des parois cellulaires végétales (lignocellulose) ou capacité lignocellulolytiques est très répandue chez les micro-organismes. Parmi les souches présentant cette capacité, l'une des plus étudiée, servant actuellement de modèle de base et dont l'utilisation est la plus répandue est la souche *Trichoderma reesei* (Prevot, 2013). Parmi les genres producteurs de cellulases les plus répandus dans le sol on peut citer ; *Trichoderma* sp. *Aspergillus* sp. *Acremonium* sp. *Penicillium* sp. *Rhizopus* sp et *Chaetomium* sp. (Makut et Godya, 2010).

La plupart des membres d'*Aspergillus* sont des microorganismes utiles dans la nature pour la dégradation des polysaccharides végétaux et sont d'importance industrielle pour la production d'enzymes : *A. niger*, *A. oryzae* et *A. sojae* (Ward et al., 2006).

#### **IV.2.1.Genre *Trichoderma***

Le genre *Trichoderma* regroupe un ensemble de champignons imparfaits saprophytes qui se retrouvent couramment dans le sol, sur le bois mort, les débris végétaux et les organes aériens des plants. On le reconnaît facilement en culture grâce à la couleur généralement verdâtre de ses spores et le port typique de ses phialides (en forme de quilles) (Johanne, 2002).

#### **IV.2.2.Genre *Aspergillus***

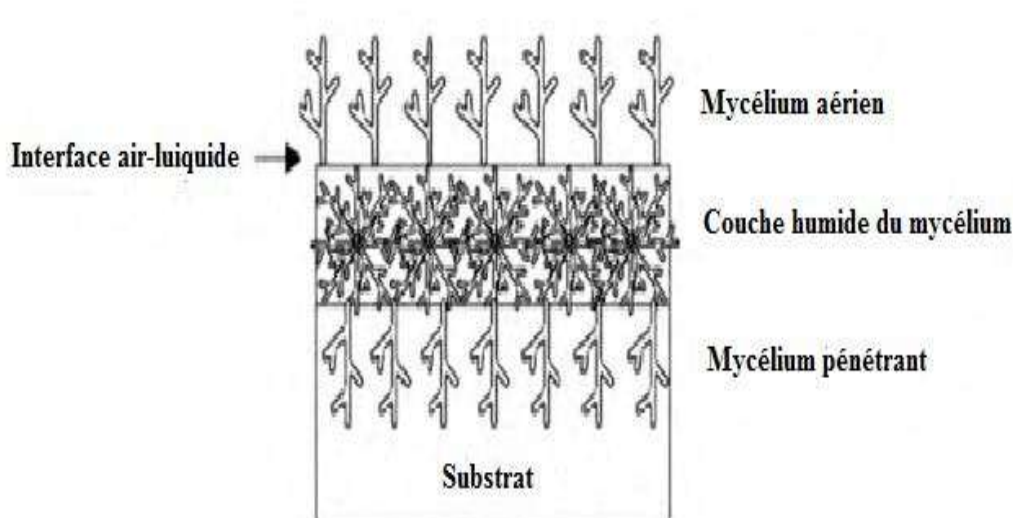
Les champignons du genre *Aspergillus* sont des moisissures, autrement dit des champignons microscopiques filamenteux, qui vivent en saprobiose dans de très nombreux écosystèmes. L'ensemble des filaments (ou hyphes) constitue le mycélium dont le développement habituel comprend une phase végétative avec croissance et nutrition, et simultanément, une phase de multiplication asexuée au cours de laquelle se forment des spores (ou conidies) qui assurent la dispersion. La germination des spores est à l'origine de la formation d'un nouveau mycélium. De plus, une multiplication sexuée (reproduction) est connue chez certaines espèces aspergillaires. Les champignons du genre *Aspergillus* sont des champignons filamenteux dont les filaments sont septés (cloisonnés) (Savalle m, 2015).

### **V. La fermentation en milieu solide (SSF)**

La fermentation en milieu solide est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides, qui jouent le rôle d'un support physique et source de nutriments en l'absence d'eau libre. La quantité d'eau dans cette matrice solide doit être suffisante pour la croissance et le métabolisme des micro-organismes (Mitchell et al., 2002).

Parmi les différents groupes de micro-organismes utilisés dans SSF, les champignons filamenteux, qui sont les espèces les mieux adaptées, indiquées dans plusieurs recherches et applications pratiques. Ceci est dû à leur capacité à croître sur des surfaces de substrats variables et de pénétrer dans les espaces inter-particulaires des substrats solides, tandis que les bactéries et les levures sont largement cultivées dans la fermentation liquide (SmF) (Viniegra - Gonzalez et Favela-Torres, 2006).

Le développement des champignons filamenteux en SSF (figure N°5) se fait 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 du milieu solide. A partir de ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules (de la matrice solide) ou dans les espaces interparticulaires (par croissance) 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 (aérobie), tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d'eau (anaérobie). 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. Pour finir, les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (Holker et Lenz, 2005 ; Rahardjo et *al.*, 2006).



**Figure 5 :** Modèle de développement d'un champignon filamenteux en SSF (Rahardjo et *al.*, 2006).

Plusieurs études ont démontré que le procédé SSF peut conduire à des rendements plus élevés avec une productivité importante et de qualité meilleure par rapport à la fermentation submergée (SmF) (Ul-Haq *et al.*, 2002 ; Martins *et al.*, 2011). L'absence d'eau libre permet de réduire le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes. En plus, la non nécessité de stérilisation préalable du substrat réduit considérablement le coût énergétique de la fermentation (Pandey *et al.*, 2000 ; Assamoi *et al.*, 2009).

Divers problèmes peuvent être rencontrés au cours d'une fermentation en milieu solide. Les principaux obstacles rencontrés sont: la faible capacité à réguler les paramètres influençant la SSF, la forte hétérogénéité du milieu, le passage à grande échelle, l'estimation de la biomasse (Hölker et Lenz, 2005).

## **VI. La fermentation submergée (SmF)**

C'est une technique dans laquelle les microorganismes sont en suspension dans un milieu liquide contenant les éléments nutritifs dissous. Elle consiste à utiliser des substrats liquides libres, tels que les mélasses et les bouillons. Les substrats sont utilisés rapidement par les microorganismes pour produire différentes molécules bioactives (Colla et al., 2010 ; Subramaniam et Vimala, 2012 ; Salihu et al., 2012).

Cette technique est mieux adaptée pour les microorganismes qui nécessitent une haute teneur en humidité tels que les bactéries (Subramaniam et Vimala, 2012).

Le substrat utilisé en SmF, est un liquide libre dont la composition dépend des besoins de microorganisme a utilisé (Subramani et Vimala, 2012). Cependant, il doit contenir obligatoirement une source de carbone et une source d'azote.

Elle est avantageuse dans le contrôle des paramètres de la fermentation, la récupération facile des métabolites, des mycéliums ou des spores et fournit de bons rendements en enzymes (extraits enzymatiques plus stable) (Sun et Xu, 2009 ; Colla *et al.*, 2010 ; Subramaniam et Vimala, 2012).

La fermentation submergée est un procédé présentant divers avantages et un rendement élevé mais il présente certains inconvénients tels que les contaminations microbiennes et le développement naturel, sous forme mycélien, des microorganismes fongiques. Ce dernier provoque une augmentation de la viscosité préjudiciable à la solubilisation de l'oxygène dans le milieu (Sun et Xu, 2009).



## VII. Comparaison entre la SmF et SSF

**Tableau II** : Comparaison entre SSF et SmF (Raimbault, 1998; Assamoi et *al.*, 2009).

<b>Facteur</b>	<b>Fermentation solide (SSF)</b>	<b>Fermentation liquide (SmF)</b>
<b>Substrat</b>	Polymère insolubles (amidon, pectine, cellulose, lignine)	Substrats solubles (sucres)
<b>Eau</b>	Consommation limitée de l'eau; aw faible	Des grands volumes d'eau sont consommés
<b>pH et Température</b>	Contrôle aléatoire et transfert difficile de la chaleur	Contrôle facile
<b>Aération (O<sub>2</sub>)</b>	Aération facile et diffusion rapide de l'oxygène	Faible solubilité de l'(O <sub>2</sub> ) dans l'eau
<b>Fermentation</b>	Fermentation en batch	Fermentation continu
<b>Contamination</b>	Risque de contamination fongique	Risque de contamination bactérienne
<b>Demande énergétique</b>	Besoin énergétique faible	Consommation élevée d'énergie
<b>Biomasse</b>	Inséparable du substrat	Facilement séparable
<b>Produit</b>	Concentré	Très dilué

Aw : Activité d'eau.

## VIII. 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 variété de micro-organismes (Hu et *al.*, 2011 ; Bader et *al.*, 2010).

De nombreux chercheurs se sont intéressés à la réalisation de cultures mixte qui sont capables de transformer certains polymères (cellulose) en sucres (glucose) et en CH<sub>4</sub>. Ces études ont pour but le plus souvent de travailler avec un minimum de souches pour arriver

dans les meilleures conditions au résultat souhaité : la production de bio méthane. De plus, ces expériences nous permettent de mieux comprendre les interactions pouvant exister entre les différents microorganismes. On pourrait aussi concevoir d'utiliser ces cultures mixtes pour inoculer les déchets (Ollivier, 1987).

La composition de la charge lignocellulosique utilisée comme substrat pour la culture SSF peut avoir une influence importante sur l'ensemble des enzymes sécrétées par les champignons. Ça a été suggéré que l'utilisation des enzymes sécrétées à partir de microorganismes cultivés sur le même substrat lignocellulosique qui sera converti en éthanol pourrait être un moyen possible d'améliorer la composition du complexe enzymatique (Delabona et al., 2012 ; van den Brink et al., 2014 ; Florencio et al., 2016; Johnson et al., 2016).

L'application de cultures pures domine dans les processus biotechnologiques, mais à travers l'application de cultures mixtes le métabolisme combiné entraîne des effets: rendement plus élevé de la production d'éthanol; rendement plus élevé de la production d'acide acétique; enrichissement de la teneur en vitamine dans les aliments fermentés (Stoilova et al., 2014).

Spécial attention a été accordée aux cultures mixtes utilisées pour augmenter la production d'enzyme, comme l'amylase, l'inulinase, xylanase, endoglucanase et  $\beta$ -glucosidase.

La culture mixte en fermentation solide accomplit une colonisation plus complète du substrat et a plus lent taux de croissance, ce qui permet un meilleur équilibre. L'association de populations microbiennes de champignons mycéliens permet une production d'enzymes encore plus élevée des hémicellulases et des cellulases, qui agissent en synergie, se dégrade efficacement les déchets végétaux (Stoilova et al., 2014).

En cultures mixtes, pour un temps de culture suffisamment long, la population ayant un taux de Croissance supérieur peut dépasser en nombre la population la plus lente. Cela constitue un avantage dans la compétition. En absence d'interaction, l'issue d'une culture mixte est donc la sélection de la bactérie la plus rapide, qui a un avantage sélectif (Cornu, 2000).

## IX. Plan d'expérience

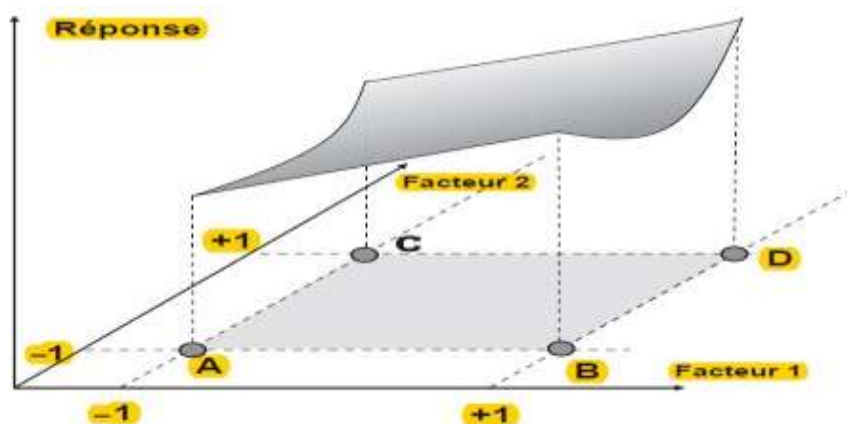
### IX.1. Définition

Les plans d'expériences sont des techniques qui permettent de quantifier les effets de divers facteurs sur une réponse et de les optimiser dans des domaines expérimentaux bien déterminés. On organise une suite d'essais consistant à manipuler les facteurs afin de décrire la méthode permettant d'obtenir la réponse optimale (Hanco et *al*, 2011).

### IX.2. Plan de surface et de réponse(RSM)

C'est une technique de modélisation empirique consacrée à l'évaluation de la relation d'un ensemble de facteurs expérimentaux contrôlés et observés avec les résultats (Annadurai, 1998).

Chaque point du domaine d'étude correspond à une réponse. L'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond à un ensemble de réponses qui se localise sur une surface appelée surface de réponse (Goupy, 2006).



**Figure 6 :** Ensembles des réponses qui correspondent à tous les points du domaine d'étude (Goupy, 2006).

### IX.2. Plan de Box-Behnken

Les points expérimentaux de ce plan sont représentés au milieu des arêtes de chacun des cotes d'un cube. C'est un plan qui peut comporter plus de 12 essais, auxquels on peut ajouter des points au centre (Goupy, 2006).

### IX.3. Modèle mathématique

On choisit a priori une fonction mathématique qui relie la réponse aux facteurs. On prend un développement limité de la série de Taylor-Mac Laurin. Les dérivées sont supposées constantes et le développement prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z$$

- ✓  $y$  est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée.
- ✓  $x_i$  représente le niveau attribué au facteur  $i$  par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue. On suppose même que ce niveau est déterminé sans erreur (hypothèse classique de la régression).
- ✓  $a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii}$  sont les coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences (Goupy, 2006).

# **Matériels et Méthodes**

## I. Matériel analytique

Le matériel analytique est décrit en annexe I.

## II. Matériel biologique

Les souches fongiques utilisées dans ce travail sont *Aspergillus sp* et *Trichoderma sp* appartenant à la collection du laboratoire de microbiologie appliquée « LMA » de l'université A/Mira de Bejaia. Les souches fongiques sont isolées dans les sols de trois sites de la région d'Akbou (Algérie) par Mm Azzouze Zahra.

### II.1. Préparation du matériel biologique

#### II.1.1. Repiquage des souches

Les souches fongiques sont repiquées sur des boites de Pétrie contenant le milieu PDA (Potato- Dextrose- Agar) et sont incubé à 28°C pendant 7 à 10 jours.

#### II.1.2. Observation macroscopique

Les cultures obtenues après 7 jours sur milieu PDA ont été identifiées sur la base de leurs aspects, taille, structure et la couleur des colonies, à l'œil nu.

#### II.1.3. Observation microscopique

Un scotch a été fixé sur la surface de la boite de Pétrie contenant le mycélium, le prélèvement est mis sur une lame stérile, l'observation a été effectuée sur microscope optique.

#### II.1.4. Préparation des solutions sporale

Après sporulation des souches fongiques ensemencées préalablement sur milieu PDA, chaque boite est lavée avec 10 ml d'eau distillée stérile contenant 1 % de Tween-80, la solution obtenu est conservé dans des flacon stériles pour être utilisées comme inoculum pour la production d'enzymes (Sandhu *et al.*, 2013 ; Ang *et al.*, 2015).

## II.2. Préparation de substrat de fermentation

La paille de blé a été utilisée comme substrat dans les fermentations mixtes (solides et liquides). Ce substrat est récolté au niveau des agricultures de la région. La paille est d'abord lavée avec l'eau distillé, séchée au four pasteur à 80°C pendant 24h, broyer à l'aide d'un mixeur puis stockés à température ambiante (Madhuri *et al.*, 2014).

Le taux d'humidité de substrat est déterminé selon l'équation suivante :

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

$P_0$  : poids frais       $P_{\text{sec}}$  = Poids sec

Le poids sec est déterminé après séchage des substrats au four pasteurs à 105°C jusqu'à poids constant.

### **II.3. Productions des enzymes cellulolytiques par fermentation mixte sur des milieux liquide et solide**

#### **II.3.1. Fermentation liquide**

Les cultures sont réalisées dans 3 flacons de 250ml, un pour la culture mixte (*Aspergillus* sp et *Trichoderma* sp), le deuxième pour la souche G (*Trichoderma* sp) et le dernier pour la souche BG (*Aspergillus* sp), contenant 50ml de solution minérale Mendels et Weber avec 2% (p/v) de paille de blé comme seule source de carbone. Après traitement thermique à 121°C pendant 15mn, les milieux sont inoculés comme suit :

- $10^4$  spore/ml (*Trichoderma* sp) pour la souche G
- $10^4$  spore/ml (*Aspergillus* sp) pour la souche BG
- $10^4$  spore/ml ( $5 \cdot 10^3$  spore/ml de *Trichoderma* sp +  $5 \cdot 10^3$  spore/ml de *Aspergillus* sp) pour la culture mixte

Les flacons sont incubés sous agitation à 28°C pendant 7 jours (Prevot, 2013).

À la fin de l'incubation, les extraits enzymatiques sont obtenus par centrifugation à 10000g à 4°C pendant 15mn, le surnageant récupéré est conservé à 4°C jusqu'à l'utilisation pour le dosage enzymatique.

#### **II.3.2. Fermentation solide**

Toutes les cultures sont effectuées dans 3 erlenmeyer de 500ml à col large un pour la culture mixte (*Aspergillus* sp et *Trichoderma* sp), le deuxième pour la souche G (*Trichoderma* sp) et le dernier pour la souche BG (*Aspergillus* sp) contenant 10g de la paille de blé. Le taux d'humidité a été fixé à 70% est obtenu avec le milieu Mendels et Weber. Les erlènes sont stérilisés à 121°C pendant 15mn, refroidi, puis inoculés comme suit :

- $10^4$  spore/ml (*Trichoderma* sp) pour la souche G
- $10^4$  spore/ml (*Aspergillus* sp) pour la souche BG
- $10^4$  spore/ml ( $5 \cdot 10^3$  spore/ml de *Trichoderma* sp +  $5 \cdot 10^3$  spore/ml de *Aspergillus* sp) pour la culture mixte.

Les erlènes sont fermés avec les cotons cardés et recouverts avec le papier aluminium puis incubés à 28°C pendant 7 jours (Sandhu *et al.*, 2013).

A la fin de l'incubation, 100 ml d'eau distillée sont ajoutés dans chaque erlenmeyer. Après agitation pendant 15mn, le contenu est centrifugé à 10000g à 4°C pendant 15mn. Les surnageant ainsi obtenant constituent les extraits enzymatiques bruts.

#### II.4. Dosage de l'activité endoglucanases (CMCase)

L'activité CMCase est déterminée selon la méthode de **Ghose (1987) (Tableau X)**.

- Dans des tubes à hémolyse, ajouter 0,5 ml d'une solution de CMC à 2% (p/v) [dans du tampon citrate (0,05 M - pH 4,8)].
- Equilibrer pendant 10 minutes à 50°C dans un bain marie.
- Additionner 0,25 ml de l'extrait enzymatique brut.
- Incuber à 50°C pendant 30 minutes,
- Arrêter la réaction en ajoutant 1,5 ml du réactif de DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique), suivi d'un chauffage à 100°C pendant 5 minutes.
- La concentration de glucose est déterminée par référence à une courbe étalon établie avec des concentrations variables en glucose (0,33 à 2 mg/ml) à partir d'une solution mère à 2 g/l. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm.

**Tableau III:** Différentes étapes du dosage de l'activité CMCase selon Ghose (1987).

	<b>Gamme</b>	<b>Témoin enzyme</b>	<b>Enzyme</b>
<b>Substrat (µl)</b>	250	250	250
Equilibrer à 50°C pendant 10 min			
<b>Enzyme (µl)</b>	/	/	250
Incuber pendant 30 min à 50 °C			
Arrêter la réaction en ajoutant 1.5 ml de DNS			
<b>Tampon (µl)</b>	/	/	/
<b>Glucose (µl)</b>	250	/	/
<b>Enzyme (µl)</b>	/	250	/
Placer 5 min à 100 °C			
Refroidir dans un bain d'eau glacée			
Mesurer l'absorbance à 540 nm contre l'eau déminéralisée			

$$\text{Absorbance} = \text{Absorbance de l'enzyme} - \text{Absorbance témoin enzyme}$$

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



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

## **II.5. Optimisation des paramètres de la fermentation mixte sur milieu solide par one factor at time**

### **II.5.1. Temps d'incubation**

Dans cette étude, la fermentation est effectuée dans des erlènes de 500ml contenant 10 g de substrat, humidifié à 70 % avec milieu MW, inoculées avec  $10^4$  spore/ml. Puis incubées à 28°C pendant 10 jours. Les erlènes sont prélevés tous les 24 heures jusqu'à 10<sup>ème</sup> jour.

### **II.5.2. Humidité**

L'activité enzymatique de CMCase a été déterminée dans des erlènes de 500ml contenant 10 g de substrat, humidifier aux différents taux d'humidité allant de 35 jusqu'à 95% de milieu MW avec un intervalle de 5% , inoculées avec  $10^4$  spore/ml puis incubé à 28°C pendant un temps optimal déterminé précédemment .

### **II.5.3. Température**

Afin de déterminer la meilleure température pour la production de cellulases par *Aspergillus* sp et *Trichoderma* sp. Les fermentations ont été réalisées à 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 et 42°C avec une humidité optimale et pendant un temps optimal déterminés précédemment.

### **II.5.4. Ratio (paille de blé/ son de blé)**

Différents essais ont été effectués pour étudier les possibilités de production de CMCase par SSF en employant la paille de blé comme substrat le plus dominant, en ajoutant le son de blé pour induire l'activité de cellulase, l'expérience a été réalisée avec l'addition du son de blé dans le milieu de fermentation avec une faible concentrations par rapport à la paille de blé (tableau 3). Les erlènes ont été stérilisés à 121°C pendant 15 minutes, refroidies et inoculé avec une charge de  $10^4$  spore/ml puis sont incubée à une température, temps et humidité optimales déterminés précédemment.

**Tableau IV** : Optimisation de la source de carbone

Echantillon	Ratio (Paille/Son de blé)
1	10/00
2	9.5/0.5
3	9/1
4	8.5/1.5
5	8/2
6	7.5/2.5
7	7/3
8	6.5/3.5
9	6/4
10	5.5/4.5

## II.6. Analyse statistique

L'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test Tukey (HSD) est utilisée pour déterminer les différences significatives à l'aide du logiciel statistique Excel STAT. Pour toutes les analyses, la différence est considérée comme étant significative lorsque  $p < 0.05$  pour un intervalle de confiance de 95%.

## II.7. Optimisation de production d'endoglucanases par surfaces de réponse (RSM)

Une fois les paramètres optimaux déterminés par les méthodes classiques (OFAT), l'optimisation est réalisée par un plan factoriel à quatre facteurs  $X_1$  (temps),  $X_2$  (humidité),  $X_3$  (température) et  $X_4$  (ratio) et à trois niveaux (-1, 0, +1) qui est appliqué pour étudier l'influence de ces paramètres sur la production d'enzyme et pour déterminer la préliminaire des variables. Les niveaux bas, moyen et haut de chaque variable sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau V** : Différents niveaux des paramètres choisis pour l'optimisation

Paramètres	Niveau bas -1	Niveau centré 0	Niveau haut +1
$X_1$ (Temps) Jours	4	7	10
$X_2$ (Humidité) %	75	85	95
$X_3$ (Température) °C	26	30	34
$X_4$ (Ratio) P/S	8/2	6/4	4/6

Le modèle mathématique polynomial développé pour l'optimisation est un modèle de second degré (Quadratique) et la matrice d'expérience du plan Box-Behnken (BBD) est réalisé par le logiciel Design-Expert 11<sup>®</sup> software Trial (Version 11.0.5.0. USA)

La surface de réponse (RSM) a été conduite pour déterminer les variables de processus de production de CMCCase. Le tableau 6 représente les valeurs non-codées des variables expérimentales et de 27 points expérimentaux. Trois réplications ont été employées pour évaluer l'erreur pure.

**Tableau VI :** Matrice d'expérience donnée par BBD

	<b>Facteur 1</b>	<b>Facteur 2</b>	<b>Facteur 3</b>	<b>Facteur 4</b>
<b>Expérience</b>	A:temp	B:Humidité	C:Température	D:Ratio P/S
	Jours	%	°C	%
<b>1</b>	10	95	30	40
<b>2</b>	10	75	30	40
<b>3</b>	7	75	30	60
<b>4</b>	7	75	34	40
<b>5</b>	7	85	30	40
<b>6</b>	10	85	34	40
<b>7</b>	7	85	26	20
<b>8</b>	7	75	30	20
<b>9</b>	10	85	30	60
<b>10</b>	7	95	34	40
<b>11</b>	7	95	30	60
<b>12</b>	10	85	26	40
<b>13</b>	4	85	34	40
<b>14</b>	7	85	30	40
<b>15</b>	7	85	30	40
<b>16</b>	7	85	34	60
<b>17</b>	7	75	26	40
<b>18</b>	7	95	26	40
<b>19</b>	10	85	30	20
<b>20</b>	7	95	30	20
<b>21</b>	4	85	26	40
<b>22</b>	4	75	30	40
<b>23</b>	7	85	34	20
<b>24</b>	4	85	30	20
<b>25</b>	4	85	30	60
<b>26</b>	7	85	26	60
<b>27</b>	4	95	30	40

La matrice réalisée est employée pour l'analyse de régression des données pour adapter une équation polynômiale du second degré (modèle quadratique), selon l'équation suivante

(Eq. (1))

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i=1}^k B_{ii} X_i^2 + \sum_{i>j}^k B_{ij} X_i X_j + E$$

**Y** : représente la fonction de réponse

**B<sub>0</sub>** : coefficient constant

**B<sub>i</sub>**, le **B<sub>ii</sub>** et le **B<sub>ij</sub>** sont les coefficients du linéaire, quadratique et les limites interactives, respectivement,

**X<sub>i</sub>** et le **X<sub>j</sub>** représentent les variables indépendantes codées.

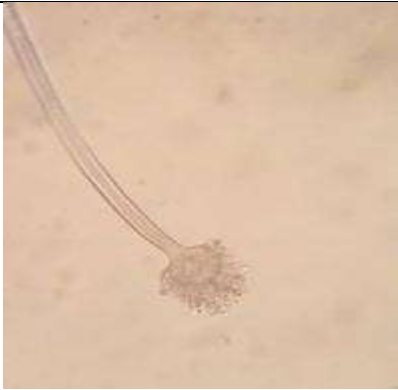


# Résultats et discussions


## I. Caractérisations des souches fongiques

Les caractéristiques microscopiques des souches fongiques sélectionnées ont portées essentiellement sur la forme des conidiophores, des conidies et du mycélium.

Les caractères macroscopiques des différentes souches sélectionnées sont étudiés sur les milieux PDA. Les critères macroscopiques représentés dans le tableau VII reposent sur l'observation de la couleur, la taille, le relief, l'aspect des filaments, et la pigmentation des colonies.

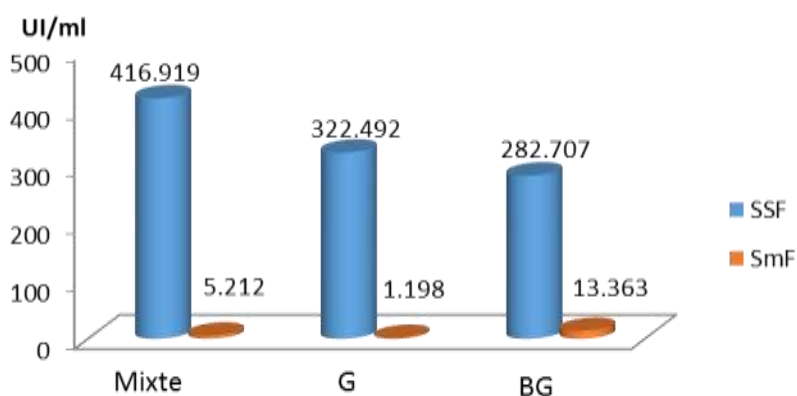
**Tableau VII :** Les principaux caractères microscopiques et macroscopiques de la souche (BG) et la souche (G)

	<b>Aspect microscopique</b>	
<b><i>Aspergillus sp</i> (BG)</b>	Le mycélium est formé d'hyphe, filaments végétatifs fin et cloisonné 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	
<b><i>Trichoderma sp</i> (G)</b>	Mycélium composé d'hyphe, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies)	
	<b>Aspect macroscopique</b>	
<b><i>Aspergillus sp</i> (BG)</b>	L'observation à l'œil nu après une incubation de 4 jours à 28°C a montré un mycélium blanchâtre avec un aspect velours et une prolongation d'incubation devient poudreuse avec l'apparition des spores noires après 7 jours d'incubation et absences de pigments.	

<p><b><i>Trichoderma sp</i></b> <b>(G)</b></p>	<p>La souche (G) présente une croissance très rapide et le mycélium envahi facilement le milieu, il est de couleur jaune et qui devient vert après sporulation.</p>	
--	---	---

## II. Productions des enzymes cellulolytiques par fermentation mixte sur milieux liquide et solide

La production de CMCCase par les deux fermentations (solide et liquide) sur la paille de blé est mesuré après 7 jours d'incubation à 28°C et les résultats obtenus sont illustrée dans la figure suivante :



**Figure 07:** Production de CMCCase par la fermentation mixte sur milieu liquide et solide après 7 jours d'incubation.

Selon les résultats de la figure 07, nous avons observé une activité maximale de 416,919UI/ml dans la culture mixte des deux souches (BG et G) et qui est meilleure que celle de la monoculture dans la fermentation solide; contrairement à la fermentation liquide dont on a trouvé une meilleure activité de 13,363UI/ml avec une culture de la souche BG seule que la fermentation mixte (5,212UI/ml).

- Fermentation solide : Les deux souches présentent une meilleure activité dans la fermentation mixte que la fermentation seule, ce qui détermine un effet synergique entre ces deux souches.

- Fermentation liquide : L'activité CMCCase dans la fermentation mixte est inférieure à celle de la souche BG, ce qui indique qu'il y'a pas un effet synergique entre les deux souches dans ce type de fermentation.

C'est pour ça nous avons choisies de continuer avec la fermentation mixte solides dans les autres testes.

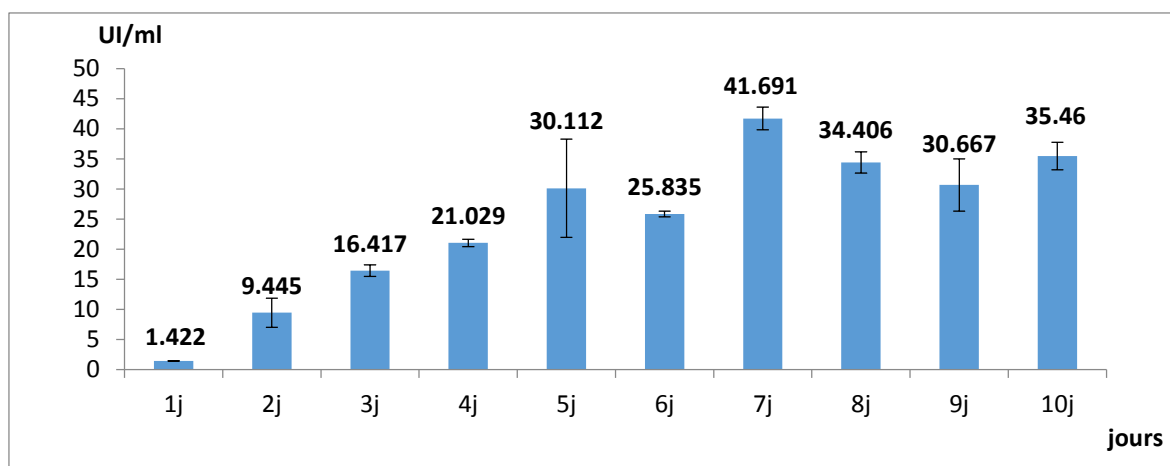
La performance supérieure des cultures mixtes est basée sur le fait que dans la nature, la biodégradation de la biomasse lignocellulosique est réalisée par la coopération synergique de variété de micro-organismes (Bader, J et al, 2010 ; Hu, H et al, 2011).

### III. Optimisation des paramètres de la fermentation mixte sur milieu solide par la méthode classique (One Factor At Time)

Les conditions de cultures telles que le temps d'incubation, la composition du milieu de fermentation et le genre du microorganisme utilisé, sont des paramètres qui contrôlent l'activité enzymatique ainsi que sa stabilité (Al- jazairi et *al.*, 2015).

#### III.1. Temps d'incubation

L'effet du temps d'incubation sur les activités CMCases de cultures mixte avec les deux souches BG et G sur la paille de blé sont rapporté dans la figure suivante :



**Figure 08 :** Effet du temps d'incubation sur l'activité CMCCase de la culture mixte des souches BG et G sur la paille de blé.

Selon les résultats de la figure 8; une augmentation de l'activité CMCases du 1<sup>er</sup> jour jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour a été observée pour atteindre une activité maximale de (41,691±0.189 UI/ml) dans la culture mixte des souches BG et G sur la paille de blé. Après le 7<sup>ème</sup> jour une diminution de cette activité est observée. L'analyse de l'ANOVA a donné une différence hautement significative avec p value < 0.0001. Saradouni et *al.*,(1990) ont rapporté une valeur de 2.6UI/ml au 7<sup>ème</sup> jour de la fermentation d'*Aspergillus fumigatus* en milieu solide



à base de la paille d'avoine, Roussos(1998), mentionne des activités maximales au 7<sup>ème</sup> jour en SSF sur bagasse de canne à sucre avec une souche de *Trichoderma harzianum*. Par contre, Kang et al.,2004 ont enregistré une production maximale de CMCCase par *A. niger* après 5-6 jours de fermentation sur la paille de riz. Saradouni et al., (2004) rapporte une activité  $\beta$ -glucosidase de 820U/ml en seulement 5 jours de fermentation avec *Aspergillus fumigatus*. La production de cellulases est proportionnelle à la croissance des souches utilisées (Bettache, 2013).

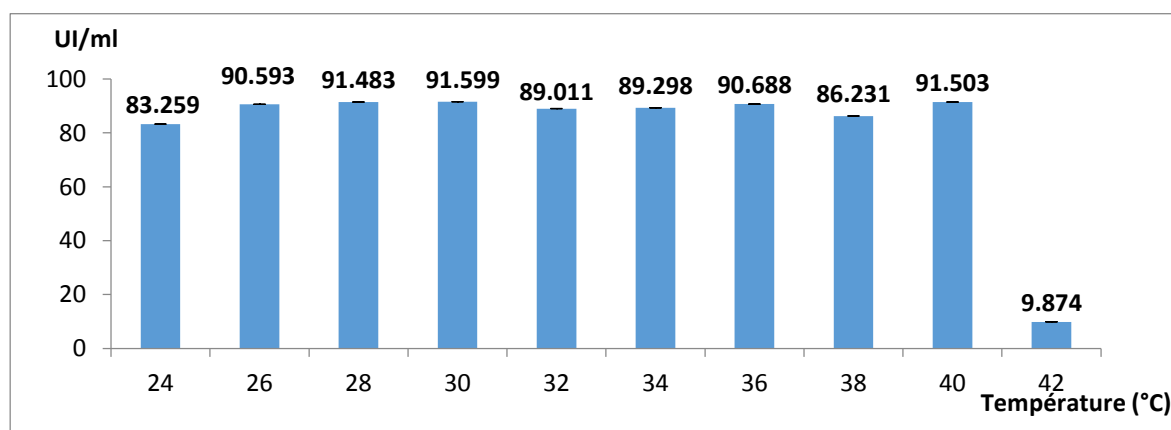
La diminution de l'activité cellulasique au-delà du pic, peut être due à l'arrêt de la croissance et de l'appauvrissement nutritif du milieu de culture (Santos et al., 2011).

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

Sur ce, la durée nécessaire pour l'incubation de la culture mixte pourrait dépendre principalement du taux de croissance des espèces fongiques, la nature du substrat utilisé et le modèle de production d'enzymes (solide ou submergé).

### III.2. Température

L'effet de la température sur l'activité CMCases de la culture mixte des souches BG et G sur la paille de blé a été réalisé en faisant varier la température des milieux de cultures de 24°C jusqu'à 42°C avec un intervalle de 2°C, les résultats sont représentés sur la figure suivante :



**Figure 09:** Effet de la température sur l'activité CMCCase de la culture mixte des souches BG et G.

Selon les résultats de la figure 09, et après 7 jours d'incubation, une activité maximale de CMCases a été observée, et qui est de  $91,599 \pm 0,002 \text{ UI/ml}$  dans la culture mixte de BG et G sur la paille de blé. L'analyse de l'ANOVA a donné une différence hautement significative avec  $p \text{ value} < 0.0001$ .



**Figure 10:** Croissance des souches BG et G sur la paille de blé incubé à 30°C.

La température d'incubation est un facteur important affectant la production d'enzyme en SSF. La température atteinte en SSF varie de 25 à 30 °C (Singhania et *al.*, 2006). Selon Bansal et *al.*, (2012), les rendements les plus élevés de CMCCase ( $297,00 \pm 10,46 \text{ U / gd}$ ), ont été obtenus à 30 °C pour *Aspergillus niger* NS-2.

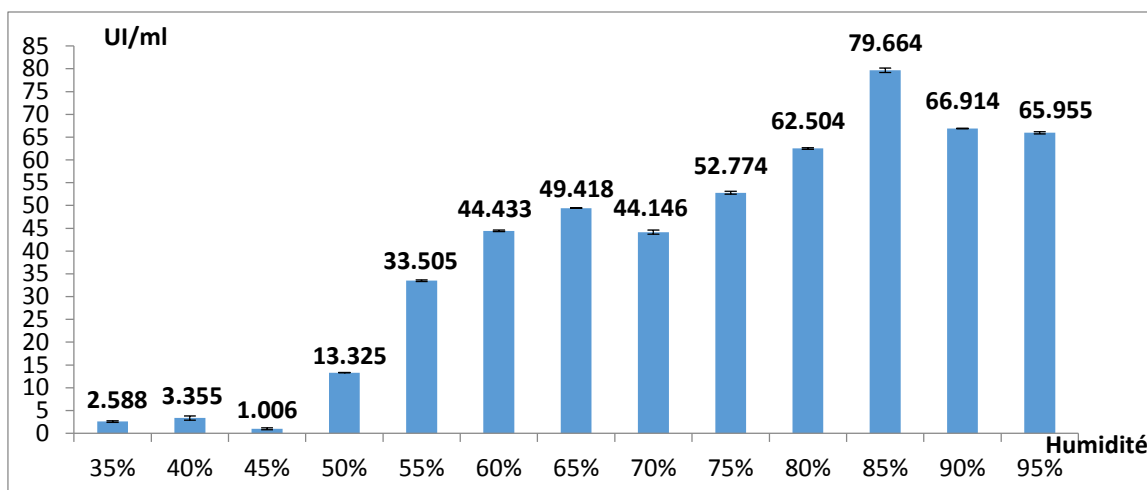
La température optimale dans une gamme de 25-30 °C ont été rapportés pour la production de cellulase dans divers champignons (Gautam et *al.*, 2011).

L'activité enzymatique de *Trichoderma harzianum* augmente en fonction de l'augmentation de la température, jusqu'à 35 °C, avec une activité maximale de  $422 \pm 3,21 \text{ IM / ml / min}$  (Iqbal et *al.*, 2010).

Dans une étude de Haq et *al.*, (2006), une plage de température allant de 25 à 40 °C a été étudiée, une meilleure croissance d' *Aspergillus niger* et *Trichoderma viride* a été trouvé a 30°C. Des études ont rapporté des températures optimales de 55°C pour une endoglucanase de *Trichoderma reesei* (Sutanu et *al.*, 2012).

### III.3 Humidité

L'effet de l'humidité sur l'activité CMCCase de la culture mixte de deux souches BG et G été réalisée en faisant varier l'humidité des milieux de cultures de 35% jusqu'à 95% avec un intervalle de 5% et les résultats sont représentés sur la figure ci-dessous.



**Figure 11:** Effet de l'humidité sur l'activité CMCases de la culture mixte des souches (BG) et (G).

Selon la figure 10, on observe une augmentation de l'activité CMCases pour atteindre une activité maximale de  $79,664 \pm 0,501$  UI/ml avec une humidité de 85% dans la culture mixte des souches BG et G sur la paille de blé incubées pendant 7 jours, l'analyse de l'ANOVA a donné une différence hautement significative avec  $p$  value  $< 0.0001$ .



**Figure 12:** Croissance des souches BG et G sur la paille de blé humidifié à 85%.

La teneur en eau nécessaire pour les cultures est avant tout dépendante des souches utilisées, mais sa limite basse serait fixée à 12%, seuil au-delà duquel les activités métaboliques cessent, et sa limite supérieure dépendrait principalement du support et de sa capacité de rétention (mais elle serait de 90% pour les substrats lignocellulosiques) (Assamoi et al., 2009 ; Smith et al., 1983).

La teneur optimale en humidité pour la croissance et l'utilisation du substrat se situe entre 40 et 70% mais dépendait de l'organisme et du substrat utilisé pour la culture. (Raimbault & Alazard, 1980).

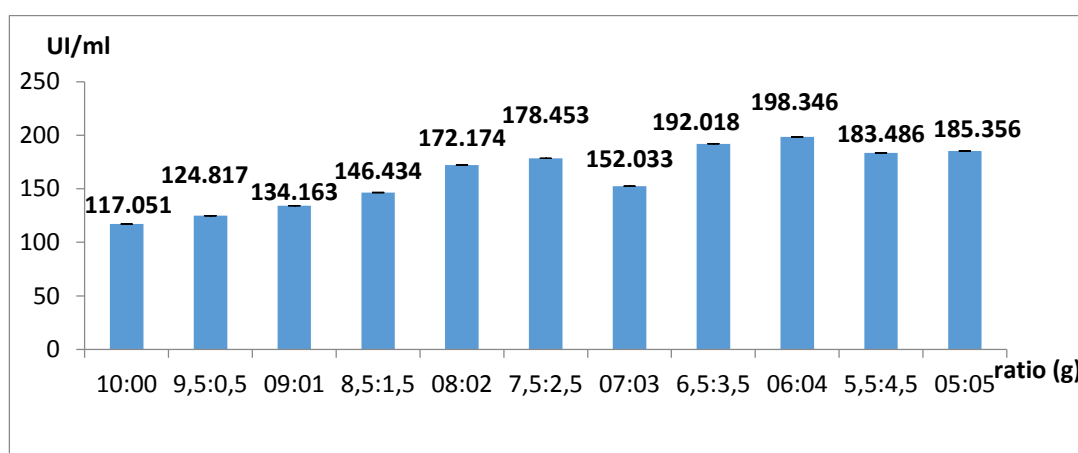
Liu et al. (2011), ont utilisé *A. fumigatus* Z5 pour la production de cellulase à partir de matériaux lignocellulosiques à travers la fermentation à l'état solide avec une humidité initiale de 80% et l'activité CMCase correspondante était de 526,3 U / g.

Selon Chandra et al(2007), *Aspergillus niger* a produit l'APFase la plus élevée (2,9 U/g) sous une humidité de 50%.

L'humidité optimale dans le substrat solide est entre 40 à 60% dans le cas de *Trichoderma koningii* pour la production de CMCase (10,5 U/g (Liu et Yang, 2007).

### III.4.Ratio

L'effet du ratio sur l'activité CMCase de la culture mixte de deux souches BG et G à été réalisée en utilisant la paille de blé comme substrat le plus dominant, en ajoutant le son de blé. Les résultats sont représentés sur la figure suivant :



**Figure 13:** Effet du ratio sur l'activité CMCase de la culture mixte de souches (BG) et (G).

Selon les résultats de la figure 13, nous avons observées une augmentation de l'activité CMCase pour atteindre une activité maximale de  $198,346 \pm 0,097$  U/ml, avec un ratio 06 :04 (40%) (Paille de blé : son de blé) dans la culture mixte des souches BG et G incubées pendant 7 jours à 30°C avec une humidité de 85%. L'analyse de l'ANOVA a donné une différence hautement significative avec p value < 0.0001.



**Figure 14:** La croissance des souches BG et G sur un milieu contenant la paille de blé et son de blé avec un ratio de 6:4.

Selon Manfrin et al., (2017) la production de CMCCase la plus élevée est de  $66.88 \text{ U g}^{-1}$  a été observée avec un rapport Biomasse de sorgho / son de blé de 1:1 avec la culture mixte de *Aspergillus niger* SCBM1 et *Aspergillus fumigatus* SCBM6.

Kachlishvili et al., (2005), ont également obtenu différents profils de production de CMCCase dans différentes combinaisons de sources de carbone et d'azote.

La biomasse de sorgho en association avec la peptone induit une production satisfaisante d'endo- et d'exoglucanases ; sachant que les cellulases sont généralement difficiles à produire en grandes quantités (DOS Santos et al 2015, Pereira et al., 2015).

Une activité plus élevée de  $\beta$ -xylosidase  $239 \text{ UI/g}$  a été obtenue dans le rapport le plus bas de la paille de riz et du son de blé (Kang et al., 2004).

D'après. Sherief et al., (2010), la production de CMCCase la plus élevée  $14.71 \text{ U g}^{-1}$  a été observée avec un rapport paille de riz/son de blé de 1:1 avec *Aspergillus fumigatus*.

Une valeur de CMCCase de  $12.94 \text{ U g}^{-1}$  a été observé avec un rapport son de blé / paille de riz de 1 :9 produite par *Aspergillus ustus* (Shamala et Sreekantiah., 1985).

#### IV. Optimisation par Plan d'expérience Box-Behnken

L'optimisation des paramètres de culture de la fermentation mixte sur la paille de blé en faisant varier une variable indépendante à la fois en maintenant les autres à des niveaux constants (OFAT), entraîne une augmentation considérable de la productivité enzymatique. Cependant, en plus d'être coûteuse et longue, cette méthodologie ne montre pas les interactions qui peuvent survenir entre différentes variables qui affectent cette production. En revanche, les approches statistiques utilisant la méthodologie de la surface

de réponse permettent non seulement d'identifier les conditions optimales par un ensemble de variables indépendantes, mais révèlent également les interactions entre deux ou plus de variables (Kasana et *al.*, 2011).

#### IV.1. Analyse de la variance (ANOVA)

L'analyse de la variance « ANOVA » pour le modèle polynomial quadratique utilisé pour la production des CMCases par fermentation mixte avec SSF sur la paille de blé est présenté dans le tableau suivant :

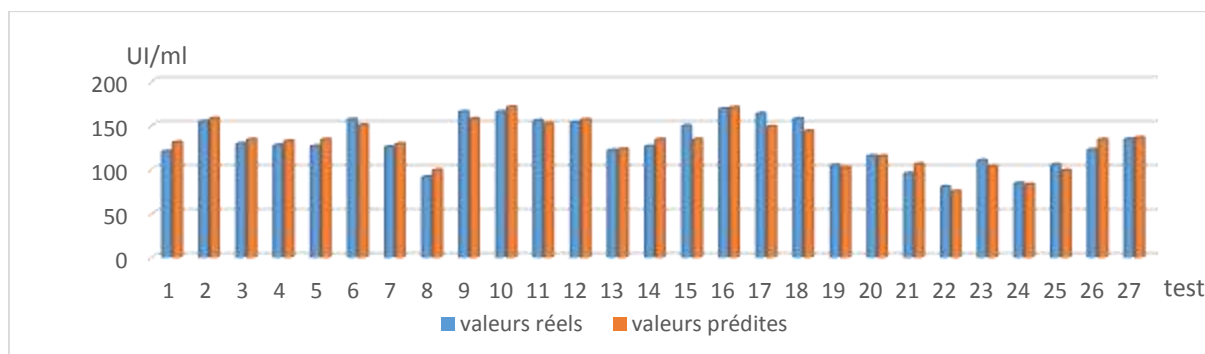
**Tableau VIII** : Analyse de variance pour le modèle polynomial de l'activité CMCCase.

	Somme des carrés	Carrés moyen	F-value	P-value
<b>Modèle</b>	16565,26	1183,23	9.21	0.0002
<b>Manque d'ajustement</b>	1184,22	1184,22	0.6636	0.7321
<b>Erreur pure</b>	356,89	178,44		

$R^2=0,9149$                        $CV=8,74$

La valeur de p-value du modèle inférieure à 0,05 ont montré des termes de modèle qui sont significatifs, la valeur F ( $F = 9.21$ ) et la valeur p ( $p = 0.0002$ ) implique la signification du modèle. L'importance du modèle était également jugée par le test de manque d'ajustement. Comme indiqué dans le tableau VIII, F-value du manque d'ajustement de 0,66 implique que le manque d'ajustement n'est pas significatif par rapport à l'erreur pure. La signification de chaque coefficient a été déterminée en utilisant la valeur F et la valeur p. Les variables correspondantes seraient plus significatives si la valeur F devient plus grande et la valeur de p devient plus petite (Atkinson et Donev, 1992).

Les résultats des expériences réalisés par le plan Box-Behnken (BBD) sont représentés dans la figure suivante :



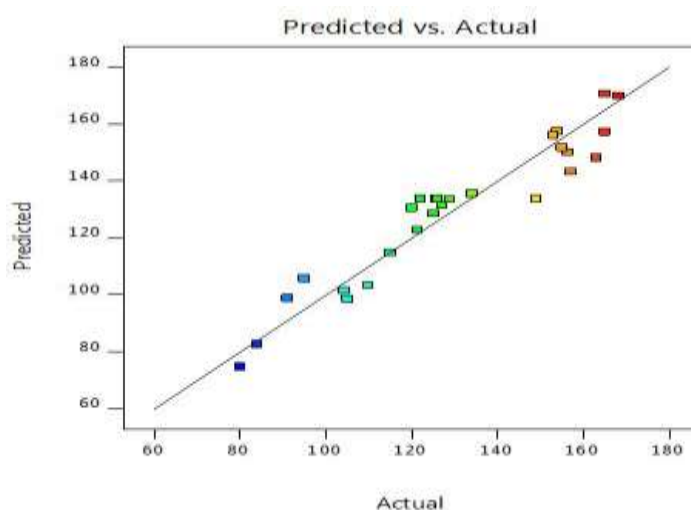
**Figure 15** : Comparaison entre les valeurs réelles et prédites par BDD.

D'après les résultats obtenus par le BBD, l'activité enzymatique varie entre 80 UI/ml et 168,292 UI/ml, ce qui indique l'influence des paramètres optimisés qui sont le temps, la température, l'humidité et le ratio. Les résultats de l'analyse effectuée montrent que les valeurs prédites par le BBD ainsi que les valeurs réelles sont proches.

## IV.2. Coefficient de détermination $R^2$

Le  $R^2$  est un paramètre qui nous indique la validité du modèle étudié, le coefficient de détermination de ce modèle est égale à 1 ( $R^2 = 1$ ), et la valeur du coefficient de détermination  $R^2$  ajustée est de 0.99. Les résultats obtenus confirment que les valeurs réelles sont très proches des valeurs prédites (Manohar et *al.*, 2013).

Le modèle de régression quadratique a montré la valeur du coefficient de détermination ( $R^2$ ) de 0,9149, ce qui impliquait que 91,49% des variations pourraient s'expliquer par le modèle ajusté. Le CV dans le modèle réduit a montré une valeur améliorée de 8,74, indiquant ainsi une meilleure qualité statistique des résultats expérimentaux.



**Figure 16 :** Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour la production du CMCCase par les deux souches G et BG.

### IV.3. Effet des facteurs

L'effet des facteurs linéaire, quadratique et l'effet des interactions sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau IX** : Effet des facteurs linéaire, quadratique et l'effet des interactions.

Source	F-value	p-value	
<b>Model</b>	9,21	0,0002	significatif
<b>Linéaire</b>			
<b>A (Temps)</b>	35,27	< 0.0001	significatif
<b>B (Humidité)</b>	6,77	0,0231	significatif
<b>C (Température)</b>	0,7022	0,4184	Non significatif
<b>D (Ratio P/S)</b>	29,99	0,0001	significatif
<b>Interaction</b>			
<b>AB</b>	15,04	0,0022	Significatif
<b>AC</b>	1,03	0,3310	Non significatif
<b>AD</b>	3,07	0,1055	Non significatif
<b>BC</b>	3,75	0,0768	Non significatif
<b>BD</b>	0,0092	0,9253	Non significatif
<b>CD</b>	7,36	0,0189	Significatif
<b>Quadratique</b>			
<b>A<sup>2</sup></b>	5,91	0,0316	Significatif
<b>B<sup>2</sup></b>	0,3318	0,5753	Non significatif
<b>C<sup>2</sup></b>	5,91	0,0316	Significatif
<b>D<sup>2</sup></b>	5,72	0,0340	Significatif

#### IV.3.1.Effet linéaire

Les résultats obtenus, montrent que les trois facteurs (temps, humidité et ration) possèdent une influence significative sur production enzymatique (P-value<0.05). En contrepartie, le facteur température qui a un p-value>0.05 n'est pas significatif.



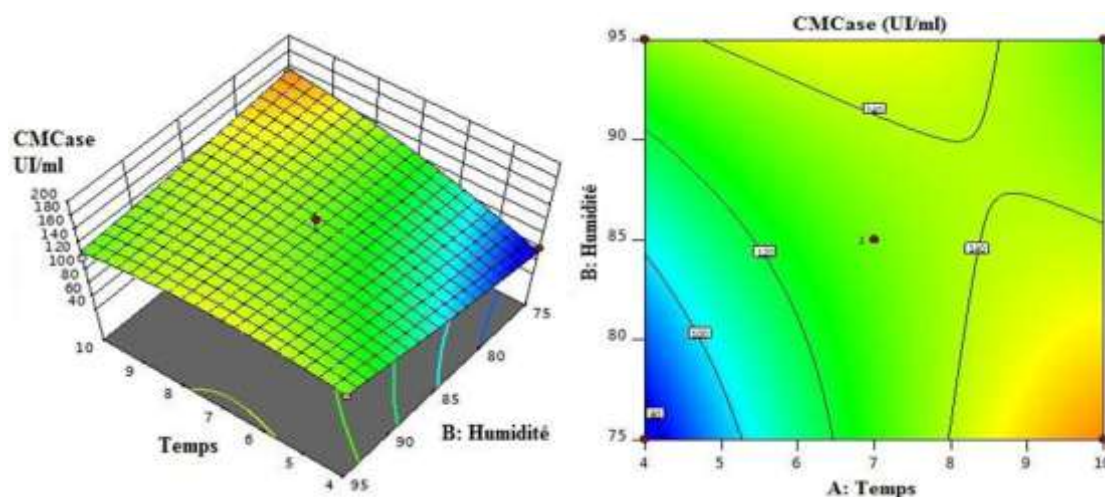
Ces résultats montrent également que le facteur temps présente le P-value le plus faible ( $<0.0001$ ), ce qui met en évidence le grand impact et l'influence que possède ce facteur sur la production de l'enzyme.

### IV.3.2. Etude des interactions

- **Temps et humidité**

Les résultats obtenus, montrent que les interactions en les deux facteurs (temps, humidité) possèdent une influence significative sur production enzymatique ( $P\text{-value} < 0.05$ )

Les interactions entre les deux variables : (A) temps, (B) humidité sont représentées par la surface de réponse définissant l'interaction entre les deux facteurs dans la figure suivante :

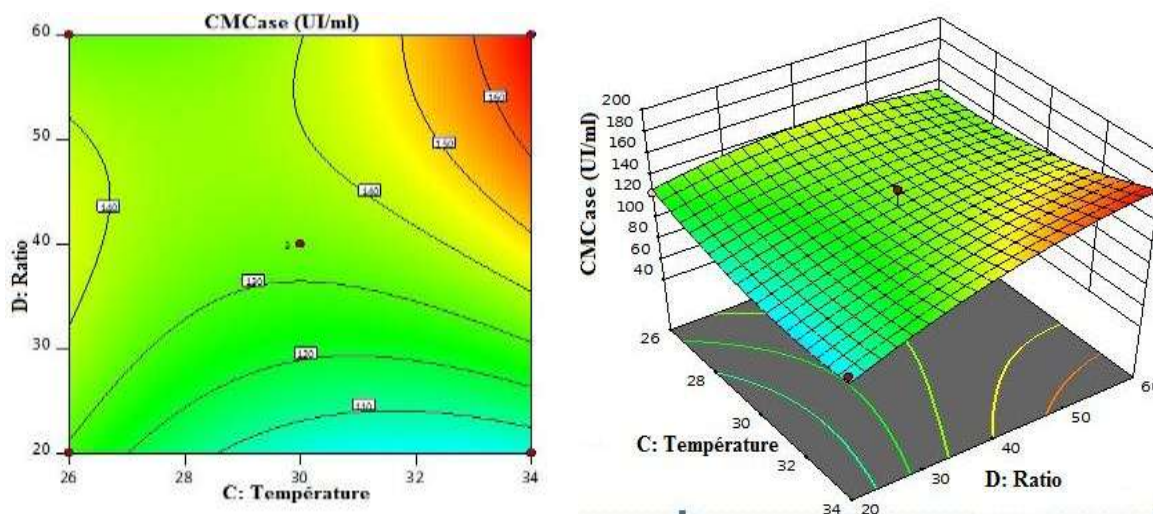


**Figure 17:** Courbe de surface de réponse indiquant l'interaction entre les variables sur la production de la CMCase; (A) période d'incubation et (B) humidité.

Les couleurs bleu, vert et orange indiquent la quantité d'activité endoglucanases, basse, intermédiaire et à haute quantité respectivement.

Cette figure montre les différentes zones qui présentent l'activité CMCases de la fermentation mixte sur la paille de blé, où la zone en bleu représente l'intervalle entre le temps et l'humidité ou nous avons retrouvés la zone d'activité la plus faible ( $<60\text{UI/ml}$ ) ce qui indique que la production de CMCases est moins importante. Cet intervalle se situe à des niveaux bas pour un temps d'incubation (5 – 4jrs) et 75-85% pour l'humidité La zone en orange présente la zone d'activité la plus importante ( $>160\text{UI}$ ). Cet intervalle se situe à des niveaux hauts pour un temps d'incubation (8 – 10jrs) et humidité de (75-80%) ce qui signifie une production plus importante.

- **Température et ratio**



**Figure 18:** Courbe de surface de réponse indiquant l'interaction entre les variables sur la production de la CMCCase; (C) Température et (D) Ratio.

Cette figure montre les différentes zones qui présentent l'activité CMCases de la fermentation mixte solide où la zone en bleu représente l'intervalle entre le ratio et la température ou nous avons retrouvés une zone d'activité la plus faible (<40UI/ml). Cet intervalle se situe à un niveau bas pour une température entre (30-34°C) et un ration (<30%) ce qui indique que la production de CMCases est moins importante. La zone en rouge présente la zone d'activité la plus importante (>160UI/ml) avec les valeurs en température entre (32-34°C) et ratio entre (40-60%) ce qui signifie que une production plus importante. La zone vert présente la zone de production intermédiaire.

#### IV.4. Modèle mathématique

Les résultats obtenus sont résumés sous forme d'une équation polynomiale du second degré, donné en variables naturelles :

$$\text{CMCase} = +133.58 + 19.43A + 8.51B + 2.74C + 17.92D - 21.98 - 5.74AC + 9.92AD + 10.97BC + 0.5425BD + 15.37CD - 11.93A^2 + 2.83B^2 + 11.93C^2 - 11.74D^2$$

A, B, C, D sont respectivement : le temps, l'humidité, la température et la ration.

Avec ce modèle, le calcul de la réponse dans le domaine d'étude sera possible. Il suffit d'attribuer des valeurs aux niveaux A, B et C, et D pour obtenir l'activité

## II. validation du modèle

Pour vérifier la validation du modèle les valeurs optimales proposées par BDD sont présenté sur le tableau suivant :

**Tableau X** : Conditions optimales appliquées pour la production de CMCases proposées par le modèle BBD.

Essais	Temps	humidité	Température	Ratio P/S
1	7	85	34	60
2	7	94	32	57
3	9	77	26	37
4	10	77	26	31
5	10	81	26	51
6	10	75	28	59
7	10	81	32	60

Les résultats des valeurs réelles et les valeurs prédites sont présentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XI** : Valeurs réelles et prédites.

Essais	Temps	Humidité	Température	Ratio P/S	Valeurs prédites	Valeurs réelles
1	7	85	34	60	169,794	218,861
2	7	94	32	57	170,95	177,447
3	9	77	26	37	165,791	146,195
4	10	77	26	31	169,444	193,073
5	10	81	26	51	169,872	196,908
6	10	75	28	59	172,586	174,858
7	10	81	32	60	168,364	246,278

Une corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales après optimisation confirme la validité du modèle et l'existence d'une valeur optimale à l'essai N°1 avec des conditions optimales d'un temps d'incubation de 7 jours, humidité 85%, température de fermentation 34°C, et un ratio de 60%, à un taux de production de 218.861 UI/ml.

# Conclusion

Les biotechnologies industrielles font partie des technologies essentielles pour le développement économique de demain. Elles exploitent les micro-organismes et les enzymes, pour fabriquer divers produits.

L'objectif de ce travail de recherche était de développer des biocatalyseurs lignocellulolytiques naturelles par fermentation fongique sur substrat solide. A cet effet la paille de blé qui est utilisé en alimentation animal, peut être transformée en sucres fermentescibles et servir du substrat pour la production d'enzymes.

Des examens microscopiques et macroscopiques sont réalisées sur les deux souches fongiques : *Aspergillus sp* (BG) et *Trichoderma sp* (G).

Des fermentations submergées sur milieu solide sont réalisé avec les deux souches BG et G avec la paille de blé comme seule source de carbone pour sélectionner le meilleur type de fermentation, et qui permet d'avoir une meilleure production de CMCases.

Ce travail qui a pour but l'optimisation des conditions de production des CMCases à savoir :

Le temps d'incubation, l'humidité et la température d'incubation, en utilisant en premier lieu l'optimisation par one factor at time (OFAT) et à la fin le plan d'expérience BBD. Ce plan a permis d'optimiser la production enzymatique et de réduire le nombre d'expériences à réaliser.

Une meilleure production de CMCCase a été observée sur la paille de blé avec une culture mixte solide de *Trichoderma sp* et *Aspergillus sp*.

Les résultats de la SSF sur la paille de blé montrent que les deux souches BG et G présentent une meilleure production de CMCases (198,346 UI/ml) au bout de 07 jours de fermentation incubé à 30°C, humidifié à 85% et avec un ratio (p/s) de 6/4.

Les résultats de l'optimisation sur BDD affirment que le modèle est significatif avec des valeurs réelles qui sont très proches de celles prédites, avec un coefficient de corrélation  $R^2$  égale à 0,9149.

Les optimums des facteurs établis pour la validation du model sont respectivement 7 jours, 85%, 34°C et 60% (P/S), pour une activité CMCCase maximale de l'ordre 218.86 U/ml, proche de la valeur prédite.

A travers ces résultats intéressants, il est essentiel de poursuivre les investigations de recherche et d'exploitation des champignons à intérêt industriel pour la production de

métabolites, particulièrement les cellulases à partir de la valorisation des déchets agroalimentaires.

L'utilisation efficace de tels déchets agricoles résout des problèmes non seulement de l'environnement, mais aussi participe en grande partie à la promotion de la valeur économique des produits agricoles.

En perspectives aux résultats obtenus :

- ❖ Réalisation d'une fermentation mixte solide avec d'autres déchets agroalimentaires tels que : coque d'arachide, les écorces, grignons d'olives, sciure du bois, canne à sucre, ...etc.
- ❖ Optimisation des conditions de la fermentation mixte sur substrat solide: taux d'inoculation, humidité, pH initiaux et température d'incubation, pour un meilleur rendement de production.
- ❖ La recherche de facteurs de croissance, précurseurs et sources d'azote exogènes qui peuvent améliorer la croissance et la production.
- ❖ Caractérisation de l'enzyme brut : la stabilité de l'activité CMCCase en présence de détergents de commerces, effet d'ions et réactifs chimiques, thermostabilité, affinité vis-à-vis de différents substrats, effet de pH et de température, profil protéique...etc.
- ❖ Purification d'une endoglucanase pour mieux élucider le mode d'action des CMCCase produites.

# Références bibliographiques

**A**

- **Al-Jazairi M, Abou-Ghorra S, Bakri Y, Mustafa M. (2015).** Optimization of  $\beta$ -galactosidase production by response surface methodology using locally isolated *Kluyveromyces marxianus*. *International Food Research Journal*, 22(4).
- **Anastas P. T, Warner J. C. (2000).** Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press.
- **Annadurai G, Sheeja R.Y. (1998).** *Bioprocess ENG*, 18.463p.
- **Assamoi 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*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 13(2); 281–294p.

**B**

- **Bader J, Mast-Gerlach E, Popovic M. K, Bajpai R, Stahl U. (2010).** Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 109, (2), 371-387.
- **Ballerini D. (2011).** Les biocarburants. Répondre aux défis énergétiques et environnementaux des transports. Paris (France) : Technip. 381 p. ISBN: 978-2710809692.
- **Bansal N, Tewari R, Soni R, Soni K.S. (2012).** Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*, 32, 1341–1346
- **Bettache A. (2013).** Isolement et sélection d'actinomycètes producteurs d'enzymes cellulolytiques. Thèse de doctorat. Université A.MIRA-BEJAIA. Algérie. 73.
- **Boisset C, Fraschini C, Schlein M, Henrissat B, Chanzy H. (2000).** Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbio.*66.1444-1452.
- **Boulaouad I. (2013).** Isolement et sélection d'une moisissure cellulolytiques locale et estimation de son potentiel cellulasique sur substrats solides. Thèse magistères. Université A.MIRA-BEJAIA. Algérie.



- **Braaksma M, Van Den Berg R.A, Van Der Werf M.J, Punt P.J (2010).** A Top Down Systems Biology Approach for the Identification of Targets for Fungal Strain and Process Development. In; Borkovich. K.a., Ebbole. d.j. Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fung. Ed; *ASM Press*. Washington. U.S.A.25-35p.
- **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.
- **Brown M.R.J. (2004).** Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st Century. *J.Polym.Sci.*42.487-495p.

### E

- **Colla L, Rizzardi J, Pinto M, Reinehr C, Bertolin T, Vieira- Costa J. (2010).** Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresour. Tech.* 101: 8308–14p.
- **Cornu M. (2000).** Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes. Thèse doctorat. Université de LYON1.France.56p.

### D

- **Dekker R.F.H, Lindner. (1979).** Bio-utilization of lignocellulosic waste materials- A review. *South African journal of science*, 75, 56-71.
- **Delabona P.S, Pirota R.D.P.B, Codima C.A, Tremacoldi C.R, Rodrigues A, Farinas C.S. (2012).** Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass Bioenerg.* 37, 243–250p.
- **Demain A.L (2000).** Microbial Biotechnology (feature). *Trends in biotechnology.* 18(1): 26–31p.
- **Dos Santos B.S.L, Gomes A.F.S, Franciscan E.G, Oliveira J.M, Baffi M.A. (2015).** Thermotolerant and mesophylic fungi from sugarcane bagasse and their prospection for biomass-degrading enzyme production. *Braz J Microbiol* 46, 903-910p.

**F**

- **Eloutassi N, Louaste B, Boudine L, Remmal A. (2014).** Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération. *Revue des Energies Renouvelables*, 17(4) : 600-609p.

**F**

- **Florencio C, Cunha F. M, Badino A. C, Farinas C. S, Ximenes E, Ladisch M.R. (2016).** Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*. 90, 53-60p.

**G**

- **Gautam S.P, Bundela P.S, Pandey A.K, Khan J, Awasthi M.K, Sarsaiya S, (2011).** Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnol. Res. Int.*, 1, 1–8p.
- **Ghose T.K. (1987).** Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59(2), 257-268p.
- **Goupy J. (2006).** Les Plans d'expériences. Edition: *Revue MODULAD*.

**H**

- **Haberra S. (2014).** Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet. Thèse doctorat. Université Badji Mokhtar Annaba. Algérie.
- **Hanco V, Poilâne C, Chen J. (2011).** In 17èmes Journées Nationales sur les Composites, Poitiers Futuroscope, France
- **Haq I, Javed M.M, Khan T.S. (2006).** An innovative approach for hyper production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *A. niger* and *T.viride* MSK-10. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 609–614p.

- **Hasper A, Dekkers E, Van Mil M, Peter J, Van de Vondervoort I, Leo H.(2002).**EglC, a Nex Endoglucanase from *Aspergillus niger* With Major Activity towards Xyloglucan. *Applied and Enviromental Microbiology*.68 (4). 1556-1560p.
- **Heitner C, Dimmel D, Schmidt J. (2010).** Lignin and lignans: advances in chemistry. *CRC press*, 495-512p.
- **Holker U, Lenz J. (2005).**Solid-state fermentation – are there any biotechnological Advantages? *Current Opinion in Microbiology* [en ligne], 8 (3), 301-306p.
- **Holtz C, Kaspari H, Klemme J.H. (1991).** Production and properties of xylanases from thermophilic actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 59, 1-7p.
- **Hu H, van den Brink J, Gruben B, Wosten H, Gu J, De Vries R. (2011).** Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65, (1), 248-252p.

Q

- **Iqbal H.M.N, Asgher M, Ahmed I, Hussain S, (2010).** Media optimization for hyper-production of carboxymethyl cellulase using proximally analyzed agroindustrial residue with *Trichoderma harzianum* under SSF. *I.J.A.V.M.S.* 4, 47–55p.

J

- **Johanne C. (2002).** Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma*. Conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi.
- **Johnson E. (2016).** Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*. 10, (2), 164-174p.

K

- **Kachlishvili E, Penninckx M.J, Tsiklauri N, Elisashhvili V. (2005).** Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World J Micro & Biotech* 22, 391-397p.

- 
- **Kalogeris E, Christakopoulos P, Kekos D, Macris B.J. (1998).** Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. *J Biotechnol.* 60, 155-163p.
  - **Kang SW, Park YS, Lee JS, Hong SI, Kim SW. (2004).** Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 91.153–156p.



- **Liu D, Zhang R, Yang X, Wub H, Xu D, Tang Z, Shen Q. (2011).** Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 65, 717–725p.
- **Liu J, Yang J. (2007).** Cellulase production by *Trichoderma Koningii* AS3.4262 .in solid state fermentation using lignocellulosic waste from vinegar industry. *Food Technol. Biotechnol.* 45.420-425p.



- **Madhuri N, Garima D, Jyoti D, kiran K, Data M, Amita R.S. (2014).** Production purification and characterization of a novel GH12 family endoglucanases from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw .*international biodeterioration and biodegradation* .88.150-4161p.
- **Makut M. D, Godiya E. M. (2010).** A survey of cellulolytic mesophilic fungi in the soil environment of Keffi Metropolis, Nasarawa State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 4(21), 2191-2195p.
- **Martins D.A.B, Do prado H.F.A, Leite R.S.R, Ferreira H, De Sousa M.M. (2011).** Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. *Integrated Waste Management*, 2, 320-360p.
- **Mitchell D.A, Berovic M, Krieger N. (2002).** Overview of solid state bioprocessing. *Biotech. Annu. Rev.* 8: 183–225p.
- **Mussatto S.I, Fernandes M, Roberto I.C. (2007).** Lignin recovery from brewer's spent grain black liquor. *Carbohydrate Polymers* .70. 218–223p.

**O**

- **Ollivier B. (1987).** Fermentation Méthanique Par Des Cultures Mixtes Définies De Bactéries Thermophiles. Thèse doctorat. Université AIX-MARSEILLE 1. France.21.

**P**

- **Pandey A, Nigam P, Soccol C.R, Soccol V. T, Singh D, Mohan R. (2000).** Advances In. Microbial amylases. *Biotechnology. Appl. Biochem.* (31), 135-152p.
- **Pereira J.C, Marques N.P, Rodrigues A, Brito de Oliveira T, Boscolo M, Silva R, Gomes E, Martins D.A.B. (2015).** Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. *J Appl Microbiol* 118, 928-939p.
- **Pérez J, Muñoz-Dorado J, De La Rubia T, Martínez J (2002).** Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Inter. Microbiol .5:* 53 -63p.
- **Perez S. (2000).** Structure et morphologie de la cellulose. Initiation à la science des polymères, *GFP*, 1-24p.
- **Pimental R, Souza A.L, Nascimento A.T, Andrade E.V, Astolfi-Filho S, Nunes-Silva C.G. (2014).** Endo and exoglucanases produced by *Penicillium citrinum* isolated from Amazon. *BMC Proceedings*, 8(4).179p.
- **Prevot V. (2013).** Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide .thèse doctorat. Université de Reims champagne –ardenne .france.159p.
- **Privas E. (2013).** Matériaux lignocellulosiques « Élaboration et Caractérisation ». Thèse doctorat. École nationale supérieure des mines de Paris. France.

**R**

- **Rabinovich M.L, Melnick M.S, Bolobova A.V. (2002).** The Structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes .*Biochemistry (Mosc).* (67). 850-871p.

- **Rahardjo Y. S. P, Tramper J, Rinzema A. (2006).** Modeling and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances* [en ligne]. 24. (2). 161-179p.
- **Raimbault M, Alazard D. (1980).** Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9, 199-209p.
- **Reculeau-Arnoud X. (2003).** Production et étude de toxicité des peptaibols d'une souche marine de *Trichoderma koningii*. Thèse doctorat. Université de NANTES. France.25.
- **Roussos S, Raimbault M. (1982).** Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. I- Screening des souches cellulolytiques. *Ann. Microbiol*, 133, 455-464p.
- **Roussos S. (1985).** Croissance de *T. harzianum* par FMS: physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse de Doctorat en sciences naturelles, Université Provence, Marseille France, 18- 67p.
- **Roussos S. (1998).** Sugar cane used in solid state fermentation for cellulases production. In: Raimbault M., Soccol C.R., Chuzel g. International training course on solid state fermentation. Montpellier. *ORSTOM*.139-150p.



- **Saddler, Arantes, Valdeir, Jack N. (2010).** Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* [en ligne], février. 3, (4).
- **Saidi. A. (2011).** La biomasse lignocellulosique et la bioénergie. *Recherche et Développement*, 4-5p.
- **Salihu A, Alam Md. Z, Abdulkarim M. I., Salleh H. (2012).** Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Res. Cons. Recy.* 58. 36-44p.
- **Sanchez C. (2009).** Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.* (27):185-194p.
- **Sandhu S.K, Oberoi H.S, Babbar N, Miglani K, Chadha B.S, Nanda D.K .(2013).** Two-stage statistic medium optimization for augmented cellulase production via solid state fermentation by newly isolated *Aspergillus niger* HN-1 and application of crude cellulase consortium in hydrolysis of rice straw. *J. Agric. Food Chem.* 61. 12653-12661p.

- **Santos T.C, Cavalcanti Renata SI, Bonomo Nivio C.F, Marcelo Franco B.S. (2011).** Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. *Ciência Rural*, 41(12), 2210-2216p.
- **Saradouni N, Pennick X. M, Mohand-Oussaid O, Benallaoua S. (2004).** Recherche d'un milieu optimal pour la production de B-glucosidase chez *Aspergillus fumigatus* mutant albino. *Revue des sciences et technologies*.21.
- **Savalle M. (2015).** OTOMYCOSE A ASPERGILLUS : Etude rétrospective, expérimentation in vitro et proposition d'un protocole thérapeutique. Thèse doctorat. Université Rouen. France.35p.
- **Schwarze F.W.M.R, Engels J, Mattheck C. (2000).** Fungal Strategies of wood decay in trees. *Springer, Berlin*.
- **Scriban R. (1999).** Biotechnologie. 5ème édition. Technique et documentation - Lavoisier (éd). 149-157p.
- **Shamala T. R, Sreekantiah K. R. (1985).** Production of cellulases and o-xylanase by some selected fungal isolates. *Enzyme Microb. Technol.* (8):178-182p.
- **Singhania R.R, Sukumaran R.K, Pillai A, Prema P, Szakacs G, Pandey A. (2006).** Solid-state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulase production by *Trichoderma reesei* NRRL 11,460. *Indian J. Biotechnol.* 5, 332-336p.
- **SMITH, John E., BERRY, David R., KRISTIANSEN, Bjorn. (1983).** The Filamentous Fungi: Fungal Technology. Londres (Royaume-Uni). *Edward Arnold*. 416 p.
- **Stoilova S.I, Gargova S.A, Krastanov A.I. (2014).** Production of Enzymes by Mixed Culture from Micelial Fungi in Solid-State Fermentation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 37-41p.
- **Subramaniyam R, Vimala R. (2012).** Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int. J. Sci. Nature.* 3(3): 480-486p.
- **Sun S.Y, Xu Y. (2009).** Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. *Biores.Tech.*100: 1336–1342p.
- **Sun Ye, Cheng J. (2002).** Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* [en ligne]. 83, (1), 1-11p.

- **Sutanu S, Asitava B, Umesh C.H, Soumitra K.S (2012).** Characterization of *Trichoderma reesei* endoglucanases II expressed heterologously in *Pichia pastoris* for better biofinishing and biostoning. *J. Microbiol.* (50) 3: 518– 525p.

U

- **Ul-Haq I, Roheena A, Ashraf H, Shah A.H. (2002).** Isolation and screening of fungi for the biosynthesis of amylase. *Biotechnology*, 2-4, (1), p. 61-66.

V

- **Van den Brink J, Maitan-Alfenas G. P, Zou G ; Wang C. S, Zhou Z. H, Guimaraes V. M, De Vries R. P. (2014).** Synergistic effect of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* enzyme sets on the saccharification of wheat straw and sugarcane bagasse. *Biotechnology Journal.* 9, (10), 1329-1338.
- **Viniegra-Gonzalez G, Favela-Torres E. (2006).** Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression. *Food Tech. Biotech.*44, 397–406p.

W

- **Ward O.P, Qin W.M, Dhanjoon J, Ye J, Singh A. (2006).** Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Adv. Appl. Microbiol.*, 58; 1-55p.
- **Wertz J-L. (2011).** Les hémicelluloses. *Gembloux Agro- Bio Tech*, Université de Liège.1-16p.

X

- **Xun L. (2015).** Valorisation énergétique de la biomasse lignocellulosique par digestion anaérobie : prétraitement fongique aérobie. Thèse doctorat. Université Lyon. France. 32p.

Z

- **Zeitoun R. (2010).** Procédés de fractionnement de la matière végétale- Application à la production des polysaccharides du son et la paille du blé. Thèse doctorat. Université de Toulouse. France. 32-35p.



# Annexes

## Annexe I

### Matériel utilisé

- Autoclave (Advantage Lab)
- Barreaux magnétiques
- Boite de Pétri
- Cuve en verre
- Erlenmeyers
- Micropipette
- Tube à essais
- Bain marie (Gesellschaft für Labor Technik)
- Balance (Shimadzu)
- Centrifugeuse (Hettich)
- Etuve (Nüve incubator)
- Four pasteur (Herqeus)
- Microscope optique (Zeiss)
- pH mètre (shimadzu)
- Plaque agitatrice (Velp scientifica)
- Spectrophotomètre UV –visible (Schimadzu UV mini-1240)
- Vortex (Velp scientifica)
- Cellule de comptage (Malassez)

---

---

## Annexe II

### Composition des milieux de culture

#### 1- Gélose Pomme de terre, Dextrose, Agar (PDA) (*saint-germain, 2013*)

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

Stérilisation a l'autoclave à °C pendant 20 min

#### 2- Milieu Mandels et Waber (Mandel et Waber ,1996)

- 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>.....0.3g
- CaCl<sub>2</sub>.....0.3g
- FeSO<sub>4</sub>.....0.5mg
- MnSO<sub>4</sub>.....1.56mg
- ZnSO<sub>4</sub>.....1.4mg
- CoCl<sub>2</sub>.....2mg
- Eau distillée .....1litre
- La source de carbone étant .....1 % CMC
- pH.....5

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

---

## Annexe III

### Réactifs et tampons

#### 1-Réactif DNS (Ghose ,1998)

- DNS.....10g
- NaOH .....16g
- Tartrate double de sodium et de potassium .....300g
- Eau distille .....1 litre

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

#### 2- tampon citrate de sodium (50mM, pH 4.8) (Zhang *et al.*, 2009)

- Tampon citrate (1M, pH 4.5)
- Acide citrique monohydrate.....21g
- NaOH (pour ajuster le pH a 4.2).....5 à 6g
- Eau distillée .....100ml
- Tampon citrate (50Mm, pH4.8)

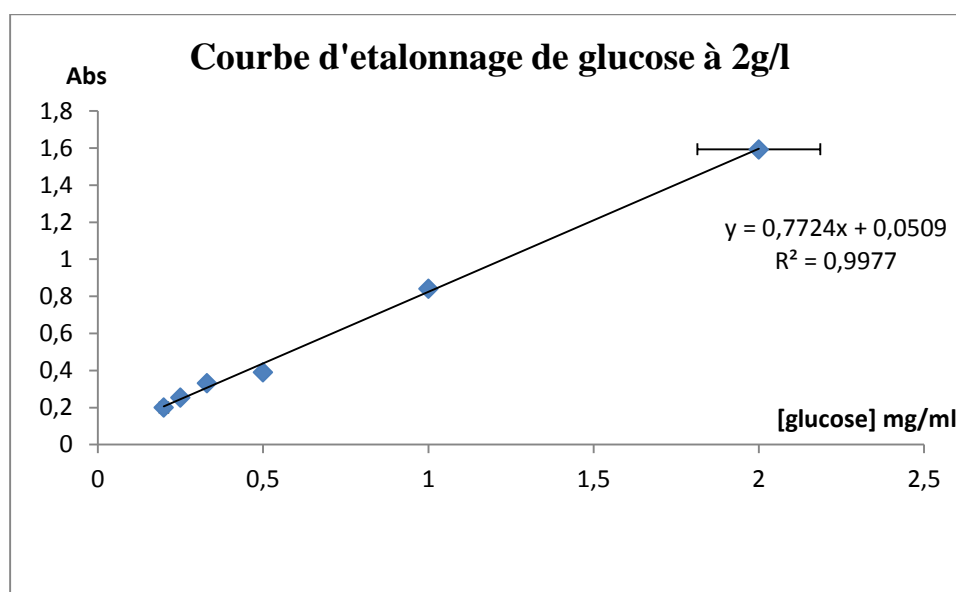
Diluer le premier tampon (1M, pH4.5) par l'ajout de 19 fois le volume en eau distillé, ajuster le pH à 4.8 avec la solution si nécessaire.

## Annexe IV

## Les courbes d'étalonnages

**Tableau XII** : Gamme étalon pour le dosage de l'A CMCases (solution mère de glucose 2g/l)

Dilution	glucose 2g/l	A1	A2	MOYENNE (A1et A2)	écart type
1 /10	0.2	0,191	0,21	0.2005	0,01343503
1/8	0.25	0,25	0,259	0.2545	0,00636396
1/6	0.333	0,335	0,328	0.3315	0,00494975
1/4	0.5	0,387	0,394	0.3905	0,00494975
1/2	1	0,836	0,846	0.841	0,00707107
1	2	1,462	1,525	1.4935	0,04454773



**Figure 19:** courbe d'étalonnage du dosage de CMCases

## Annexe V

Tableau XIII : Les valeurs réelles et prédites de BDD.

Essais	A:Temps	B:Humidité	C:Température	D:Ratio P/S	CMCase	CMCase
	jours	%	°C	%	UI/ml	UI/ml
1	10	95	30	40	120	130,43
2	10	75	30	40	153,912	157,36
3	7	75	30	60	128,83	133,52
4	7	75	34	40	127,118	131,59
5	7	85	30	40	126	133,58
6	10	85	34	40	156,261	150,00
7	7	85	26	20	125	128,48
8	7	75	30	20	91	98,78
9	10	85	30	60	165,033	157,17
10	7	95	34	40	165	170,56
11	7	95	30	60	155	151,63
12	10	85	26	40	152,906	156,00
13	4	85	34	40	121,318	122,63
14	7	85	30	40	125,728	133,58
15	7	85	30	40	149	133,58
16	7	85	34	60	168,292	169,79
17	7	75	26	40	163	148,05
18	7	95	26	40	157	143,13
19	10	85	30	20	104,35	101,49
20	7	95	30	20	115	114,71
21	4	85	26	40	95	105,66
22	4	75	30	40	80	74,55
23	7	85	34	20	109,814	103,22
24	4	85	30	20	84	82,48
25	4	85	30	60	105	98,47
26	7	85	26	60	122	133,57
27	4	95	30	40	134	135,53

## Résumé

La fermentation mixte sur milieu solide est un bioprocédé pouvant être utilisé comme technologie captivante pour diminuer le coût des biocatalyseurs utilisés dans la conversion de la biomasse lignocellulosique. Ce travail est consacré à l'optimisation des paramètres influençant la production des CMCases par la culture mixte d'*Aspergillus* sp et *Trichoderma* sp à partir de la paille de blé. Au cours de cette étude une optimisation par la technique de one factor at time a été réalisée. L'activité CMCases atteint une valeur maximale de 198,346 UI/ml avec une période d'incubation de 7 jours, humidité 85%, température 30°C et une ration de 40% de la paille de blé, avec une fermentation mixte des deux souches *Aspergillus* sp et *Trichoderma* sp. L'application du model Box-Behnken (BBD) à quatre facteurs (temps, humidité, température et ratio) avec les trois niveaux (-1, 0, +1) a révélé que la meilleur activité enzymatique 218.86 UI/ml est obtenue avec les conditions optimales de temps, humidité, température et le ratio, de l'ordre de 7 jrs, 85%, 34°C et 60%, respectivement.

**Mots clés :** *Aspergillus* sp, *Trichoderma* sp, fermentation mixte, Endoglucanases, Paille de blé.

## Abstract

Mixed fermentation on solid medium is a bioprocess that can be used as a captivating technology to reduce the cost of biocatalysts used in the conversion of lignocellulosic biomass. This work is devoted to optimizing the parameters influencing the production of CMCases by the mixed cultivation of *Aspergillus* sp and *Trichoderma* sp from wheat straw. During this study an optimization by the technique of one factor at time was realized. The CMCCase activity reaches a maximum value of 198,346 IU / ml with a 7-day incubation period, humidity 85%, temperature 30 ° C and a ration of 40% of the wheat straw, with a mixed fermentation of the two strains *Aspergillus* sp and *Trichoderma* sp. The application of the four-factor Box-Behnken (BBD) model (time, humidity, temperature and ratio) with the three levels (-1, 0, +1) revealed that the best enzyme activity 218.86 IU / ml is obtained with the optimal conditions of time, humidity, temperature and ratio, of the order of 7 days, 85%, 34 ° C and 60%, respectively.

**Key words:** *Aspergillus* sp, *Trichoderma* sp, mixed fermentation, Endoglucanases, wheat straw.

## ملخص

التخمير المختلط في الحالة الصلبة هو عملية حيوية يمكن استخدامها كتكنولوجيا أسرة لخفض تكلفة المحفزات الحيوية المستخدمة في تحويل الكتلة الحيوية لنيو سيليلوز. هذا العمل مخصص لتحسين المعلمات المؤثرة في إنتاج CMCases بواسطة زراعة مختلطة من *Aspergillus* sp و *Trichoderma* sp من قش القمح. خلال هذه الدراسة تم إجراء تحسين باستخدام تقنية عامل واحد في الوقت المحدد. يصل نشاط CMCCase إلى قيمة قصوى تبلغ 198,346 وحدة دولية / مل مع فترة حضانة تبلغ 7 أيام، والرطوبة 85 ٪، ودرجة الحرارة 30 درجة مئوية، وحصص 40 ٪ من قش القمح، مع تخمير مختلط من السلالتين *Aspergillus* sp و *Trichoderma* sp. وقد أظهر تطبيق نموذج (Box-Behnken (BBD) المكون من أربعة عوامل (الوقت والرطوبة والحرارة والنسبة) مع المستويات الثلاثة (-1، 0، +1) أن أفضل نشاط للإنزيم 218.86 وحدة دولية / مل يتم الحصول عليه باستخدام الظروف المثلى للوقت والرطوبة ودرجة الحرارة والنسبة، من أجل 7 أيام، 85 ٪، 34 درجة مئوية و60 ٪ على التوالي.

**الكلمات المفتاحية:** *Aspergillus* sp، *Trichoderma* sp، التخمير، اندوغلوكاناز.