

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Biotechnologie microbienne



Réf :

Mémoire de fin de cycle
En vue de l'obtention du diplôme de Master

Thème

**Optimisation de la production d'enzymes
lignocellulolytiques de type fongique par
Fermentation solide**

Présenté par

Rafik KACI

Mouloud OURAMDANE

Soutenu le : **25 Juin 2023**

Devant le jury composé de :

Mme. SOUAGUI Samiha	M.C.B	Présidente
M. BETTACHE Azzeddine	Professeur	Encadreur
Mme. BOUCHERBA Nawel	Professeur	Examinatrice

Année universitaire : 2022 / 2023

Remerciements

Nos remerciements sincères vont, en premier lieu à notre encadreur Pr. Bettache A. pour avoir accepté d'encadrer le présent travail ainsi que pour sa disponibilité et son écoute.

Nous exprimons notre sincère gratitude à Mme. AZZOUZ Z. pour son aide précieuse, ses conseils et sa bienveillance.

Nous tenons d'adresser nos remerciements à M. AMGHAR Z. avec qui nous avons eu le plaisir de travailler et à toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) pour l'accueil favorable qui nous a permis d'accomplir nos missions pratiques.

Nous adressons nos remerciements à tous les enseignants et le personnel du département de Microbiologie, particulièrement à Mme BOUCHERBA N. et Mme SOUAGUI S. qui ont accepté d'évaluer le présent travail.

Enfin, un grand Merci à nos chères camarades de la promotion BM 2023 pour tous les bons moments passés ensemble.

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents qui m'ont toujours soutenu tout au long de mon parcours scolaire et universitaire. A mon frère Mazigh et mes sœurs, à mes amis et camarades.

Mouloud

A ma famille, mes amis,

*Merci d'être là pour moi, votre soutien et votre
présence rendent la vie plus joyeuse.*

Rafik

Liste des abréviations

ANOVA : Analysis of Variance.

BBD : Box-Behnken Design.

BG : β -Glucosidase.

CBM : Catalytic binding model.

CE : Carbohydrate Estérase.

CMC : Carboxymethyl cellulose.

DC : Déchets carton.

DNS : 3,5- acide dinitrosalicylique.

EO : Ecorce d'orange

EG : Endoglucanase.

FDP : Feuilles de palmier.

FMS : Fermentation en milieu solide.

GH : Glycoside hydrolase.

GO : Grignon d'olive.

kDa : Kilodalton.

LiP : Lignine peroxydase.

MnP : Manganase peroxydase.

MD : Milliard de dollar.

MW : Mendels et Weber.

OFAT: One factor at time.

PB : Paille de blé.

PDA : Potato- Dextrose- Agar.

pH : Potentiel d'hydrogène.

P-value : probability value.

rpm : Revolution par minute.

RSM : Response surface methodology.

UI : Unité internationale.

v/v : Volume /Volume.

w/v : Poids/volume.

3D : tridimensionnelle.

2D : Deux dimensions.

Liste des figures

Figure 1 : structure cellulaire et moléculaire de la biomasse lignocellulosique	2
Figure 2 : Structure moléculaire de la cellulose	3
Figure 3 : Représentation des différentes structures des hémicelluloses	4
Figure 4 : Les trois principaux monolignols qui donnent naissance à la lignine	5
Figure 5 : les différentes voies de la valorisation de la biomasse lignocellulosique	7
Figure 6 : Représentation schématique de l'action des cellulases sur la cellulose	8
Figure 7 : Les différents milieux de fermentation	19
Figure 8 : Images de la souche isolée sur milieu gélosé (PDA).	23
Figure 9 : Caractères microscopique	24
Figure 10 : Diagramme en barres des activités CMCases mesurées sur les cinq substrats du criblage	25
Figure 11 : Nuage de points des valeurs réelles et des valeurs prédites	30
Figure 12 : Représentations graphiques des effets linéaires sur l'activité endoglucanase	30
Figure 13 : Effet d'interaction entre le temps d'incubation et la température.	32
Figure 14 : Effet d'interaction entre le temps d'incubation et l'humidité.	32
Figure 15 : Effet d'interaction entre la temperature d'incubation et l'humidité.	33
Figure 16 : Effet d'interaction entre le temps d'incubation et le milieu d'humidification	33
Figure 17 : Effet d'interaction entre le temps d'incubation et la solution d'humidification	34
Figure 18 : Effet d'interaction entre l'humidité et la solution d'humidification.	34

Liste des tableaux :

Tableau I: Composition en pourcentage des composants lignocellulosiques dans diverses biomasses	6
Tableau II : Les différentes hémicellulases utilisées en industrie	9
Tableau III: Avantages et inconvénients de la fermentation sur milieu solide	13
Tableau IV: Les conditions opératoires du criblage sur les différents déchets	19
Tableau V : Les niveaux des paramètres choisis pour l'optimisation	20
Tableau VI : Matrice d'expériences Box-Behnken	21
Tableau VII: Résultats expérimentaux des 30 expériences réalisées.	26
Tableau VIII : Analyse de la variance et des paramètres statistiques du modèle	27
Tableau IX: Validation du modèle mathématique	28
Tableau X: Valeurs réelles et prédites par le modèle des activités endoglucanases.	29
Tableau XI : Paramètres statistique du modèle postulé	29
Tableau XII: Solutions proposées par le logiciel pour la détermination des conditions optimales	35

Table de matière

Remerciement

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION _____ 1

CHAPITRE I : Revue bibliographique

I- Bioraffinage lignocellulosique _____ 2

I-1 Biomasse lignocellulosique _____ 2

I-1-1 Cellulose _____ 3

I-1-2 Hémicellulose _____ 3

I-1-3 Lignine _____ 4

I-2 Déchets lignocellulosique _____ 5

I-3 Voies de valorisation de la lignocellulose _____ 6

II- Exploration des enzymes lignocellulolytique _____ 7

II-1 Cellulases _____ 7

II-2 Hémicellulases _____ 9

II-3 ligninases _____ 10

III- Biotechnologie fongique _____ 12

III-1 Les champignons filamenteux _____ 12

III-2 Fermentation sur milieu solide _____ 12

III-2-1 Avantages et inconvénients _____ 13

III-2-2 Paramètres contrôlés lors de FMS _____ 14

III-3 Optimisation de la production d'enzymes _____ 15

III-3-1 Notions sur le plan Box-Behnken _____ 15

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

I- Matériel biologique _____ 17

II- Observation des caractères cultureux et morphologiques _____ 17

III- Mise en œuvre de la FMS _____ 17

IV- Mesure de l'activité enzymatique _____ 18

V- Sélection de substrat de fermentation _____ 19

VI- Optimisation par Box-Behnken _____ 20

CHAPITRE III : Résultats et discussion

I- Identification de la souche _____ 23

II- Sélection de substrat de fermentation _____ 24

III- Optimisation par Box-Behnken _____ 26

IV- Conclusion et perspectives _____ 37

Références bibliographiques

Annexes

Résumé/Abstract

INTRODUCTION

Dans un contexte de crise environnementale causée par les activités humaines, notamment l'utilisation intensives des ressources naturelles et la production de gaz à effet de serre, la nécessité de lutter contre le changement climatique est de plus en plus pressante. Avec une population mondiale en constante augmentation, les besoins en énergie, en nourriture et en produits sont également en hausse, ce qui entraîne une pression toujours plus grande sur les ressources naturelles, notamment les ressources fossiles épuisables.

L'intégration des procédés biotechnologiques dans le bioraffinage offre une alternative durable aux industries qui dépendent des ressources non-renouvelables. En effet, en un siècle seulement, la biotechnologie industrielle a radicalement changé et s'est épanouie, passant d'une simple expérimentation de preuve de concept dans des Erlenmeyers à une industrie de plusieurs milliards de dollars produisant des mégatonnes de molécules utiles (**Cairns *et al.*, 2018**) ce succès est d'autant plus valorisée que les couts de production continuent de baisser grâce à l'utilisation de substrats moins onéreux comme les résidus agroindustriels ce qui augmente, non seulement la rentabilité des bioraffineries, mais stimule également la transition vers une économie circulaire, ce qui constitue donc un intérêt aussi bien économique qu'environnemental.

Bien que l'hydrolyse enzymatique ait démontré une efficacité élevée dans les processus de biotransformation, avec des taux de conversion dépassant 90%, cette approche est néanmoins confrontée à des contraintes liées au prix et au rendement de production des enzymes industrielles, d'où la nécessité de réduire les couts relatifs à leur production par l'optimisation des procédés de fermentation et par la substitution des substrats couteux par des substrats plus économiques (**Usmani *et al.*, 2021**). De ce fait, nous avons tenté, dans ce modeste travail, d'optimiser la production d'une enzyme cellulolytique (Endoglucanase) produite par une souche fongique en utilisant des résidus agro-industriels comme substrat dans une fermentation sur milieu solide.

Le présent travail a été réparti en trois chapitres :

Le premier chapitre se consacre à une revue de la littérature qui explore l'état actuel des connaissances sur le bioraffinage lignocellulosique, mettant en avant l'importance des champignons et de leurs enzymes dans ce processus, aussi bien l'importance de la fermentation en milieu solide vu les avantages qu'elle présente par rapport aux autres procédés de fermentation.

Le deuxième est consacré à la présentation du matériel utilisé et la méthodologie suivie dans la réalisation de cette étude.

Un dernier chapitre qui regroupe les résultats et la discussion des trois volets : étude et interprétation des résultats obtenus ; il s'en suivra une conclusion avec les perspectives à envisager dans le cadre de cette étude

Chapitre I

Revue Bibliographique

I-Le Bioraffinage lignocellulosique : Etat des connaissances et perspectives économiques

La bioraffinerie est un élément essentiel de la bioéconomie, définie par l'Agence internationale de l'énergie comme "une usine de production intégrée utilisant des matières premières de la biomasse pour produire une gamme de produits à valeur ajoutée" (Hassan *et al.*, 2019). Elle utilise principalement la biomasse lignocellulosique comme matière première pour produire, de manière durable, des produits tels que les biocarburants et d'autres produits chimiques de base (Usmani *et al.*, 2021).

En effet, le taux de production de la biomasse lignocellulosique est d'environ 2×10^{11} tonnes par an, dont seulement 3 % sont utilisés dans des domaines non alimentaires. En outre, sur la base du contenu énergétique, le coût des matières premières lignocellulosiques est beaucoup plus faible (environ 50 % de moins) que celui des autres matières premières (De Bhowmick *et al.*, 2018) ce qui rend cette matière première très intéressante d'un point de vue économique.

I-1 La biomasse lignocellulosique

La lignocellulose est le principal élément constitutif des parois cellulaires des plantes, et principalement composée de trois polymères : de cellulose, d'hémicellulose, et de lignine (Kumar *et al.*, 2009). Elle est considérée comme la source renouvelable de carbone la plus abondante de la planète et possède un grand potentiel en tant que matière première pour la production de nombreux produits industriels tels que les biocarburants, les produits chimiques et les biomatériaux. La résistance physique des cellules végétales est assurée par la cellulose, qui se présente sous forme de chaînes linéaires hautement ordonnées dans leur paroi. Pour sa part, la lignine hydrophobe et amorphe est responsable de leur résistance aux produits chimiques, notamment à l'eau, tandis que l'hémicellulose permet la liaison entre la cellulose et la lignine (Borrero-López *et al.*, 2022).

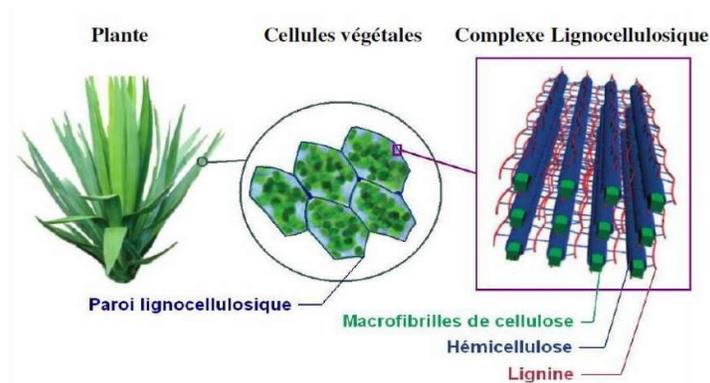


Figure 1 : structure cellulaire et moléculaire de la biomasse lignocellulosique (Zakzeski *et al.*, 2010)

I-1-1 La cellulose

La cellulose est le principal constituant structural des parois cellulaires des plantes, qui peut représenter jusqu'à 50 % de la masse totale (Eloutassi *et al.*, 2014). Elle est par ailleurs le polysaccharide le plus abondant sur terre. Ce polymère linéaire se présente sous la forme d'une structure fibreuse organisée, et constitué de sous-unités de D-glucose reliées entre elles par des liaisons glycosidiques de type β -1,4, le motif dimérique constitutif de la cellulose étant le cellobiose (Figure : 2) (Mogni, 2015). La cellulose dans la biomasse est présente à la fois sous une forme cristalline et amorphe. La cellulose cristalline représente la majeure partie de la cellulose, tandis qu'un petit pourcentage de chaînes de cellulose non organisées forme la cellulose amorphe, la forme sous laquelle la cellulose est la plus sensible à la dégradation enzymatique (Kumar *et al.*, 2009).

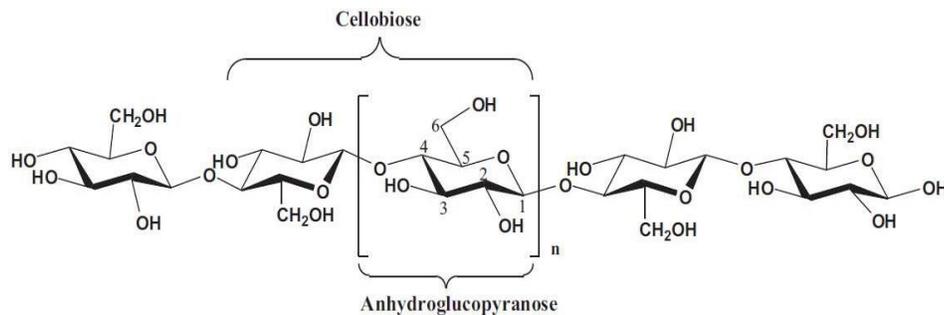


Figure 2 : Structure moléculaire de la cellulose (Mogni, 2015).

I-1-2 L'hémicellulose

L'hémicellulose est le second polymère de la biomasse lignocellulosique et constitue 10 à 30% de la matière sèche totale (Jourdiar, 2012).

Les hémicelluloses sont des polysaccharides hétérogènes avec une structure de chaîne principale liée par des liaisons β (1 \rightarrow 4) composée de sucres pentoses (C5) tels que le xylose et l'arabinose, ainsi que de sucres hexoses (C6) comprenant le mannose, le galactose et le glucose comme unités répétitives. La similarité structurale des hémicelluloses avec les liaisons β -1,4-glycosidiques de la molécule de cellulose favorise une homologie conformationnelle, ce qui peut conduire à une forte association non covalente avec les microfibrilles de cellulose. Le xyloglucane et le xylane sont les principales hémicelluloses de la biomasse végétale. Le xyloglucane est abondant dans la paroi primaire, l'oligosaccharide étant composé de xylose et de glucose avec diverses chaînes latérales.

Contrairement à la cellulose qui est cristalline et résistante à la dégradation, les hémicelluloses sont amorphes et donc facilement hydrolysées en sucres monomères. Cependant, les hémicelluloses sont

intégrées et interagissent avec la cellulose et la lignine, ce qui augmente significativement la résistance et la robustesse de la paroi cellulaire végétale (Gil, 2021).

On peut les classer en différents groupes qui sont représentés sur la Figure 3 ci-dessous :

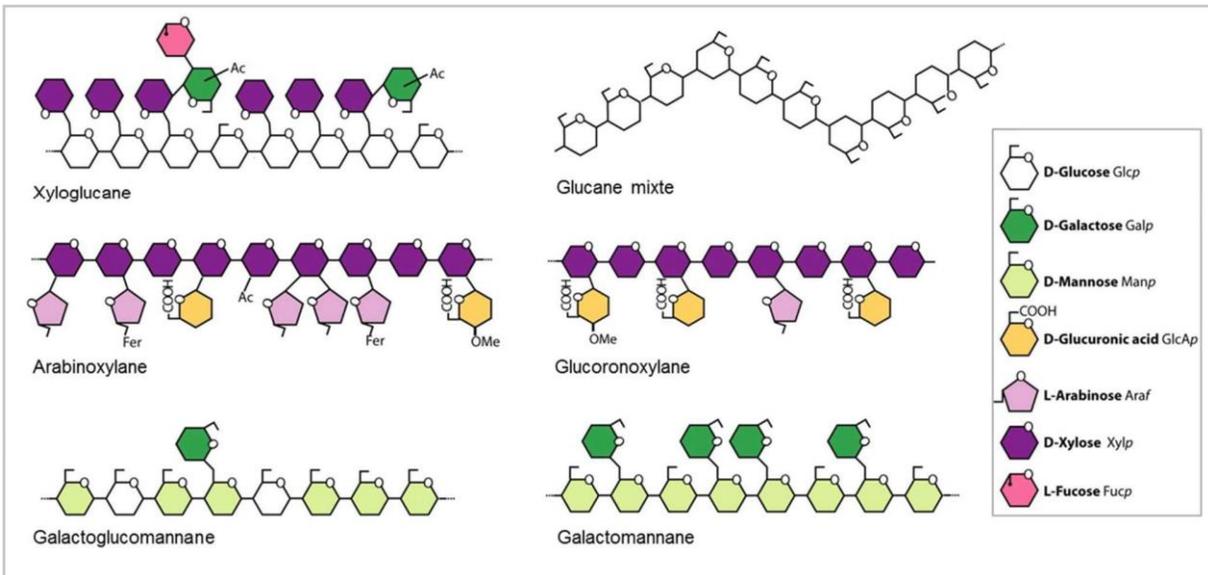


Figure 3 : Représentation des différentes structures des hémicelluloses (Chastel, 2019)

I-1-3 La lignine

Constitue 20 à 30%, les lignines sont des polymères phénoliques complexes et extrêmement résistants. Elles jouent un grand rôle dans la structure macroscopique de la plante, en lui conférant sa rigidité et son hydrophobicité (Jourdiar, 2012).

La lignine est généralement polymérisée à partir de trois précurseurs monomères phénylpropanoïdes : les alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique, qui sont aussi connus comme les monolignols (Fig. 4). Les trois monomères diffèrent par leur degré de méthylation des noyaux aromatiques. Leur complexité provient de l'association des trois monolignols par différentes liaisons chimiques sans caractère ordonné ni répétitif pour former un polymère amorphe et hydrophobe.

Les lignines offrent, de plus, une barrière de protection contre l'attaque microbienne du végétal. En effet, de par sa nature chimique, la lignine est très résistante à divers agents chimiques et à la dégradation biologique (Wertz *et al.*, 2015).

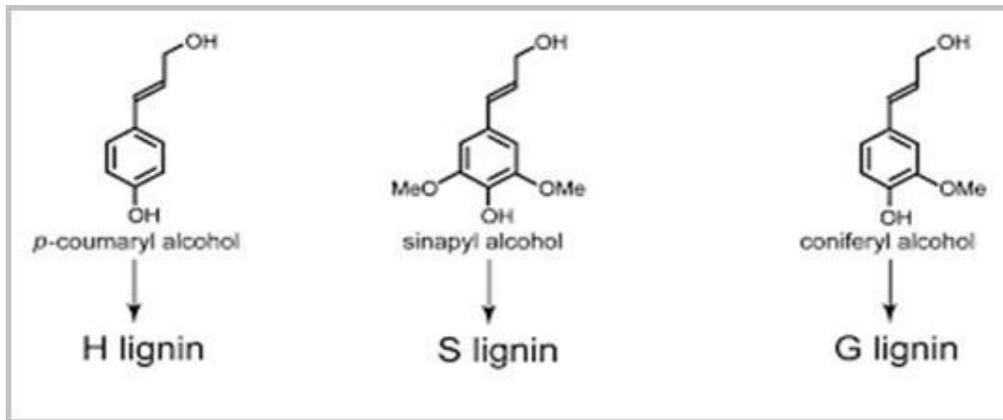


Figure 4 : Les trois principaux monolignols qui donnent naissance à la lignine (Wertz et al., 2015)

I-2 Déchets lignocellulosiques

Les activités agricoles, forestières et agro-industrielles génèrent principalement des tonnes de déchets lignocellulosiques chaque année (Chukwuma *et al.*, 2020). Une grande partie de cette biomasse reste inutilisée dans l'environnement. Souvent, son élimination devient une préoccupation pour divers pays. L'incinération est une pratique courante pour l'élimination des résidus agro-industriels, ce qui aggrave le problème de la pollution de l'environnement. Les biomasses lignocellulosiques ont fait l'objet d'un intérêt croissant de la part des chercheurs et ont acquis une importance particulière en raison de leur nature renouvelable. Par conséquent, les énormes quantités de biomasse lignocellulosique peuvent potentiellement être converties en différents produits à haute valeur ajoutée, notamment en biocarburants, en produits chimiques fins à valeur ajoutée et en sources d'énergie bon marché pour la fermentation microbienne et la production d'enzymes. (Anwar *et al.*, 2014)

Les sources de biomasses peuvent être classées en :

- Déchets forestiers : déchets produits par l'exploitation forestière.
- Déchets agricoles : paille de céréales, paille d'oléagineux, cannes de maïs, fumier, lisier...
- Les produits issus des industries agro-alimentaires comme la transformation des oléagineux, les déchets des fruits et des légumes, vins et distilleries des betteraves... (Ali, 2021).

En général, la composition de la lignocellulose dépend fortement de sa source. Le tableau I présente les compositions chimiques typiques dans divers matériaux lignocellulosiques dont la composition varie en raison de la variabilité génétique entre les différentes sources (Sharma and Saini, 2020).

Tableau I: Composition en pourcentage des composants lignocellulosiques dans diverses biomasses (**Sharma and Saini, 2020**)

Biomasse lignocellulosique	Cellulose (%)	Hémicellulose (%)	Lignine (%)
Paille de blé	35-45	20-30	15
Bagasse de canne à sucre	42.11	28.42	19.20
Canne de maïs	34.33	26.62	7.56
Paille d'orge	35-45	30-50	8-20
Tiges de bois dur	40-55	24-40	18-25
Tiges de résineux	45-50	25-35	25-35
Eucalyptus	54.10	18.40	21.50
Miscanthus	40	18	23
Le pin	42-50	24-27	20
Paille de riz	36-41	24-26.5	15.26- 23.30

I-3 Voies de valorisation de la lignocellulose

Il existe de nombreuses techniques de valorisation qui peuvent être utilisées pour produire plus de 200 produits biochimiques d'intérêt commercial à partir de la biomasse lignocellulosique. La figure 5 représente les différents bioproduits qui pourraient être dérivés de la biomasse lignocellulosique. Dans une bioraffinerie lignocellulosique, Les deux constituants majeurs de la biomasse lignocellulosique, la cellulose et l'hémicellulose, sont traités pour générer des sucres monomères qui peuvent être soumis à la fermentation pour obtenir des produits finaux utiles, tels que des produits biochimiques, du biogaz et des biocarburants (**Singh et al., 2022**).

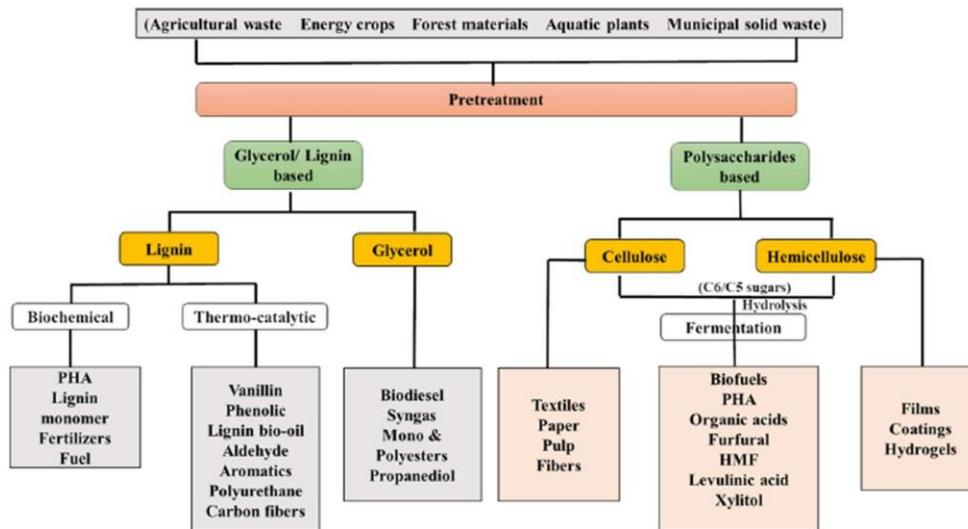


Figure 5 : les différentes voies de la valorisation de la biomasse lignocellulosique (Singh et al., 2022).

II- Exploration des Enzymes lignocellulolytiques

Les enzymes lignocellulolytiques sont des biocatalyseurs impliqués dans la décomposition de la lignine et des matériaux cellulosiques en leurs composants pour une hydrolyse ultérieure en produits utiles. Parfois appelées lignocellulases, elles comprennent des enzymes hydrolytiques qui dégradent la lignocellulose récalcitrante, un composant de la biomasse végétale. Des études montrent que les enzymes lignocellulolytiques peuvent être caractérisées comme un grand groupe de protéines principalement extracellulaires, qui comprennent les enzymes ligninolytiques (peroxydases et oxydases) et les enzymes hydrolytiques (cellulases et hémicellulases) (Chukwuma et al., 2020).

II-1 Les cellulases

Un grand nombre de recherches sur la séparation et la purification du système cellulase ont permis de déterminer que la cellulase est un système multi-enzyme composé de plusieurs éléments qui fonctionnent en synergie. Selon la spécificité du substrat et le site d'action, les cellulases sont principalement classées en : exo-B-1,4-glucanase, endo-1,4-glucanase (EG, EC 3.2.1.4), et B-1,4-glucosidase (BG, EC 3.2.1.21) (Chen, 2014).

II-1-1- Exo-B-1,4-glucanase (EC 3.2.1.91)

Les exoglucanases ou cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) constituent le principal composant du système cellulitique, représentant 40 à 70 % des cellulases. Les exoglucanases agissent de manière processive sur les extrémités réductrices ou non réductrices des chaînes de polysaccharides de la cellulose, libérant du glucose ou de la cellobiose comme produits principaux. Les exoglucanases peuvent également agir sur la cellulose microcristalline, probablement en détachant les chaînes de cellulose de

la structure microcristalline (El-Ahmady El-Naggar *et al.*, 2019).

II-1-2 Endo-B-1,4-glucanase (EG, EC 3.2.1.4)

L'endocellulase ou l'endoglucanase (EG) est une hydrolase qui représente environ 20 à 30 % des protéines dans la préparation de cellulase. Elle hydrolyse les régions non cristallines de la cellulose en rompant de manière irrégulière les liaisons glycosidiques β -1,4 pour former du glucose, de la cellobiose, de la cellotriose et des dextrans de fibres de différentes tailles. Cela crée davantage d'extrémités disponibles pour les enzymes cellulases. Elle est parfois appelée enzyme CMC (CMCase) car la plupart du CMC est utilisé comme substrat pour évaluer son activité. (Chen, 2014)

II-1-3 B-1,4-glucosidase (BG, EC 3.2.1.21)

La B-1,4-Glucosidase hydrolyse principalement la cellobiose et les résidus de glucose de l'extrémité non réductrice de la petite dextrine de cellulose pour produire du glucose. La vitesse d'hydrolyse de la BG augmente avec la diminution de la taille du substrat, et la cellobiose a la vitesse d'hydrolyse la plus élevée. Dans la préparation des enzymes, la teneur en protéines enzymatiques de la BG est plus faible que celle des autres composants de la cellulase, environ 1 % seulement (Chen, 2014).

Grâce à leurs différences de spécificité, ces trois types d'enzymes agissent de manière synergique sur la cellulose (Chastel, 2019), comme représenté sur la Figure 6.

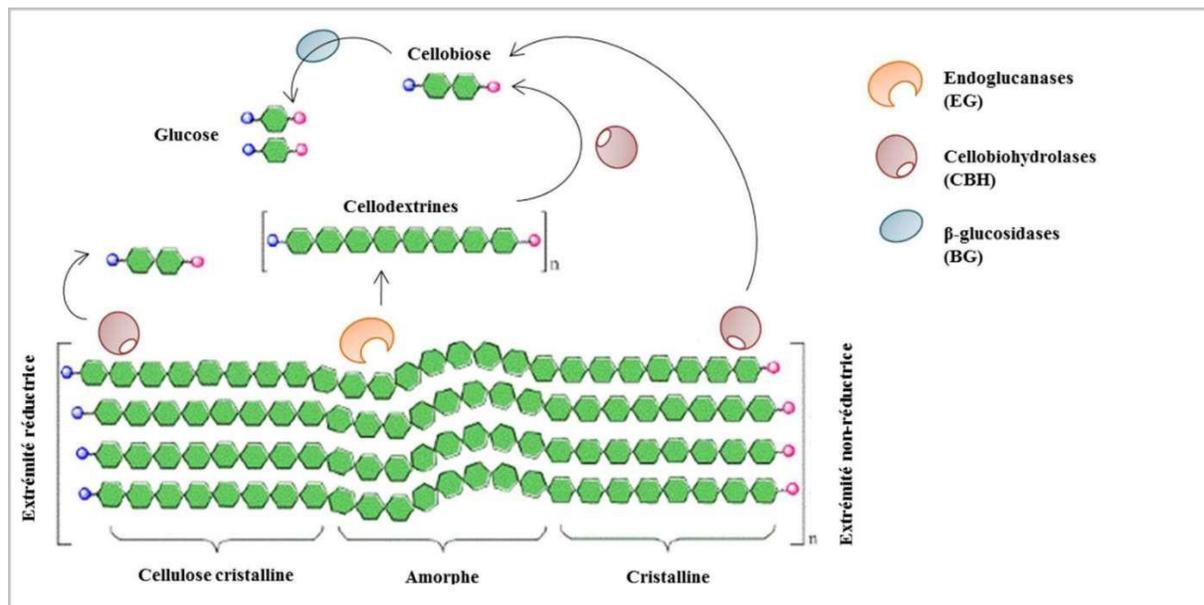


Figure 6 : Représentation schématique de l'action des cellulases sur la cellulose (Chastel, 2019)

II-2 Les hémicellulases

Les hémicellulases sont un groupe diversifié d'enzymes qui hydrolysent l'hémicellulose. La structure et l'organisation variables de l'hémicellulose nécessitent l'action concertée de nombreuses enzymes pour sa dégradation complète.

Les hémicellulases sont dotées, en plus de leurs domaines catalytiques, de modules de liaison aux glucides (CBM), qui facilitent la fixation des enzymes sur les polysaccharides insolubles, et les modules de dockerine qui interviennent dans la liaison des domaines catalytiques via des interactions cohésine-dockerine. Ces modules sont soit des glycosides hydrolases (GH) qui hydrolysent les liaisons glycosidiques, soit des glucide estérases (CE), qui hydrolysent les liaisons ester des groupes latéraux acétate ou acide férulique. Une classification basée sur l'homologie de la séquence primaire répartit ces modules en familles repérées par des numéros (par exemple GH7 pour la famille 7 des glycosides hydrolases). Certaines familles, avec une structure globalement similaire, peuvent être regroupées en clans, marqués par ordre alphabétique (par exemple GH-A) (Shallom & Shoham, 2003).

Tableau II : Les différentes hémicellulases utilisées en industrie (Wertz *et al.*, 2017)

Enzyme	Famille	Code de classification (EC)	Mécanisme d'action
β -Xylanase	GH 10, GH 11	EC 3.2.1.8	Hydrolyse les liaisons β - 1,4 du Xylan
β -Xylosidase	GH 52	EC 3.2.1.37	Hydrolyse le xylobiose
Glucanase	GH 16	EC 3.2.1.-	Hydrolyse les β -1,3 ; β -1,6 ; α -1,4 ; α -1,6 glucan
Mannanase	GH 26	EC 3.2.1.78	Hydrolyse les liaisons β -1,4 mannosidiques du mannane, galactomannane, glucomannane
Xyloglucan hydrolase	GH 12, GH 16	EC 3.2.1.150,151,155	Hydrolyse le xyloglucane (β -1,4 glucane lié au xylose en α -1,6).
Arabinofuranosidase	GH 43, GH 51, GH 54, GH 127	EC 3.2.1.55	Elimination des chaines d'arabinose liées à α -arabinofuranoside, arabinoxylanes, arabinogalactans.
Glucouronidase	GH 67, GH 79	EC 3.2.1.139	Elimination des glucuronoyl lié au xylane
Acetyl xylan esterase	CE 1, CE 5, CE 16	EC 3.1.1.72	Elimination des groupements acetyl du xylane et des autres xylooligosaccharides
Feruloyl esterase	CE 10	EC 3.2.1.73	Hydrolyse les esters feruloyl
Glucoronoyl esterase	CE 15	EC 3.2.1.-	Deméthylation du methyl glucoronoyl α -1,2 lié au xylose

II-3 Les ligninases fongiques

Selon (Wertz *et al.*, 2017), les champignons dégradent la lignine en sécrétant des enzymes appelées collectivement ligninases ou enzymes modifiant la lignine. Les principales ligninases sont :

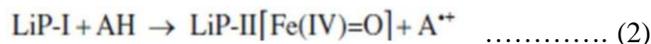
- La lignine peroxidase (LiP).
- La manganèse peroxidase (MnP).
- Les Peroxidases polyvalentes.
- Les Laccases.

En plus des peroxydases et des laccases, les champignons produisent d'autres oxydases accessoires telles que l'aryl-alcool oxydase et la glyoxal oxydase, qui génèrent le peroxyde d'hydrogène requis par les peroxydases. Ces enzymes dégradant la lignine ont attiré l'attention pour leurs précieuses applications biotechnologiques, notamment dans le prétraitement de la biomasse lignocellulosique récalcitrante pour la production de biocarburants. L'utilisation d'enzymes dégradant la lignine a été étudiée dans diverses applications telles que l'industrie du papier, l'industrie textile, le traitement des eaux usées et la dégradation des herbicides.

II-3-1 La lignine peroxidase

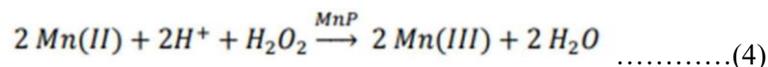
La lignine peroxydase est une enzyme contenant de l'hème qui catalyse la dégradation oxydative de la lignine en présence du peroxyde d'hydrogène. La LiP est une glycoprotéine d'un poids moléculaire moyen de 38-46 kDa. Les lignine peroxydases oxydent les substrats lors de transferts d'électrons en plusieurs étapes et forment des radicaux intermédiaires, tels que des radicaux phénoxy et des cations radicalaires d'alcool vératrylique non phénolique (Suryadi *et al.*, 2022).

Généralement, le cycle catalytique de ces enzymes est divisé en trois étapes : une première oxydation (eq 1), suivie de deux étapes de réduction (eq.2) et (eq.3) (Nargotra *et al.*, 2023) et (wertz *et al.*, 2017).



II-3-2- La manganèse peroxydase

Il s'agit d'un groupe hémique d'enzymes extracellulaires produites par le groupe de champignons basidiomycètes responsables de la dégradation de la lignine. Contrairement aux autres peroxydases, la MnP utilise le Mn^{2+} , qui est omniprésent dans toutes les lignocelluloses et dans le sol, comme donneur d'électrons pour générer le Mn^{3+} selon l'équation suivante :



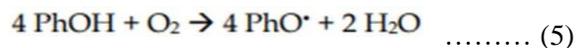
Le Mn^{3+} généré joue un rôle important dans l'oxydation de divers composés phénoliques en agissant comme médiateur (Yadav et al., 2019) et (Hofrichter, 2002)

II-3-3- Les Peroxydases versatiles

Les peroxydases polyvalentes (VPs ; EC 1.11.1.16) combinent les caractéristiques de spécificité du substrat des deux autres peroxydases ligninolytiques (LiP et MnP). Contrairement à ces deux enzymes, elle peut oxyder des substrats phénoliques et non phénoliques, y compris l'alcool vératrylique, les méthoxybenzènes et les composés modèles de la lignine (Andlar et al., 2018).

II-3-4- Laccases

La laccase est une oxydoréductase appartenant aux oxydases multinucléaires contenant du cuivre omniprésent dans tous les règnes, des plantes aux champignons et même dans les bactéries. Elle fut l'une des premières enzymes isolées et décrites, et ce chez l'arbre à laque japonias *Rhus vernicifera*. Les champignons sont les principaux producteurs de laccase, en particulier les champignons du groupe basidiomycètes. Les laccases catalysent l'oxydation monoélectronique des substrats aux dépens de l'oxygène moléculaire selon l'équation suivante (Virk et al., 2012) et (Rakotoveloa, 2016).



III- La Biotechnologie fongique

Au cours des dernières décennies, le marché mondial des enzymes a connu une croissance rapide. Il était évalué à 7,082 MD en 2017 et devrait atteindre 10,519 MD en 2024, soit un taux de croissance annuel composé de 5,7 % entre 2018 et 2024 (**Satyanarayana et al., 2019**).

La biotechnologie fongique est un contributeur majeur et un moteur de ce succès dans la mesure où, sur les quelques 260 enzymes commerciales, 60 % proviennent d'environ 25 genres fongiques. Le plus dominant parmi les micro-organismes est le genre *Aspergillus*, qui représente environ 25 % du total des enzymes industrielles. Les enzymes provenant de *Trichoderma*, *Penicillium*, *Rhizopus* et *Humicola* représentent encore 20 % des enzymes industrielles. De plus, le marché des enzymes fongiques dégradant les plantes en 2016 était estimé à 4,7 milliards d'euros, et devrait atteindre 10 milliards d'euros au cours de la prochaine décennie. (**Cairns et al., 2018**) et (**Satyanarayana et al., 2019**).

III-1 Les champignons filamenteux

Ces organismes jouent un rôle vital dans le recyclage de la matière organique. Avec plus d'un million d'espèces différentes, les champignons représentent un royaume extrêmement diversifié sur les plans morphologique, physiologique et écologique. Les champignons filamenteux se distinguent par un mycélium composé d'hyphes septés ou de filaments ramifiés divisés en sections distinctes (**Troiano et al., 2020**). La diversité métabolique et écophysologique des champignons en fait un outil précieux pour leur utilisation dans les bioraffineries. En effet, les champignons filamenteux ont la capacité de produire de manière extracellulaire une grande variété d'enzymes non spécifiques et spécifiques capables de décomposer la lignine, la cellulose et l'hémicellulose (**Harirchi et al., 2023**).

III-2 Fermentation sur milieu solide FMS

La fermentation en milieu ou en phase solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelles des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux (**Prevot, 2013**). Elle implique la croissance contrôlée de ces microorganismes sur des substrats solides humides et insolubles dans l'eau, en l'absence ou la quasi-absence de liquide libre, où les champignons, les levures et les bactéries sont largement utilisés pour produire des enzymes. Les champignons filamenteux ont été préférés aux bactéries pour la production de cellulase en raison de leur grande capacité à produire des enzymes extracellulaires complexes et à se développer à la surface du substrat en l'absence d'eau libre (**Manuel et al., 2022**).

Le développement des champignons filamenteux en FMS se fait par extension et ramification des

filaments formant le mycélium. Après l'inoculation d'un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. A partir de ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules (de la matrice solide). Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Pour finir, les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (Prevot, 2013).

III-2-1 Avantages et inconvénients de la fermentation solide

La fermentation en milieu solide (FMS) présente des avantages et des inconvénients récapitulés dans le tableau 3 :

Tableau III: Avantages et inconvénients de la fermentation sur milieu solide (Assamoi et al., 2009) et (Thomas et al., 2013).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Moindre risque de contamination : La faible teneur en humidité empêche la contamination bactérienne. En effet, la majorité des bactéries nécessitent des taux d'humidité élevés pour survivre. • Flexibilité du substrat : La fermentation en milieu solide permet d'utiliser une grande variété de substrats solides, qui sont des résidus agro-industriels peu coûteux comme source de carbone. Cela permet de valoriser des matériaux qui seraient autrement gaspillés • Moindre consommation d'eau. Cela en fait une option plus écologique, car elle réduit la consommation d'eau et la production d'eaux usées. • Concentration élevée des produits : La FMS peut entraîner une concentration plus élevée des produits finaux, tels que les enzymes ou les métabolites, par rapport aux méthodes de fermentation liquide. 	<ul style="list-style-type: none"> • Les microorganismes utilisés sont limités. En effet, seuls les microorganismes se développant bien aux basses humidités peuvent être employés. • Les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur milieux solides sont faibles. • Les problèmes de transfert d'oxygène et de chaleur rendent difficile l'augmentation d'échelle des procédés. En effet, la faible quantité d'eau ralentit les échanges de chaleur, pouvant créer des problèmes de surchauffe lorsque des masses importantes sont mises en fermentation • Il est difficile d'assurer une distribution homogène du milieu de culture. Ce qui rend le contrôle des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration des nutriments, assez aléatoire. • La nature solide et hétérogène des substrats utilisés complique le suivi direct des paramètres de fermentation. Les sondes utilisées en fermentation liquide ne sont pas utilisables. • Difficulté d'extraction de métabolites.

III-2-2 Paramètres contrôlés lors d'une FMS

Les conditions de fonctionnement de la FMS, telles que la composition du milieu de fermentation, la durée de la fermentation, le pH, la température et l'humidité du substrat, peuvent affecter la production de cellulase. Il existe une relation directe entre les conditions de fonctionnement et le titre de cellulase obtenu. Par conséquent, une gamme appropriée de conditions de fonctionnement doit être sélectionnée avec soin pendant la fermentation en milieu solide (Yoon, 2014).

a- Humidité

L'humidité est un paramètre important pour la culture des champignons dans des conditions de SSF. Le niveau d'humidité dépend du type d'organisme et des propriétés de sorption du substrat utilisé pour la culture, principalement la capacité de fixation de l'eau. L'augmentation de l'humidité réduit le transfert d'oxygène, ce qui ralentit la croissance des champignons à une profondeur de 1 à 5 cm de la surface du substrat. Les niveaux d'humidité idéaux pour la croissance des champignons filamenteux se situent entre 60 et 90 % (Chmelová *et al.*, 2022).

b- Température

La température de croissance microbienne est également un paramètre très important pour contrôler la FMS. En général, la FMS est réalisée par des micro-organismes mésophiles, et les champignons, en particulier, peuvent survivre dans une large gamme de températures allant de 20 à 55°C. Un contrôle optimal de la température des micro-organismes permettra d'obtenir un produit maximal, car les microorganismes fonctionnent mieux à leur température optimale (Srivastava *et al.*, 2019).

c- pH

Le pH est ajusté au début de la fermentation et les variations de celui-ci au cours de la fermentation ne sont normalement pas prises en compte. Le pH peut varier légèrement et cette variation est liée aux activités métaboliques des champignons. En général, un pH initial d'environ 5 est préférable pour la production de cellulase par la plupart des champignons. Il convient de noter que la plupart des substrats lignocellulosiques ont une propriété tampon qui leur permet de minimiser la variation du pH au cours de la FMS. En raison de ces facteurs collectifs, il n'est pas rare que la production de cellulase soit réalisée sans ajustement initial du pH (Yoon, 2014).

d- Nutrition

Les besoins en nutriments des micro-organismes au cours de la SSF sont également un paramètre important. Les macro-éléments et les microéléments régulent et améliorent les activités métaboliques des micro-organismes pendant le processus de fermentation. Outre une source de carbone, ces éléments comprennent des sources d'azote, des minéraux et des vitamines ou

cofacteurs. Parmi les macronutriments, les sources d'azote comprennent principalement l'ammonium, le sulfate, le nitrate, le chlorure, le nitrate de sodium, l'urée, les peptones et les acides aminés. En outre, les micronutriments tels que Na^+ , Ca^{2+} , Ni^+ , Cu^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} et Mo^{2+} sont utilisés pour la croissance microbienne avec quelques composés organiques tels que la thiamine, la biotine et l'acide folique, qui peuvent fonctionner comme cofacteurs pour améliorer la croissance microbienne (**Srivastava et al., 2019**).

III-3 Optimisation de la production d'enzymes

Dans le but de réduire le coût de production des enzymes à l'échelle industrielle, les paramètres physiques et chimiques affectant la croissance cellulaire ainsi que la production d'enzymes sont contrôlés et optimisés par un certain nombre d'expériences. La méthode conventionnelle d'optimisation faisant varier une variable à la fois (OFAT) tout en gardant les autres variables constantes est un processus qui prend du temps et qui est moins fiable dans de nombreux cas. Pour surmonter ce problème, des approches statistiques utilisant des plans d'expérience sont appliquées. La méthodologie de la surface de réponse (RSM) est l'application statistique la plus fiable qui a été utilisée pour l'optimisation des milieux de fermentation. Ces approches permettent aussi d'évaluer l'interaction entre les facteurs physiologiques et nutritionnels affectant la croissance cellulaire et la formation du produit (**Gupta et Tuohy, 2016**).

III-3-1 Notions sur le Plan Box Behnken design

Parmi les différents plans RSM, le plan de Box-Behnken (BBD) est considéré comme très utile pour établir la relation de cause à effet entre les facteurs étudiés et les réponses. Il a été mis au point par George E.P. Box et Donald Behnken en 1960 pour optimiser les facteurs d'influence impliqués dans les expériences en se basant sur les trois conditions suivantes (**Beg et Akhter, 2021**) :

- Chaque facteur ou variable indépendante doit comporter trois niveaux (-1, 0, +1).
- Le plan se concentre sur l'établissement d'un modèle quadratique avec des effets d'interaction.
- Le rapport entre le nombre de points expérimentaux et le nombre de coefficients doit être le plus faible possible.

Le nombre d'expériences (N) nécessaires pour établir un plan BBD est donné par :

$$N = 2k(k - 1) + C_0$$

Où k est le nombre de facteurs et C_0 le nombre de points centraux. Tous les facteurs ont trois niveaux : $-1, 0$ et $+1$. Ces plans sont faciles à mettre en oeuvre et possèdent la propriété de séquentialité (**Goupy, 2006**). De plus, Une comparaison entre le BBD et d'autres plans de surface de réponse (plan composite central, matrice de Doehlert et plan factoriel complet à trois niveaux) a démontré que le BBD et la matrice de Doehlert sont légèrement plus efficaces que le plan composite central, mais beaucoup plus efficaces que les plans factoriels complets à trois niveaux, où l'efficacité d'un plan expérimental est définie comme le nombre de coefficients dans le modèle estimé divisé par le nombre d'expériences (**Ferreira et al., 2007**).

Le modèle postulé dans un plan BBD peut s'écrire sous la forme :

$$Y = \beta_0 + \sum_i^n \beta_i X_i + \sum_i^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_i^n \sum_j^n \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Y : La réponse

β_0 : Le terme constant

β_i : Effets des termes des effets linéaires

β_{ij} : Correspond aux termes des effets d'interactions

β_{ii} : Effets quadratiques

Chapitre II

Matériel et Méthodes

I- Matériel biologique

L'isolat RM09, procuré au laboratoire de microbiologie appliquée (LMA), a été isolé dans un pressoir d'huile d'olive situé dans la commune de Feraoun, Wilaya de Bejaïa et a été maintenu sur Gélose PDA avec un repiquage chaque 10 jours. Le repiquage s'est effectué par transfert d'implant (cylindre d'agar) d'une culture ancienne vers une nouvelle boîte puis celle-ci est incubée à 28°C.

II- Observation des caractères cultureux et morphologiques

L'identification des moisissures repose sur l'examen des critères cultureux et morphologiques en se basant sur une observation macroscopique et microscopique de l'espèce.

II-1 Observation macroscopique

L'étude macroscopique consiste à observer à l'œil nu la texture et la couleur des colonies ainsi que l'aspect et la couleur des spores. L'isolat est incubé à 28°C pendant 7 à 10 jours sur milieu PDA et la croissance a été suivie en mesurant le diamètre des colonies.

II-2 Observation microscopique

L'identification microscopique se base sur l'observation de caractéristiques morphologiques telles que l'aspect du mycélium et la structure des conidiophores. L'observation est effectuée à l'aide d'un microscope optique (**Euromex iScope**) en utilisant la méthode du scotch. Cette méthode consiste à appliquer un ruban adhésif (Scotch) sur l'extrémité des colonies afin de prélever des filaments mycéliens. Le ruban est par la suite étalé sur une lame et une observation à l'objectif 40 (G×40) est effectuée pour visualiser les caractères microscopiques de la souche.

III- Mise en œuvre de la fermentation en milieu solide (FMS)

III-1 Substrats de fermentation

III-2 III-1-1 Préparation

Cinq substrats, qui constituent des résidus agro-industriels, sont procurés de divers endroits de la Wilaya de Bejaïa. Ces substrats : paille de blé, feuilles de palmier, écorces d'agrumes, déchets carton et grignon d'olive ont été lavés, séchés au four (60°C pendant 24h), broyés, tamisés pour obtenir des particules du même diamètre puis stockés à température ambiante dans des récipients étanches à l'air.

III-1-2 Mesure de l'humidité

L'humidité des substrats a été mesurée, juste avant la réalisation de la fermentation, à l'aide d'un dessiccateur. L'humidité est définie comme le rapport entre la masse de l'eau contenue dans le substrat et la masse totale :

$$H(\%) = \frac{P_0 - P_{SEC}}{P_0} \times 100$$

P_0 : Poids frais

P_{SEC} : Poids sec

III-3 Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé en inondant les boîtes cultivées par une solution stérile de Tween 80 à 1 % (v/v), à raison de 5 ml par boîte. Grâce à sa propriété émulsifiante, le Tween 80 empêche la formation des agrégats de spores et permet ainsi une bonne dispersion de celles-ci. Les mycéliums ont été délicatement grattés à l'aide d'un raton pour libérer les spores dans la solution. Ensuite, la suspension a été recueillie et conservée à 4 °C en vue de l'inoculation. Un échantillon de 10 µl a été prélevé et dilué dans un tube à essai afin de compter le nombre de spores sous microscope optique dans une cellule de Malassez.

III-4 Déroulement des fermentations

Les fermentations solides ont été réalisées dans des Erlenmeyers de 500 ml à raison de 10g de substrat par Erlen. Ensuite, l'humidité a été ajustée par l'ajout d'une solution d'humidification (Eau distillée/Solution de Mendels et Weber) de manière à atteindre le niveau requis (70% durant le criblage ; Pour l'optimisation les différents niveaux sont fournis par le logiciel statistique « Design Expert »), par la suite les Erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé, recouverts avec du papier aluminium et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, les milieux de culture ont été inoculés par l'ajout de 900 µl de solution sporale (dont la charge sporale a été estimée à 1.1×10^8 spores/ml) afin d'obtenir une charge de 10^7 spores par gram de substrat, puis homogénéisés à l'aide d'une spatule stérile. Enfin, les milieux sont incubés à des températures et des durées bien déterminés.

III-5 Extraction

A la fin de la fermentation, le contenu de chaque Erlenmeyer a été additionné de 100 ml d'eau distillée puis agité à 250 rpm pendant 30 min. Par la suite, le milieu a été filtré par papier Whatman n° 1 puis centrifugé à 10000 rpm dans une centrifugeuse (**Rotina 380R**) pendant 15 min à 4°C. Le surnageant a été analysé pour la quantification de l'activité endoglucanase (CMCase).

IV- Mesure de l'activité enzymatique

L'activité endoglucanase (ou CMCase) a été déterminée en suivant la méthode de Ghose modifiée (**Ghose, 1987**) en utilisant 1% (w/v) de CMC, préparé dans un tampon de citrate de sodium (50 mM, pH 5,0). Le mélange réactionnel, contenant 50 µl d'extrait enzymatique dilué et 450 µl de substrat, a été

incubé à 50°C pendant 10 min. La réaction a été stoppée par l'ajout de DNS suivi d'une ébullition à 100°C pendant 5 min (Miller, 1959). L'absorbance a été lue à 540 nm à l'aide du spectrophotomètre (Shimadzu UV-mini 1240). Les quantités de sucres réducteurs libérés ont été quantifiées en utilisant la courbe d'étalonnage du glucose.

L'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 µmole de sucre réducteur par minute dans les conditions de l'essai. Elle est exprimée en unités internationale par millilitre (U/ml).

V-Sélection du substrat de fermentation :

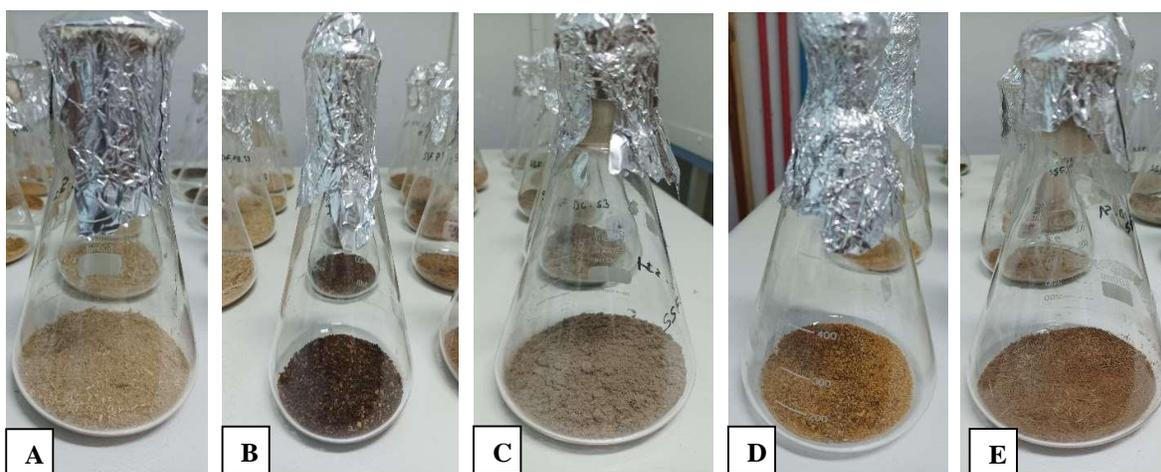


Figure 7 : Les différents milieux de fermentation. **A)** Paille de blé ; **B)** Grignon d'olive, **C)** Déchets carton, **D)** Ecorces d'orange, **E)** Feuilles de palmier.

Les cinq substrats ont fait l'objet d'une sélection qui vise à sélectionner le meilleur substrat pour l'optimisation, de ce fait, 5 fermentations ont été réalisées dans les conditions standards suivantes (Tableau IV) :

Tableau IV: Les conditions opératoires du criblage sur les différents déchets

N°	Substrat	Quantité de substrat	Taille d'inoculum	Humidité	Température	Temps d'incubation
1	Grignon d'olive	10g	10 ⁷ spores/g	70%	28°C	7 jours
2	Ecorces d'agrumes					
3	Déchets carton					
4	Paille de Blé					
5	Feuilles de Palmier					

VI- Optimisation par plan Box-Behnken

Un plan Box-Behnken (BBD) a été utilisé pour étudier l'influence des paramètres physiques les plus importants tels que le temps d'incubation (A), la température d'incubation (B) et le taux d'humidité (C), ainsi que la solution d'humidification (D) sur la production des endoglucanases et pour trouver la combinaison la plus appropriée de ces variables opérationnelles permettant d'obtenir une production maximale d'enzyme. Les niveaux des facteurs ont été choisis par rapports aux résultats cités dans la littérature.

Tableau V : Les niveaux des paramètres choisis pour l'optimisation

Facteur	Nom	Unité	Type	Niveau inférieur (-1)	Niveau supérieur (+1)	Centre (0)
A	Temps d'incubation	Day	Quantitatif	4,00	10,00	7,00
B	Température	°C	Quantitatif	24,00	32,00	28,00
C	Humidité	%	Quantitatif	45,00	95,00	70,00
D	Milieu d'humidification	/	Qualitatif	Eau distillée	Solution minérale	/

La matrice BBD (Tableau VI) est générée en variant les trois facteurs à trois niveaux, 30 essais sont proposés y compris cinq répétitions au point central, et ont été utilisés pour évaluer les effets linéaires et d'interaction des facteurs, ainsi que pour ajuster un modèle du second ordre avec des termes quadratiques. Les facteurs A, B, C et D ont été considérés comme des variables indépendantes et l'activité endoglucanase (Y) est la réponse (variable dépendante). Les niveaux, inférieur, moyen et supérieur des variables quantitatives ont été codés respectivement en tant que -1, 0 et +1. Les valeurs codées et réelles sont indiquées dans le Tableau 5.

Le facteur D (Solution d'humidification) étant un facteur qualitatif nominatif, son intégration dans l'équation de régression nécessite qu'il soit annoté de variables numériques correspondant aux niveaux supérieur et inférieur. Ainsi, les valeurs discrètes -1 et +1 sont attribuées aux modalités « Eau distillée » et « Solution minérale » respectivement. Quant aux autres facteurs numériques, le passage d'une variable réelle vers une variable codée se fait par la relation du codage :

$$X_i = \frac{Z_i - Z_0}{\Delta Z_i}$$

X_i Variable codée

Z_i Variable réelle

Z_0 Centre du domaine

ΔZ_i Le pas

Tableau VI : Matrice d'expériences Box-Behnken en variables réelles et codées. (* points centraux)

	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4
Essai	A : Temps d'incubation	B : Température d'incubation	C : Humidité	D : Solution d'humidification
	Day	°C	%	/
1	10 (+1)	32 (+1)	70 (0)	Eau distillée (-1)
2	7 (0)	24 (0)	45 (-1)	Eau distillée (-1)
3	4 (-1)	28 (0)	45 (-1)	Eau distillée (-1)
4*	7 (0)	28 (0)	70 (0)	Solution minérale (+1)
5*	7 (0)	28 (0)	70 (0)	Eau distillée (-1)
6	4 (-1)	28 (0)	45 (-1)	Solution minérale (+1)
7*	7 (0)	28 (0)	70 (0)	Solution minérale (+1)
8	7 (0)	24 (-1)	95 (+1)	Eau distillée (-1)
9	7 (0)	32 (+1)	95 (+1)	Solution minérale (+1)
10	7 (0)	32 (+1)	45 (-1)	Solution minérale (+1)
11	10 (+1)	28 (0)	95 (+1)	Eau distillée (-1)
12	10 (+1)	24 (-1)	70 (0)	Solution minérale (+1)
13*	7 (0)	28 (0)	70 (0)	Eau distillée (-1)
14	10 (+1)	32 (+1)	70 (0)	Solution minérale (+1)
15	4 (-1)	32 (+1)	70 (0)	Solution minérale (+1)
16	4 (-1)	24 (-1)	70 (0)	Solution minérale (+1)
17	7 (+1)	24 (-1)	45 (-1)	Solution minérale (+1)
18	4 (-1)	28 (0)	95 (+1)	Solution minérale (+1)
19	10 (+1)	28 (0)	45 (-1)	Eau distillée (-1)
20	4 (-1)	32 (+1)	70 (0)	Eau distillée (-1)
21	7 (0)	24 (-1)	95 (+1)	Solution minérale (+1)
22	4 (-1)	28 (0)	95 (+1)	Eau distillée (-1)
23	7 (0)	32 (+1)	95 (+1)	Eau distillée (-1)
24*	7 (0)	28 (0)	70 (0)	Solution minérale (+1)
25	10 (+1)	24 (-1)	70 (0)	Eau distillée (-1)
26	7 (0)	32 (-1)	45 (-1)	Eau distillée (-1)
27	10 (+1)	28 (0)	95 (+1)	Solution minérale (+1)
28	10 (+1)	28 (0)	45 (-1)	Solution minérale (+1)
29	4 (-1)	24 (-1)	70 (0)	Eau distillée (-1)
30*	7 (0)	28 (0)	70 (0)	Eau distillée (-1)

L'équation polynomiale du second ordre suivante a été adoptée pour étudier les effets des variables sur la réponse avec :

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_4X_4 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{44}X_4^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{14}X_1X_4 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{34}X_3X_4 + \beta_{24}X_2X_4$$

Où Y est la réponse (activité endoglucanase), β_0 est le terme constant ; $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ et β_4 sont les coefficients des effets linéaires ; $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ et β_{44} sont les coefficients des effets quadratiques ; β_{12}, β_{13} et $\beta_{14}, \beta_{23}, \beta_{34}, \beta_{24}$ sont les coefficients des effets d'interactions respectivement. Cette équation ne peut s'exprimer qu'en fonction des variables codées X_1, X_2, X_3 et X_4 correspondant aux variables réelles A, B, C et D respectivement. Et ce, en raison de l'intégration du facteur qualitatif D dont les valeurs réelles sont des catégories (Eau distillée ou solution minérale).

VI-1 Analyse statistique

Le niveau de signification statistique du modèle généré et des coefficients de régression a été évalué par l'analyse de variance (ANOVA, $p < 0.05$). La qualité d'ajustement de l'équation a été évaluée par le coefficient de détermination (R^2), le coefficient de détermination ajusté (R^2 -adj) et le test d'absence d'ajustement (Lack of fit) a été effectué pour la recherche de biais et la validation du modèle. Le logiciel Design expert 11 a été utilisé pour l'analyse des données et la création des graphiques.

Chapitre III

Résultats et Discussion

I- Identification de la souche

En s'appuyant sur les critères d'identification rapportés par (Quatresous, 2011; Campbell and Johnson, 2013; Makhoulf, 2019), la souche utilisée dans le présent travail a été identifiée au niveau de l'espèce en se basant principalement sur les caractères macroscopiques et microscopiques.

I-1- Caractères macroscopiques

Les cultures de la Souche sur milieu PDA à 28°C donnent des colonies rondes, plates, formées de courts filaments aériens de couleur initialement blanche et qui prennent une teinte noire après la sporulation, conférant ainsi une texture granuleuse à la colonie.

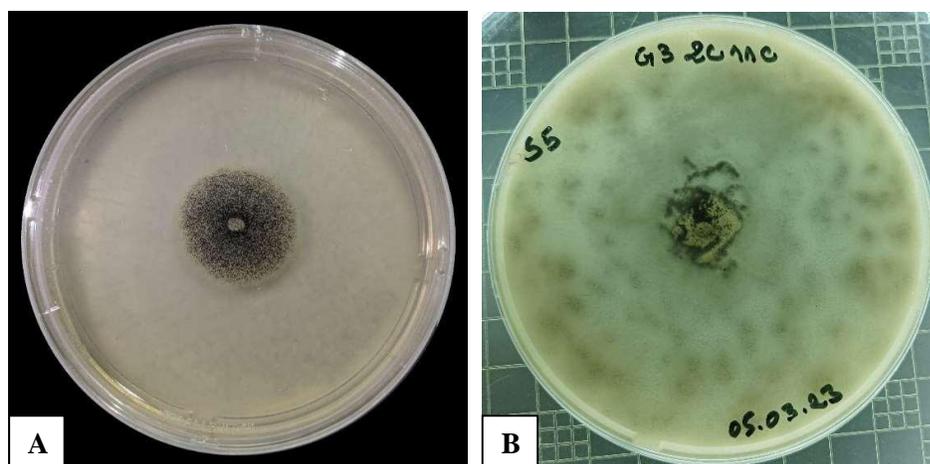


Figure 8 : Images de la souche isolée sur milieu gélosé (PDA).
A) Recto de la boîte, B) Verso de la boîte.

La sporulation a lieu après 48h. Les spores, de couleur noire, présentent une certaine hydrophobicité et sont pulvérulente, facilement disséminées par l'air. La souche exhibe une vitesse de croissance relativement lente atteignant un diamètre de 3.5 cm au bout de 72 h et envahit la moitié de la boîte (de 90 mm de diamètre) dans une période de 96h.

Le verso de la boîte montre une couleur jaune pâle. Cette couleur s'accroît d'autant plus que la colonie vieillit et occupe toute la boîte.

I-2- Caractères microscopiques

L'observation microscopique de la souche montre les caractères typiques de *Aspergillus niger*. En effet, le thalle est constitué de filaments hyalins septés portant de longs conidiophores qui présentent une paroi épaisse hyaline. Au bout des conidiophores, on observe la présence de vésicules sphériques de grande taille sur lesquelles sont insérées des métules teintées d'une couleur noire. A l'extrémité de ces

métules sont attachées des phialides serrées qui sont responsables de la production de conidies.

Les conidies, de forme globulaire et de couleur noire caractéristique, se retrouvent majoritairement isolées mais peuvent toutefois se regrouper en chaînes de 3-7 spores. Des amas pourraient également se constituer par regroupement latérale de plusieurs chaînes.

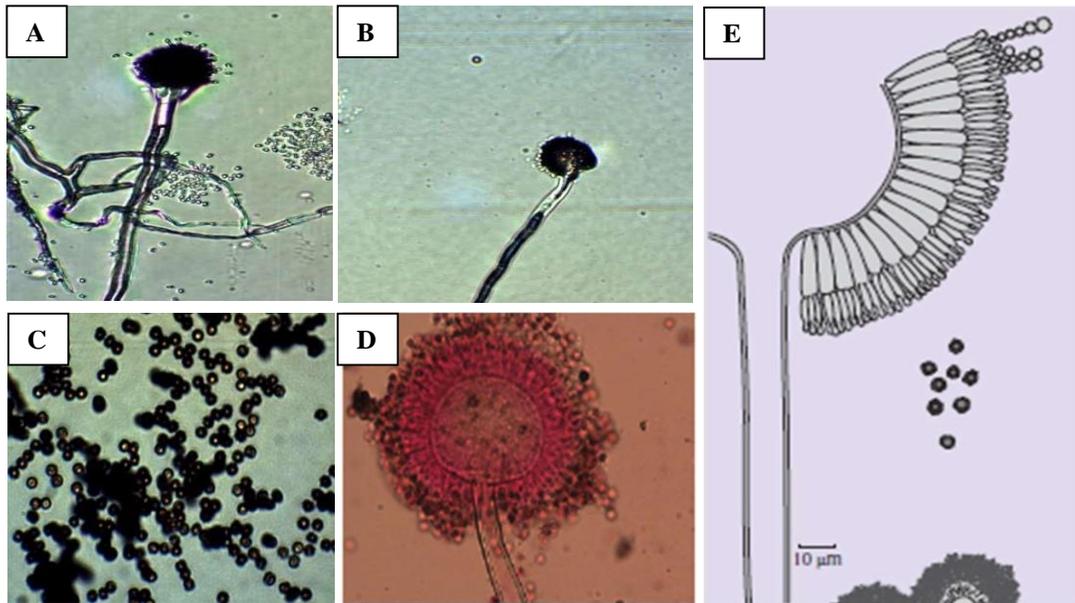


Figure 9 : A, B) Photos originales microscopiques de la souche RM09 montrant la structure du conidiophore (G x40). C) Aspect microscopique des spores (photo originale). D) Conidiophore d'*Aspergillus niger* (Campbell *et al.*, 2013). E) Schéma de la structure du conidiophore d'*Aspergillus niger* (Campbell *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces caractères culturels et morphologiques correspondent aux caractères de *Aspergillus niger* tels qu'ils sont décrits par (Campbell *et al.*, 2013).

II- Sélection du substrat de fermentation

Les cinq fermentations qui ont été réalisées ont permis de sélectionner le substrat ayant donné la meilleure production d'endoglucanase, les résultats sont représentés dans l'histogramme de la figure 10 :

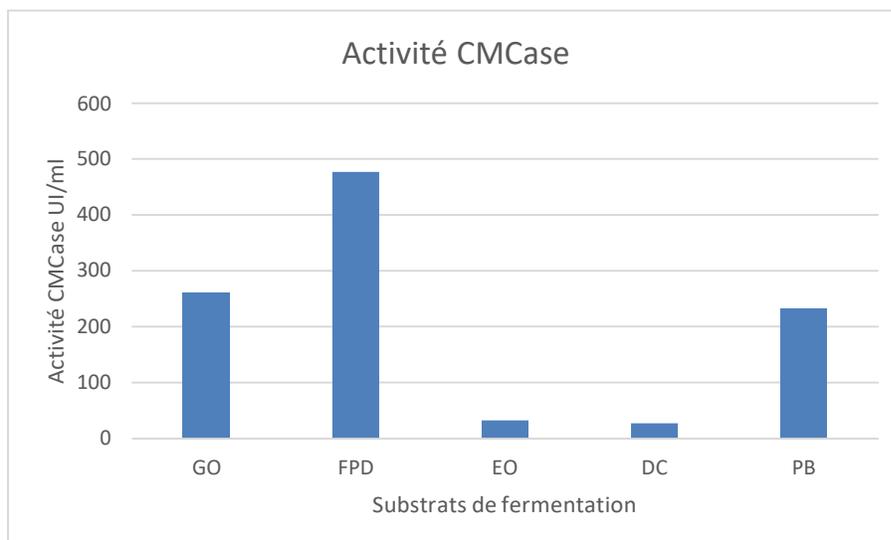


Figure 10 : Diagramme en barres des activités CMCases mesurées sur les cinq substrats du criblage (GO : Grignons d'olive ; FDP : Feuilles de palmier ; EO : Ecorces d'orange ; DC : Déchets carton ; PB : Paille de blé)

Les résultats de notre étude ont démontré que les feuilles de palmier (FDP) se révèlent être le substrat le plus efficace pour la production d'endoglucanases, avec une activité enzymatique mesurée à 476.785 UI/ml. Cette activité est significativement supérieure aux activités optimisées rapportées par (Teo et Wahab, 2023) en utilisant une souche de *Trichoderma harzianum* sur le même substrat, mais inférieures à celles obtenues par (Al-Kolaibe *et al.*, 2021). Il convient également de souligner qu'aucune étude antérieure n'a été rapportée sur l'utilisation de l'espèce *Aspergillus niger* sur les feuilles de palmier pour la production d'endoglucanase.

Le Grignon d'olive était le deuxième meilleur substrat donnant une activité de 261.15 UI/ml, la paille de blé a également montré une activité significative de 231.41 UI/ml comme le montre la Figure 10, Notre souche s'est démontrée être plus performante comparée à la souche utilisée par (Delabona *et al.*, 2012) ou la paille de blé a été également utilisée pour la production d'endoglucanase. En revanche, l'écorce d'orange et le déchet carton ont affiché des performances nettement inférieures, avec des valeurs respectives de 32.51 UI/ml et 26.935 UI/ml. Ces derniers étant les seuls résidus industriels, les résultats faibles peuvent être interprétés par la présence d'inhibiteurs, étant donné que Les biomasses de lignocellulose ont été utilisées directement, sans aucun prétraitement. Cette partie de l'expérience est très importante, car le prétraitement entraînerait des coûts supplémentaires dans les processus industriels. Il est important de mentionner que la composition de la lignocellulose peut varier et donc affecter son accessibilité aux champignons, ce qui pourrait à son tour affecter, à des degrés divers, la production d'endoglucanase.

III- Optimisation par plan Box-Behnken

Les résultats des expériences réalisées pour l'optimisation de la production des CMCases sont regroupés dans le tableau VII :

Tableau VII: Résultats expérimentaux des 30 expériences réalisées.

Essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4	Réponse
	A : Temps d'incubation	B : Température d'incubation	C : Humidité	D : Solution d'humidification	Endoglucanase
	Day	°C	%	/	U/ml
1	10	32	70	Eau distillée	162,05
2	7	24	45	Eau distillée	258,90
3	4	28	45	Eau distillée	214,00
4	7	28	70	Solution minérale	594,18
5	7	28	70	Eau distillée	134,73
6	4	28	45	Solution minérale	402,95
7	7	28	70	Solution minérale	546,99
8	7	24	95	Eau distillée	129,76
9	7	32	95	Solution minérale	830,00
10	7	32	45	Solution minérale	348,31
11	10	28	95	Eau distillée	154,00
12	10	24	70	Solution minérale	604,11
13	7	28	70	Eau distillée	169,50
14	10	32	70	Solution minérale	586,00
15	4	32	70	Solution minérale	467,52
16	4	24	70	Solution minérale	556,00
17	7	24	45	Solution minérale	432,75
18	4	28	95	Solution minérale	607,00
19	10	28	45	Eau distillée	186,88
20	4	32	70	Eau distillée	132,25
21	7	24	95	Solution minérale	680,00
22	4	28	95	Eau distillée	154,00
23	7	32	95	Eau distillée	186,88
24	7	28	70	Solution minérale	534,57
25	10	24	70	Eau distillée	119,83
26	7	32	45	Eau distillée	207,00
27	10	28	95	Solution minérale	908,00
28	10	28	45	Solution minérale	345,83
29	4	24	70	Eau distillée	181,92
30	7	28	70	Eau distillée	162,05

D'après le tableau 7, on remarque que l'activité endoglucanase varie entre 119.83 UI/ml et 908.00 UI/ml. La valeur maximale a été trouvée suivant les conditions d'essai N° 27 et la valeur minimale a

été enregistrée pour les conditions de l'essai N° 25.

Les résultats du BBD révèlent une variabilité notable de l'activité CMC_{ase}, cela peut s'expliquer par l'influence des différents paramètres optimisés sur la production de cette enzyme.

III-1- Analyse statistique

Le but de cette analyse statistique est d'identifier les coefficients des facteurs et les interactions influant de manière significative l'activité CMC_{ase}. De plus, différents paramètres ont été étudiés pour déterminer la validité ou non du modèle entier.

III-1-1- Paramètres du modèle et Analyse de variance (Anova)

Les coefficients des effets linéaires, des effets d'interaction et les effets quadratiques sont récapitulés dans le tableaux VIII. Leur signification a été étudiée par analyse de la variance (ANOVA) à partir des résultats expérimentaux obtenus et déterminée par les valeurs du test de Fischer (F) et les p-valeurs (P-value) correspondantes. Des P-valeurs inférieures à 0.05 indiquent que les coefficients sont significatifs (Paulo and Santos, 2016).

Tableau VIII : Analyse de la variance et des paramètres statistiques du modèle estimés par le logiciel Design expert 11 (* Significatif).

Coefficient de régression	Valeurs	F-Value	P-value
Constant	+357.00	76.11	< 0.0001*
X ₁	+21.94	5.06	0,0389*
X ₂	-2.70	0.0768	0,7852
X ₃	+78.31	64.43	< 0.0001*
X ₄	+196.35	759.43	< 0.0001*
X ₁ X ₂	+20.28	2.16	0,1609
X ₁ X ₃	+48.15	12.18	0,0030*
X ₁ X ₄	+29.37	9.06	0,0083*
X ₂ X ₃	+42.93	9.68	0,0067*
X ₂ X ₄	-2.42	0,0618	0,8069
X ₃ X ₄	+108.58	123,86	< 0.0001*
X ₁ ²	+9.21	0,4110	0,5305
X ₂ ²	+3.41	0,0565	0,8152
X ₃ ²	+23.79	2,74	0,1171

III-1-2 Modèle mathématique de régression

En appliquant une analyse de régression multiple à la matrice et aux réponses données dans le tableau VII, l'équation polynomiale du second ordre suivante a été établie pour expliquer la variation de l'activité CMCCase en fonction des valeurs codées :

$$Y = 357,00 + 21,94 X_1 - 2,70 X_2 + 78,31 X_3 + 196,35 X_4 + 20,28 X_1 X_2 \\ + 48,15 X_1 X_3 + 29,37 X_1 X_4 + 42,93 X_2 X_3 - 2,42 X_2 X_4 + 108,58 X_3 X_4 \\ + 9,21 X_1^2 + 3,41 X_2^2 + 23,79 X_3^2$$

Après élimination des coefficients non significatifs, l'équation se simplifie en :

$$Y = 357,00 + 21,94 X_1 + 78,31 X_3 + 196,35 X_4 + 48,15 X_1 X_3 + 29,37 X_1 X_4 \\ + 42,93 X_2 X_3 + 108,58 X_3 X_4$$

III-3 Validation du modèle

Une fois les coefficients significatifs sont déterminés, l'étape suivante concerne la validation du modèle qui consiste à la vérification de plusieurs grandeurs telles que le manque d'ajustement, le coefficient de corrélation R^2 le coefficient de corrélation ajusté R^2 -adj.

III-3-1 Analyse du manque d'ajustement

Tableau IX: Validation du modèle mathématique

Source	S Squares	df	Mean Square	F-value	P-value
Residual	24367,40	16	1522,96	/	/
Lack of Fit	21719,37	12	1809,95	2,73	0,1716
Pure Error	2648,03	4	662,01	/	/
Cor Total	1,531E+06	29	/	/	/

Selon (Ghari et al., 2014), le manque d'ajustement (Lack of fit) est un paramètre permettant de déterminer la présence ou l'absence du biais. Si la p-valeur qui lui est associée est supérieure à 0.05, le modèle est donc sans biais. Dans notre étude, les valeurs de la F-value (2.73) et la P-value (0.1716) (supérieure à 0.05) du manque d'ajustement montrent que le modèle est hautement significatif (Tableau IX), on conclue donc à la validation de notre modèle.

III-3-2 Coefficient de corrélation linéaire

Afin de juger de la qualité du modèle, on s'intéresse à l'utilisation du coefficient de corrélation linéaire multiple R^2 , accompagné par le R^2 ajusté (R-adj) et le R^2 prédit. Ces indicateurs sont appuyés par la représentation graphique qui est un nuage de point des résidus estimés permettant de visualiser, en l'occurrence, la bonne répartition des résidus (Tinsson, 2010).

D'après (moghddam et al., 2016), la différence entre la valeur du R^2 et du R^2 -adj tend idéalement vers 0 pour un modèle fiable. De plus, un modèle est d'autant plus réaliste que son R^2 s'approche de 1.

Tableau X: Valeurs réelles et prédites par le modèle des activités endoglucanases.

Run Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Run Order	Actual Value	Predicted Value	Residual
1	162,05	167,44	-5,39	16	556,00	521,66	34,34
2	258,90	261,33	-2,43	17	432,75	441,72	-8,97
3	214,00	261,08	-47,08	18	607,00	655,36	-48,36
4	594,18	553,35	40,83	19	186,88	149,92	36,96
5	134,73	160,65	-25,92	20	132,25	141,72	-9,48
6	402,95	377,88	25,07	21	680,00	729,64	-49,64
7	546,99	553,35	-6,36	22	154,00	104,24	49,76
8	129,76	114,93	14,83	23	186,88	200,24	-13,36
9	830,00	805,25	24,75	24	534,57	553,35	-18,78
10	348,31	345,59	2,72	25	119,83	127,43	-7,60
11	154,00	185,70	-31,70	26	207,00	174,91	32,09
12	604,11	583,71	20,40	27	908,00	854,29	53,71
13	169,50	160,65	8,84	28	345,83	384,19	-38,36
14	586,00	614,02	-28,02	29	181,92	182,85	-0,9309
15	467,52	470,84	-3,32	30	162,05	160,65	1,39

Les valeurs du R^2 , R^2 -adj et du R^2 prédit sont égales à 0.9841, 0.9712 et 0.9325 respectivement (Tableau XI) ce qui satisfait les conditions de validité des plans d'expérience, indiquant une bonne corrélation entre les prédictions du modèle et les résultats issus de l'expérimentation.

Tableau XI : Paramètres statistique du modèle postulé

Ecart-type	39.03	R^2	0.9841
Moyenne	366.60	R^2 -adj	0.9712
C.V.%	10.65	R^2 prédit	0.9325
		Précision	28.1348

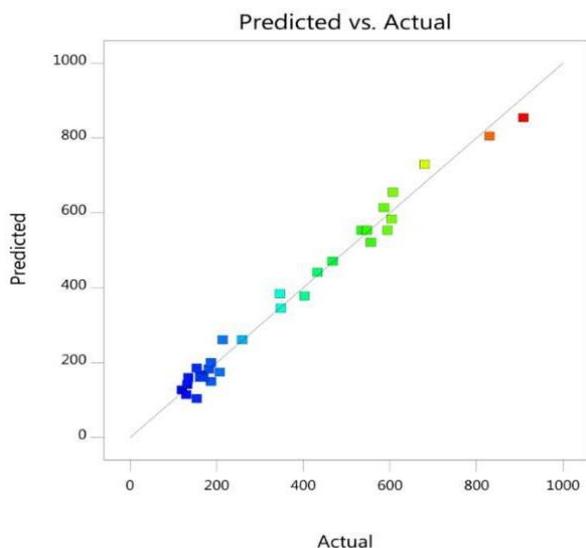


Figure 11 : Nuage de points des valeurs réelles et des valeurs prédites

III-4 Etude des effets et analyse des surfaces de réponses

Dans le but d'étudier les effets des différents facteurs sur le rendement en endoglucanase et visualiser l'effet des variables sur la réponse, des représentations graphiques consistant en des courbes en deux dimensions pour les effets linéaires et des surfaces en trois dimensions pour les effets d'interactions ont été établies par le Logiciel Design expert 11.

III-4-1 Effets linéaires

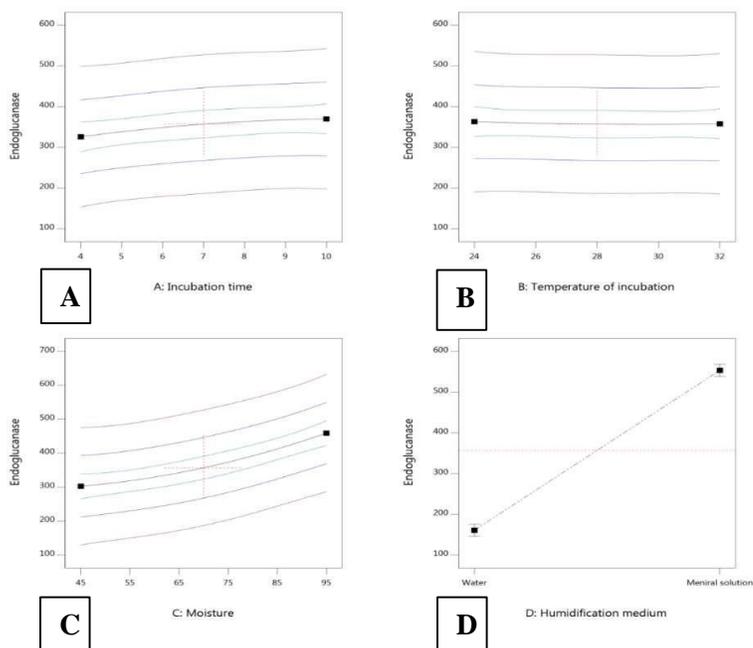


Figure 12 : Représentations graphiques des effets linéaires sur l'activité endoglucanase. **A)** Temps d'incubation, **B)** Température d'incubation, **C)** Humidité, **D)** Solution d'humidification.

L'analyse statistique des résultats a permis de déterminer la signification des facteurs étudiés (p -valeur < 0.05). Les résultats montrent que les trois facteurs : temps d'incubation, taux d'humidité et milieu d'humidification ont un effet positif significatif sur le rendement en endoglucanase avec des coefficients de 21.94, 78.31, 196.35 et des p -valeurs de 0.0389, < 0.0001 , < 0.0001 respectivement.

Le facteur A (Temps d'incubation) a un effet significativement positif, en accordance avec l'étude de **Santos et al. (2016)** ou le temps de fermentation a eu un effet positif sur la production d'endoglucanase et de cellulase totale chez *Rhizopus sp.* Et *Aspergillus niger*. La figure montre une augmentation de l'activité même après 10 jours de fermentation, ce qui est remarquable étant donné que l'évolution typique de l'activité Endoglucanase marque d'abord une augmentation proportionnelle avec le temps de fermentation jusqu'à un certain point. Ensuite, une diminution graduelle de l'activité de l'enzyme se produit et une réduction brusque est observée. La raison peut être l'épuisement des nutriments ou la production de substances toxiques qui retardent la croissance de l'organisme et, par conséquent, la production de CMCase (**Abdullah et al., 2021**).

Le taux d'humidité (facteur C) a un effet positif sur le rendement. Son coefficient (78.31) indique une proportionnalité directe avec la production d'endoglucanase, confirmant l'importance de ce facteur, d'autant que différents auteurs ont observé une baisse importante de la productivité en diminuant le taux d'humidité (diminution de 8.6 % dans l'étude menée par **Kalogeris et al. (2003)**). Une autre étude a conclu que l'humidité optimale est de 80% (**Panagiotou et al., 2003**).

Le facteur qualitatif D (milieu d'humidification) est le facteur ayant la plus grande influence sur le rendement en endoglucanase (Coeff = 196.35). Ceci est interprété par le besoin exprimé par les champignons pour les minéraux, nécessaires non seulement à la production d'enzymes, mais également au bon déroulement de la plupart des fonctions biochimiques qu'ils entreprennent. Ces minéraux sont apportés par la solution de Mendels et Weber.

La température d'incubation est le seul facteur linéaire n'ayant aucune influence significative sur le rendement, cela est évident dans son coefficient (-2.7) et sa p -valeur (0,7852 $\gg 0.05$). Une étude similaire menée par **Tai et al. (2019)** a montré également que la température d'incubation n'influe pas significativement l'activité CMCase, l'auteur a donc conclu que, d'un point de vue économique, il est envisageable de travailler dans la température ambiante. Cette invariabilité de production d'enzyme vis-à-vis de la température d'incubation pourrait être avantageuse, indiquant une flexibilité et stabilité de la souche quand celle-ci est incubée dans des plages de températures plus ou moins larges. En revanche, la température optimale de production d'endoglucanases indiquée par **Santos et al. (2016)** est de 29.56°C.

III-4-2 Effets des interactions

L'étude des interactions affirme que les effets de celles-ci sont tous significativement positifs, sauf pour l'interaction entre le temps d'incubation et la température d'incubation (AB) et celle entre la température d'incubation et la solution d'humidification (BD), dont les P-valeurs sont de 0.1609 et de 0.8069 respectivement.

Les différents effets d'interactions sur la production d'endoglucanases sont représentés ci-dessous en s'appuyant sur des graphes de type surface de réponse (3D) et les courbes d'isoréponses (2D).

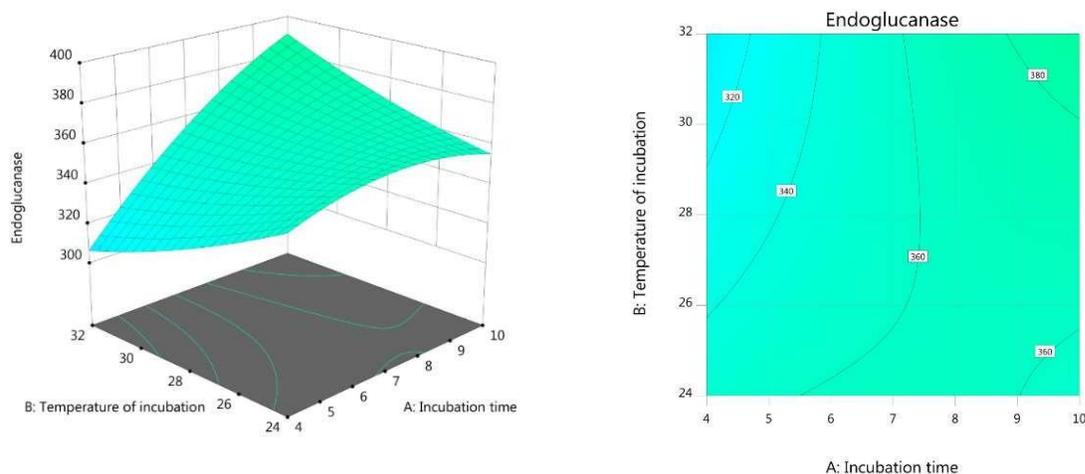


Figure 13 : Effet d'interaction entre le temps d'incubation et la température.

L'interaction entre le temps d'incubation et la température montre un effet positif synergique sur l'activité endoglucanase. La surface d'isoréponse montre une zone de production maximale en s'approchant des niveaux supérieurs des deux facteurs (Figure 13).

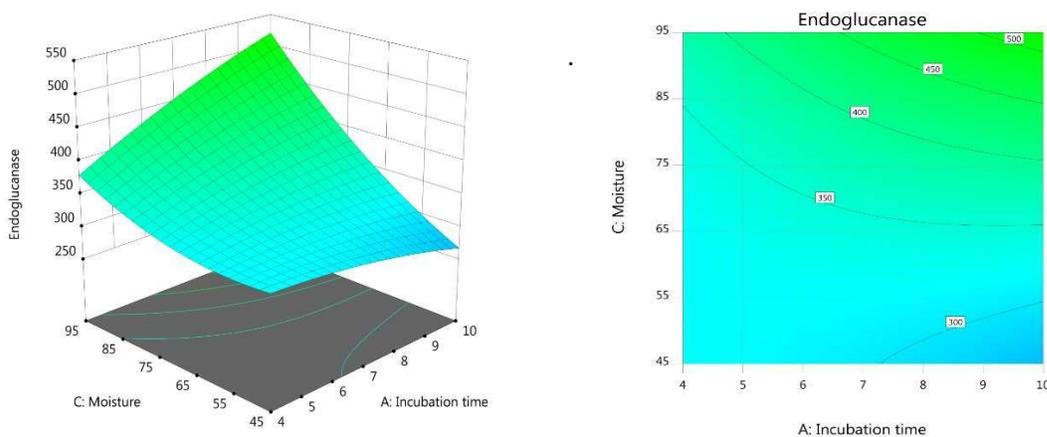


Figure 14 : Effet d'interaction entre le temps d'incubation et l'humidité.

Une synergie est présente également entre le temps d'incubation et le taux d'humidité. Une variation positive est observée quand les facteurs tendent vers les bornes supérieures du domaine

d'étude (Figure 14).

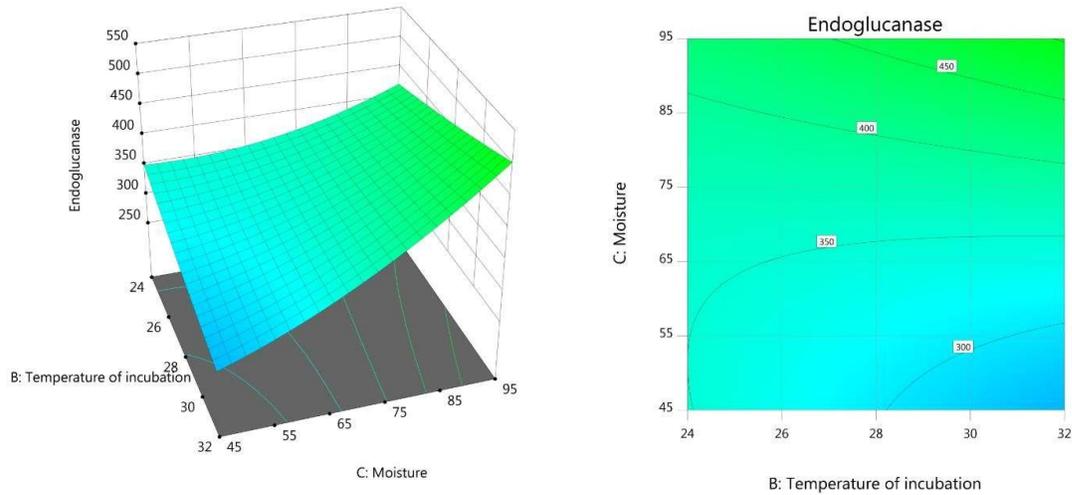


Figure 15 : Effet d'interaction entre la température d'incubation et l'humidité.

L'activité CMC_{Case} évolue proportionnellement avec l'interaction entre l'humidité et la température d'incubation (Figure 15).

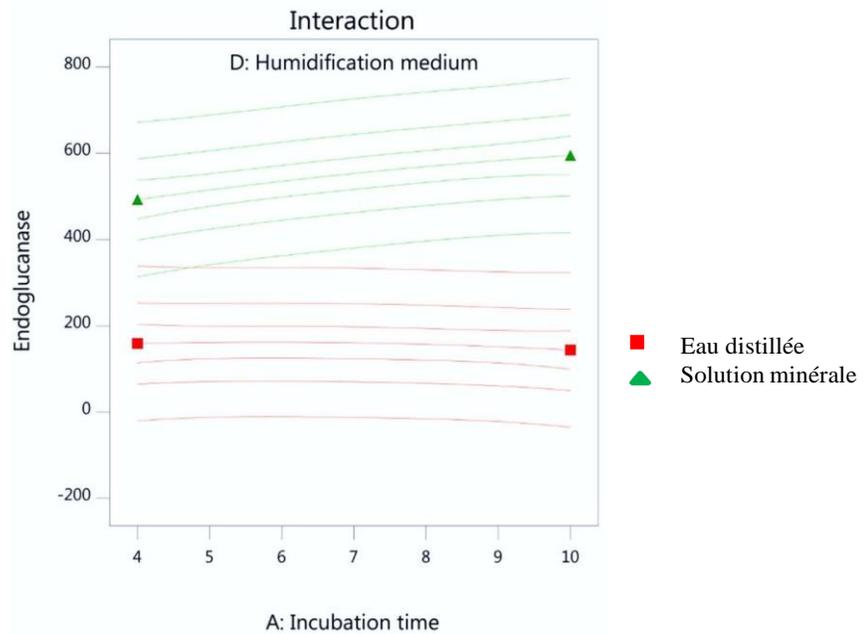


Figure 16: Effet d'interaction entre le temps d'incubation et le milieu d'humidification

L'interaction entre le temps d'incubation et le milieu d'humidification présente deux domaines de variation dans la mesure ou le rendement augmente uniquement quand on humidifie avec la solution minérale. Dans le cas d'une humidification avec l'eau distillée, représentée par des lignes rouges dans la Figure 16, l'activité endoglucanase décroît légèrement, cela pourrait être expliqué par l'appauvrissement du milieu en minéraux au cours du temps.

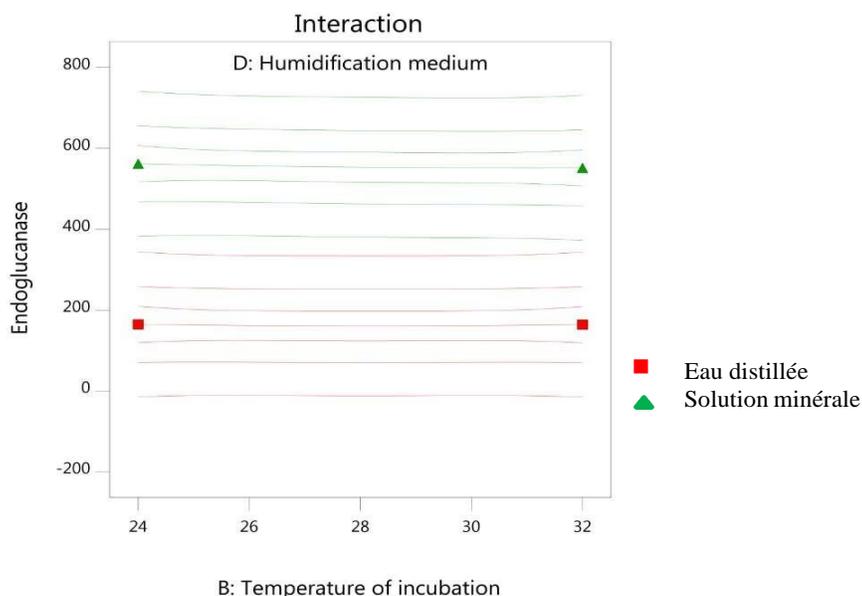


Figure 17: Effet d'interaction entre le temps d'incubation et la solution d'humidification

Aucune variation de l'activité endoglucanase n'est observée en fonction de la température d'incubation (Figure 17), aussi bien en humidifiant avec la solution minérale qu'avec l'eau distillée. L'effet de cette interaction n'est, en effet pas significatif (P-value = 0,8069).

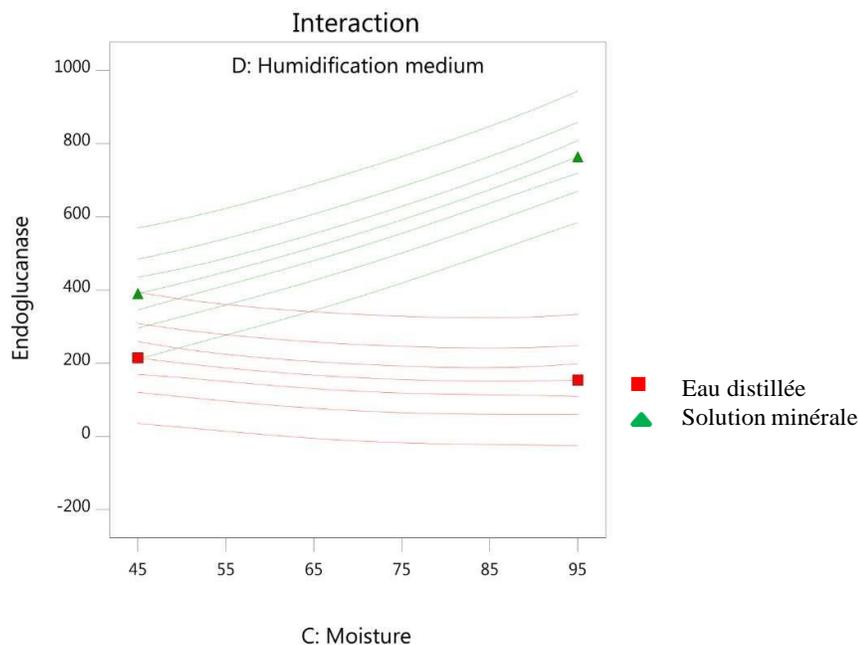


Figure 18 : Effet d'interaction entre l'humidité et la solution d'humidification.

L'interaction ayant montré l'effet le plus élevé est celle entre le taux d'humidité et le milieu d'humidification (CD) avec un coefficient de 108,58. En effet, une augmentation du taux d'humidité signifie un apport important en minéraux dans le cas d'une humidification par la solution minérale. Cependant, cette interaction montre un effet antagonisant dans le cas d'une humidification par l'eau

distillée qui dilue le milieu et l'appauvrit en minéraux (Figure 18).

III-5- Conditions d'optimalité et leur validation

Dans le but de valider le modèle et de déterminer les conditions optimales de production d'endoglucanases, 6 fermentations supplémentaires ont été lancées, correspondant aux solutions proposées par le logiciel Design expert regroupées dans le tableau XII.

Tableau XII: Solutions proposées par le logiciel pour la détermination des conditions optimales

Essai	Temps d'incubation	Température d'incubation	Humidification	Milieu d'humidification	Valeurs réelles	Valeurs prédites	Ecart-type
1	10	30	95,00	Solution minérale	987,01	1047,829	75,912
2	10	32	95,00	Solution minérale	804,85	1081,232	90,664
3	10	32,000	95	Solution minérale	819,72	1064,581	88,660
4	4,000	25	45,00	Eau distillée	154,25	388,512	83,733
5	4,012	24,000	50	Eau distillée	131,95	357,172	85,949
6	10	30	95,00	Eau distillée	146,82	291,378	77,297

Nous remarquons que les valeurs prédites par le modèle mathématique sont très proches aux valeurs obtenues par l'expérimentation, ce qui met en évidence la robustesse de notre modèle.

Les conditions optimales de production d'endoglucanases sont :

- Un temps d'incubation de 10 jours.
- Une température d'incubation de 30°C.
- Un taux d'humidité de 95%.
- Une humidification par la solution minérale.

L'étude menée par **Zhang et al. (2012)** a montré que l'activité maximale de l'endoglucanase produite par une souche *d'Aspergillus niger* pouvait être atteinte lorsque la teneur en humidité, la température de culture et le pH initial de la culture étaient respectivement de 70,5 %, 33,5 °C et 4,662. L'activité maximale prédite de l'endoglucanase était de 306,807 U/g. Concernant l'optimisation par d'autres souches fongiques, **Teo et Wahab (2023)** ont effectué une optimisation de la production d'endoglucanase avec les feuilles de palmier comme substrat en utilisant la matrice de Taguchi et ont établi que les conditions optimales de SSF pour la production maximale de CMCCase par *T. harzianum* étaient l'utilisation d'un inoculum de $7,00 \times 10^8$ spores/g, une teneur en eau initiale de 50 %, un milieu de Mandel de pH 12 et une incubation de 3 jours à 40°C.

CONCLUSION

Ce travail a comme objectif d'optimiser certains paramètres influençant la production d'une enzyme cellulolytique (Endoglucanase) par une souche fongique dans un milieu solide en utilisant des résidus agro-industriels à faible coût comme substrats de fermentation.

En premier lieu, nous avons identifié la souche utilisée, en se basant sur des critères macroscopique et microscopique, comme étant une souche d'*Aspergillus niger*. Puis on a sélectionné l'un des cinq substrats choisis pour la production d'endoglucanase (Paille de blé, feuilles de palmier, écorces d'oranges, grignon d'olive et déchets carton), en réalisant cinq fermentations dans des conditions bien déterminées. Les feuilles de palmier sont avérées être le meilleur substrat, avec une activité enzymatique de 476.785 UI/ml.

Dans le but de maximiser le rendement de la production d'endoglucanases tout en réalisant un minimum d'expériences, quatre variables indépendantes ont été optimisées à savoir le temps d'incubation, la température et le milieu d'humidification (eau distillée ou solution minérale MW) par un plan BBD (Box-Behnken design). Les optimums établis par cette technique sont respectivement : 10 jours, 30°C, 95% d'humidité et solution minérale comme milieu d'humidification. Ces conditions ont conduit à une activité maximale de l'ordre de 987,01 UI/ml.

En conclusion, ce travail a exploré l'état actuel des connaissances sur le bioraffinage lignocellulosique, appréhendant une méthodologie permettant l'optimisation des paramètres influençant la production d'une enzyme cellulolytique à partir de résidus agro-industriels. Les résultats obtenus ouvrent des perspectives pour améliorer les procédés de fermentation tels que :

- Des recherches futures peuvent se concentrer sur l'optimisation continue et l'exploration de nouveaux substrats économiques comme le chêne de liège.
- Optimiser d'autres paramètres opératoires tels que le taux d'inoculum et le pH.
- Réaliser des prétraitements de substrats de fermentation notamment ceux issus de l'industrie pour réduire les facteurs qui peuvent affecter la production (ex : polluants chimiques).
- Réfléchir à la réalisation de modifications génétiques pour optimiser la production.
- Exploiter les résultats de la présente étude dans la conception et le développement de bioréacteurs adaptés aux fermentations solides et les extrapoler dans le scale-up à l'échelle industrielle.
- Purification et caractérisation des enzymes produites.
- Envisager une culture mixte avec d'autres espèces fongiques ou bactériennes.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdullah, R., Akhtar, A., Nisar, K., Kaleem, A., Iqtedar, M., Iftikhar, T., et al. (2021) Process optimization for enhanced production of cellulases from locally isolated fungal strain by submerged fermentation. *Bioscience Journal* **37**: 1981–3163.

Ali, M. (2021) Etude expérimentale et modélisation de la combustion de biocombustibles solides issus de la biomasse lignocellulosique sur lit fixe (Doctoral dissertation, Université de Monastir).

Al-Kolaibe, A., Moharram, A., and Al-Bedak, O. (2021) Worthwhile enzyme production and eco-friendly bioconversion of three agricultural residues by *Aspergillus curvatus* and *Aspergillus gaarensis*, promising enzyme-producers isolated from extreme environment. *Journal of Basic & Applied Mycology (Egypt)*, *12*, 1-14.

Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., and Šantek, B. (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, *18*(11), 768-778.

Anwar, Z., Gulfranz, M., and Irshad, M. (2014) Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* **7**: 163–173.

Assamoi, A.A., Destain, J., and Thonart, P. (2009) Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures: le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, *13*(2).

B

Beg, S., & Akhter, S. (2021). Box–Behnken designs and their applications in pharmaceutical product development. *Design of Experiments for Pharmaceutical Product Development: Volume I: Basics and Fundamental Principles*, 77-85.

Borrero-López, A.M., Valencia, C., and Franco, J.M. (2022) Lignocellulosic Materials for the Production of Biofuels, Biochemicals and Biomaterials and Applications of Lignocellulose-Based Polyurethanes: A Review. *Polymers (Basel)* **14**: 881.

C

Cairns, T.C., Nai, C., and Meyer, V. (2018) How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biol Biotechnol* **5**: 13.

Campbell, C.K. and Johnson, E.M. (2013) Identification of pathogenic fungi, John Wiley & Sons.

Chastel, C.F. (2019) Exploration de sécrétomes d'*Aspergillus spp.* en vue de la complémentation du cocktail cellulolytique de *Trichoderma reesei*. 130 p.

Chen, H. (2014) Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. In *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Chen, H. (ed). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 25–71.

Chmelová, D., Legerská, B., Kunstová, J., Ondrejovič, M., and Miertuš, S. (2022) The production of

laccases by white-rot fungi under solid-state fermentation conditions. *World J Microbiol Biotechnol* **38**: 21.

Chukwuma, O.B., Rafatullah, M., Tajarudin, H.A., and Ismail, N. (2020) Lignocellulolytic Enzymes in Biotechnological and Industrial Processes: A Review. *Sustainability* **12**: 7282.

D

Delabona, P.D.S., Pirota, R.D.P.B., Codima, C.A., Tremacoldi, C.R., Rodrigues, A., and Farinas, C.S. (2012) Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy* **37**: 243–250.

E

El-Naggar, N., Deraz, S., and Khalil, A. (2019) Bioethanol Production from Lignocellulosic Feedstocks Based on Enzymatic Hydrolysis: Current Status and Recent Developments. *Biotechnology* **13**: 1–21.

Eloutassi, N., Louaste, B., Boudine, L., and Remmal, A. (2014) Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération. *JREEN* **17**: 600–609.

F

Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., et al. (2007) Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* **597**: 179–186.

G

Gil, A. (2021) Current insights into lignocellulose related waste valorization. *Chemical Engineering Journal Advances* **8**: 100186.

Gupta, V.K. and Tuohy, K. (2016) *Microbial enzymes in bioconversions of biomass*, Springer.

Harirchi, S., Roustae, N., Varjani, S., and Taherzadeh, M.J. (2023) 5 - Sampling, preservation, and growth monitoring of filamentous fungi. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Taherzadeh, M.J., Ferreira, J.A., and Pandey, A. (eds). Elsevier, pp. 149–180.

H

Hassan, S.S., Williams, G.A., and Jaiswal, A.K. (2019) Lignocellulosic Biorefineries in Europe: Current State and Prospects. *Trends in Biotechnology* **37**: 231–234.

Hofrichter, M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 454–466.

J

Jourdier, E. (2012) Modélisation et optimisation de la production de cellulases par *Trichoderma reesei* pour les bioraffineries lignocellulosiques.

K

Kalogeris, E., Christakopoulos, P., Katapodis, P., Alexiou, A., Vlachou, S., Kekos, D., and Macris, B.J. (2003) Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. *Process Biochemistry* **38**: 1099–1104.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., and Stroeve, P. (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind Eng Chem Res* **48**: 3713–3729.

M

Makhlouf, J. (2019) Caractérisation de la biodiversité des souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* isolées d'aliments commercialisés au Liban : approche moléculaire, métabolique et morphologique.
Manuel, C.-R., Carlos, Q.-F., Carmen, P.-C., Marisela, V.-D.L., and Iván, M.-A. (2022) Fungal solid-state fermentation of food waste for biohydrogen production by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* **47**: 30062–30073.

Mogni, A. (2015) Fractionnement des complexes lignine-polysaccharides issus de différentes biomasses lignocellulosiques par extrusion bi-vis et séparation chromatographique.

N

Nargotra, P., Sharma, V., Lee, Y.-C., Tsai, Y.-H., Liu, Y.-C., Shieh, C.-J., et al. (2023) Microbial Lignocellulolytic Enzymes for the Effective Valorization of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Catalysts* **13**..

P

Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., and Christakopoulos, P. (2003) Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial crops and products* **18**: 37–45.

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

R

Rakotoveloa, A. (2016) Fragmentation enzymatique de la lignine pour l'obtention de synthons phénoliques.

S

SANTOS, T.C.D., Abreu Filho, G., BRITO, A.R.D., Pires, A.J.V., Bonomo, R.C.F., and Franco, M. (2016) Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus sp.* by solid state fermentation of prickly pear. *Revista Caatinga* **29**: 222–233.

Satyanarayana, T., Deshmukh, S.K., and Deshpande, M.V. (2019) Advancing frontiers in mycology & mycotechnology: basic and applied aspects of fungi, Springer.

Shallom, D. and Shoham, Y. (2003) Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 219–228.

Sharma, D. and Saini, A. (2020) Lignocellulosic Ethanol Production from a Biorefinery Perspective: Sustainable Valorization of Waste, Singapore: Springer.

Singh, N., Singhanian, R.R., Nigam, P.S., Dong, C.-D., Patel, A.K., and Puri, M. (2022) Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology* **344**: 126415.

Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, P.W., and Mishra, P.K. (2019) Solid-state fermentation strategy for microbial metabolites production: An overview. *New and future developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* 345–354.

Suryadi, H., Judono, J.J., Putri, M.R., Eclessia, A.D., Ulhaq, J.M., Agustina, D.N., and Sumiati, T. (2022) Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Heliyon* **8**: e08865.

T

Tai, W.Y., Tan, J.S., Lim, V., and Lee, C.K. (2019) Comprehensive studies on optimization of cellulase and xylanase production by a local indigenous fungus strain via solid state fermentation using oil palm frond as substrate. *Biotechnology progress* **35**: e2781.

Teo, H.L. and Wahab, R.A. (2023) Optimization of Endoglucanase Synthesis by *Trichoderma harzianum* via Taguchi Approach: Taguchi-optimized endoglucanase production by *T. harzianum*. *Journal of Tropical Life Science* **13**: 37–44.

Thomas, L., Larroche, C., and Pandey, A. (2013) Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* **81**: 146–161.

Tinsson, W. (2010) Plans d'expérience en blocs. In *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques*. Mathématiques et Applications. Tinsson, W. (ed). Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 203–248.

Troiano, D., Orsat, V., and Dumont, M.J. (2020) Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **117**: 109472.

U

Usmani, Z., Sharma, M., Awasthi, A.K., Lukk, T., Tuohy, M.G., Gong, L., et al. (2021) Lignocellulosic biorefineries: The current state of challenges and strategies for efficient

commercialization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **148**: 111258.

V

Virk, A.P., Sharma, P., and Capalash, N. (2012) Use of laccase in pulp and paper industry. *Biotechnology Progress* **28**: 21–32.

W

Wertz, J.-L., Deleu, M., Coppée, S., and Richel, A. (2017) Hemicelluloses and lignin in biorefineries, CRC Press.

Wertz, J.-L., Richel, A., and Gérin, P. (2015) Molécules issues de la valorisation de la lignine. *ValBiom*.

Y

Yadav, A., Sharma, V., Tsai, M.-L., Chen, C.-W., Sun, P.-P., Nargotra, P., et al. (2023) Development of lignocellulosic biorefineries for the sustainable production of biofuels: Towards circular bioeconomy. *Bioresource Technology* **381**: 129145.

Z

Zakzeski, J., Bruijninx, P.C., Jongerius, A.L., and Weckhuysen, B.M. (2010) The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical reviews* **110**: 3552–3599.

Zhang, H., Sang, Q., and Zhang, W. (2012) Statistical optimization of cellulases production by *Aspergillus niger* HQ-1 in solid-state fermentation and partial enzymatic characterization of cellulases on hydrolyzing chitosan. *Annals of microbiology* **62**: 629–645.

ANNEXES

Annexe 1 : 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
- Urée0.3g
- $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 2 : Réactifs et solutions chimiques

1. Réactif DNS (Ghose, 1987)

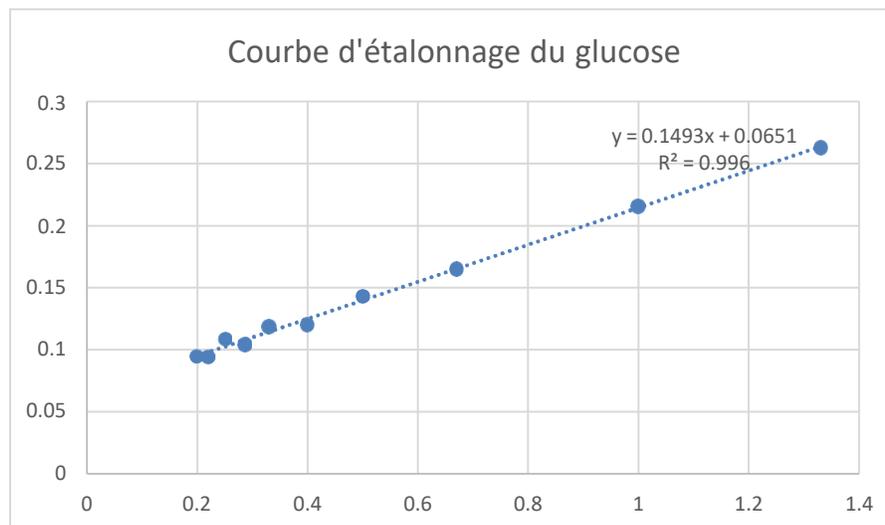
- DNS..... 10g
- NaOH.....16g
- Tartrate double de sodium et de potassium..... 300g
- Eau distillée (qsp.)..... 1 litre

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 distillée : 1 litre

Annexe 3 : Courbe d'étalonnage

	Dilution	[Glucose] mg/ml	DO		
			Essai 1	Essai 2	Moyenne
1	1 : 0,5	1.33	0.27	0.255	0.2625
2	1 : 1	1	0.217	0.214	0.2155
3	1 : 2	0.67	0.165	0.165	0.165
4	1 : 3	0.5	0.137	0.149	0.143
5	1 : 4	0.4	0.124	0.116	0.12
6	0,5 : 2,5	0.33	0.12	0.117	0.1185
7	0,5 : 3	0.286	0.106	0.102	0.104
8	0,5 : 3,5	0.25	0.105	0.111	0.108
9	0,5 : 4	0.22	0.094	0.094	0.094
10	0,5 : 4,5	0.2	0.095	0.094	0.0945



Résumé

La biomasse lignocellulosique constitue une matière première importante qui peut substituer aux ressources non renouvelables d'autant qu'elle est valorisable en une large gamme de produit à haute valeur ajoutée par l'utilisation d'enzymes appelées lignocellulases. Cette approche est néanmoins confrontée à des contraintes liées aux coûts de production et de commercialisation de ces enzymes. Ainsi, dans une perspective économique et environnementale, la présente étude s'intéresse à l'optimisation de la production d'une endoglucanase fongique en utilisant des résidus industriels comme substrats afin de réduire les coûts de production. La souche fongique utilisée est identifiée comme appartenant à l'espèce d'*Aspergillus niger*. Une culture de la souche sur 5 substrats (Grignon d'olive, Paille de blé, Feuilles de palmier, Déchets carton et écorces d'oranges) montre que les feuilles de palmier constitue un très bon substrat pour la production d'endoglucanase, il a été donc choisi comme substrat pour l'optimisation. Les conditions optimales de production sont déterminées par l'utilisation d'un plan d'expérience Box-Behnken et les résultats affirment une productivité maximale de 987.01 UI/ml quand la souche est cultivée pendant 10 jours à une température de 30°C et une humidification à 95% par une solution minérale.

Mots clés : Lignocellulose, Endoglucanase, cellulase, feuilles de palmier, *Aspergillus niger*

Abstract

Lignocellulosic biomass is an important raw material that can substitute for non-renewable resources, especially since it can be converted into a wide range of high-value products using enzymes called lignocellulases. However, this approach is faced with constraints related to the production and commercialization costs of these enzymes. Therefore, from an economic and environmental perspective, this study focuses on optimizing the production of a fungal endoglucanase using industrial residues as substrates to reduce production costs. The fungal strain used is identified as belonging to the species *Aspergillus niger*. Cultivation of the strain on five substrates (olive pomace, wheat straw, palm leaves, cardboard waste, and orange peels) shows that palm leaves are a very good substrate for endoglucanase production, thus it was chosen as the substrate for optimization. The optimal production conditions are determined using a Box-Behnken experimental design, and the results indicate a maximum productivity of 987.01 IU/ml when the strain is cultivated for 10 days at a temperature of 30°C with 95% humidity using a mineral solution.

Key words : Lignocellulose, Endoglucanase, Cellulase, Palm leaves, *Aspergillus niger*

ملخص

الكتلة الحيوية اللغوسلولوزية تشكل مادة خام مهمة يمكن أن تحل محل الموارد غير المتجددة نظراً لقابلية الاستفادة منها في مجموعة واسعة من المنتجات ذات القيمة المضافة العالية باستخدام الإنزيمات المعروفة باللغوسلولاز. ومع ذلك، تواجه هذه الإنزيمات تحديات مرتبطة بتكاليف الإنتاج وتسويق هذه الإنزيمات. لذا، من منظور اقتصادي وبيئي، تركز هذه الدراسة على تحسين إنتاج إنزيم إندوجلوكاناز فطرية باستخدام النباتات الزراعية و النفايات الزراعية كمواد أساسية لتوليد تكاليف الإنتاج. تم تحديد السلالة النظرية

المستخدمة كعضو من نوع أسبيرجيلوس نيجر. أظهرت زراعة السلالة على خمسة مواد أساسية (قشور الزيتون، قش القمح، أوراق النخيل، نفايات الكرتون، وقشر البرتقال) أن أوراق النخيل تعتبر مادة أساسية جيدة جداً لإنتاج إنزيم إندوجلوكاناز، وبالتالي تم اختيارها كمادة أساسية لتحسين الإنتاج. يتم تحديد الظروف المثلى للإنتاج باستخدام تصميم تجربة متوازن-بينكن، وتظهر النتائج إلى أقصى إنتاجية تبلغ 987.01 وحدة دولية/مل عندما يتم زراعة السلالة لمدة 10 أيام عند درجة حرارة تبلغ 30 درجة

مئوية مع درجة رطوبة تصل إلى 95% باستخدام محلول معدني.

كلمات مفتاحية : أسبيرجيلوس نيجر، الإندوجلوكاناز، لغوسلولوز، سلولولاز، أوراق النخيل.