

Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Optimisation de la production d'enzymes
lignocellulolytiques de *Trichoderma* sp
par fermentation solide des coproduits
par RSM**

Présenté par :
IDRISSOU Souhila & IDIR Salima
Soutenu le : **21 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mr KECHA Mouloud
Mr BETTACHE Azzeddine
M^{me} KERAMANE Badria
Melle AZZOUZ Zahra

Professeur	Président
MCA	Encadreur
MAA	Examinatrice
Doctorante	Invitée

Année universitaire : 2017 / 2018

Dédicaces

*Je dédie ce travail en premier lieu aux êtres, les plus chers au monde : **mes parents**.
Quoi que je fasse je ne pourrais leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivée là
c'est bien grâce à eux que dieu les bénisse, et leurs accorde longue vie et les protège.*

*Que ce travail vous soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde et
infinie reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi, j'espère que je
serai toujours à la hauteur de vos espérances.*

Je dédie aussi ce modeste travail

A mes sœurs ainsi que leurs époux

A mes frères ainsi que leurs épouses

Et à tous mes neveux, bien

Précisément les prunelle a mes yeux ma petite Maria Mailys et Hadil

Je leurs souhaite santé et réussites dans leurs vie

A ma binome Salima Idir ainsi que sa famille

A tout mes amis à qui je leurs souhaite une vie pleine de joie, bonheur et Santé Meryam

Foudil , Manissa Kessai, Lahna Ait Mokhtar, Katia ramdani Sabrina messali, Assma chalal,

Fadwa, Malek moudoub, Morad Oumllil. Et à toute l'équipe de biotechnologie M2.

A tous ceux qui me sont chers

M^{elle} Souhila

Dédicaces

Avec tout respect et amour, je dédie ce modeste travail

A' mes chers parents, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A' ma nana Zineb je te souhaite longue vie mamy

A' ma chère sœur NASSIRA pour son encouragement ainsi que son époux NASSIM

A' ma belle sœur NADJET pour sa compréhension

A' mes frères ZAHIR et AZIZ pour leur soutien

A' mon neveu YACINE et ma nièce SERINE

A' ma binôme SOUHILA ainsi que sa famille

A' tout mes enseignants depuis le primaire

A' tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail

A' tous ceux qui me sont chers

M^{elle} SALIMA

Remerciements

Nos remerciements s'adressent en premier lieu à Mr BETTACHE Azzeddine, Maitre de conférence A à l'université Abderrahmane Mira de Bejaia qui a dirigé ce travail avec beaucoup d'enthousiasme en nous faisant bénéficier de ses compétences scientifiques ; Egalement pour la confiance qu'il nous a témoigné, ses conseils, ses orientations , sa gentillesse et ses intérêts portés pour ce sujet de recherche nous ont permis de mener à terme ce travail. Son encadrement était le plus exemplaire. Qu'il reçoive l'expression de notre vive gratitude.

On souhaite remercier également Mlle AZZOUZ Zahra pour nous avoir assistés et guidés pour la réalisation de ce travail. Je ne saurai la remercier assez pour son soutien et son suivi scientifique et moral.

On remercie les membres de jury ; Mr KECHA Mouloud professeur à l'université de Bejaia, et membre de l'équipe LMA pour tout le savoir qu'on a pu bénéficier en tant qu'enseignant dans les différents cursus et pour l'honneur qu'il nous fait de présider ce jury. A M^{me} KERAMANE Badria maitre Assistant A, à l'université de Bejaia, pour le temps qu'elle a bien voulu consacrer à lire et à juger ce travail en tant qu'examinatrice.

Je remercie également Mr BENALLAOUA Saïd Professeur de l'université A/Mira directeur du laboratoire LMA pour nous avoir accueilli au sein de son laboratoire, ainsi que les ingénieurs du laboratoire pour leurs aides et dispositions

Un immense merci également aux enseignants qui ont contribué à notre formation scientifique durant le cursus universitaire.

Nous nous permettons d'adresser nos remerciements à nos familles, qui ont contribués beaucoup d'une manière ou d'une autre, durant toute la période de ce travail..

Et à tous ceux qu'on a omis de citer leurs noms.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Biomasse lignocellulosique.....	3
I.1 Etude et définitions.....	3
I.1.1 Cellulose.....	3
I.1.2 Hémicellulose.....	3
I.1.3 Lignine.....	4
I.2 Matière première.....	4
I.2.1 Son de blé.....	4
I.2.2 Paille de blé.....	5
II. Les champignons filamenteux.....	5
II.1 Genre <i>Trichoderma</i>	5
II.1.1 Taxonomie	6
II.1.2 Production de métabolites intéressantes	6
II.1.2.1 Cellulases fongiques	6
II.1.2.2 Hémicellulases	7
II.1.2.3 Ligninases fongiques	7
III. Les enzymes lignocellulolytiques	7
III.1 Les cellulases.....	7
III.2 Les xylanases.....	7
III.3 Les ligninases.....	8
III.4 Applications industrielles de xylanases.....	8
IV. La fermentation sur milieu solide (FMS).....	9
IV.1 Généralités et définitions.....	9
IV.2 la conduite de procédé.....	9
IV.2.1 Le support/ Substrat.....	9

IV.2.2 Température (°C)...	10
IV.2.3 Teneur en eau (A_w).....	10
IV.2.4 la biomasse fongique	10
V. Plans d'expériences.....	10
V.1 Définition d'un plan d'expérience.....	10
V.2 Terminologie.....	11
V.3 Plans de surface de réponse (RSM).....	11
V.4 Box- Behnken Design (BBD)	11
V.5 Modèle mathématique postulé.....	12

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel microbiologique	13
II. Observation macro et microscopique de la souche Ak S3	13
II.1 Observation macroscopique.....	13
II.2 Observation microscopique.....	13
III. Mise en œuvre de la FMS par la technique «One Factor At Time ».....	13
III.1 Préparation du substrat solide de fermentation.....	13
III.2 Préparation de suspension sporales	14
III.3 Fermentation solide sur le son et la paille de blé.....	14
IV. Mesure de l'activité enzymatique.....	15
V. Paramètres cinétique.....	17
V.1 Temps d'incubation	17
V.2 Humidité.....	17
V.3 Température.....	17
V.4 Charge d'inoculum.....	17
VI. Analyse statistique.....	17
VII. Optimisation de la production de xylanases par RSM.....	18

Chapitre III : Résultats et discussions

I. Etude morphologique de la souche Ak S3.....	20
I.1 Etude macroscopique.....	20
I.2 Etude microscopique.....	20
II. Effet de la source de carbone sur la production de xylanases.....	21
III. Effet des paramètres cinétiques sur la production de xylanases par la technique OFAT.....	23
III.1 Effet de temps d'incubation.....	23
III.2 Effet d'humidité.....	25
III.3 Effet de température.....	26
III.4 Effet de la charge de l'inoculum.....	28
IV. Plan d'expérience Box-Behnken.....	30
IV.1 Analyse des résultats.....	30
IV.2 Coefficient de détermination R^2	31
IV.3 Analyse de la variance pour la production xylanolytiques (ANOVA).....	32
IV.3.1 La signification du modèle.....	32
IV.3.2 la signification d'effet des facteurs.....	33
IV.3.3 Modèle mathématique de régression.....	37
V. Validation du modèle.....	37
Conclusion et perspective.....	39

Références bibliographiques

Annexes

Résumé/ Abstract

Liste des tableaux

<i>Tableaux</i>	<i>Titres</i>	<i>Pages</i>
<i>Tableau I</i>	Différentes étapes du dosage de xylanases selon Ghose (1987)	16
<i>Tableau II</i>	Différents niveaux des paramètres choisis pour l'optimisation	18
<i>Tableau III</i>	Tableau de la matrice des expériences	19
<i>Tableau IV</i>	Analyse du modèle de régression	32
<i>Tableau V</i>	Estimation des coefficients de régression du modèle polynomiale de second degré	33
<i>Tableau VI</i>	Conditions optimales pour la production de xylanases proposé par le modèle BBD	38
<i>Tableau VII</i>	Conditions optimales appliqué pour la production de xylanases	38
<i>Tableau VIII</i>	Valeurs prédites et valeurs réelles	38

Liste des tableaux insérés en annexe

<i>Tableaux</i>	<i>Titres</i>	<i>Annexe</i>
<i>Tableau I</i>	Composition en sucre de son de blé	Annexe I
<i>Tableau II</i>	Composition en sucre de la paille de blé	Annexe I

Liste des figures

<i>Figures</i>	<i>Titres</i>	<i>pages</i>
<i>Figure N°1</i>	Représentation moléculaire de la chaîne de cellulose	03
<i>Figure N°2</i>	Schéma structural de l'hémicellulose	04
<i>Figure N°3</i>	Plan de Box- Behnken pour trois facteurs	11
<i>Figure N°4</i>	Observation macroscopique de la souche Ak S3	20
<i>Figure N°5</i>	Observation microscopique de la souche Ak S3 au microscope optique Gx40	21
<i>Figure N°6</i>	Culture fongique sur la paille de blé après sept jours d'incubation	21
<i>Figure N°7</i>	Culture fongique sur le son de blé après sept jours d'incubation	22
<i>Figure N°8</i>	Effet de différentes sources de carbone sur la production de xylanases	22
<i>Figure N°9</i>	Effet de temps d'incubation sur la production de xylanases	24
<i>Figure N°10</i>	Effet de l'humidité sur la production de xylanases	25
<i>Figure N°11</i>	Effet de la température sur la production de xylanases	27
<i>Figure N°12</i>	Effet de la charge initial de l'inoculum sur la production de xylanases	28
<i>Figure N°13</i>	Résultats des valeurs réelles et prédites obtenue par BBD	30
<i>Figure N°14</i>	Réponses réelles en fonction des réponses prédites	31
<i>Figure N°15</i>	Surfaces de réponses définissant les différentes interactions	36
<i>Figure N°1</i>	Courbe d'étalonnage pour le dosage du Xylose (2g/ l)	Annexe V

Liste des abréviations

- **A_w**: Activity water.
- **BBD**: Box-Behnken Design.
- **CMC** : Carboxymethyl cellulose.
- **DNS**: 3,5- acide dinitrosalicylique.
- **FML** : Fermentation en milieu liquide.
- **FMS** : Fermentation en milieu solide.
- **H_{initial}** : Humidité initial.
- **LOF**: Lack of Fit.
- **M_{sèche}** : Matière sèche.
- **M_{Total}** : Masse totale.
- **nm** : nanomètre.
- **OFAT**: One Factor At Time.
- **p value**: probability value.
- **PDA**: Potato- Dextrose- Agar.
- **RSM**: Response surface methodology.
- **SSF**: Solid State Fermentation.
- **sp.** : Espèce
- **Spr/ml**: Spores/millilitre.
- **T**: Trichoderma.
- **UI**: Unité internationale.
- **V /V**: Volume /Volume.
- **3D**: tridimensionnelle.
- **2D**: Deux dimensions.

Introduction

générale

L'épuisement à moyen terme des énergies fossiles, la consommation d'énergie qui ne cesse d'augmenter et l'accroissement des préoccupations environnementales, ont suscité un vif intérêt des pouvoirs publics pour le développement d'une technologie énergétique alternative. A ce titre, 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) (Roussos., 1985).

Les voies métaboliques extrêmement diversifiées trouvées chez les champignons peuvent aboutir à la synthèse de nombreuses molécules utilisables d'un point de vue commercial et industriel comme l'éthanol, les acides organiques, différentes enzymes, et des antibiotiques (Roussos et Raimbault., 1982).

La cellulose, matériel structural de base des parois cellulaires des végétaux, est la macromolécule la plus abondante et la plus largement synthétisée dans le monde végétal. Elle constitue une source d'énergie renouvelable pratique inépuisable. L'efficacité d'hydrolyse de la cellulose en glucose nécessite une coopération des différents enzymes (endoglucanases, cellobiohydrolases et β -glucosidases) (Baldrian et Valskova., 2008 ;Singh et Kaur., 2012).

Une quantité importante de biomasse hémicellulosique est présente dans les coproduits d'agriculture. Elle est constituée de divers polymères biologiques comme le xylane, le mannane, le galactans. Parmi eux le xylane qui a pris une place importante (Shrivastava et *al.*, 2016; Basu et *al.*, 2018). La décomposition complète de la structure de l'hémicellulose nécessite l'action combinée d'un certain nombre d'enzymes hydrolytiques (endoxylanases ; exoxylanase ; β -xylosidases). (Subramaniyan et *al.*, 2002 ; Collin et *al.*, 2005).

Les enzymes xylanases sont produites par diverses bactéries du genre *Bacillus* (Azeri et *al.*, 2010; Battan et *al.*, 2007), des champignons du genre *Aspergillus* et *Trichoderma* (Shrivastava et *al.*, 2011 ; Kumar et *al.*, 2014) et par des levures (Lombard et *al.*, 2013).

Les xylanases sont des groupes d'enzymes qui provoquent l'hydrolyse de l'hémicellulose (Oydeji et *al.*, 2018). Cet enzyme a toujours été privilégiée pour les applications industrielles dans diverses industries telles que l'industrie du papier et de la pâte à papier, l'industrie des biocarburants, l'industrie agroalimentaire, liquéfaction de fruits et légumes et aussi dans la clarification de la bière et des jus (Kumar et Shukla., 2015).

La SSF (solide state fermentation) ou autrement dite FMS (fermentation en milieu solide) est particulièrement avantageux pour la production d'enzymes par les champignons

filamenteux, car simule l'habitat naturel de ces micro-organismes. Du point de vue environnemental, l'avantage de la SSF est lié à l'utilisation de résidus agro-industriels comme substrat solide, agissant comme sources de carbone et d'énergie (Hansen et *al.*, 2015).

Notre étude s'inscrit dans cette optique en fixant comme objectifs la détermination et l'optimisation de quelques paramètres influençant la production d'une variété d'enzymes lignocellulosiques par une souche de champignon filamenteux en l'occurrence *Trichoderma* sp en utilisant des plans d'expériences.

Notre travail s'organise autour de trois parties :

- La première partie fait état des connaissances existantes sur les champignons filamenteux et de leurs capacités à produire des enzymes xylanolytiques ainsi que des notions fondamentales relatives aux plans d'expériences.
- La deuxième partie expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre pour la détermination et l'optimisation des paramètres influençant cette production ainsi que la modélisation de l'activité par le biais de la méthode des plans d'expériences.
- La troisième partie retrace et discute les résultats obtenus au cours de cette étude.

*Synthèse
bibliographique*

I. Biomasse lignocellulosique

I.1 Etude et définition

Le principal constituant des parois cellulaires végétales est la lignocellulose qui est constituée de cellulose, hémicellulose et de la lignine. Elle représente la source de carbone renouvelable la plus abondante de la planète et plus de 70% de la biomasse est produite sur terre (Octave *et al.*, 2009), avec une production annuelle estimée à 200 milliards de tonnes (Zhang *et al.*, 2008).

I.1.1 Cellulose

La cellulose est le polymère le plus abondant du règne végétal, et le polysaccharide le plus abondant sur terre (Bayer *et al.*, 1998). Elle représente entre 2% et 50% de la matière sèche des parois cellulaires végétales (Zhang *et al.*, 2006), et confère à la plante une grande résistance à la flexion et à la traction. D'un point de vue biochimique, la cellulose est un homopolysaccharide linéaire et insoluble, munie d'une formule chimique $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Balat., 2011), composé d'unités D-anhydroglucopyranose reliées entre elles par des liaisons osidiques de type β -1,4 (Chandawat *et al.*, 2011).

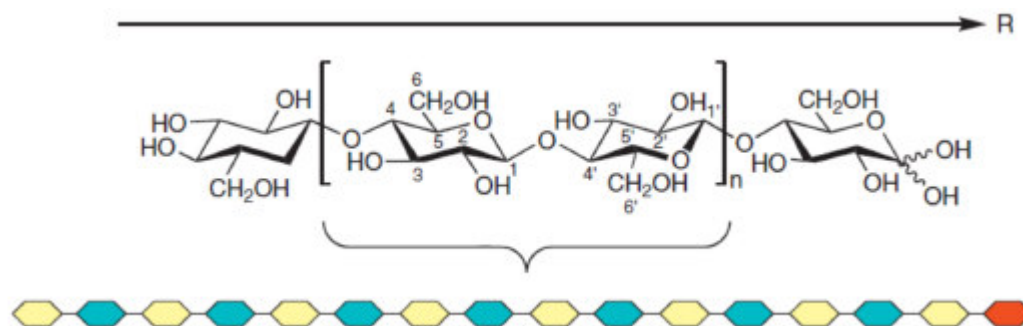


Figure N°1 : Représentation moléculaire de la chaîne de cellulose (Perez et Samain., 2010).

Le **n** indique le nombre d'unités cellobiose (β -1,4) répétées.

Le **R** indique l'extrémité réductrice de la chaîne.

I.1.2 Hémicellulose

L'hémicellulose est la seconde source de polysaccharide de la biosphère et représente entre 15 et 35% de la matière sèche des parois cellulaires végétales (Wertz., 2011). Elle se retrouve principalement dans la paroi primaire et la paroi secondaire du végétal où elle

joue un rôle de renforcement au sein de la paroi, l'hémicellulose forme un réseau robuste en s'associant étroitement à la surface des micro fibrilles de cellulose via des liaisons hydrogène et en se liant à la lignine via des liaisons covalentes de type ester. D'un point de vue biochimique, l'hémicellulose représente un mélange de pentoses, d'hexoses et d'acides uroniques (Kumar et *al.*, 2008).

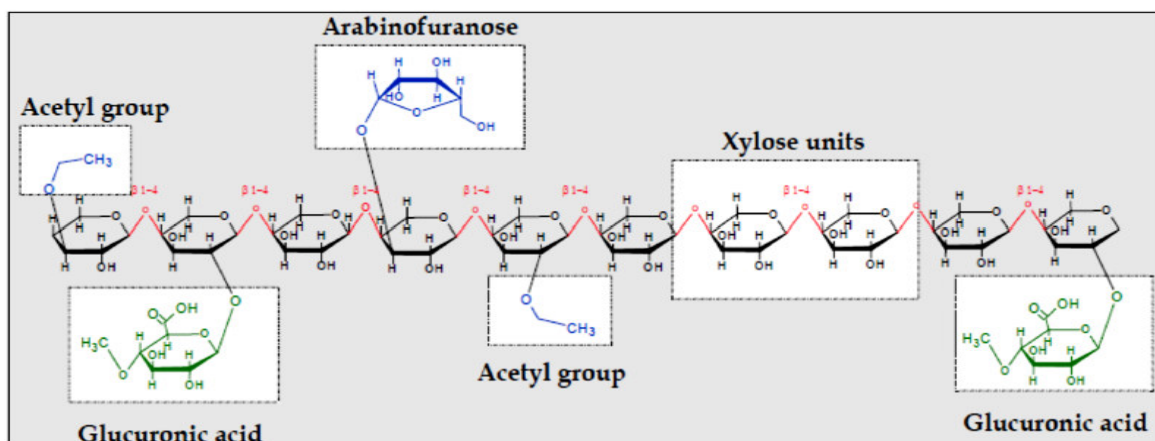


Figure N° 2: Schéma structural de l'hémicellulose (Mussatto et *al.*, 2012).

I.1.3 La lignine

La lignine est une macromolécule extrêmement hétérogène composée de polymères aromatiques. Elle représente après la cellulose, le polymère naturel le plus abondant sur terre et représente 30% de la matière sèche de la paroi végétale (Leonowicz et *al.*, 1999). La lignine est caractérisée par son nombre élevé de noyaux aromatiques et la présence d'éther, impliqué dans les liaisons de polymérisation, qui lui confèrent une grande résistance à la biodégradation notamment vis à vis de l'hydrolyse alcaline (Moularat et *al.*, 2013).

I.2 Matière première

I.2.1 Son de blé

Le son de blé est l'un des sous-produits de la mouture sèche du blé tendre. Il se compose de couches extérieures du grain du blé avec une partie de l'albumen, Il représente 10 à 17% du blé moulu (Hassan et *al.*, 2008). Les enveloppes sont constituées de cellulose, hémicellulose et de lignine formées par un ensemble de monosaccharides dont la teneur est variable. La composition des sucres complexe est illustré dans le tableau I (Hui et Qing., 2015) (**Annexe I**).

I.2.2 Paille de blé

Le terme paille est utilisé pour désigner les tiges et feuilles sèches débarrassées de grains.

La paille est constituée de trois parties majeures : la tige, les nœuds et les feuilles (Harper *et al.*, 1981).

Dans le cas du blé, il y a 5 à 6 nœuds sur la plante à maturité. Les entre-nœuds, qui représentent environ 50 % de la masse de la paille, lui donnent sa résistance mécanique alors que les nœuds et les feuilles ont une moins bonne tenue mécanique, car ils contiennent plus de minéraux et moins de cellulose (Marechal., 2001).

La composition des sucres complexes de la paille de blé est illustrée dans le tableau II (Hui et Quin., 2015) (**Annexe 1**).

II. Champignons filamenteux

Les champignons filamenteux eucaryotes représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre (Mueller et Schmit., 2007), ils jouent un rôle clé dans la dégradation de la matière végétal (cellulose, hémicellulose, lignine) (Mendels et weber. 1969). Ils représentent un groupe de microorganismes aérobie, hétérotrophes, saprophytes ou parasites, ils préfèrent un environnement acide, mésophile et se développent entre 5 à 37 °C (Madan et Thind., 1998). Les champignons filamenteux sont composés d'un appareil végétatif appelé thalle, il est composé de filaments ou hyphes enchevêtrés les uns par rapport aux autres, et l'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium (Gonçalves *et al.*, 2005).

Les champignons filamenteux possèdent une paroi constituée essentiellement de polysaccharides (chitine), de glycoprotéines et de monoprotéines (Nwe *et al.*, 2008).

Le développement des moisissures comprend deux phases : une phase végétative et une phase reproductive. Pendant la phase végétative, qui correspond à la phase de croissance, l'appareil végétatif colonise le substrat par extension et ramification des hyphes (Davidson *et al.*, 1996). La phase reproductive comprend deux types de reproduction : la reproduction asexuée, et la reproduction sexuée (Adams *et al.*, 1998).

II.1 Genre *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* appartient au grand groupe des champignons imparfaits sans reproduction sexuée connue (Taylor *et al.*, 1999). Le terme « *Trichoderma* » a été introduit

dans la mycologie en 1794 par Persoon (Roussos., 1985 ; Bissett., 1991). Elle se développe à une température optimale qui varie entre 25 et 30C° (Montoya et *al.*, 2016). Les espèces de ce genre produisent des quantités importantes de cellulases (Makut et Godiya., 2010), et d'hémicellulases (Peterson et Nevalainen., 2012).

II.1.1 Taxonomie

La position taxonomique actuelle des *Trichoderma* sp se présente comme suit selon Bissett, 2004 cité par (Ghorri., 2015) :

- Embranchement : *Amastigomycota* et/ou *Eumycetes*
- Sous embranchement : *Ascomycotina*
- Classe : *Sordariomycetes*
- Ordre : *Hypocreales*
- Famille : *Hypocraceae*
- Genre : *Trichoderma*

II.1.2 Production des métabolites intéressantes

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma* sp est rapportée pour la première fois par Weidling., (1934), où la production d'un antifongique a été décrite (Papavizas., 1985). Les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient fortement impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizscaino et *al.*, 2005).

La littérature cite que les métabolites importants de *Trichoderma* sp sont principalement des enzymes et des molécules bioactives (Ghorri., 2015).

II.1.2.1 Cellulases fongiques

La dégradation de la cellulose par les moisissures cellulolytiques, telles que *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Trichoderma* sp, est assurée par des cellulases extracellulaire de trois types qui sont nécessaires à l'hydrolyse totale de la cellulose (Moularat et *al.*, 2013).

La plupart des cellulases sont disponibles dans le commerce (Lambertz et *al.*, 2014). Le genre *Trichoderma* sp est connu pour ces cellulases à haute activité enzymatique par rapport à d'autre genre (Pirzadah et *al.*, 2014).

II.1.2.2 Hémicellulases

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

II.1.2.3 Ligninases fongiques

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

III. Les enzymes lignocellulolytiques

Il existe principalement trois catégories d'enzymes nécessaires à la dégradation des parois cellulaires végétales :

Les cellulases, les hémicellulases et les enzymes accessoires ; les éventuelles enzymes dégradant ou modifiant la lignine (Himmel et *al.*, 2007).

III.1 Les cellulases

Les enzymes cellulases comprennent un ensemble de glycoside hydrolases dont l'action implique l'hydrolyse des liaisons β -1,4-glycosidiques de la cellulose, qui est le principal polymère présent dans la biomasse lignocellulosique. Ces enzymes montrent une action synergique lors de la dégradation du polymère à chaîne de cellulose (Mansfield et *al.*, 1999 ; Cui et *al.*, 2011). Le mécanisme d'action le plus largement accepté des cellulases implique trois classes d'enzymes : les endoglucanases, les exoglucanases et les β -glucosidases (Chundawat et *al.*, 2011 ; Pachauri et *al.*, 2016).

III.2 Les xylanases

Les xylanases sont des hydrolases définies comme étant le groupe d'enzymes responsable de l'hydrolyse des liaisons 1,4-D-xylosidique dans les régions non substituées des chaînes de xylane (Bakri., 2003). La biodégradation du xylane est un processus qui exige l'intervention de plusieurs enzymes (Padilha et *al.*, 2014), assurant des activités plus

ou moins spécifique pour attaquer le squelette du substrat hémicellulosique. L'hydrolyse complète des xylanes requiert l'action combinée d'endo- et d'exoenzymes qui, non seulement hydrolysent les liaisons au sein de la chaîne principale, mais également libèrent les constituants des chaînes latérales (Assamoi., 2009).

Non seulement les enzymes qui attaquent les liaisons intérieures de type β 1,4-xylosidique appelées endo- β -1,4-xylanases sont nécessaires, mais également les exoxylanases hydrolysant les petits oligomères libérés par les endoxylanases et en dernier lieu la β -xylosidase responsable de la décomposition finale de xylobiose en unité de xylose (Knob et *al.*, 2010). De plus celle qui est dite débranchante dont le rôle est d'hydrolyser les ramifications présentes sur la chaîne principale (Ryabova et *al.*, 2009).

III.3 Les ligninases

Les éventuelles ligninases sont des métallo-enzymes qui oxydent les phénols composant les chaînes ramifiées des lignines (Prevot., 2013).

III.4 Applications industrielles des xylanases

Les enzymes lignocellulosiques détiennent un énorme potentiel d'application en biotechnologie (Karmakar et Ray., 2011).

- Utilisation de xylanases dans l'alimentation animale, contribuent d'une manière significative à améliorer la digestion chez les animaux en diminuant la viscosité de l'alimentation (Polizeli et *al.*, 2005).
- Dans l'industrie alimentaire, les xylanases sont utilisées dans la fabrication du pain en provoquant sa moellité (Mandal., 2015) et pour accélérer la cuisson des biscuits, gâteaux, et autres aliments en aidant à décomposer les polysaccharides dans la pâte (Harris et Ramalingam., 2010).
- En combinaison avec d'autres enzymes, les xylanases conduisent à un meilleur rendement en jus et augmentation de la récupération des arômes, des huiles essentielles, des vitamines et des sels minéraux (Camacho et Aguilar., 2003).
- Dans l'industrie de papeterie, plusieurs applications ont approché l'utilisation commerciale dans le pré-blanchiment de la pâte pour minimiser l'utilisation de produit chimique (Verma et Satyanarayana., 2013).

IV. La fermentation sur milieu solide (FMS)

IV.1 Généralités et définitions

Les processus de culture microbienne pour la production industrielle d'enzymes peuvent être réalisés en utilisant un milieu liquide (FML) ou un milieu solide (FMS). Dans ce dernier cas, la culture utilise un substrat solide avec suffisamment d'humidité seulement pour le maintien de la croissance et le métabolisme du micro-organisme (en d'autres termes, il n'y a pas d'eau libre), la FMS peut être particulièrement avantageuse pour la culture des champignons filamenteux, conduisant à une productivité enzymatique plus élevée, comparée aux processus FML (Kuhad *et al.*, 2016 ; Farinas *et al.*, 2015 ; Hansen *et al.*, 2015).

Un autre avantage de la FMS par rapport à FML est le coût d'exploitation en raison de l'utilisation des déchets agro-industrielle comme substrat solide à faible coût (Bettache *et al.*, 2014).

IV.2 La conduite de procédé

Le développement d'un bioprocédé de fermentation en milieu solide nécessite le choix minutieux d'une souche, d'un substrat, afin de les maintenir constants durant le temps de fermentation. La conduite d'un procédé de fermentation en milieu solide est plus difficile que pour une fermentation en milieu liquide, principalement à cause de l'hétérogénéité de la culture et à l'absence d'eau libre (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

IV.2.1 Le support/substrat

Le support est l'un des paramètres les plus importants en fermentation en milieu solide. Il doit être choisi avec attention en fonction de plusieurs facteurs comme la taille des particules, la porosité, la composition biochimique, puisque celle-ci aura une incidence sur les microorganismes et sur le profil enzymatique, sa capacité de rétention d'eau et/ou sa capacité à contenir les éléments nutritifs (essentiellement source de carbone), sa disponibilité et son coût (Krishna *et al.*, 2005).

IV.2.2 Température (°C)

A l'échelle industrielle, les contrôles de la température de culture et de l'humidité du milieu sont très importants (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). La température élevée influence sur la germination fongique, le métabolisme et la sporulation (Raghavarao *et al.*, 2003). Au cours de la FMS, une grande quantité de chaleur est générée, ce qui est proportionnel aux activités métaboliques du micro-organisme. Cependant, le champignon peut se développer sur une large gamme de températures allant de 20 °C à 55 °C. Néanmoins, la température optimale pour la croissance fongique pourrait être différente de celle requise pour la formation du produit (Yadav., 1988).

IV.2.3 La teneur en eau(A_w)

L'eau est impliquée dans la croissance cellulaire, les activités enzymatiques, les transports des éléments nutritifs et des métabolites extracellulaires au cours de FMS (Bellon-Maurel *et al.*, 2003 ; Gervais, Molin., 2003). La teneur en eau est habituellement déterminée par les mesures de la matière sèche, laquelle, ne différencie pas l'eau disponible pour les activités microbiennes (c'est-à-dire l'activité d'eau A_w) de l'eau liée au substrat indisponible aux microorganismes (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

IV.2.4 La biomasse fongique

L'estimation de la biomasse pour le suivi des cinétiques de croissance est délicate car les microorganismes sont inséparables du support. Cependant, il existe des méthodes d'estimation indirectes qui se font soit par le dosage de composés spécifiques de la biomasse (protéines, acides nucléiques, glucosamine, ergostérol), soit par le suivi de l'activité métabolique de la biomasse (Assamoi *et al.*, 2009).

V. Plans d'expérience

V.1 Définition d'un plan d'expérience

Les plans d'expériences sont des techniques qui permettent de quantifier les effets de divers facteurs (X_1 , X_2 , X_3 ..) sur une réponse et de les optimiser dans des domaines expérimentaux bien déterminés. Organiser une suite d'essais consistant à manipuler les facteurs afin de décrire la méthode permettant d'obtenir la réponse optimale (Hancoo *et al.*, 2011).

V.2 Terminologie

La grandeur d'intérêt, qui est généralement notée Y , porte le nom de réponse. Les Variables qui peuvent modifier la réponse sont appelées facteurs. On parle des facteurs notés X , qui influent sur une réponse. Les termes facteur et réponse sont universellement employés dans le domaine des plans d'expériences.

V.3 Plans de surface de réponse (RSM)

La méthodologie de surface de réponse fait partie des plans d'expériences utilisés pour l'optimisation. C'est une modélisation empirique technique consacrée à l'évaluation de la relation d'un ensemble de facteurs expérimentaux contrôlés et observés avec les résultats (Annadurai et *al.*, 1998).

V.4 Box- Behnken Design (BBD)

Box et Behnken (1960) ont introduit un type différent de plans d'expériences pour les modèles du deuxième ordre qui permettent l'estimation de certaines interactions.

Le plan de Box-Behnken est facile à réaliser car tous les facteurs ne prennent que trois niveaux $[-1, 0 \text{ et } +1]$, en variables codées.

Les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (**Figure N° 3**).

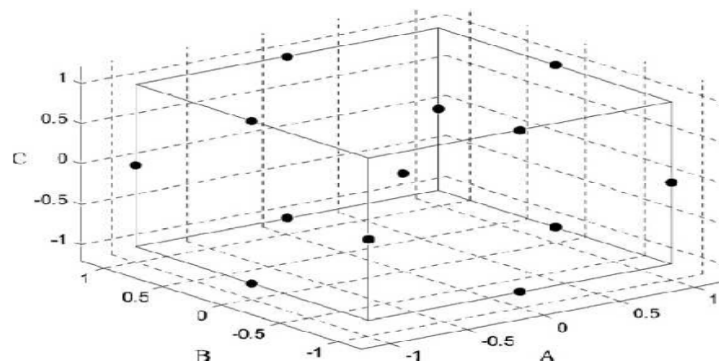


Figure N°3 : Plan de Box- Behnken pour trois facteurs.

Le modèle de Box-Behnken (BBD) présente l'avantage à réduire le temps durant les expériences réalisées (nombre d'essais réduits) et ressources à investir pour l'expérimentation (Manohar et *al.*, 2013).

V.5 Model mathématique postulé

En l'absence de toute information sur la fonction qui lie la réponse aux facteurs, on se donne a priori une loi d'évolution dont la formulation la plus générale est la suivante :

$$Y=f(X_1, X_2, X_3.... X_n)$$

Cette fonction est trop générale et il est d'usage d'en prendre un développement limité de Taylor-Mac Laurin, c'est-à-dire une approximation. Si les dérivées peuvent être considérées comme des constantes, le développement précédent prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$y = a + \sum a_{ix}x_i + \sum a_{ijx}x_ix_j + \sum a_{iix}x_i^2 + \dots \varepsilon$$

Où :

- Y est la grandeur à laquelle s'intéresse l'expérimentateur ; c'est la réponse ou la grandeur d'intérêt (Dinarvend et *al.*, 2016)
- x_i représente un niveau du facteur i,
- x_j représente un niveau du facteur j,
- a, a_i , a_{ij} , a_{ii} sont les coefficients du polynôme.
- ε représente l'erreur (Fadil et *al.*, 2015), selon Goupy (1990) l'erreur est négligeable.

Ce modèle est appelé le modèle a priori ou le modèle postulé (Goupy. 2006).

Matériel et méthodes

I. Matériel microbiologique

L'isolat utilisé durant la FMS est procuré depuis le laboratoire de microbiologie appliquée « LMA ». Suite à un échantillonnage fait par la doctorante AZZOUZ Zahra dans le sol de la région d'Akbou, puis isolé sur un milieu sélectif à un pH acide contenant la CMC (Carboxymethyl cellulose) (Sigma, Aldrich, USA) comme seule source de carbone et d'énergie.

L'isolat a été repiqué sur plusieurs boîtes de gélose PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar (**annexe II**)) à raison de 15ml par boîte Pétri. Après 7-10 jours d'incubation à 28°C, les boîtes serviront comme source de spores pour l'inoculation du substrat solide.

II. Observation macro et microscopique de la souche Ak S3

L'identification des moisissures est basée sur l'observation macroscopique et une étude microscopique (Botton *et al.*, 1990).

II.1 Observation macroscopique

Ce type d'étude est primordial pour l'identification des moisissures. Dans ce cas, la souche isolée est nommée Ak S3 et est incubée à 28°C pendant 7 à 10 jours sur milieu PDA. L'étude macroscopique repose sur l'observation à l'œil nu de la couleur du mycélium, l'aspect et la couleur des spores.

II.2 Observation microscopique

L'identification microscopique repose sur des critères morphologiques (aspect du mycélium, structure des conidiophores).

L'examen microscopique de la souche Ak S3 est réalisé par la méthode de scotch observée sous microscope optique (CARLE ZIESS) au G×40.

III. Mise en œuvre de la FMS par la technique «One Factor At Time »

III.1 Préparation du substrat solide de fermentation

La paille et le son de blé ont été utilisés dans ces études dans la fermentation solide. Les échantillons sont récoltés au niveau des minoteries et agriculteurs de la région d'Akbou.

Tous les substrats sont lavés à l'eau distillée, séchés au four pasteur à 70°C pendant 48 heures puis stockés à température ambiante dans des récipients étanches à l'air (Menez et

al., 2017). Les pailles séchées sont ensuite broyées en petites particules à l'aide d'un mixer (DAEWOO). Un tamisage est réalisé pour la paille de blé à fin d'obtenir une poudre de paille.

La veille du lancement de la fermentation, le taux d'humidité des substrats sont déterminées.

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

P_0 : Poids frais

P_{sec} : Poids sec

Le poids sec est déterminé après séchage des substrats au four Pasteur à 105°C pendant 24 heures.

III.2 Préparation de suspension sporales

Les souches préalablement cultivées sur le milieu PDA à 28°C pendant 7 à 10 jours servent pour l'obtention de la suspension sporales. Après sporulation, les spores sont grattées délicatement afin d'éviter le détachement du mycélium à l'aide d'un grattoir stérile par l'ajout de 25 ml d'eau distillée stérile contenant 1% (v/v) de tween 80. Les spores sont recueillies dans des bouteilles stérilisées pour être utilisé comme inoculum pour la production d'enzyme (Sandhu et *al.*, 2013 ; Ang et *al.*, 2015).

La charge de l'inoculum est exprimée en quantité de spores par rapport à 1ml de suspension sporales. Le comptage est réalisé sous microscope optique à l'aide d'une cellule de Malassez (MARIENFELD).

III.3 Fermentation solide sur le son et la paille de blé

Une étape de criblage a été suivie, dans le but de sélectionner le substrat adéquat pour la fermentation en milieu solide (paille ou son de blé) qui donne une meilleure production de xylanases, la fermentation est réalisée pendant sept jours. Le substrat le plus performant sera incorporé dans la culture pour l'étape d'optimisation par la technique OFAT.

Après la culture, l'extract enzymatique brut des cultures a été préparé selon les procédures décrites par Menezes et *al.*, (2017).

a) Les milieux de culture de type solide sont répartis à raison de 10 g de substrat sec par Erlenmeyer de 500 ml, dont le taux d'humidité initial est déterminée.

b) L'humidité finale est ajustée avec le milieu Mendels et Weber (MW) (**annexe II**) à pH=5 à un taux de 70% pour les deux substrats utilisé en FMS.

Exemple

H_{initial} 10%

M_{total} 100%

$M_{\text{sèche}} (10\text{g})$ $100\% - 60\%$ } $M_{\text{sèche}} = 40\%$

10g 40%

$M(\text{MW})$ 60% $M(\text{MW}) = (60.10)/40 = 15\text{g}$

Ce qui correspond à un volume de 15 ml du milieu (MW) pour ajuster à 70% d'humidité final.

c) Les Erlenmeyer sont obturées avec du coton cardé puis stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

d) Après refroidissement, les Erlenmeyer sont inoculées avec une suspension sporales à raison de 1.10^7 spores/g de substrat (poids sec), L'ensemble est bien homogénéisé à l'aide d'une spatule stérile (Liao et *al.*, 2015).

e) Les Erlenmeyer sont incubées à 28°C dans une étuve pendant 7 jours.

f) Après incubation, les échantillons sont traité.

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

1. les échantillons sont parfaitement homogénéisés manuellement à l'aide d'une spatule, les 10g du substrat sont misent en suspension dans 100 ml d'eau distillée. Afin de récupérer le maximum d'enzymes extracellulaires, l'homogénéisation est réalisée dans un mixer pendant 2min par intermittence pour éviter l'augmentation de la température.

2. Le mélange est centrifugé à 10000g pendant 10 min à 4°C. La filtration n'est pas nécessaire car le surnageant obtenu est clair (Gassara et *al.*, 2010).

Le surnageant clair récupéré représente l'extrait enzymatique brut, et qui est conservé à 4°C (Bansal et *al.*, 2012).

IV. Mesure de l'activité enzymatique

L'évaluation de l'activité des enzymes xylanolytiques est réalisée en mettant en contact la solution enzymatique avec un substrat spécifique pendant un temps défini, et dans des conditions de température, de pH appropriés.

Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 μmol de sucre réducteur équivalent au xylose par minute dans les conditions du test. (Miller., 1959) cité par (Da Silva Menez et *al.*, 2018).

Le sucre réducteur libéré a été mesuré par la méthode de 3,5-acide dinitrosalicylique (DNS) dans laquelle la réaction a été arrêtée par l'ajout 1,5 ml de réactif acide DNS. Une couleur brun rougeâtre développée après avoir placé les tubes de réaction dans un bain d'eau bouillante pendant 5min (Miller., 1959).

➤ Activité xylanases

Les dosages de xylanases ont été effectués en utilisant 2% (p / v) de xylane [dans tampon citrate de sodium (50 mM, pH 4.8)]. Le mélange réactionnel est composé de 900 µl de substrat et 100 µl d'enzyme brute. Le mélange a été incubé pendant 10 min à 50 °C (Long et *al.*, 2017). Le dosage de l'activité est réalisé en duplicata.

Cette concentration est déterminée par référence à une courbe étalonnage (**Annexe V**). L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm (**SHIMADZU**).

Tableau I : Différentes étapes du dosage de xylanases selon Bailey (1992)

	Gamme	Témoin enzyme	Enzyme
Substrat µl	900	900	900
Equilibrer à 50°C pendant 10 min			
Enzyme (µl)	/	/	100
Incuber pendant 10 min à 50 °C			
Arrêter la réaction en ajoutant 1.5 ml de DNS			
Tampon (µl)	/	/	/
Xylose (µl)	100	/	/
Enzyme (µl)	/	100	/
Chauffer 5 min à 100 °C			
Refroidir dans un bain d'eau glacée			
Mesurer l'absorbance à 540 nm contre l'eau déminéralisée (en duplicate)			

$$\text{Activité xylanases} = \frac{(\text{mg de xylose libéré} / 0,15013 \text{ mg/}\mu\text{mol})}{(0,1 \text{ ml} * 10 \text{ min})}$$

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

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

V. Paramètres cinétique

V.1 Temps d'incubation

La période de fermentation est un paramètre important dans la croissance et la production des enzymes. Dans cette étude, la fermentation est effectuée jusqu'à 10 jours d'incubation. La production et la croissance sont mesurées à 24 h d'intervalles.

Le paramètre étudié étant varié, tandis que l'humidité, la température et l'inoculum sont fixés respectivement 70%, 28°C, 10^7 spores /g de substrat sec.

V.2 Humidité

L'influence de l'humidité sur la production des enzymes est étudiée à pH 4.8. Les mesures sont réalisées pour une gamme de 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% afin de déterminer l'humidité optimale pour la production d'enzyme. Les Erlenmeyer sont incubés à un temps d'optimum fixé précédemment.

V.3 Température

Afin de déterminer la meilleure température pour la production d'enzyme, des fermentations sont réalisées à 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42°C. Les Erlenmeyer sont incubés à un temps et à une humidité définis précédemment.

V.4 Charge de l'inoculum

Dans le but de visualiser la taille d'inoculum optimale pour la production des enzymes, des fermentations sont réalisées à 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 spores /g de substrat sec.

VI. Analyse statistique

Les résultats obtenus précédemment (OFAT) sont exprimés par une moyenne plus ou moins un écart type. L'analyse de ces résultats est réalisée par le logiciel Excel STAT, basé sur l'analyse de la variance ANOVA. Pour toutes les analyses la différence est considérée comme étant significative lorsque p value < 0,05 pour un intervalle de confiance de 95%.

VII. Optimisation de la production de xylanases par RSM

Une fois que les paramètres optimaux déterminés par OFAT, l'optimisation de la production de xylanases en utilisant RSM est réalisée par un plan factoriel complet à quatre facteurs X_1 : temps, X_2 : Humidité, X_3 : température, X_4 : charge d'inoculum et à trois niveaux (-1, 0, +1), qui est appliqué pour étudier l'influence de l'interaction de ces paramètres sur la production. Les niveaux bas, moyen et haut de chaque variable sont représentés dans le tableau suivant

Tableau II : Différents niveaux des paramètres choisis pour l'optimisation.

Paramètres	Niveau bas -1	Niveau centré 0	Niveau haut +1
X_1 (temps : Jours)	3	5	7
X_2 (Humidité :%)	55	70	85
X_3 (Température :°C)	22	26	30
X_4 (Inoculum : Spr/g)	10^6	10^7	$1,9 \cdot 10^7$

La matrice d'expérience du plan Box-Behnken avec un ensemble de 27 essais est représentée dans le tableau III.

Tableau III : Tableau de la matrice des expériences

N° d'essais	Temps (jrs)	Humidité(%)	T°C	Inoculum (spr /g)
1	5	55	22	1E+07
2	5	70	22	1E+06
3	3	70	26	1,9E+07
4	5	70	26	1E+07
5	7	70	30	1E+07
6	3	70	22	1E+07
7	5	85	26	1E+06
8	3	55	26	1E+07
9	5	70	30	1E+06
10	7	70	26	1E+06
11	7	85	26	1E+07
12	3	70	30	1E+07
13	7	70	22	1E+07
14	3	85	26	1E+07
15	5	85	26	1,9E+07
16	5	70	26	1E+07
17	5	70	22	1,9E+07
18	5	55	26	1,9E+07
19	7	55	26	1E+07
20	5	55	26	1E+06
21	5	55	30	1E+07
22	5	85	22	1E+07
23	7	70	26	1,9E+07
24	5	70	26	1E+07
25	5	85	30	1E+07
26	3	70	26	1E+06
27	5	70	30	1,9E+07

Les résultats expérimentaux obtenus par le BBD sont analysé par le logiciel (Design-Expert® 1.1 Trial version). Pour toute les analyses, la différence est considérée comme étant significative lorsque p value < 0,05 pour un intervalle de confiance de 95%.

Résultats et discussions

I. Etude morphologique de la souche Ak S3

I.1 Etude macroscopique

La figure 4 présente, la souche Ak S3 incubée à 28 °C pendant 7 jours sur le milieu PDA observée à l'œil nu (Macroscopique), elle a un aspect blanchâtre (Figure 4-a) qui vire vers le vert après sporulation au fil de temps à une croissance rapide (Figure 4-b).

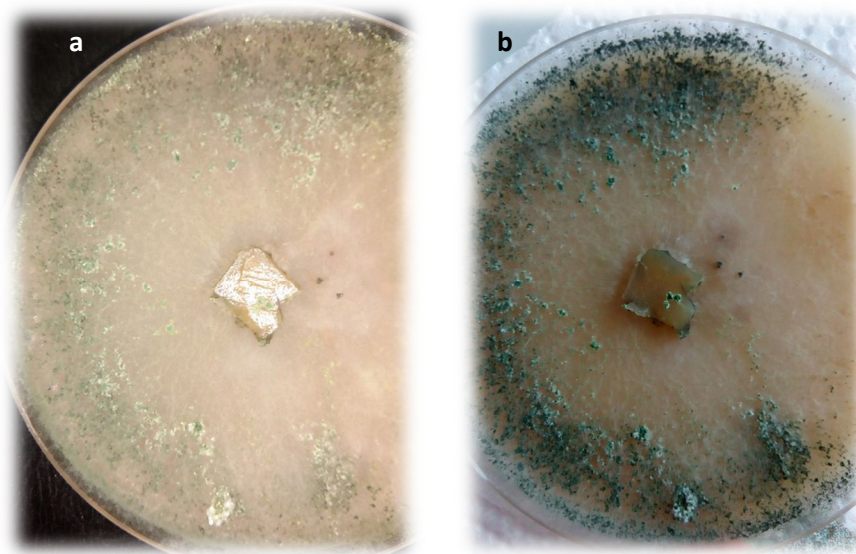


Figure N° 4 : Observation macroscopique de la souche Ak S3

(a) : Après 4 jours d'incubation. **(b) :** Après 7 jours d'incubation

I.2 Etude microscopique

D'après la figure 5, la souche Ak S3 présente les caractères suivants :

1. Des hyphes cloisonnés.
2. Des conidiophores très ramifiés, irrégulièrement verticillés avec des ramifications.
3. Des phialides ovoïdes atténués au sommet directement insérés sur le conidiophores.
4. Des conidies sont réunies au sommet des Phialides de couleur verte.

Ces critères rejoignent ceux du genre *Trichoderma* d'après une étude similaire de Leghlimi (Leghlimi., 2013) qui se réfère à (Chabasse et *al.*, 2002).

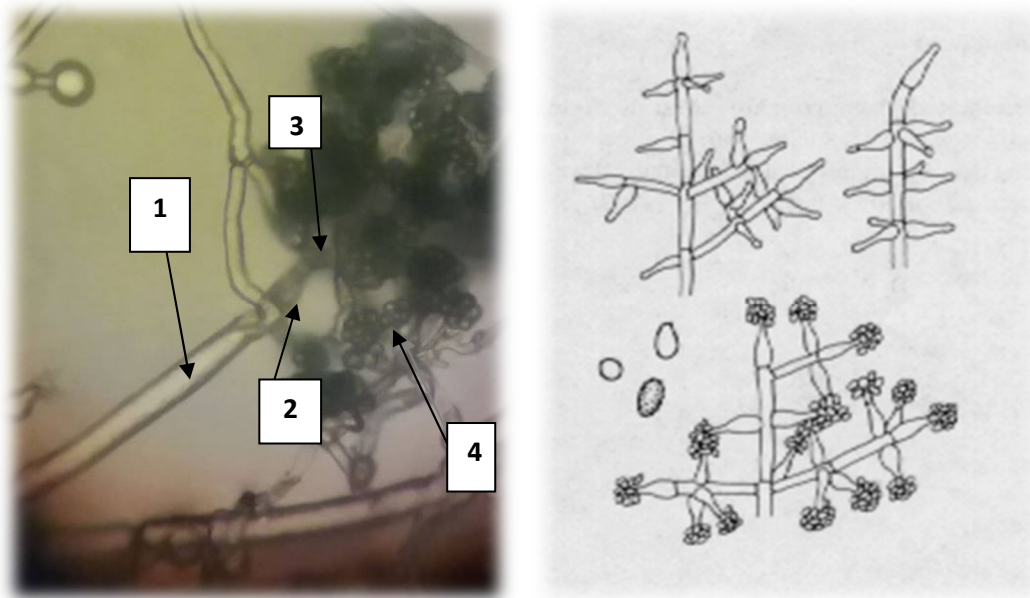


Figure N° 5 : Observation microscopique
de la souche Ak S3 au microscope optique Gx40

(Malloche., 1997)

II. Effet de la source de carbone sur la production de xylanases

La source de carbone est une partie essentielle des milieux de culture, fournit de l'énergie et maintient l'activité et le métabolisme des cellules (Ahn et *al.*, 2011).

Dans notre cas, les deux sources de carbone étudié sont respectivement la paille et le son de blé.

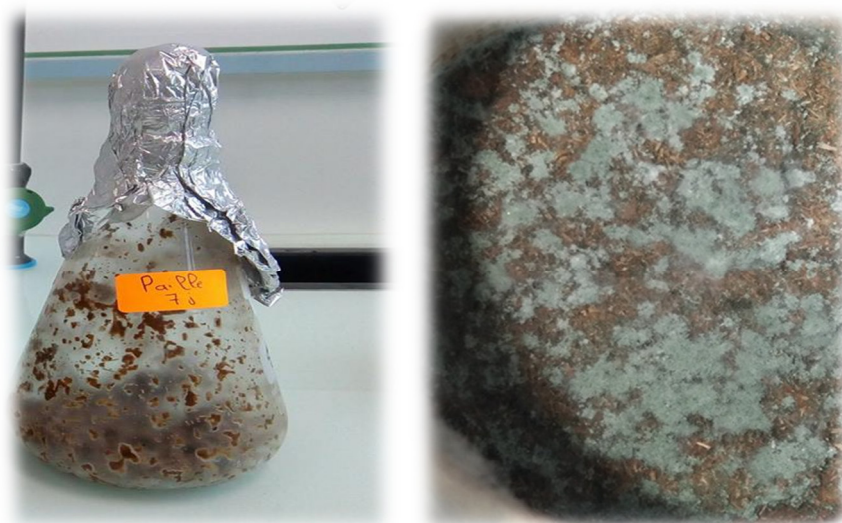


Figure N° 6 : Culture fongique sur la paille de blé après sept jours
d'incubation

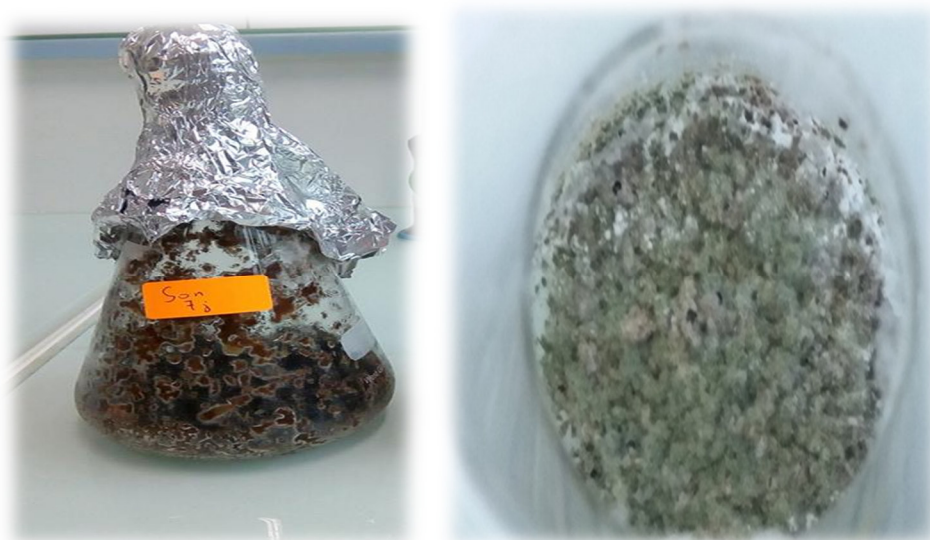


Figure N° 7 : Culture fongique sur le son de blé après sept jours d'incubation

Les résultats de l'activité xylanolytiques obtenus par fermentation solide sur la paille et le son de blé sont illustrés dans la figure 8.

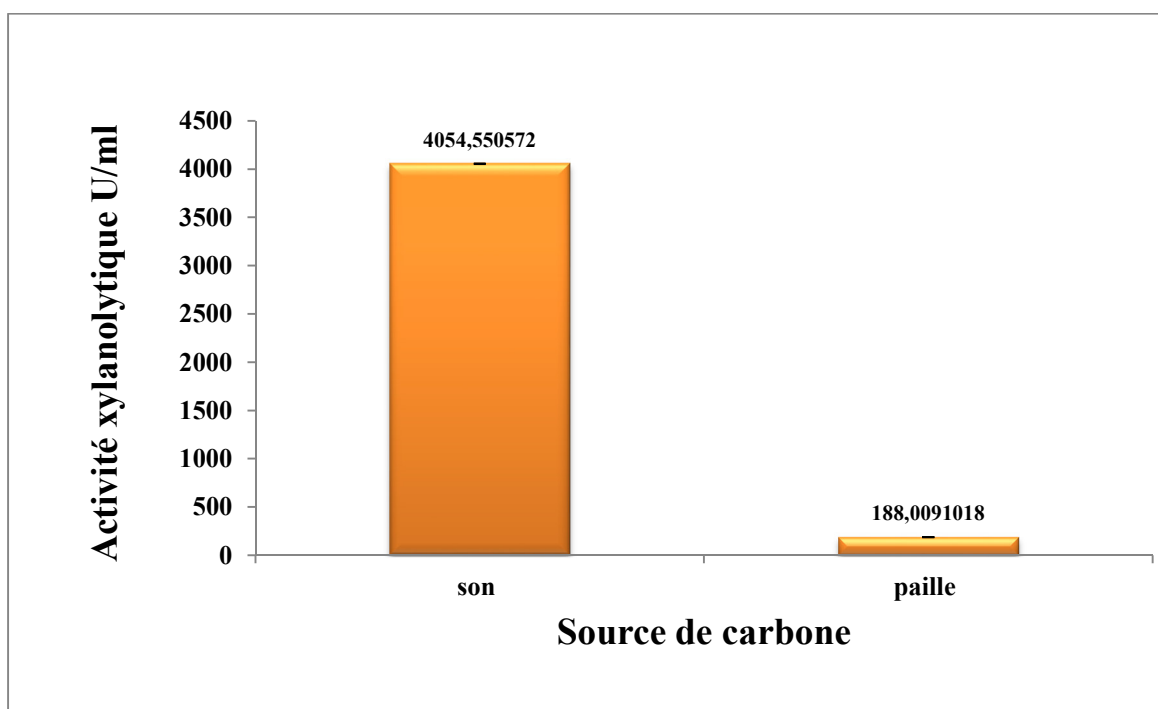


Figure N° 8 : Effet de différentes sources de carbone sur la production de xylanases

Les résultats obtenus déterminent que la souche Ak S3 est hautement capable de produire de grandes quantités de xylanases sur le son de blé 4054.55 ± 2.37 U/ml en comparant avec la paille de blé 188.00 ± 1.32 U/ml.

Plusieurs rapports sont en accord avec ces résultats, que le son de blé est le meilleur substrat producteur de xylanases (Mender et al., 2013 ; El-Shishtawy et al., 2014 ; El-Shishtawy et al., 2015 ; Kumar et al., 2017; Bharti et al., 2018).

La composition chimique du son de blé est relativement élevée par rapport à la paille de blé, notamment la composition élevée de l'hémicellulose est idéal pour une croissance de culture et la production de xylanases (Brijwani et al., 2009).

III. Effet des paramètres cinétiques sur la production de xylanases par la technique OFAT

L'activité xylanases a été déterminée en utilisant les procédures IUPAC (International Union Pure And Applied Chemistry) (Ghose., 1987) cité par Chakraborty et ces collaborateurs en 2016.

Les conditions optimales qui contribuent à la production de xylanases comprennent la période d'incubation, l'humidité, la température, et la charge d'inoculum.

La production de xylanases est effectuée sur le son de blé qui est choisi comme substrat solide ; le processus de fermentation sur le milieu solide a été réalisé par la technique OFAT pour l'optimisation de la production enzymatique. Des données sont reçues continuellement de chaque étape d'optimisation, le paramètre optimal de la première expérience a été fixé puis on passe à une seconde expérience, subséquemment pour la suite des autres paramètres (Bettache., 2013).

III.1 Effet de temps d'incubation

Le son de blé a été utilisé comme source de carbone pour induire la production d'enzyme xylanases par la souche Ak S3 en utilisant un procédé FMS.

Le temps d'incubation dépend des caractéristiques de la culture, du temps de croissance et de la production d'enzymes (Gautam et al., 2015).

Les résultats illustré dans figure 9 décrit que la période d'incubation optimale pour la production de xylanases par la souche Ak S3 a atteint un maximum de $4647,58 \pm 14,06$ U/ml à 5 jours d'incubation, et la production de xylanases diminue progressivement avec la

prolongation du temps d'incubation jusqu'au dixième jour d'incubation touchant un taux de $804,67 \pm 2,68$ U/ml.

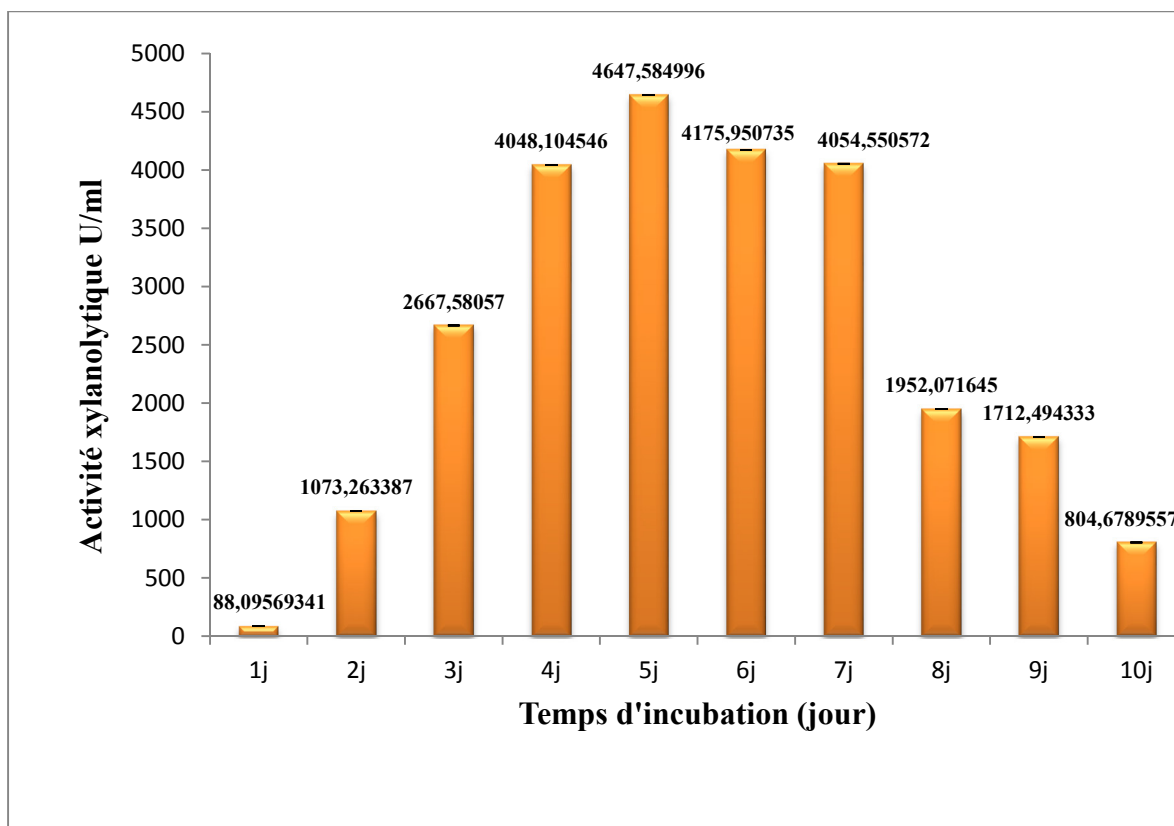


Figure N° 9 : Effet du temps d'incubation sur la production de xylanases

L'analyse statistique confirme l'existence d'une différence hautement significative entre les différents temps d'incubation à un p value <0.0001 .

En outre, une augmentation de la période d'incubation au-delà du niveau optimal entraîne une baisse de la production de xylanases, qui peut être due à l'épuisement du milieu de fermentation en nutriment ou la production de métabolites toxiques pendant la fermentation par les champignons (Kumar et *al.*, 2017). Et aussi due à la protéase non spécifique sécrétée par les champignons qui peuvent dégrader les xylanases synthétisés (Adhyaru et *al.*, 2015).

Quant à Tomas et *al.*, (2016), la production de xylanases atteint le maximum à une période de 4 jours avec un rendement de $2201,30 \pm 114,70$ U/ml produite par *Aspergillus* sp en utilisant le son de blé comme substrat dans des conditions FMS. Ensuite une diminution d'activité xylanases a été remarquée à partir du cinquième jour jusqu'à l'obtention d'une valeur très réduite $804,67 \pm 2,68$ U/ml. Jampala et *al.*, (2017) rapporte

que la production maximale de xylanases est acquise au bout de 6^{ème} jours d'incubation dans des conditions FMS.

(Kumar *et al.*, 2017 ; Bharti *et al.*, 2018 ; Da Silva Menezes *et al.*, 2018 ; et . Jampala *et al.*, 2017) rapportent que 5 jours est la période de fermentation optimale pour la production de xylanases qui est comparable à nos résultats.

III.2 Effet d'humidité

L'hydratation est un facteur important qui influence sur le taux de croissance, l'évolution de la germination, la sporulation et le rendement du produit en FMS (El-Shichtawy *et al.*, 2015).

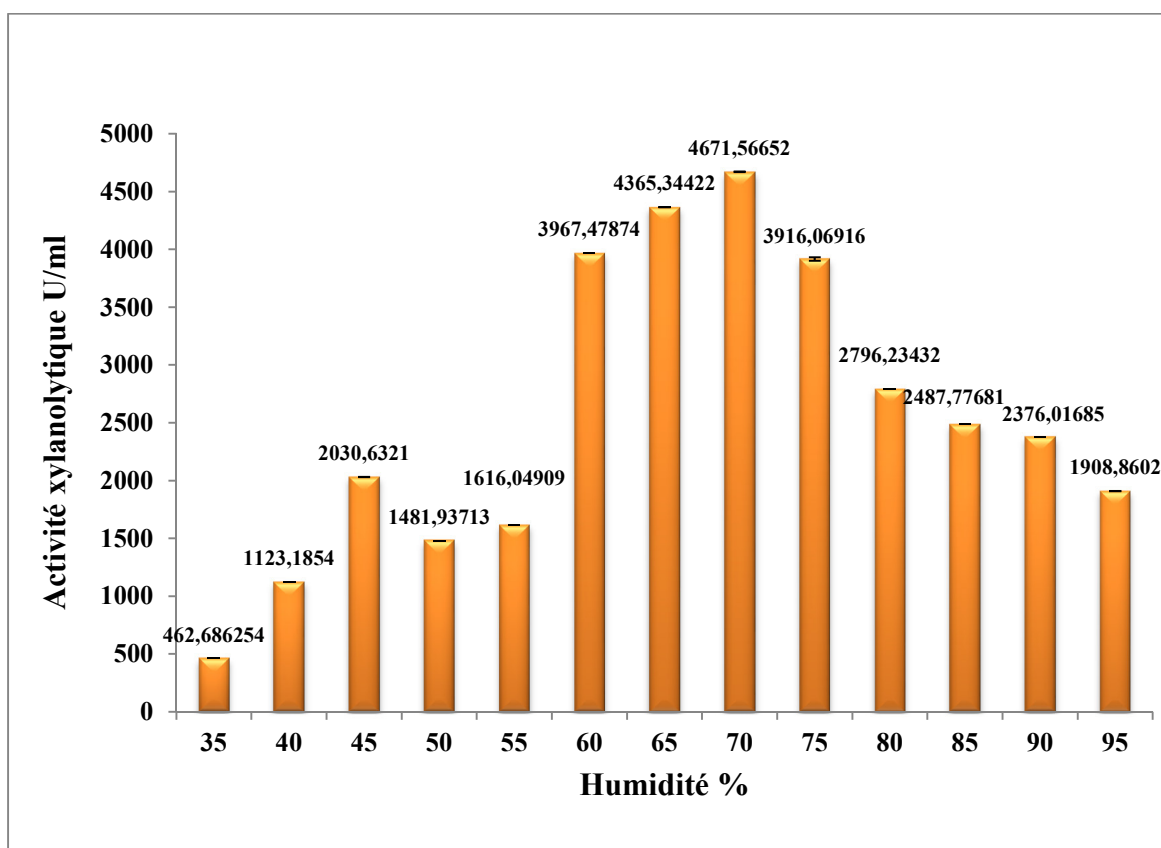


Figure N° 10 : Effet de l'humidité sur la production de xylanases

D'après les résultats de la présente étude, La figure 10 montre que l'activité xylanases est négligeable au début de la FMS jusqu'à atteindre un pic maximal de 4671,56 $\pm$ 0,88 U/ml à une teneur en humidité de 70% qui présente une condition optimale. La production d'enzyme est déclinée linéairement à des teneurs en humidité supérieur à la valeur optimale.

L'analyse statistique confirme l'existence d'une différence significative entre les différentes valeurs d'humidité à un p value égale 0,0038.

Des teneurs en humidité sont variées d'un substrat à un autre pour un microorganisme particulier (Chugh et *al.*, 2016), Une production maximal de xylanases a été détecté à 60% ; 70% d'humidité respectivement par *Trichoderma virens* et *Aspergillus brasiliensis* respectivement, en utilisant le son de blé et le cosse de riz comme substrat respectivement, dans des conditions FMS (El-Shichtawy et *al.*, 2015 ; Da silva Menezes et *al.*, 2018).

Il a été montré que le niveau d'humidité supérieur à la valeur optimal entraine une diminution de la porosité qui réduit encore la disponibilité de l'oxygène requis pour la croissance du microorganisme aérobic (khanahmadi et *al.*, 2018), D'autre part la teneur en humidité inférieure au niveau optimal, réduit le gonflement du substrat qui rend le transfert des nutriments difficile cité par (Bharti et *al.*, 2018) qui se réfère à (Kar et *al.*, 2013 ; Maan et *al.*, 2016).

III.3 Effet de température

La température de fermentation est considérée comme le facteur affectant la production de xylanases, des systèmes enzymatiques correspondants affectant davantage le transport des nutriments et la croissance cellulaire (Guan et *al.*, 2016).

Différentes températures d'incubation allant de 24°C à 42°C ont été testées sur la production de xylanases par la souche Ak S3 comme présente la figure 11.

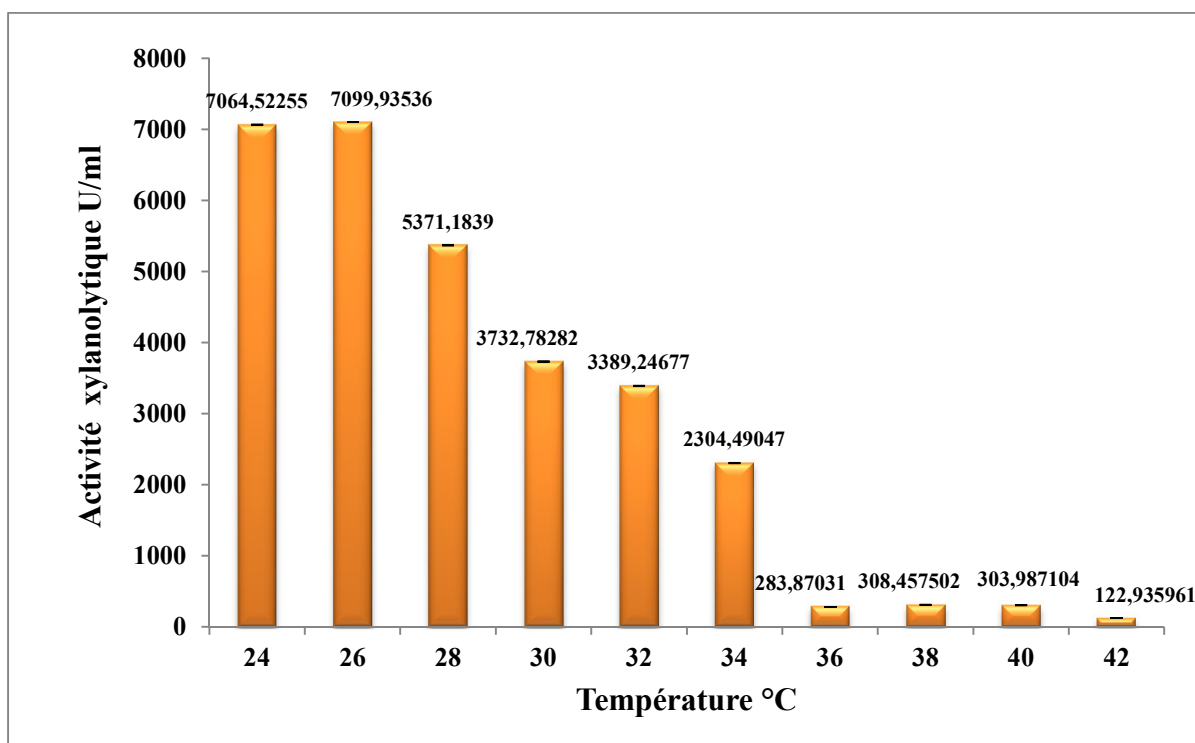


Figure N° 11 : Effet de la température sur la production de xylanases.

La température de 24°C à 26°C a favorisée la production de xylanases avec une activité élevée de 7099.93 ± 1.02 U/ml à 26°C, l'augmentation de la température résulte un effet négatif sur la production de xylanases, qui est à l'ordre de $122,93 \pm 0,64$ U/ml à 42°C.

L'analyse statistique confirme l'existence d'une différence significative entre les différentes valeurs de température p value $<0,0001$.

Plusieurs auteurs ont rapportés des optima de production à 30°C par *Jonesia denitrificans* BN-13 (Boucherba et al., 2011) ; 26°C par *Trichoderma asperillum* (Ajijolakewu et al., 2016) ; 30°C par *Aspergillus niger* (Javed et al., 2017) et à 25°C par *Chryseobacterium* sp (Nkohla et al., 2017).

La différence de température optimale pour la production d'enzymes xylanolytiques pourrait être attribuée aux variations de la souche et à l'adaptation à la dynamique de la température (Harris., 2016).

Lorsque la température est supérieure à l'optimum, l'activité xylanases est progressivement réduite probablement en raison de la dénaturation enzymatique vue que les enzymes sont de nature protéique (Tallapragada et Venkatesh., 2011 ; Harris., 2016 ; Kumar et al., 2017).

III.4 Effet de la charge de l'inoculum

Un niveau d'inoculum optimal est nécessaire pour maintenir l'équilibre entre la biomasse proliférée et les nutriments disponible pour produire le maximum d'enzymes (Maktar et *al.*, 2013 ; Desai et Iyer., 2016) .

L'effet des concentrations initiales de l'inoculum sur la biosynthèse de xylanases est donné dans la figure 12.

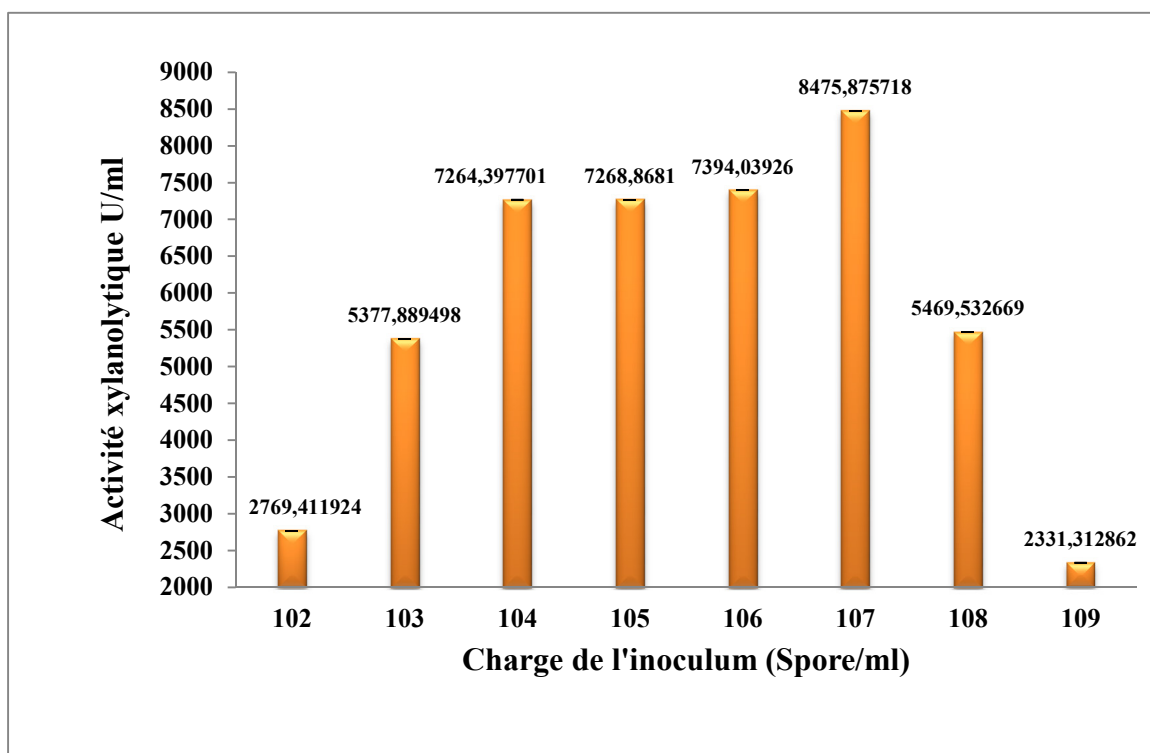


Figure N°12 : Effet de la charge initiale de l'inoculum sur la production de xylanases

Nos résultats montrent que la souche Ak S3 induit une production importante de xylanases à un taux d'inoculum de 10^7 spores /ml pour atteindre un maximum de 8475.87 ± 1.13 U/ml. Cette hausse est suivie d'une diminution jusqu'à atteindre une valeur de 5469.53 ± 0.17 U/ml, 2332.31 ± 0.58 U/ml respectif pour un taux de 10^8 , 10^9 spores/ ml respectivement.

L'analyse statistique confirme l'existence d'une différence significative entre les différentes valeurs de la charge d'inoculum avec un p value $<0,0001$.

En général pour une production maximale de xylanases, il a été suggéré que la concentration des spores varié entre 10^6 et 10^7 spores/ml (Desai et Iyer., 2016).

Les études précédentes réalisées par Pathak et *al.*, (2014), Da Silva Menezes et *al.*, (2018), El- Aty et *al.*, (2018) sur *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus Brasiliensis*, et *Trichoderma Longibrachiatum* KT693225 respectivement, confirment la citation de (Desai et Iyer., 2016).

L'inoculum à faible taille retarde la biosynthèse de xylanases qui peut être due à la présence minimale de cellules conidiales qui sont insuffisantes pour utiliser le milieu de fermentation d'une meilleure manière (Bensal et *al.*, 2012 ; Thomas et *al.*, 2016). La taille de l'inoculum minimale nécessite plus de temps pour que les cellules puissent se multiplier à un nombre suffisant pour utiliser le substrat et produire puissamment l'enzyme (Singh et Kaur., 2012 ; Garais et Kumar., 2013). D'autre part, la diminution du rendement pour une charge au-delà de l'optimum revient au stress oxydative dans le milieu, en raison de la forte concentration initiale fongique, ou un déséquilibre nutritionnel causé par une énorme croissance entraînant l'autolyse cellulaire (Singh et Kaur., 2012 ; Thomas et *al.*, 2016).

IV. Plan d'expérience Box-Behnken

Une fois que les variables ayant l'influence statistiquement significative sur les réponses identifiés préalablement par la technique OFAT, RSM est utilisé pour optimiser les variables filtrées pour améliorer la production de xylanases basée sur Box-Behnken Design (BBD) (Long et *al.*, 2017).

IV.1 Analyse des résultats

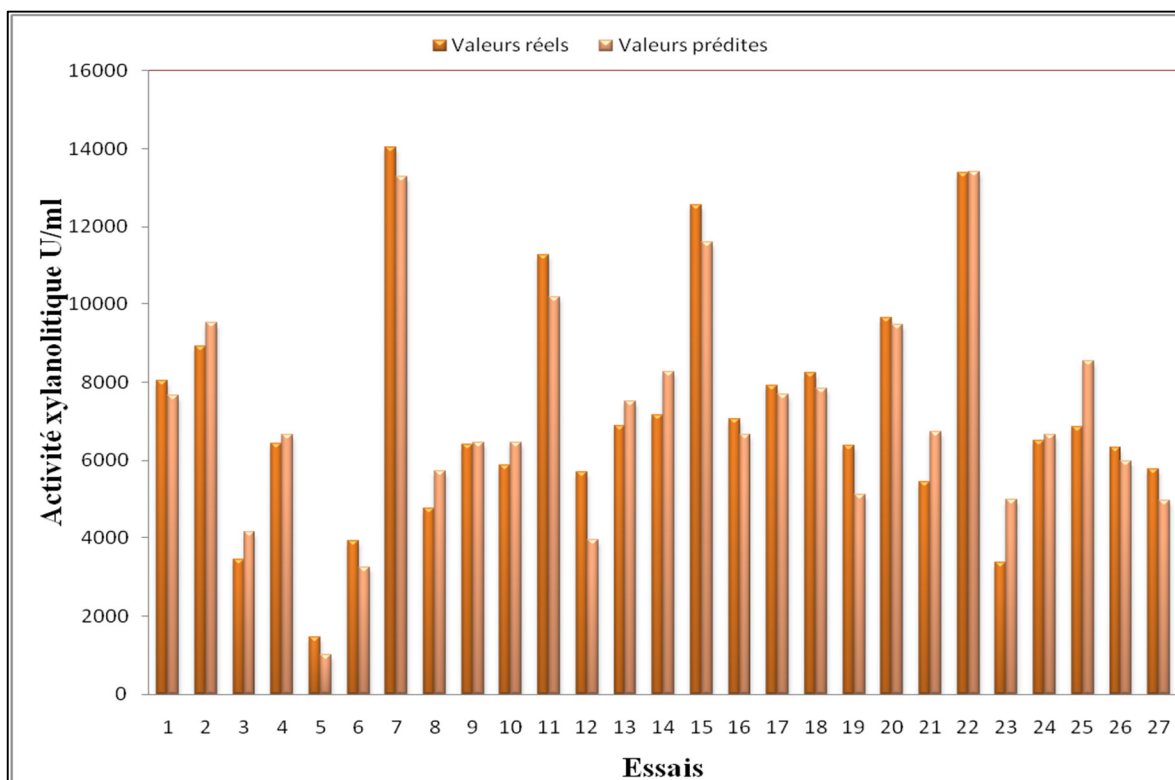


Figure N°13 : Résultats des valeurs réelles et prédites obtenue par BBD

D'après les résultats obtenus par le BBD (**annexe VI**), illustré sur la figure N° 13 montre que l'activité enzymatique atteint un maximum de 14037,10 U/ml à l'essai N°7 avec une période d'incubation de 5j, Humidité 85%, Température 26°C et une charge d'inoculum de 10^6 spores/ml, et un minimum d'activité de 1461,82 à l'essai N°5 avec une période d'incubation 7j, Humidité 70%, Température 30°C et une charge d'inoculum de 10^7 spores /ml.

Ghoshal et *al.*, (2016) ; Khusro et *al.*, (2016) ; Bagewadi et *al.*, (2016) ; Long et *al.*, (2017) et Da Silva Menezes et *al.*, (2018) confirment l'influence du paramètre optimisé sur la production de xylanases.

IV.2 Coefficient de détermination R^2

Selon Goupy., (2006) le R^2 est un paramètre statistique qui nous indique la validité du model étudié. La mesure de la corrélation et la signification statistique du model par le coefficient de détermination R^2 égale à 0.913 proche de 1, indique que 91,3 % de la variabilité de la réponse peut être exprimé par le modèle ce qui signifie que uniquement 8.7 % des variations ne sont pas exprimé par le modèle, et la valeur du coefficient de détermination ajusté $R^2_{ajustée} = 0.81$ confirment que les valeurs réelles sont proche des valeurs prédites (Pérez-Rodríguez et *al.*, 2014), le coefficient de validation CV égal à 18,08 % indique que les expériences sont fiable et précises (Khusro et *al.*, 2016), toutes ces études reflète la précision et l'applicabilité de RSM (Narra et *al.*, 2014).

Cette corrélation peut être aussi confirmée en traçant la courbe de valeurs réelles en fonction des valeurs prédites, la Figure 14 présente ci-dessous

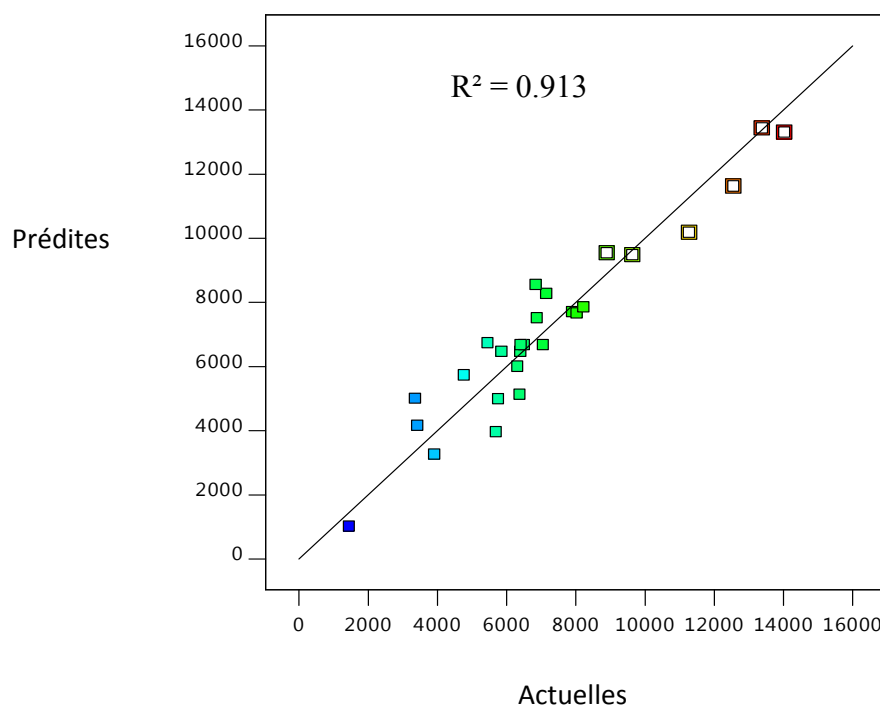


Figure N° 14 : Réponses réelles en fonction des réponses prédites.

D'après la figure N° 14, les points sont repartis autour de la droite de régression. Le modèle peut être donc jugé de qualité suffisante (Bouzaouit- Boudjeniba., 2016), puisqu'il y'a 91.31% de chance qu'il explique effectivement les variations mesurées de la réponse.

IV.3 Analyse de la variance pour la production xylanolytiques (ANOVA)

IV.3.1 La signification du modèle

Tableau IV : Analyse du modèle de régression

Source	P value	Signification
Modèle	0.0003	significatif
Lack of Fit	0.0574	Non significatif
R ²	0.9131	/

p value <0.05 est considéré comme étant significatif (Goupy., 2006). Comme le montre le tableau IV, la faible valeur du modèle p value égal 0.0003, indiquant que ce modèle (quadratique) est statistiquement très significatif à un niveau de confiance de 95%, cela signifie que les variables du modèle ont un effet significatif sur la réponse Y. Ces résultats sont encore confirmé par le manque d'ajustement (Lack of Fit ; LOF) du modèle 0,0574, ce qui n'été pas significatif par rapport à l'erreur pure (Pena-Maravilla et *al.*, 2017). Sur ce, l'équation de régression peut bien être validée (He et al., 2018).

IV.3.2 La signification d'effet des facteurs

Tableau V : Estimation des coefficients de régression du modèle polynomiale de second degré

Source	F-value	P-value	Signification
X₁-Temps	0,7622	0,3998	Non significatif
X₂-Humidité	25,62	0,0003	Significatif
X₃-Température	14,98	0,0022	Significatif
X₄-Inoculum	4,87	0,0475	Significatif
X₁*X₂	0,9385	0,3518	Non significatif
X₁*X₃	7,72	0,0167	Significatif
X₁*X₄	0,0217	0,8854	Non significatif
X₂*X₃	2,33	0,1530	Non significatif
X₂*X₄	0,0004	0,9839	Non significatif
X₃*X₄	0,0186	0,8939	Non significatif
X₁²	16,07	0,0017	Significatif
X₂²	26,71	0,0002	Significatif
X₃²	0,7458	0,4047	Non significatif
X₄²	3,06	0,1060	Non significatif

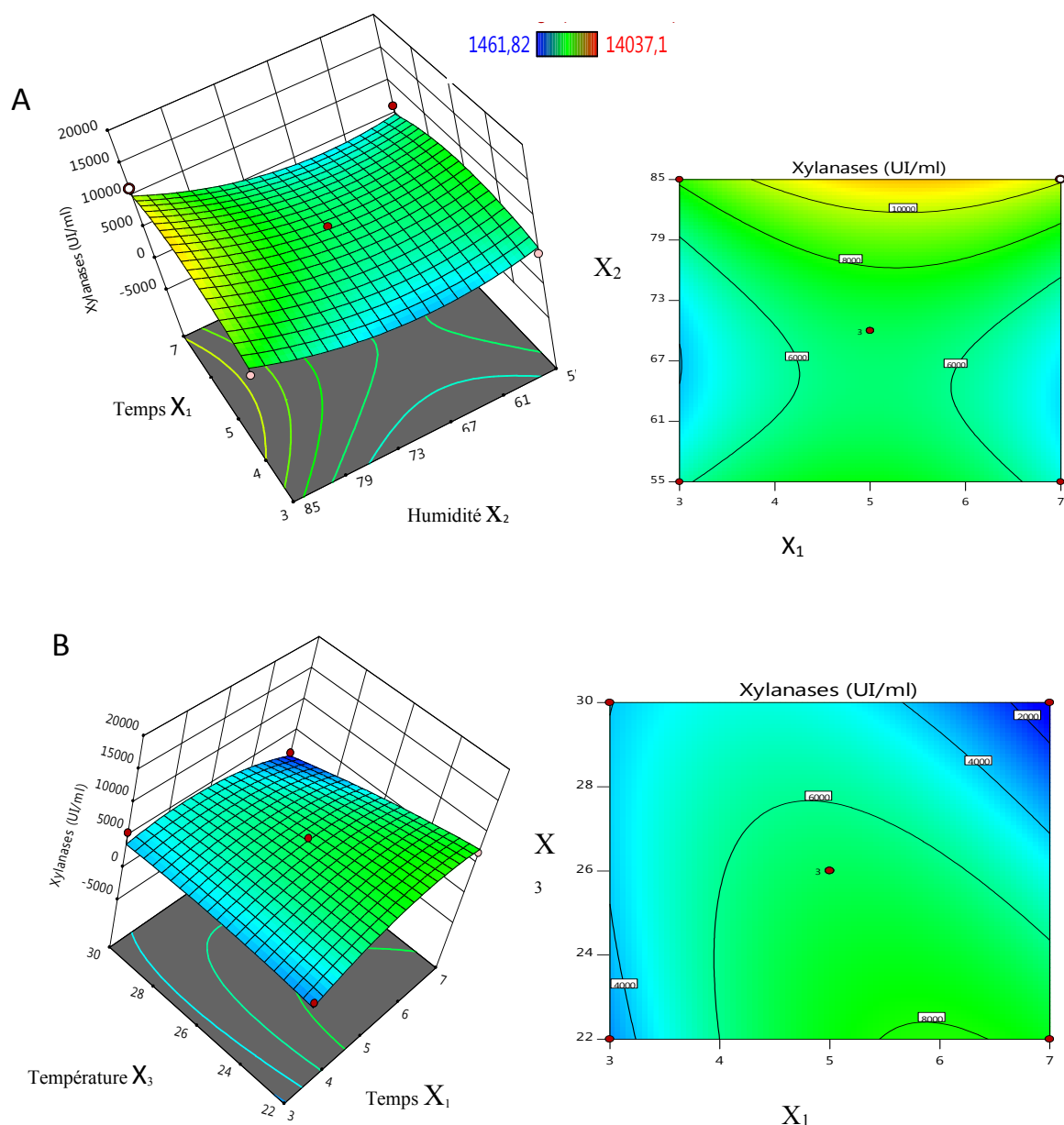
➤ Effet linéaire

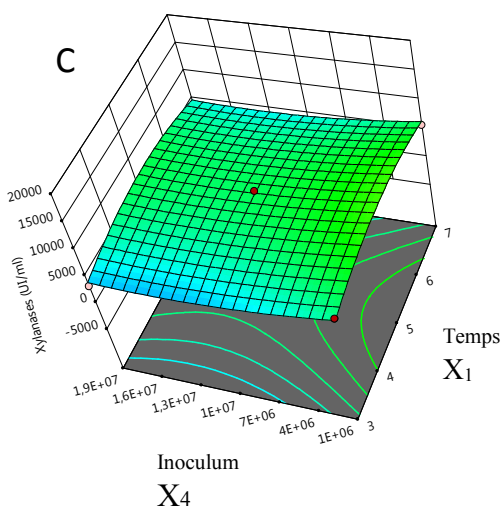
Le p value des coefficients inférieur à 0,05 indique que la variable correspondante est significatif (He et *al.*, 2018). Le test ANOVA appliqué pour chacun des facteurs de la culture de la souche Ak S3 a montré que les effets linéaire à savoir l'humidité X_2 , la température X_3 , et la charge d'inoculum X_4 ont une valeur probable 0.0003, 0.0022 et 0.0475 respectivement, sont statistiquement significatif au niveau de 95% de confiance, étant des variables importante pour une production élevée de xylanases. Cependant l'impact de temps d'incubation est non significatif ayant un p value égale $0,3998 > 0.05$ pour la production de xylanases.

Ces résultats obtenus sont en accord avec ceux trouvés par Zhang et Sang., (2015) ; Xue et *al.*, (2016) ; Ramanjaneyulu et Rajasekhat., (2016) ; Yegin., (2016). Dont le but est d'optimiser la production de xylanases.

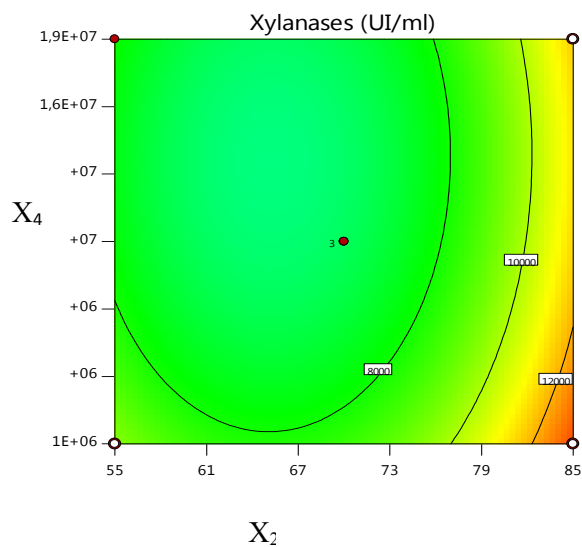
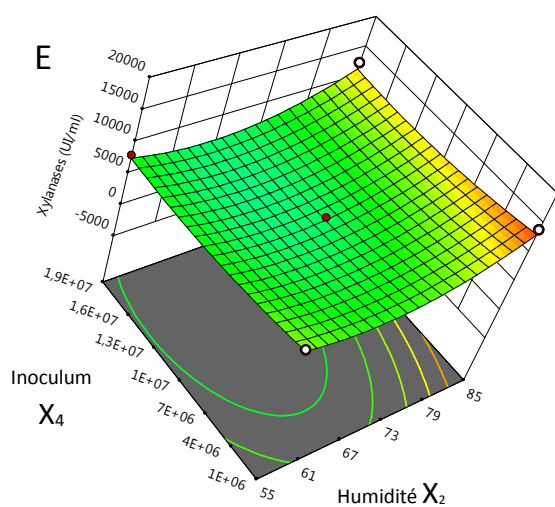
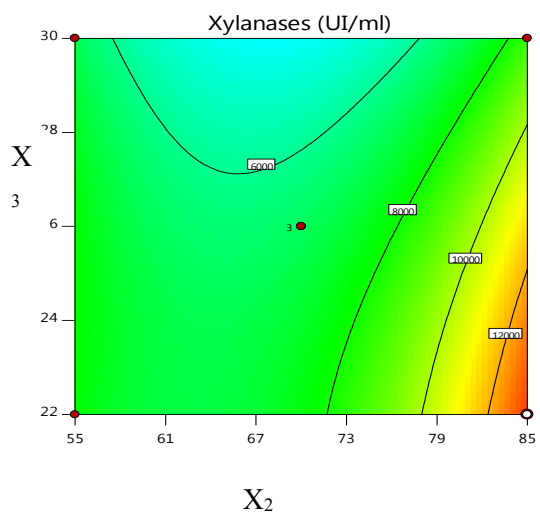
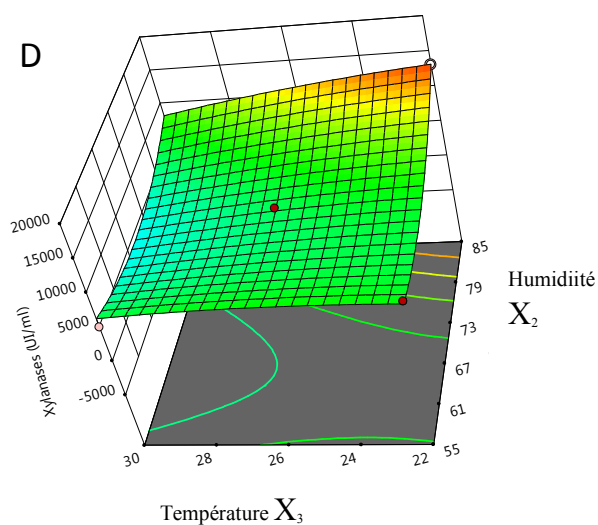
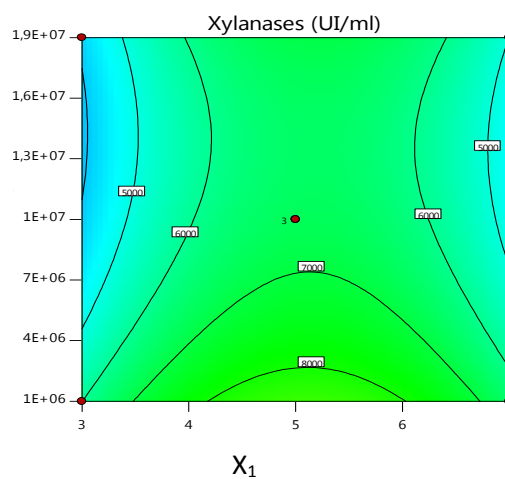
➤ Effet d'interaction

Afin de comprendre les effets des différents facteurs et de leurs interactions sur la production enzymatique, des courbes de 2D (deux dimension) et 3D (trois dimension) ont été tracées par le modèle statistiquement significatif.





X
4



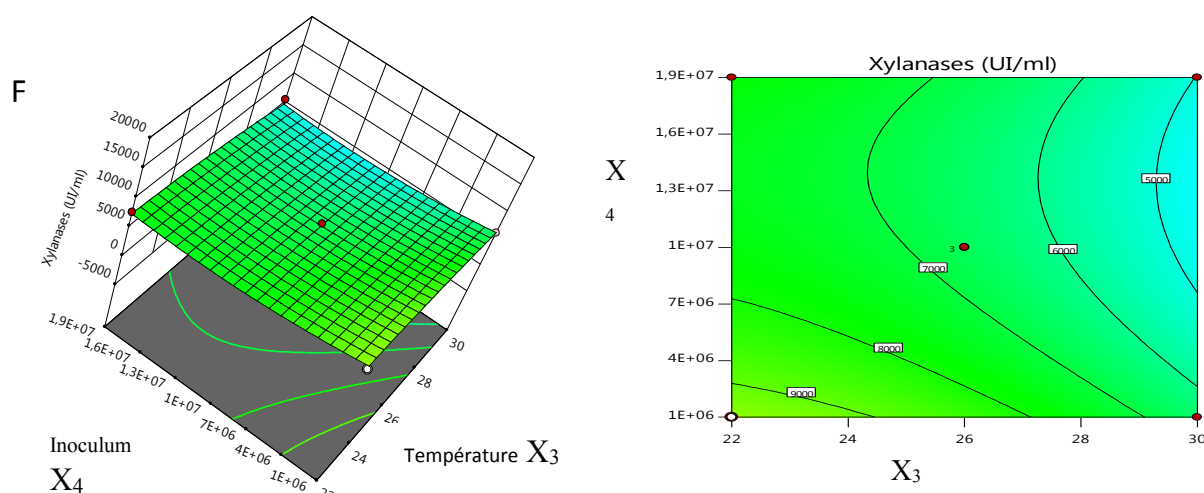


Figure N° 15 : Surfaces de réponses définissant les différentes interactions (A) Temps et Humidité ; (B) Temps et Température ; (C) Temps et Inoculum ; (D) Humidité et Température ; (E) Humidité et Inoculum ; (F) Température et Inoculum

Les résultats obtenus à partir de l'étude menée, montrent que l'interaction (X_1X_3) entre le temps d'incubation X_1 et la température X_3 possède une grande influence sur l'activité enzymatique est significatif ; avec un p value qui égal à $0,0167 < 0,05$, Cependant le coefficient des couples X_1X_2 (temps et humidité), X_1X_4 (temps et inoculum), X_2X_3 (humidité et température), X_2X_4 (humidité et inoculum), X_3X_4 (température et inoculum), sont non significatifs car leur p value 0,3518, 0,8854, 0,1530, 0,9839, 0,8939 respectivement qui sont supérieur à 0,05.

Selon les études faites par : Yegin et *al.*, (2016) ; Dos Santos et *al.*, (2017) ; Pathania et *al.*, (2017) observent qu'une interaction entre le temps d'incubation et la température a un impact sur une production maximal d'enzyme xylanases par *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1; *Aspergillus niger* ; et *Rhizopus delemar* F2, respectivement.

La figure 15-B montre que la zone en bleu foncé représente l'intervalle des facteurs X_1 et X_3 là où on retrouve la zone d'activité la plus faible donc une production de xylanases moins importante. Cet intervalle se situe à des niveaux haut pour un temps d'incubation (6 – 7jrs), et à un niveau haut pour la température allant de (27– 30 °C).

La zone en vert foncé représente l'intervalle des valeurs entre X_1 et X_3 ou on retrouve la zone d'activité la plus importante donc une production de xylanases plus importante. Cet intervalle se situe à un niveau haut pour un temps d'incubation entre (4–7 jrs) et à un niveau bas pour la température entre (22- 24°C).

L'augmentation de la température cause la diminution de l'activité xylanases, cependant, l'augmentation du temps d'incubation à eu un léger impact positif sur la production de xylanases (Yegin et *al.*, 2016).

➤ Effet quadratique

Au sein du modèle, les effets quadratique de X_1^2 (Temps d'incubation*Temps d'incubation) et X_2^2 (Humidité*humidité) ayant un p value égale à 0,0017, 0,0002 respectivement sont significatifs au niveau 95%. Par contre les termes X_3^2 (Température*Température) et X_4^2 (Inoculum*Inoculum) sont statistiquement non significatif avec un p value qui est 0,4047 et 0,1060 respectivement. Dans la même perspective, des études ultérieurs faites par Narra et *al.*, (2014) ; Zhang et *al.*, (2015) ; Ping et *al.*, (2017) ; Rosmine et *al.*, (2017), trouvent les paramètres quadratique (Temps d'incubation²) et (Humidité²) sont significatif.

IV.3.3 Modèle mathématique de régression

Les résultats obtenus sur la production de xylanases sont exprimés sous la forme d'une équation de régression. Lorsque des variables du modèle sont insignificatifs, elles sont exclues de l'équation polynomial quadratique du modèle (Bagewadi et *al.*, 2016 ; Hosseinkhani et *al.*, 2016).

$$Y = 6669,09 + 1896,41(X_2) - 1449,91(X_3) - 926,88(X_4) - 1802,69 (X_1 * X_3) - 2252,93(X_1^2) + 2904,56(X_2^2).$$

- Y : la réponse de l'activité xylanolytiques, exprimée en U/ml.
- X_2, X_3, X_4 : les variables indépendantes des effets linéaires à savoir humidité, température et inoculum respectivement.
- $X_1 * X_3$: l'effet d'interaction (temps*température).
- X_1^2, X_2^2 : les effets quadratiques à savoir temps² et humidité² respectivement.

V. Validation du modèle

Afin de vérifier la validité du modèle, les conditions optimales proposées par le modèle BBD de l'activité xylanolytiques, sont représentés dans le tableau suivant

Tableau VI : Conditions optimales pour la production de xylanases proposé par le modèle BBD

Essais	Temps (jrs)	Humidité %	Température °C	Inoculum (Spr/ml)
1	4,842	84,866	28,879	16323123,353
2	6,126	84,917	22,155	18738848,917
3	6,660	84,819	22,051	18846015,338

Dans le cadre d'une approche expérimentale, l'application exacte de tel estimation s'avère être difficile. Afin d'y remédié, de légère modification ont été apportés, en arrondissant les valeurs au chiffre le plus proche.

Tableau VII : Conditions optimales appliqué pour la production de xylanases

Essais	Temps (jrs)	Humidité %	Température °C	Inoculum (Spr/ml)
1	5	85	29	1.6×10^7
2	6	85	22	1.9×10^7
3	7	85	22	1.9×10^7

Les valeurs prédites et les résultats des valeurs réelles sont donné dans le tableau suivant

Tableau VIII : Valeurs prédites et valeurs réelles

Essais	Valeurs prédites	Valeurs réelles	Standard d'erreur
1	9392,635	1355,0895	1037.687
2	14114,874	14766,2853	1623.182
3	14038,995	13352,5218	1857,600

La bonne corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales après optimisation justifie la validité de la réponse du modèle et l'existence d'une valeur optimale à l'essai N°2 avec des conditions optimales d'un temps d'incubation de 6 jours, humidité 85%, température de fermentation 22 °C, et une charge de $1,9 \times 10^7$ spores/ml, à un taux de production 14766,2853 U/ml.

Conclusion et perspectives

Ce travail avait pour principaux objectifs la détermination et l'optimisation des facteurs influençant la production de xylanases par une souche nommée Ak S3, appartenant à la collection du laboratoire de microbiologie appliquée « LMA » de l'université A/Mira de Bejaia.

Dans cette étude, nous avons étudié la production des enzymes en utilisant les déchets agricoles à faible coût, à savoir le son de blé, qui est pris en considération comme substrat dont la souche Ak S3 est capable de produire des xylanases à travers un simple processus de fermentation sur milieu solide, donnant un taux de 4054,55 U/ml.

La production de xylanases par la souche Ak S3 est optimisée par la technique classique (OFAT) et aussi par la méthode de surface de réponse (RSM). Les variables indépendantes étudiées à savoir le temps d'incubation, l'humidité, la température de fermentation et la charge d'inoculum nécessaire pour la production d'enzyme sont optimisées en premier lieu par la technique classique One Factor At time, cependant les résultats obtenus montrent que l'activité xylanolytique est meilleure lors d'une période d'incubation de 5 jours, humidifié à une teneur de 70% par le milieu MW à pH=5, la température est de 26°C et la charge d'inoculation est de 10^7 spores/ml, procurent des pics de xylanases à l'ordre de 4647,58 U/ml, 4671,56 U/ml, 7099,93 U/ml, et 8475,87 U/ml respectivement.

Les résultats de cette étude ont montré une productivité et des valeurs de stabilité enzymatique conformément à ceux disponibles dans la littérature.

En outre, la méthode de surface de réponse (RSM) a été utilisée dont le but est de maximiser le rendement de xylanases et de réduire le nombre d'expériences à réaliser.

Les résultats de l'optimisation affirment que le modèle est significatif avec des valeurs réelles qui sont très proches aux valeurs prédites, avec un coefficient de corrélation égale à 0,913 qui est très proche de 1.

Selon les résultats obtenus par la conception du modèle Box-Behnken, démontre que les principaux paramètres ont amélioré la production de xylanases. Les optimums des facteurs établis par le plan sont respectivement 6 jours, 85%, 22°C, et 1.9×10^7 spores/ml, pour une activité xylanolytique maximale de l'ordre 14766,28 U/ml, proche de la valeur prédite.

Ce dernier confirme que la production est relativement élevée dans une courte durée de fermentation qui pourrait être attrayant pour la production de xylanases à grande échelle.

Les résultats obtenus à travers cette étude semblent prometteuse et incitent à poursuivre la recherche dans cette thématique en vue de définir une ligne de conduite pour une application à l'échelle industrielle. Toutefois, il serait intéressant d'envisager :

- La purification de xylanases.
- La détermination et l'optimisation d'autres facteurs nutritionnels et culturels tels que d'autres sources de carbone, sources d'azote, sources d'ions métalliques et aération.
- Procéder à des cultures mixtes avec une autre souche performante, tel que cette dernière qui est capable d'engendrer une surproduction.
- D'élargir l'étude sur d'autres sous-produits afin d'élaborer de nouveaux produits à valeur économique, vu que le xylane commercial est très coûteux.

*Références
bibliographique*

A

Adams, T. H., Wieser, J. K., & Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 35-54.

Adhyaru, D. N., Bhatt, N. S., & Modi, H. A. (2015). Optimization of upstream and downstream process parameters for cellulase-poor-thermo-solvent-stable xylanase production and extraction by *Aspergillus tubingensis* FDHN1. *Bioresources and bioprocessing*, 2(1), 3

Ahn, J., Chung, B. K., Lee, D. Y., Park, M., Karimi, I. A., Jung, J. K., & Lee, H. (2011). NADPH-dependent pgi-gene knockout *Escherichia coli* metabolism producing shikimate on different carbon sources. *FEMS microbiology letters*, 324(1), 10-16.

Ajijolakewu, K. A., Leh, C. P., AbduLLah, W. N. W., & Lee, C. K. (2016). Assessment of the effect of easily-metabolised carbon supplements on xylanase production by newly isolated *Trichoderma asperellum* USM SD4 cultivated on oil palm empty fruit bunches. *BioResources*, 11(4), 9611-9627.

Ang, S. K., & Abd-Aziz, S. (2015). Potential uses of xylanase-rich lignocellulolytic enzymes cocktail for oil palm trunk (OPT) degradation and lignocellulosic ethanol production. *Energy & Fuels*, 29(8), 5103-5116.

Annadurai, G., & Sheeja, R. Y. (1998). Use of Box-Behnken design of experiments for the adsorption of verofix red using biopolymer. *Bioprocess engineering*, 18(6), 463-466.

Assamoi, A. A., & Destain, J. Thonart Ph., 2009. Aspects microbiologiques de la production par la fermentation solide des endo- β -1, 4-xylanases de moisissures: le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 13(2), 271-280.

Azeri, C., Tamer, U. A., & Oskay, M. (2010). Thermoactive cellulase-free xylanase production from alkaliphilic *Bacillus* strains using various agro-residues and their potential in biobleaching of kraft pulp. *African Journal of Biotechnology*, 9(1).

B

Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I., Shouche, Y., & Ninnekar, H. Z. (2016). Xylanase production from *Penicillium citrinum* isolate HZN13 using response surface methodology and characterization of immobilized xylanase on glutaraldehyde-activated calcium-alginate beads. *3 Biotech*, 6(2), 164.

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

Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy conversion and management*, 52(2), 858-875.

Baldrian, P., & Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 32(3), 501-521.

Bansal, N., Tewari, R., Soni, R., & Soni, S. K. (2012). Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste management*, 32(7), 1341-1346.

Basu, M., Kumar, V., & Shukla, P. (2018). Recombinant Approaches for Microbial Xylanases: Recent Advances and Perspectives. *Current Protein and Peptide Science*, 19(1), 87-99.

Battan, B., Sharma, J., Dhiman, S. S., & Kuhad, R. C. (2007). Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6-7), 733-739.

- Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R., & Shoham, Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current opinion in structural biology*, 8(5), 548-557.
- Bellon-Maurel, V., Orliac, O., & Christen, P. (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*, 38(6), 881-896
- Bettache A. (2013). Isolement et sélection d'actinomycètes producteurs d'enzymes cellulolytiques. Thèse de Doctorat de Microbiologie appliqué. Université de Bejaia, Abderrahmane Mira. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. p73.
- Bettache, A., Messis, A., Duchiron, F., & Benallaoua, S. (2014). Solide-State Fermentation Technology for Bioconversion of Lignocellulose. *Int J Emer Tech Adv Eng*, 4(10), 486-490.
- Bharti, A. K., Kumar, A., Kumar, A., & Dutt, D. (2018). Exploitation of Parthenium hysterophorous biomass as low-cost substrate for cellulase and xylanase production under solid-state fermentation using Talaromyces stipitatus MTCC 12687. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*.
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus Trichoderma. II. Infrageneric classification. *Canadian journal of botany*, 69(11), 2357-2372.
- Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Guy, P., Larpent, J. P., & Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.
- Boucherba, N., Said, B., Estelle, C., Hakim, H., & Duchiron, F. (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by Jonesia denitrificans isolated in Algerian soil. *Process Biochemistry*, 46(2), 519-525.
- Boussarsar, H. (2008). *Application de Traitements Thermique et Enzymatique de Solubilisation et Saccharification de la Fraction Hemicellulosique en Vue de la Valorisation de la Bagasse de Canne à Sucre* (Doctoral dissertation, Reims).

Bouzaouit. B.N. (2016). Optimisation de la synthèse enzymatique d'esters de sucres par la méthodologie des plans d'expériences (Doctoral dissertation, Université BADJI MOKHTAR-ANNABA).

Box, G. E., & Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4), 455-475.

Brijwani, K., Oberoi, H. S., & Vadlani, P. V. (2009). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, 45(1), 120-128

C

Camacho, N. A., & Aguilar, G. (2003). Production, purification, and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking. *Applied biochemistry and biotechnology*, 104(3), 159-171.

Chabasse, D., Bouchara, J. P., De Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., & Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation: biologie médicale.-159. Paris, Bioforma*.

Chakraborty, S., Gupta, R., Jain, K. K., & Kuhad, R. C. (2016). Cost-effective production of cellulose hydrolysing enzymes from *Trichoderma* sp. RCK65 under SSF and its evaluation in saccharification of cellulosic substrates. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39(11), 1659-1670.

Chugh, P., Soni, R., & Soni, S. K. (2016). Deoiled Rice Bran: A Substrate for Co-Production of a Consortium of Hydrolytic Enzymes by *Aspergillus niger* P-19. *Waste and Biomass Valorization*, 7(3), 513-525.

Chundawat, S. P., Beckham, G. T., Himmel, M. E., & Dale, B. E. (2011). Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, 121-145.

Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 29(1), 3-23.

Cui, F., Li, Y., & Wan, C. (2011). Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource technology*, 102(2), 1831-1836.

D

Da Silva Menezes, B., Rossi, D. M., Squina, F., & Ayub, M. A. Z. (2018).

Comparative production of xylanase and the liberation of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass by *Aspergillus brasiliensis* BLf1 and recombinant *Aspergillus nidulans* XynC A773. *International Journal of Food Science & Technology*.

Davidson, F. A., Sleeman, B. D., Rayner, A. D. M., Crawford, J. W., & Ritz, K. (1996). Context-dependent macroscopic patterns in growing and interacting mycelial networks. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 263(1372), 873-880.

Desai, D. I., & Iyer, B. D. (2016). Utilization of Corn Cob Waste for Cellulase-Free Xylanase Production by *Aspergillus niger* DX-23: Medium Optimization and Strain Improvement. *Waste and Biomass Valorization*, 8(1), 103-113.

Dinarvand, M., Rezaee, M., & Foroughi, M. (2016). Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). *brazilian journal of microbiology*, 48(3), 427-441.

Dos Santos, T. C., dos Santos Reis, N., Silva, T. P., Bonomo, R. C. F., Aguiar-Oliveira, E., de Oliveira, J. R., & Franco, M. (2017). Production, Optimisation and Partial Characterisation of Enzymes from Filamentous Fungi Using Dried Forage Cactus Pear as Substrate. *Waste and Biomass Valorization*, 9(4), 571-579.

E

El Aty, A. A. A., Saleh, S. A., Eid, B. M., Ibrahim, N. A., & Mostafa, F. A. (2018).

Thermodynamics characterization and potential textile applications of *Trichoderma longibrachiatum* KT693225 xylanase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *14*, 129-137

El-Shishtawy, R. M., Mohamed, S. A., Asiri, A. M., Abu-bakr, M. G., Ibrahim, I. H., & Al-Talhi, H. A. (2014). Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. *BMC biotechnology*, *14*(1), 29

El-Shishtawy, R. M., Mohamed, S. A., Asiri, A. M., Abu-bakr, M. G., Ibrahim, I. H., & Al-Talhi, H. A. (2015). Saccharification and hydrolytic enzyme production of alkali pre-treated wheat bran by *Trichoderma virens* under solid state fermentation. *BMC biotechnology*, *15*(1), 37.

F

Fadil, M., Farah, A., Ihssane, B., Haloui, T., & Rachiq, S. (2015). Optimisation des

paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse. *J. Mater. Environ. Sci.*, *6*(8), 2346-2357.

Farinas, C. S. (2015). Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *52*, 179-188.

G

Garai, D., & Kumar, V. (2013). A Box–Behnken design approach for the

production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. *Industrial Crops and Products*, *44*, 352-363.

- Gassara, F., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2010). Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 388-394.
- Gautam, A., Kumar, A., & Dutt, D. (2015). Production of cellulase-free xylanase by *Aspergillus flavus* ARC-12 using pearl millet stover as the substrate under solid-state fermentation. *Journal of Advanced Enzymes Research*, 1, 1-9.
- Gervais, P., & Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 85-101.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 59(2), 257-268.
- Ghoshal, G., Banerjee, U. C., & Shivhare, U. S. (2016). Utilization of agrowaste and xylanase production in solid state fermentation. *Journal of Biochemical Technology*, 6(3), 1013-1024.
- Goncalves, C. A. ; Rodrigues Filho, J. A. ; Camarao, A. P. ; Azevedo, G. P. C. de, 2005. Evaluation of *Panicum maximum* cv. Tobiata pasture to milk production of under two levels of concentrate supplementation in the Northeast of the State of Para. Documentos - Embrapa Amazonia Oriental (39): 35 pp. 2005.
- Goupy, J. (1990). Etude comparative de divers plans d'expériences. *Revue de statistique appliquée*, 38(4), 5-44.p 6.
- Goupy, J.(2006). Les Plans d'expériences. Edition : Revue MODULAD.
- Ghorri, S. (2015). Isolement des microorganismes possédant une activité anti-Fusarium. Thèse de Doctorat En Bioprocédés et Biotechnologies, Applications Mycologiques, Université frères Mentouri, CONSTANTINE. P24
- Guan, G. Q., Zhao, P. X., Zhao, J., Wang, M. J., Huo, S. H., Cui, F. J., & Jiang, J. X. (2016). Production and partial characterization of an alkaline xylanase from a novel fungus *Cladosporium oxysporum*. *BioMed Research International*, 2016.

H

Hancco, V., Poilâne, C., & Chen, J. (2011, June). Composite lin/époxy: optimisation par plan d'expériences. In *17èmes Journées Nationales sur les Composites (JNC17)* (p. 50).

Hansen, G. H., Lübeck, M., Frisvad, J. C., Lübeck, P. S., & Andersen, B. (2015). Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 50(9), 1327-1341

Harper, S. H., & Lynch, J. M. (1981). The chemical components and decomposition of wheat straw leaves, internodes and nodes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32(11), 1057-1062.

Harris, A. D., & Ramalingam, C. (2010). Xylanases and its application in food industry: a review. *Journal of Experimental Sciences*, 1(7).

Harris, S. A. D. (2016). Partial Purification and Characterization of Xylanase from *Bacillus weihenstephanensis* Strain ANR1 using Watermelon Rind. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 10(1).

Hassan, E. G., Alkareem, A. M. A., & Mustafa, A. M. I. (2008). Effect of fermentation and particle size of wheat bran on the antinutritional factors and bread quality. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(4), 521-526.

He, X. L., Song, C., Li, Y. Y., Wang, N., Xu, L., Han, X., & Wei, D. S. (2018). Efficient degradation of Azo dyes by a newly isolated fungus *Trichoderma tomentosum* under non-sterile conditions. *Ecotoxicology and environmental safety*, 150, 232-239.

Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *science*, 315(5813), 804-807.

Hosseinkhani, M., Montazer, M., Eskandarnejad, S., & Harifi, T. (2016). Optimization of Wool Slenderizing Along with In-situ Synthesis of Silver Nanoparticles Using Box–Behnken Design. *Journal of Natural Fibers*, 14(2), 175-184.

J

Jampala, P., Tadikamalla, S., Preethi, M., Ramanujam, S., & Uppuluri, K. B. (2017).

Concurrent production of cellulase and xylanase from *Trichoderma reesei* NCIM 1186: enhancement of production by desirability-based multi-objective method. *3 Biotech*, 7(1), 14.

Javed, U., Aman, A., & Qader, S. A. U. (2017). Utilization of corncob xylan as a sole carbon source for the biosynthesis of endo-1, 4- β xylanase from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 19.

K

Kar, S., Gauri, S. S., Das, A., Jana, A., Maity, C., Mandal, A., ... & Mondal, K. C.

(2013). Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(1), 57-68

Karmakar, M and R.R. ray, 2011a ,characterization of extracellular thermostable endoglucanase from *Rhizopus oryzae*, using response surface methodology, Res, Rev bio sci., 4:50.55

Khanahmadi, M., Arezi, I., Amiri, M. S., & Miranzadeh, M. (2018). Bioprocessing of Agro-Industrial Residues for Optimization of Xylanase Production by Solid-State Fermentation in Flask and Tray Bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.

- Khusro, A., Kaliyan, B. K., Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., & Agastian, P. (2016). Statistical optimization of thermo-alkali stable xylanase production from *Bacillus tequilensis* strain ARMATI. *Electronic Journal of Biotechnology*, 22, 16-25.
- Knob, A., Terrasan, C. R. F., & Carmona, E. C. (2010). β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 389-407.
- Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems—an overview. *Critical reviews in biotechnology*, 25(1-2), 1-30.
- Kuhad, R. C., Deswal, D., Sharma, S., Bhattacharya, A., Jain, K. K., Kaur, A., ... & Karp, M. (2016). Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 249-272.
- Kumar, R., Singh, S., & Singh, O. V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35(5), 377-391.
- Kumar, S., SHARMA, N., & Pathania, S. (2017). optimization of process parameters and scale-up of xylanase production from *Bacillus amyloliquefaciens* sh8 in a stirred tank bioreactor. *cellulose chemistry and technology*, 51(5-6), 403-415.
- Kumar, V., & Shukla, P. (2015). Functional aspects of xylanases toward industrial applications. In *Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology* (pp. 157-165). Springer, New Delhi.
- Kumar, V., Chhabra, D., & Shukla, P. (2017). Xylanase production from *Thermomyces lanuginosus* VAPS-24 using low cost agro-industrial residues via hybrid optimization tools and its potential use for saccharification. *Bioresource technology*, 243, 1009-1019.

L

Lambertz, C., Garvey, M., Klinger, J., Heesel, D., Klose, H., Fischer, R., & Commandeur, U. (2014). Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 135.

Leghlmi H. (2013). Cellulase de souche fongique issue du sol d'un milieu extrême (Sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de doctorat en microbiologie. Université Constantine 1. Faculté des sciences de la nature et de la vie. p52.

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N. S., ... & Rogalski, J. (1999). Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal genetics and biology*, 27(2-3), 175-185.

Liao, H., Fan, X., Mei, X., Wei, Z., Raza, W., Shen, Q., & Xu, Y. (2015). Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. *Biomass and Bioenergy*, 74, 122-134.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2013). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(D1), D490-D495.

Long, C., Liu, J., Gan, L., Zeng, B., & Long, M. (2017). Optimization of Xylanase Production by *Trichoderma orientalis* Using Corn Cobs and Wheat Bran via Statistical Strategy. *Waste and Biomass Valorization*, 1-8.

M

Maan, P., Bharti, A. K., Gautam, S., & Dutt, D. (2016). Screening of important factors for xylanase and cellulase production from the fungus *C. cinerea* RM-1 NFCCI-3086 through plackett-burman experimental design. *BioResources*, 11(4), 8269-8276.

Madan M., Thind K.S. (1998). Physiology of fungi. Edition: A.P.H Publishing Corporation.

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

Mandal, A. (2015). Review on microbial xylanases and their applications. *Cellulose*, 42(2), 45-2.

Mander, P., Choi, Y. H., Pradeep, G. C., Choi, Y. S., Hong, J. H., Cho, S. S., & Yoo, J. C. (2013). Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. CS624 using an agro residue substrate. *Process Biochemistry*, 49(3), 451-456.

Manohar, M., Joseph, J., Selvaraj, T., & Sivakumar, D. (2013). Application of Box Behnken design to optimize the parameters for turning Inconel 718 using coated carbide tools. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 4(4), 620-644.

Mansfield, S. D., Mooney, C., & Saddler, J. N. (1999). Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology progress*, 15(5), 804-816.

Marechal, P. (2001). *Analyse des principaux facteurs impliqués dans le fractionnement combiné de pailles et de sons de blé en extrudeur bi-vis: obtention d'agro-matériaux* (Doctoral dissertation, Toulouse, INPT).

Matkar, K., Chapla, D., Divecha, J., Nighojkar, A., & Madamwar, D. (2013). Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 24-33.

Mendels, M., & Weber, J. (1969). The product of cellulose in cellulase and their application. *Adv. Chem. Ser*, 95, 39-443.

Menezes, B. D. S., Rossi, D. M., Antônio, M., & Ayub, Z. (2017). Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 1.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

Montoya, Q. V., Meirelles, L. A., Chaverri, P., & Rodrigues, A. (2016). Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109(5), 633-651.

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

Mueller, G. M., & Schmit, J. P. (2007). Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? . *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 1-5.

Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S. L. F., & Teixeira, J. A. (2012). *Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes* (pp. 121-140). InTech. New Delhi, pp.57-99.

N

Narra, M., Dixit, G., Divecha, J., Kumar, K., Madamwar, D., & Shah, A. R. (2014).

Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 150-161.

Nkohla, A., Okaiyeto, K., Nwodo, U. U., Mabinya, L. V., & Okoh, A. I. (2017). Endoglucanase and Xylanase Production by *Chryseobacterium* Species Isolated from Decaying Biomass. *Polish Journal of Environmental Studies*, 26(6).

Nwe, N., Stevens, W. F., Tokura, S., & Tamura, H. (2008). Characterization of chitosan and chitosan–glucan complex extracted from the cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(3), 242-251.

O

Octave, S., & Thomas, D. (2009). Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*, 91(6), 659-664.

Oyedeji, O., Iluyomade, A., Egbewumi, I., & Odufuwa, A. (2018). Isolation and Screening of Xylanolytic Fungi from Soil of Botanical Garden: Xylanase Production from *Aspergillus flavus* and *Trichoderma viride*. *Journal of Microbiology Research*, 8(1), 9-18.

P

Pachauri, P., Sullia, S. B., & Deshmukh, S. (2016). Statistical optimization for enhanced production of cellulase from sugarcane bagasse using response surface methodology.

Padilha, I. Q., Valenzuela Mayorga, S. V., Grisi, T. C., Díaz Lucea, P., de Araújo, D. A., & Pastor Blasco, F. I. J. (2014). A glucuronoxylan-specific xylanase from a new *Paenibacillus favisporus* strain isolated from tropical soil of Brazil. *International Microbiology*, 2014, vol. 17, num. 3, p. 175-184. doi:10.2436/20.1501.01.220.

Papavizas, G.C. ., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium* : Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol*, 23 : 23-54

Pathak, P., Bhardwaj, N. K., & Singh, A. K. (2014). Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(8), 3776-3797.

Pathania, S., Sharma, N., & Handa, S. (2017). Optimization of culture conditions using response surface methodology for synergism production of cellulase, xylanase and pectinase by *Rhizopus delemar* F2 under solid state fermentation. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 1872-1878.

Peña-Maravilla, M., Calixto-Romo, M. A., Guillén-Navarro, K., Sánchez, J. E., & Amaya-Delgado, L. (2017). CELLULASES AND XYLANASES PRODUCTION BY *Penicillium citrinum* CGETCR USING COFFEE PULP IN SOLID STATE FERMENTATION. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(3).

Pérez, S., & Samain, D. (2010). Structure and engineering of celluloses. In *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* (Vol. 64, pp. 25-116). Academic Press.

Perez-Rodriguez, N., Oliveira, F., Perez-Bibbins, B., Belo, I., Agrasar, A. T., & Domínguez, J. M. (2014). Optimization of xylanase production by filamentous fungi in solid-state fermentation and scale-up to horizontal tube bioreactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(3), 803-825.

Peterson, R., & Nevalainen, H. (2012). *Trichoderma reesei* RUT-C30—thirty years of strain improvement. *Microbiology*, 158(1), 58-68.

Philippe, D., & Guy, S. G. (2014). Identification des champignons d'importance médicale. Laboratoire de santé publique. Québec

Ping, L., Wang, M., Yuan, X., Cui, F., Huang, D., Sun, W., ... & Wang, H. (2017). Production and characterization of a novel acidophilic and thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. *International journal of biological macromolecules*.

Pirzadah, T., Garg, S., Singh, J., Vyas, A., Kumar, M., Gaur, N., ... & Kumar, M. (2014). Characterization of actinomycetes and trichoderma spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. *SpringerPlus*, 3(1), 622.

Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(5), 577-591.

Prevot, V. (2013). *Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide* (Doctoral dissertation, Reims).France 159.

R

Raghavarao, K. S. M. S., Ranganathan, T. V., & Karanth, N. G. (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 127-135.

Ramanjaneyulu, G., & Rajasekhar Reddy, B. (2016). Optimization of xylanase production through response surface methodology by *Fusarium* sp. BVKT R2 isolated from forest soil and its application in saccharification. *Frontiers in microbiology*, 7, 1450.

Rosmine, E., Sainjan, N. C., Silvester, R., Alikkunju, A., & Varghese, S. A. (2017). Statistical optimisation of xylanase production by estuarine *Streptomyces* sp. and its application in clarification of fruit juice. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 393-401.

Roussos, S. (1985). Croissance de *T. harzianum* par FMS: physiologie, sporulation et production de cellulases. *Croissance de T. harzianum par FMS: physiologie, sporulation et production de cellulases*.

Roussos, S., & Raimbault, M. (1982). Hydrolyse de la cellulose par les moisissures: 1-Screening des souches cellulolytiques. In *Annales de Microbiologie* (Vol. 133, pp. 455-464).

Roussos, S., Hannibal, L., Durand, A., Diez, M., Saucedo, G., Montet, D., & Graille, J. (1994). Enrichissement en protéines du tourteau de coprah: sélection de champignons filamenteux en FMS= Protein enrichment of copra cake: selection of filamentous fungi in SSF. *Oléagineux*, 49(5), 235-247.

Ryabova, O., Vršanská, M., Kaneko, S., van Zyl, W. H., & Biely, P. (2009). A novel family of hemicellulolytic α -glucuronidase. *FEBS letters*, 583(9), 1457-1462.

S

Sandhu, S. K., Oberoi, H. S., Babbar, N., Miglani, K., Chadha, B. S., & Nanda, D.

K. (2013). Two-stage statistical medium optimization for augmented cellulase production via solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus niger* HN-1 and application of crude cellulase consortium in hydrolysis of rice straw. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(51), 12653-12661.

Saucedo-Castañeda, G. (1991). *Contrôle du métabolisme de "Schwanniomycetes castellii" cultivé sur support solide* (Doctoral dissertation, Montpellier 2).

Shrivastava, S., Kumar, V., Baweja, M., & Shukla, P. (2016). Enhanced Xylanase production from *Thermomyces lanuginosus* NCIM 1374/DSM 28966 using statistical analysis. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(3), 2225-2231.

Singh, J., & Kaur, P. (2012). Optimization of process parameters for cellulase production from *Bacillus* sp. JS14 in solid substrate fermentation using response surface methodology. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(4), 505-512.

Subramaniyan, S., & Prema, P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical reviews in biotechnology*, 22(1), 33-64.

T

Tallapragada, P., & Venkatesh, K. (2011). Isolation, identification and optimization of xylanase enzyme produced by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(4), 137-147.

Taylor, J. W., Jacobson, D. J., & Fisher, M. C. (1999). The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual review of phytopathology*, 37(1), 197-246.

Thomas, L., Parameswaran, B., & Pandey, A. (2016). Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus* sp. for bioethanol production. *Renewable Energy*, 98, 9-15.

V

Verma, D., & Satyanarayana, T. (2013). Production of cellulase-free xylanase by the recombinant *Bacillus subtilis* and its applicability in paper pulp bleaching. *Biotechnology progress*, 29(6), 1441-1447

Vizcaino, J. A., Luis, S. A. N. Z., Basilio, A., Vicente, F., Gutierrez, S., Hermosa, M. R., & Monte, E. (2005). Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycological research*, 109(12), 1397-1406.

W

Wertz, J. L. (2011). Les hémicelluloses. *Rapport de synthèse, Document ValBiom-Gembloux AgroBioTech (Novembre 2011)*.

Woiciechowski, A. L., de Souza Vandenberghe, L. P., Karp, S. G., Letti, L. A. J., de Carvalho, J. C., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2013). The pretreatment step in lignocellulosic biomass conversion: current systems and new biological systems. In *Lignocellulose Conversion* (pp. 39-64). Springer, Berlin, Heidelberg.

X

Xue, J. L., Zhao, S., Liang, R. M., Yin, X., Jiang, S. X., Su, L. H., ... & Feng, J. X. (2016). A biotechnological process efficiently co-produces two high value-added products, glucose and xylooligosaccharides, from sugarcane bagasse. *Bioresource technology*, 204, 130-138.

Y

Yadav, J. . 1988. SSF of wheat straw with alcaliphilic *Coprinus*. *Biotechnol Bioeng.* 31(5), 414-417.

Yegin, S. (2016). Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* on globe artichoke stem: Bioprocess optimization, enzyme characterization and application in saccharification of lignocellulosic biomass. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(5), 441-449.

Yegin, S., Buyukkileci, A. O., Sargin, S., & Goksungur, Y. (2016). Exploitation of agricultural wastes and by-products for production of *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 xylanase: Screening, bioprocess optimization and scale up. *Waste and Biomass Valorization*, 8(3), 999-1010.

Z

Zhang, H., & Sang, Q. (2015). Production and extraction optimization of xylanase and β -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. *Biochemical engineering journal*, 97, 101-110.

Zhang, Y. H. P. (2008). Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35(5), 367-375.

Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., & Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, 24(5), 452-481.

Annexes

Annexe I : Composition chimique de paille et son de blé**Tableau 1 :** Composition en sucre de son de blé (Hui et Qing, 2015)

Compositions en sucre	Pourcentages %
Cellulose	7.40
Hémicellulose	32.38
Lignine	4.01

Tableau 2: composition en sucre de la paille de blé (Hui et Qing, 2015)

Compositions en sucre	Pourcentage %
Cellulose	43.52
Hémicellulose	22.41
Lignine	9.80

Annexe II : milieux de culture

1. Gélose Pomme de terre, dextrose, agar (PDA) (Philippe., 2013)

- Pomme de terre.....250g
- Glucose.....20g
- Agar.....20g
- Eau distillée.....1 litre

PH final égale 5.

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

2. Milieu Mandels et Weber (Mandels et Weber, 1969)

- K_2HPO_4 2g
- $(NH_4)_2SO_4$ 1.4g
- Urée.....0.3g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$0.3g
- $CaCl_2$0.3 g
- $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$5.0mg
- $MnSO_4 \cdot H_2O$1.56mg
- $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$1.4mg
- $CoCl_2$2.0mg
- Eau distillée (qsp).....1 litre

Ajuster le pH à 5

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

Annexe III : Réactifs et tampon

1. Réactif DNS (Ghose, 1987)

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

Le tartrate est ajouté par petites quantités avec un Léger chauffage (50°C) si nécessaire pour éviter la formation des grumeaux insolubles.

La solution est préparée dans l'obscurité puis conservée à l'abri de la lumière dans un flacon couvert d'aluminium.

2. Tampon citrate de sodium (50 mM ; pH 4.8) (Zhang et *al.* 2009)

- Solution A : Acide citrique $C_6H_8O_7$; $M = 192,124$ g/mol
- Solution B : Citrate de sodium $Na_3C_6H_5O_7$; $M = 258,06$ g/mol
- Eau distillé : 1 litre

Annexe IV : Matériels analytiques**Tableau 1:** Marque commerciales du matériel analytique

Matériel	Marque
Balance	SHIMIDZU UX620H (Japan)
Bain marie	MEMMERT
Centrifugeuse	METTICH ZENTRIFUGEN (Germany)
Etuve	BINDER (Germany)
Four Pasteur	HERAEUS
Autoclave	ADVENTAGE (Germany)
Microscope optique	ZEISS (Germany)
Mixeur	DAAEWOOD
pH mètre	HANNA pH 210 (Romania)
Spectrophotomètre UV -visible	SHIMADZU UV MINI. 1240(Japan)
Vortex	VELP SCIENTIFICA (Germany)
Cellule de Malassez	MARIENFELD

Annexe V : Courbe d'étalonnage

Tableau 1 : Gamme étalon pour le dosage de xylanases (solution mère de xylose 2g/l)
(Sigma, Aldrich, USA)

Dilutions	[xylose]	ABS moy _{540 nm}	Ecart type
1/1	2	1.615	0
1/2	1	1.252	0.05374012
1/4	0.5	1.116	0.019798999
1/6	0.33	1.1095	0.00070711
1/8	0.25	1.101	0.00424264
1/10	0.2	1.06	0.01131371

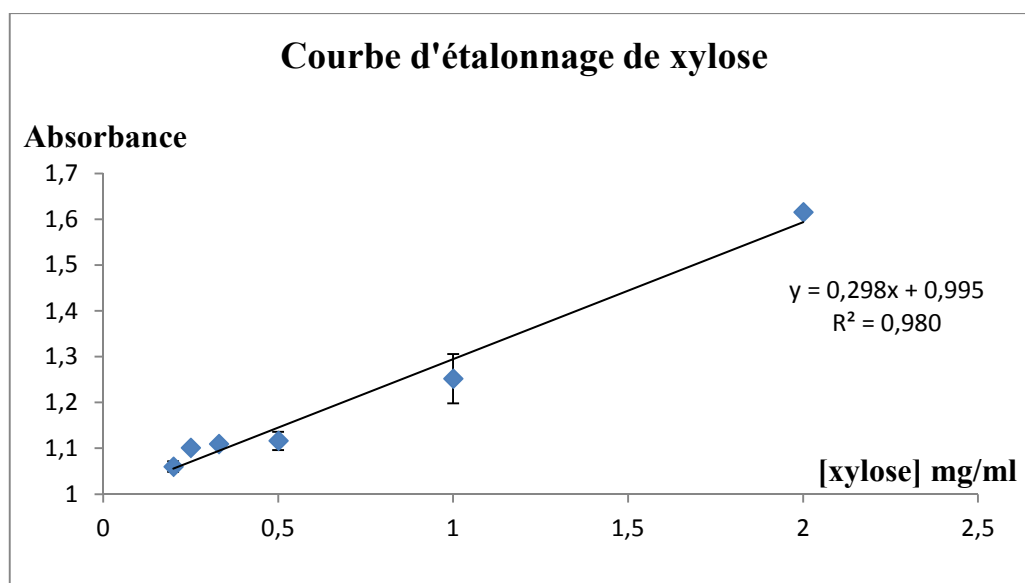


Figure N°1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage du Xylose (mg/ml)

Annexe VI : Plans d'expériences

Tableau 1 : Plan et résultats de l'optimisation de l'activité enzymatique par le plan BBD.

Essais	X1:Temps	X2:Humidité	X3:Température	X4:Inoculum	Activité xylanolytique U /ml	
Unité	Jours	%	°C	Spores/ml	Valeurs réelles	Valeurs prédites
1	5	55	22	1E+07	8037,77	7651,71
2	5	70	22	1E+06	8910	9531,25
3	3	70	26	1,9E+07	3435,5	4148,94
4	5	70	26	1E+07	6423,96	6669,09
5	7	70	30	1E+07	1461,82	1005,31
6	3	70	22	1E+07	3925,01	3250,96
7	5	85	26	1E+06	14037,1	13292,66
8	3	55	26	1E+07	4781,09	5725,87
9	5	70	30	1E+06	6412,79	6454,61
10	7	70	26	1E+06	5869,63	6456,87
11	7	85	26	1E+07	11287,8	10172,87
12	3	70	30	1E+07	5706,46	3956,52
13	7	70	22	1E+07	6891,12	7510,50
14	3	85	26	1E+07	7166,05	8261,40
15	5	85	26	1,9E+07	12566,3	11612,08
16	5	70	26	1E+07	7063,23	6669,09
17	5	70	22	1,9E+07	7912,61	7700,67
18	5	55	26	1,9E+07	8232,24	7846,07
19	7	55	26	1E+07	6388,2	5122,74
20	5	55	26	1E+06	9649,36	9473,00
21	5	55	30	1E+07	5462,83	6732,09
22	5	85	22	1E+07	13393,3	13424,73
23	7	70	26	1,9E+07	3363,97	4994,22
24	5	70	26	1E+07	6520,08	6669,09
25	5	85	30	1E+07	6858	8544,73
26	3	70	26	1E+06	6323,38	5993,81
27	5	70	30	1,9E+07	5769,05	4977,68

Résumé

Résumé

Les xylanases sont un groupes d'enzymes qui provoquent l'hydrolyse des hémicelluloses. Ils ont stimulé un grand intérêt dû à leurs larges applications industrielles et biotechnologiques.

Dans cette analyse, on a étudié la possibilité d'utiliser le son de blé comme substrat pour la production de xylanase par *Trichoderma* sp. dans des conditions de fermentation en milieu solide (FMS). Celle-ci a été optimisée pour varié les conditions de culture suivant l'approches (OFAT) et la méthode de réponse sur surface (RSM). Nos résultats ont montré que le temps d'incubation, l'humidité, la température et la charge de l'inoculum ont considérablement influencé la production de xylanase, l'optimum de ces paramètres sont respectivement de : 5 jours ,70 % , 26 °C et 10^7 spores /ml.

Des modèles statistiques expérimentaux sont utilisés pour sélectionner les paramètres influençant, et dans le but d'améliorer le rendement de production de xylanases. Les variables de l'analyse sont d'avantage étudié par la méthodologie de réponse sur surface selon la matrice de Box-Behnken. Les conditions optimal pour la production de xylanases ont été obtenus comme suit : temps de fermentation :6 jours, humidité : 85%, température d'incubation : 22 °C et la charge d'inoculum : $1,9 \times 10^7$, et l'activité de xylanases a augmenté de 8475.87 à 14766,28 U/ml.

La conception expérimentales s'est avéré être une méthode efficace pour obtenir des paramètres optimales pour la production d'enzyme.

Mots clés

Trichoderma sp, xylanases, son de blé, Fermentation sur milieu solide, OFAT, Réponse surface méthodologie, Box-Behnken.

Abstract

Xylanases are groups of enzymes that cause hydrolysis of hemicelluloses. They stimulated a great interest due to their large industrial and biotechnological applications.

In this analysis, we studied the possibility of using wheat bran as a substrate for the production of xylanase by *Trichoderma* sp in solid state fermentation (SSF). It was optimized for varied culture conditions using (OFAT) and response surface methodology approaches. Our results showed that the incubation time, the humidity, the temperature and rate of the inoculum have significantly influenced the production of xylanase, the optimum of these parameters are respectively: 5 days, 70%, 26 °C and 10^7 spore / ml. Experimental statistical models are used to improve the performance of xylanases, in order to select the parameters influencing.

The variables of the analysis are studied by the surface response methodology according to the Box-Behnken matrix. The optimal conditions for the production of xylanases were obtained as : fermentation time 6 days, humidity 85%, incubation temperature 22 °C and inoculums rate 1.9×10^7 spores/ml, xylanase activity increased from 8475.87 to 14766.28U/ml.

Experimental design has proven to be an effective method to obtain optimal parameters for enzyme production.

Keywords

Trichoderma sp, xylanases, wheat bran, Solide State Fermentation, OFAT, response surface methodology, Box-Behnken Desing.

ملخص

تعتبر الإنزيمات التي تعرف بالكزيلاناز من المحلات الهامة للسيلولوز و مشتقاته فهي ذات أهمية كبرى نظرا للتطبيقات الهامة على المستوى الصناعي.

في هذا التحليل ، تم بحث إمكانية استخدام نخالة القمح كركيزة لإنتاج الكزيلاناز بواسطة *Trichoderma* تحت ظروف التخمر الصلبة . إنتاج الكزيلاناز من طرف هذه العزلة تم تحسينه بتغيير شروط الزرع مستعملين تقنية عامل واحد في الوقت OFAT ، استجابة منهجية السطح RSM النتائج المحصل عليها أثبتت ان وقت التمديد درجة الرطوبة درجة الحرارة وكذا تركيز الكائنات المجهرية يؤثر بشكل هام على إنتاج الكزيلاناز الظروف الملائمة من بين الشروط المدروسة هي 5ايام 26 درجة وكذا 70% 10^7 spore/ ml ترتيبيا.

نماذج إحصائية تجريبية استعملت بهدف تحسين محصول الكزيلاناز و تحديد الشروط المؤثرة. متغيرات التحليل تمت دراستهن من خلال منهجية الاستجابة السطحية وفقاً لمصفوفة Box-Behnken الظروف الملائمة لإنتاج الكزيلاناز تم الحصول عليها كالتالي الوقت المستغرق للتخمر 6 ايام درجة الرطوبة 85 درجة الحرارة 22 تركيز الكائنات المجهرية 1.9×10^7 ، نشاط إنتاج الكزيلاناز ارتفع من 8475.87 الى 14766.28 و.ع/مل . التصميم التجريبي بشكل طريقة فعالة لتحديد الظروف الملائمة لإنتاج الإنزيمات.

الكلمات المفتاحية

الكزيلاناز، نخالة القمح، *Trichoderma* sp بوكس بنكن..، عامل واحد في الوقت، تخمر على وسط صلب، استجابة منهجية السطح