

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

*Mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur
d'Etat en Génie Biologique*

Thème

**Production de cellulases par
Bjerkandera sp et *Trichoderma
reesei* par fermentation en milieu
solide**

Présenté par

Melle. OUALI Souad

Mr. TIDJET Salah

Membres de jury

Présidente : Melle. SAIDANI K.

Examineur : Mr. BOUKHALFA F.

Promotrice : Melle. BELHAMICHE N.

Année universitaire : 2011/2012

R Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu, le *Généreux* qui a enseigné à l'Homme ce qu'il ne savait pas et aussi de nous avoir donné la force afin d'accomplir ce modeste travail.

Nous avons l'honneur de formuler notre gratitude et profonde reconnaissance à l'égard de **Melle BELHAMICHE N.** notre promotrice, qui nous a fait l'honneur de diriger ce travail et de nous guider tout au long de sa réalisation. Son sens des valeurs humaines et son esprit scientifique nous ont conduits à la réussite de ce travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements aux membres de jury :

Melle. SAIDANI K. pour avoir bien voulu examiner ce mémoire et nous avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'elle trouve ici l'expression de notre haute gratitude.

Mr. BOUKHALFA F. qui a bien voulu examiner ce travail et participer au jury. Qu'il trouve ici l'assurance de toutes nos reconnaissances.

Un grand **MERCI** aux Ingénieurs du Laboratoire de Biochimie Microbienne Mounia et Nassima pour leur aide et conseils et leur sourire de chaque matin, sans oublier Samira, ingénieur du laboratoire hydrobiologie de pollution.

Nous tenons à remercier également tous les gens qui nous ont aidé de près ou de loin pour réaliser ce travail.

Merci à toute l'équipe du laboratoire et au deuxième binôme (Fadia et Kassia).

Qu'Allah le Clément et Miséricordieux vous accorde son aide dans tous vos projets et toute votre vie.

Merci :

Souad et Salah

*D*edicaces

*Je dédie ce
Modeste travail*

A

*Ceux qui ont donné un sens à mon existence, en m'offrant une
Éducation digne de confiance*

Ce qui a attendu avec patience

Les fruits de sa bonne éducation

A mon père.

*Ma très chère mère pour son sacrifice, son aide, ses conseils et sa
patience.*

A ma chère Soussou.

A mes grand mères « que Dieu les gardes »

A la mémoire de mes grands parents.

A mon grand frère Juba et sa fiancée Siham.

A mes frères Hamza et KOUKOU.

Mes chers (e) cousines et cousins et leurs familles.

Mes chers (e) Amis (e) de jardin d'enfance jusqu'à ce jour. Abdelhak,

Karim, Yakoub, Mouhand, les deux Massi, Ouali, Mourad, Halim,

Elghazi, Elbahi. Et à tous ceux qui me sont chers.

Tous les enseignants qui m'ont suivi tout au long de mon parcours

éducatif.

SALAH.

Dedicaces

*Je dédie ce
Modeste travail*

*A
Ceux qui ont donné un sens à mon existence, en m'offrant une
Éducation digne de confiance
Ce qui a attendu avec patience
Les fruits de sa bonne éducation
A mon père.*

*Ma très chère mère pour son sacrifice, son aide, ses conseils et sa
patience.*

*A ma belle mère pour son sacrifice, son aide, ses conseils et sa
patience.*

*A mon unique, la lumière de mes yeux Amelhan-îw. A mon frère
Lounes.*

A mes grand mères « que Dieu les gardes »

A mes chères sœurs Linda, Lydia et ma petite Lamia.

*A mes oncles et
tantes.*

*Mes chères Amies, Rahima, Radia, Elyasmine, Taous et
Razika (Bazouke), Fatima, Samira (Camarade intime). Et à tous
ceux qui me sont chers.*

*A Tous les enseignants qui m'ont suivi tout au long de mon parcours
éducatif.*

Souad.

Liste des abréviations

APF : activité papier filtre

Bjerkandera sp. : *Bjerkandera specie*

B.S.A. : Bovin Serum Albumin

CMC : Carboxyméthylcellulose

CMCase : Carboxyméthylcellulase

DNS : Acide 3,5- dinitrosalicylique

DP : Degré de polymerization

EC : Enzyme commission

FMS : Fermentation en milieu solide

MS : Matière sèche

T. reesei : *Trichoderma reesei*

UI : Unité internationale

Liste des figures

Figure	Titre	Pages
Figure 1	Structure chimique partielle de la cellulose	5
Figure 2	Structure supramoléculaire de la cellulose	5
Figure 3	Représentation schématique des différentes étapes de la cellulolyse	12
Figure 4	Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS	23
Figure 5	Observation macroscopique des souches étudiées (à l'œil nu)	25
Figure 6	Observation microscopique des deux souches étudiées (G x 40)	26
Figure 7	Aspect de la culture des souches fongiques sur le son d'orge	26
Figure 8	Evolution de la matière sèche au cours de la fermentation	28
Figure 9	Evolution de pH au cours de la fermentation	30
Figure 10	Evolution des protéines totales au cours de la fermentation	31
Figure 11	Evolution de l'activité papier filtre (cellulases totales)	32
Figure 12	Evolution de l'activité carboxyméthylcellulase	33

Liste des figures en annexes

Figure	Titre	Annexes
Figure 1	Courbe d'étalonnage de la B.S.A.	II
Figure 2	Courbe d'étalonnage du glucose (10g/l)	III
Figure 3	Courbe d'étalonnage du glucose (2g/l)	III

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Composition de quelques résidus lignocellulosiques	4
Tableau II	Principaux éthers celluloses	7
Tableau III	Principales applications des processus de la fermentation solide dans les divers secteurs économiques	17
Tableau IV	Principaux groupes de microorganismes impliqués dans les processus de fermentation solide	18
Tableau V	Composition biochimique globale de son d'orge	19
Tableau VI	Différentes étapes de dosage de l'activité papier filtre	24
Tableau VII	Différentes étapes de dosage de l'activité CMC _{Case}	25

Liste des tableaux en annexes

Tableau	Titre	Annexe
Tableau I	Matériel analytique utilisé	I

Sommaire

- ✚ Liste des abréviations
- ✚ Liste des figures
- ✚ Liste des tableaux

Introduction	1
---------------------------	----------

Synthèse bibliographique

I. Biodégradation de la cellulose.....	3
1. Cellulose	3
1.1. Définition de la cellulose.....	3
1.2. Source de la cellulose	3
1.3. Structure de la cellulose.....	4
1.3.1. Structure moléculaire.....	4
1.3.2. Structure supramoléculaire	5
1.4. Dérivés de la cellulose.....	6
1.4.1. Ethers de cellulose	6
1.4.2. Esters de cellulose	6
2. Cellulases.....	8
2.1. Nomenclature	8
2.2. Enzymes cellulolytiques	8
2.2.1. Exo β (1-4) glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91).....	8
2.2.2. Endo β (1-4) glucanase ou endocellulase (EC3.2.1.4)	8
2.2.3. β (1-4) glucosidase ou cellobiase (EC3.2.1.21).....	9
2.3. Caractéristiques des cellulases	9
2.3.1. Réaction et spécificité	9
2.3.2. Substrats naturels	9
2.3.3. Masse moléculaire	9
2.3.4. pH optimum.....	10

2.3.5. Température optimale.....	10
2.4. Différentes origines des cellulases	10
2.4.1. Origine animale	10
2.4.2. Origine végétale	10
2.4.3. Origine microbienne	11
2.5. Structure des cellulases.....	11
2.6. Mécanisme d'action des cellulases.....	11
2.7. Domaine d'application des cellulases.....	12
3. Microorganismes cellulolytiques.....	14
3.1. Bactéries	14
3.2. Levures	14
3.3. Moisissures	14
II. Fermentation solide	15
1. Définition.....	15
2. Substrat	16
3. Applications de la fermentation solide	16
4. Microorganismes utilisés en fermentation solide.....	17
5. Valorisation biologique des substrats cellulosesques	19

Matériel et méthodes

I. Matériel	20
1. Matériel analytique	20
2. Matériel biologique.....	20
3. Milieu de culture.....	20
II. Méthodes.....	20
1. Etude morphologique.....	20
1.1. Macromorphologie	20
1.2. Micromorphologie.....	21
2. Conduite des cultures sur le milieu solide	21
2.1. Préparation des inocula	21
2.2. Ensemencement de milieu de culture	21
2.3. Obtention des extraits enzymatiques	21
3. Suivi des paramètres de fermentation	21

3.1. Evaluation de la matière sèche au cours de la fermentation	21
3.2. Evaluation du pH au cours de la fermentation	22
4. Etudes des extraits enzymatiques	22
4.1. Dosage des protéines totales	22
4.2. Dosage des activités enzymatiques.....	22
4.2.1. Dosage des sucres réducteurs	22
4.2.2. Dosage de l'activité papier filtre	23
4.2.3. Dosage de l'activité carboxyméthyl cellulase (CMCase)	24

Résultats et discussion

I. Étude morphologique	26
1. Macromorphologie	26
2. Micromorphologie.....	26
II. Obtention des extraits enzymatiques	27
1. Culture des souches	27
2. Suivi des paramètres de la fermentation.....	29
2.1. Evolution de la matière sèche.....	29
2.2. Evolution du pH du milieu	30
III. Etude des extraits enzymatiques.....	31
1. Evolution des protéines totales	31
2. Evolution des activités cellulolytiques	32
2.1. L'activité papier filtre (cellulases totales)	32
2.2. L'activité carboxyméthylcellulase (endoglucanases).....	34
Conclusion	37

Références bibliographiques

Annexes

I Introduction



Introduction

La cellulose, matériel structural de base des parois cellulaires des végétaux, est la macromolécule la plus abondante et la plus largement synthétisée dans le monde végétal. Elle constitue une source d'énergie renouvelable pratiquement inépuisable et peu exploitée. L'efficacité d'hydrolyse de la cellulose en glucose nécessite une coopération des différentes enzymes (endoglucanase, cellobiohydrolase et β -glucosidases). De plus, les cellulases actuellement disponibles fonctionnent bien sur la cellulose pure. Cependant, dans le cas des substrats lignocellulosiques (pailles des céréales, bagasse...), les hémicelluloses et la lignine forment une matrice entourant la cellulose, la masquant ainsi des enzymes cellulolytiques. Par conséquent, la dégradation du complexe lignocellulosique constitue l'étape limitante pour l'hydrolyse de la cellulose (difficile et couteuse en énergie) (ROUSSOS, 1987).

L'intérêt mondial croissant porté à la préservation de l'environnement des déchets solides induits par les différentes activités et transformations humaines, a suscité l'attention des industriels à trouver des moyens techniques pour réduire si non valoriser ces déchets lignocellulosiques. La valorisation des sous produits agricoles et agro-alimentaire par voie fermentaire constitue une approche biotechnologique très intéressante pour la production de cellulases vue leur richesse en cellulose. Parmi les substrats solides utilisés ; le son et la paille de blé ; la coque d'arachide, la sciure de bois...etc. En effet, L'importance de ces coproduits agricoles réside dans leur abondance, leur faible coût ainsi que dans le fait qu'ils représentent une source organique naturelle disponible partout sur la planète.

Cependant, selon Rouso (1987), d'une manière générale, il est surprenant de constater que la valorisation biologique de la cellulose et des substrats lignocellulosiques aie reçu encore peu d'application. Cela est du en partie à la nécessité d'hydrolyser les liaisons glucidiques (β -1,4), processus lent et difficile à réaliser. Toutefois, il faut noter que la grande majorité de ces études a été réalisée en cultures liquides dans lesquelles le substrat cellulosique n'est soluble. Ces cultures en milieu liquide présentent l'inconvénient de diluer considérablement les enzymes cellulolytiques synthétisées par le micro organisme ; de ce fait l'attaque de la cellulose non solubilisée par les enzymes spécifiques diluées n'est pas efficace. Par contre, les cultures sur substrats solides pourraient présenter des avantages intéressants. Etant donné que les champignons filamenteux se développent au contact du substrat, les enzymes excrétées se trouvent concentrées sur le substrat lui-

même, qu'elles peuvent hydrolyser beaucoup plus efficacement. En retour, les sucres libérés pourront être mobilisés rapidement par le micro organisme pour son développement. Le système en milieu solide paraît donc mieux adapté à la culture des micro organismes cellulolytiques sur de tels substrats insolubles.

Les microorganismes producteurs de cellulases cultivés en milieu solide sont dans la plupart des cas des champignons filamenteux, il s'agit en général des phycomycètes (*Mucor* et *Rhizopus*), des ascomycètes (*Aspergillus* et *Penicillium*) et des basidiomycètes. Ils constituent la première source d'enzymes performantes pour la transformation de la biomasse végétale en sucres convertibles en bioéthanol, en produits de fermentation ou simplement par une bio amélioration du substrat et de sa digestibilité pour l'alimentation animale (Singh et Pandey, 2009).

La valorisation de son d'orge par la fermentation solide constitue une approche biotechnologique très intéressante pour la production des cellulases vue sa richesse en cellulose 44 %. En effet, le son d'orge constitue une source de choix de cellulose par excellence .

L'objectif de ce travail est la production des cellulases fongiques principalement à partir de *Bjerkandera sp* et de *Trichoderma reesei* par valorisation de son d'orge. A cet effet, nous avons tracé les objectifs suivants :

👉 Suivi de certains paramètres des cultures de *Bjerkandera sp* et *Trichoderma reesei* sur le son d'orge (pH, matière sèche et la synthèse des protéines).

👉 Dosage des activités papier filtre (cellulases totales) et carboxyméthyl cellulases de *Bjerkandera sp* et de *Trichoderma reesei*.

Synthèse

Synthèse

 bibliographique

I. Biodégradation de la cellulose

1. Cellulose

1.1. Définition de la cellulose

La cellulose est le polymère le plus abondant dans la biosphère (Juwaied et *al.*, 2011). Selon Barnoud (1980), elle constitue un polymère naturel qui a un rôle structural de premier plan dans la grande majorité des parois végétales. Élément constitutif majeur de bois, la cellulose est également rencontrée comme constituant presque unique du coton et des fibres textiles du type lin, chanvre, jute et ramie. Elle représente 40 à 49 % de la matière sèche chez les résineux ou conifère (pin, sapin, épicéa) et 30 à 40 % chez les feuillus (peuplier, hêtre, charme) (Marouf et Tremblin, 2009).

1.2. Source de la cellulose

Selon Marouf et Tremblin (2009), la cellulose se trouve surtout dans la paroi secondaire, accompagnée par les lignines, mais aussi dans la paroi primaire de la fibre. A l'exception du coton, la cellulose n'est disponible que sous forme de résidus lignocellulosique. Les fibres de cellulose sont habituellement à l'état combiné avec d'autres polymères : l'hémicellulose et la lignine qui réduisent ainsi son accessibilité aux cellulases (Cullen et Kersten, 1992).

Les déchets issus de l'agriculture et des industries peuvent constituer une source importante de lignocellulose. Ainsi les diverses céréales cultivées dans le monde fournissent près de 1,7 milliards de tonnes de paille par an dont la majeure partie est inutilisée (Sasson, 1986). A ses résidus s'ajoutent les tourteaux et pailles des oléagineux, les feuilles et collectes des betteraves sucrières et les fanes des fruits et légumes (pommes de terre, topinambours...). Les déchets de l'exploitation de bois et des industries annexes (sciure) représentent également une source importante de résidus lignocellulosiques. Par ailleurs, les déchets urbains sont une source additionnelle de matière première cellulosique. En effet, 40 à 50% des déchets municipaux solides sont de la cellulose. Le tableau I représente la composition de quelques résidus lignocellulosiques.

Tableau I : Composition de quelques résidus lignocellulosiques (Howard et *al.*, 2003).

Substrats	Cellulose(%)	Hémicellulose(%)	Lignine(%)
Bagasse fraîche	33,4	30	18,9
Epis de maïs	45	35	15
Tiges de bois dur	40-50	24-40	18-25
Tiges de bois tendres	45-50	25-35	25-35
papier	85-99	0	0-15
Paille de riz	32,1	24	18
Paille de blé	30	50	15
Feuilles	15-20	80-85	0

1.3. Structure de la cellulose

1.3.1. Structure moléculaire

La cellulose est un homopolymère linéaire de haut poids moléculaire (PM 16000 à 32000 Da), constitué d'unités D-glycopyranose, reliées par des liaisons β -(1-4) glycosidiques, donnant à ce polysaccharide une structure plane (Barnoud, 1980). Les deux groupes OH qui se trouvent aux extrémités de la chaîne ont un comportement différent : Le C1 qui se trouve à l'une des extrémités est un groupe aldéhyde et a des propriétés réductrices tandis que le C4 qui se trouve à l'autre extrémité de la chaîne est un groupement hydroxyle alcool et donc non réducteur (Reguant et Rinaudo, 1999 ; Spinu, 2010).

Étant donné que la cellulose est un homopolymère linéaire, la grandeur de la chaîne moléculaire est habituellement caractérisée par le degré de polymérisation (DP). Ce lui-ci exprime le nombre de monomères présents dans la chaîne de cellulose (Reguant et Rinaudo, 1999). Il varie entre 400 et 14000. Le maximum est atteint pour la cellulose native (n'ayant subi aucun traitement). En moyenne, après traitement de purification, les celluloses possèdent un DP de 2500 (Mazza, 2009). La figure 1 représente la structure chimique partielle de la cellulose.

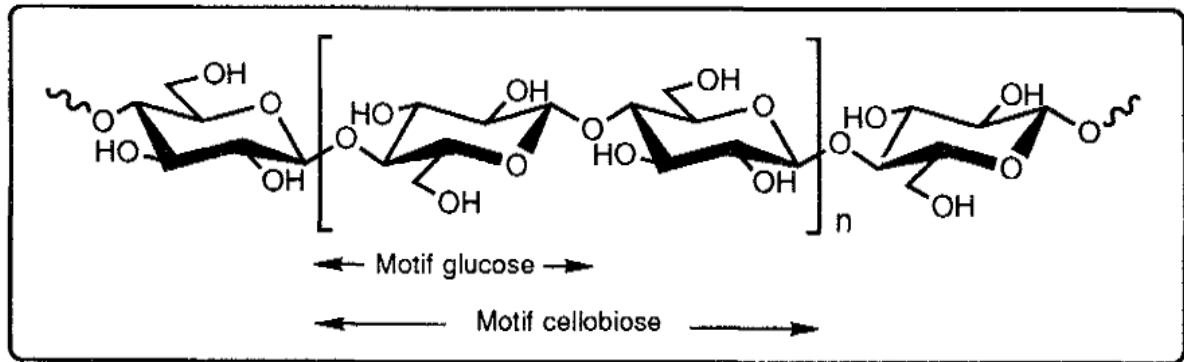


Figure 1: Structure chimique partielle de la cellulose (Thiebaud, 1995).

1.3.2. Structure supramoléculaire

Les chaînes de cellulose se regroupent parallèlement en faisceaux dans la paroi primaire pour former des micelles groupés en microfibrilles. Leur cohésion est assurée par des liaisons hydrogène entre les hydroxyles libres d'un glucose et les atomes d'oxygène d'un autre glucose de la chaîne adjacente (chaque unité anhydroglucose, à l'exception des unités terminales, comporte trois groupements $-OH$). Les fibres de cellulose sont construites à partir de l'agglomération de ces microfibrilles en fibrilles qui s'enroulent dans des directions opposées autour d'un axe central, ce qui donne un produit d'une résistance physique considérable. Elles sont noyées dans une matrice constituée d'autres molécules, généralement des hémicelluloses (Marouf et Tremblin, 2009). La structure supramoléculaire de la cellulose est illustrée dans la figure 2.

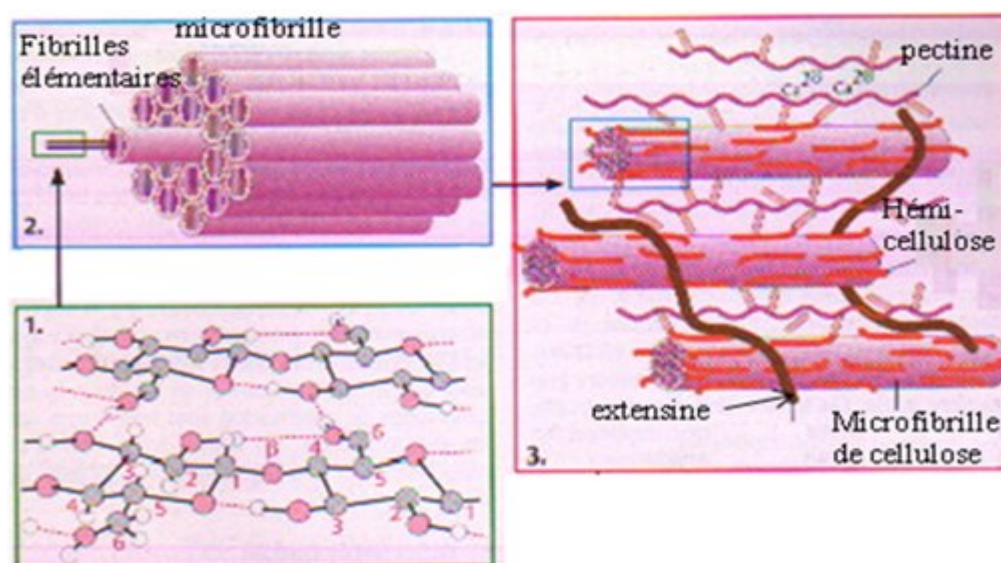


Figure 2: Structure supramoléculaire de la cellulose (Koolman et Rohm, 2004).

1.4. Dérivés de la cellulose

D'après Mario et *al.*, (2005), Alais et *al.*, (2008), la cellulose possède une grande inertie chimique: elle a un caractère hydrophile, bien que pratiquement insoluble dans l'eau comme dans les autres solvants usuels ; elle résiste aux acides dilués. Afin de l'utiliser dans l'industrie alimentaire, la cellulose doit être convertie en ses dérivés, qui sont des produits plus ou moins solubles et dont certains sont utilisés dans l'alimentation. Il existe deux grandes familles de dérivés de la cellulose :

- Les éthers de cellulose
- Les esters de cellulose

1.4.1. Ethers de cellulose

Les éthers de cellulose sont obtenus par la substitution des groupements hydroxyle par des groupements éther (Reguant et Rinaudo, 1999). Tous les éthers de la cellulose forment avec l'eau des solutions plus ou moins visqueuses. Le phénomène de gélification dépend du niveau de viscosité. Celui-ci est en fonction de la solubilité du produit, de la température, de sa concentration, de son degré de polymérisation, des facteurs du milieu (pH, autres composants de milieu, tels que amidon, sels...etc) (Linden et Lorient, 1994).

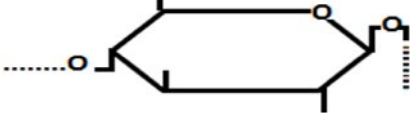
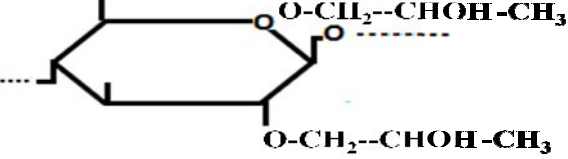
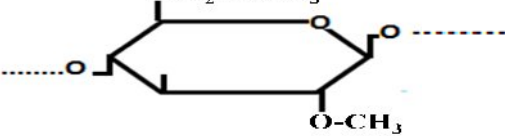
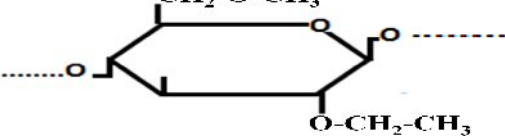
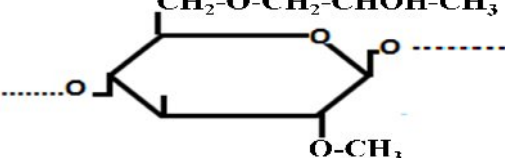
Les éthers formés par réaction de monochloroacétate en milieu sodique sont les carboxyméthylcelluloses (CMC) qui possèdent une très bonne solubilité dans l'eau. On les emploie comme agent de dispersion dans le jus de fruit, comme améliorateur de structure dans les crèmes glacées, pour la conservation des farines (1 à 2 %), pour la lutte contre la dyspepsie au lait, etc (Alais et *al.*, 2008). le tableau II résume les principaux éthers cellulosiques.

1.4.2. Esters de cellulose

Les esters de cellulose représentent une grande famille de dérivés de la cellulose. Ils peuvent être synthétisés, par exemple, par réactions de phosphorylation ou de sulfatation des hydroxyles libres de la cellulose au moyen d'un ou plusieurs acides (Khennaouil, 2009). L'estérification peut se faire en utilisant des acides minéraux et aussi organiques, ou leurs anhydrides avec l'aide de substances déshydratantes. De cette façon, on peut diviser les esters de la cellulose en deux types principaux ; les esters inorganiques et les esters

organiques, tous les deux ayant une grande importance industrielle (Reguant et Rinaudo, 1999).

Tableau II: Principaux éthers celluloses (Linden et Lorient, 1994).

Nom	Structure chimique
Carboxyméthylcellulose (CMC)	$\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-COO-Na}$ 
Hydroxypropylcellulose (HPC)	$\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH-CH}_3$ $\text{O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_3$ 
Méthylcellulose (MC)	$\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$ 
Méthylethylcellulose (MEC)	$\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$ 
Hydroxypropylméthylcellulose (HPMC)	$\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_3$ 

2. Cellulases

2.1. Nomenclature

- **Nom codifié de la Cellulase :** EC 3.2.1.4.
- **Nom systématique :** 1,4 - (1,3 ; 1,4) - beta-D – Glucan 4 –glucanohydrolase.
- **Nom recommandé :** cellulase.

A la nomenclature officielle basée sur les noms systématiques décrivant le substrat, le produit et le mode d'action de chaque enzyme, se superposent des appellations d'usage courant, tenant compte par exemple de l'utilisation de certains substrats. Une endoglucanase peut alors devenir une « Avicelase » ou une « CMCCase », selon qu'elle hydrolyse un substrat cristallin ou amorphe. Les exoglucanases qui libèrent du cellobiose sont communément appelées cellobiohydrolases, ou CBH (Bonnin et *al.*, 1997).

2.2. Enzymes cellulolytiques

La cellulase n'est pas une enzyme unique mais un composé de trois types importants de cellulases, dont seule l'action synergique peut aboutir à l'hydrolyse complète de la cellulose cristalline (Singhania, 2009).

2.2.1. Exo β (1-4) glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)

Cette enzyme attaque les polymères de cellulose par les extrémités non réductrices et libère exclusivement du cellobiose (Bonnin et *al.*, 1997 ; Arnaud et Guiraud, 1999 ; Xu et *al.*, 2007). L'enzyme seule n'est active, ni sur la cellulose cristalline, ni sur les celluloses solubles (carboxyméthyl cellulose). Par contre, elle attaque les celluloses partiellement dégradées. Le rôle essentiel de cette enzyme est de permettre l'action de l'endocellulase sur la cellulose cristalline. Seuls les champignons filamenteux semblent disposer d'une cellobiohydrolase : *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani*, *Chaetomium thermophile*, *Sporotrichum pulverulentum*. Dans tous les cas, une seule cellobiohydrolase par micro-organisme a été isolée (Arnaud et Guiraud, 1999).

2.2.2. Endo β (1-4) glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4)

L'endocellulase est capable de rompre les liaisons internes de la chaîne cellulosique. L'attaque se fait au hasard et entraîne la libération de cellodextrines, de cellobiose et de glucose. L'endocellulase est très active sur les celluloses solubles, activité d'autant plus importante que le degré de polymérisation est élevé. Par contre, son activité

reste très faible sur la cellulose cristalline. L'attaque « au hasard » de l'endocellulase a pour effet de créer de nouvelles extrémités non réductrices qui sont des sites réactifs pour la cellulbiohydrolase. Tous les microorganismes cellulolytiques possèdent au moins une endocellulase, parfois plusieurs : *Trichoderma koningii* possède ainsi quatre endocellulases à caractéristiques très différentes (Arnaud et Guiraud, 1999 ; Xu et *al.*, 2007).

2.2.3. β (1-4) glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21)

La cellobiase hydrolyse la liaison β -glucosidique du cellobiose et libère deux molécules de glucose. Selon sa spécificité, la cellobiase peut être active sur les β (1-4) oligoglucosidiques, mais l'activité diminue rapidement quand la longueur de la chaîne augmente. De nombreux auteurs ont montré que la cellobiase est fortement inhibée par son produit d'hydrolyse : le glucose. L'importance du rôle de la cellobiase lors d'une saccharification a été soulignée par divers auteurs. En effet, en hydrolysant le cellobiose, la cellobiase permet d'éviter l'inhibition de la cellobiohydrolase. Ainsi la vitesse globale de la cellulolyse est étroitement dépendante de l'activité cellobiasique (Arnaud et Guiraud, 1999; Xu et *al.*, 2007).

2.3. Caractéristiques des cellulases

2.3.1. Réaction et spécificité

Elle est représentée par l'hydrolyse des liaisons 1,4- β -D- glucosidiques de la cellulose et des lignines mais aussi l'hydrolyse des liaisons 1,4 et 1,3 en β -D- glucanes (Schamburg et Salzmann, 1991).

2.3.2. Substrats naturels

Selon Roussos (1987), le substrat naturel de la cellulase est la cellulose brute dont la dégradation complète aboutit à des espèces solubles dans l'eau du type cellobiose et glucose.

2.3.3. Masse moléculaire

Les cellulases ont des masses moléculaires très variables qui dépendent principalement de leurs origines. Certaines endoglucanases ont des masses moléculaires de 30 à 90 KDa, alors que d'autres sont de dimensions beaucoup plus faibles de l'ordre de 13 KDa (Odier et Rouau, 1985). Les exoglucanases ont des poids moléculaires de 30 à 50

KDa (Singh *et al.*, 1990) alors que les β -glucosidases ont des masses moléculaires plus élevées variant de 90 à 240 KDa (Sanyal *et al.*, 1988).

2.3.4. pH optimum

La plupart des préparations cellulolytiques étudiées ont un pH optimum variant de 3 à 7 (Lynd *et al.*, 2002). Celles d'origine fongique ont une gamme plus limitée (pH de 4 à 5), contrairement aux cellulases bactériennes dont le pH optimum est proche de la neutralité (Buchholz *et al.*, 1983).

2.3.5. Température optimale

La température optimale des cellulases fongiques varie entre 40 et 70°C alors que celle des bactéries varie entre 50 et 100°C, ce qui explique leur utilisation en industrie du textile (Ando *et al.*, 2002).

2.4. Différentes origines des cellulases

Les cellulases sont largement répandues dans la nature, elles sont recensées chez des organismes très divers : bactéries, champignons, plantes... etc. De ce fait, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale et microbienne (Xu *et al.*, 2000).

2.4.1. Origine animale

Plusieurs espèces animales (omnivores et herbivores) utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif. Des cellulases ont été isolées à partir du tube digestif d'escargot comestible (Smant *et al.*, 1998).

2.4.2. Origine végétale

Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes. Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces, des céréales tels que l'orge et le riz de la variété *Oryza sativa*. Les préparations cellulasiques d'origine végétale sont dépourvues d'exo- β -glucanases (Xu *et al.*, 2000).

2.4.3. Origine microbienne

Les bactéries et les moisissures utilisent la cellulose pour la production de quantités substantielle d'enzymes extracellulaires qui sont alors facilement récupérées du milieu de culture après fermentation, ces enzymes peuvent être présentes sur la surface des cellules, les cellulases bactériennes et fongiques sont les plus étudiées en raison de leurs utilisations potentielles en biotechnologie (Odier et Rouau, 1985).

2.5. Structure des cellulases

Les cellulases possèdent souvent une structure modulaire contenant un ou plusieurs domaines catalytiques liés à un ou plusieurs modules non catalytiques qui leur permettent de se rapprocher de leur substrat (Paës, 2005). Les deux domaines fonctionnels distincts : le site catalytique et le site de fixation du substrat, habituellement reliés entre eux par un peptide glycosylé flexible riche en Ser, Pro et Thr appelé « linker ». La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés (Hasper et *al.*, 2002).

2.6. Mécanisme d'action des cellulases

Dans un premier temps, les endoglucanases sont supposées attaquer la cellulose microcristalline, créant des failles dans les chaînes linéaires de la cellulose. L'action des endoglucanases est suivie par l'attaque des cellobiohydrolases en ces points de rupture qui libèrent du cellobiose. L'hydrolyse continue et combinée des endoglucanase et cellobiohydrolases entraîne la conversion complète de la cellulose en cellobiose et petits oligosaccharides. La β glucosidase agit sur le cellobiose et les petits oligosaccharides pour libérer le glucose. L'action synergique de toutes les enzymes impliquées dans ce phénomène est nécessaire pour réaliser l'hydrolyse effective de la cellulose cristalline (Roussos, 1987). Les sites de clivage ou d'action des activités enzymatiques majeures sont représentés dans la figure 3.

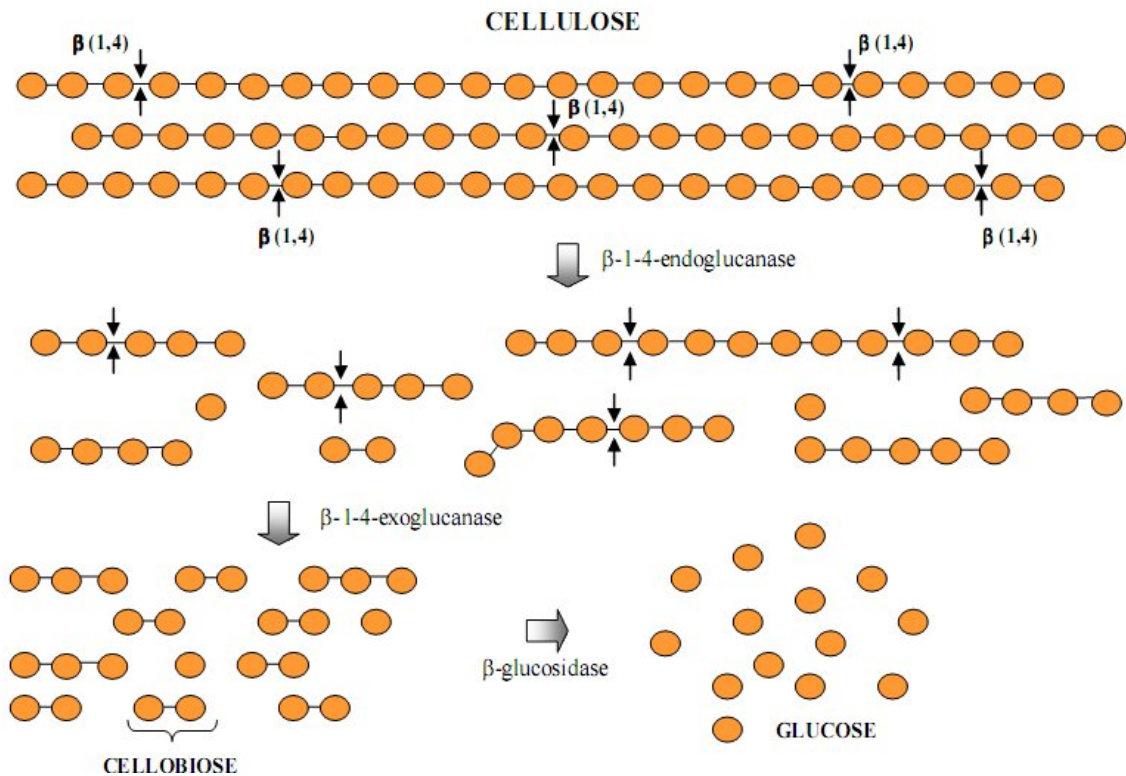


Figure 3: Représentation schématique des différentes étapes de la cellulolyse (Mussatto et Teixeira, 2010).

2.7. Domaines d'application des cellulases

Si le coût de production de cellulases reste important dans l'économie d'un procédé d'hydrolyse enzymatique, les performances élevées atteintes ouvrent à ces enzymes des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (Pourquié et Vandecasteele, 1993). Les cellulases figurent parmi les enzymes les plus utilisées dans l'industrie aujourd'hui. Elles interviennent notamment dans les industries du textile et du papier pour le lissage des fibres. De plus, elles auront un rôle essentiel en tant qu'enzyme de saccharification dans les futurs procédés de bioconversion de la biomasse lignocellulosique (Paës, 2005).

🚧 Industrie alimentaire

En industrie alimentaire, les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibres cellulosiques ainsi que pour l'obtention de l'amidon à partir de la colle végétale ou lors de l'extraction du café et du thé. Les glucanases, d'origine bactérienne ou fongique, améliorent la fabrication du moût destiné au brassage de la bière par un maltage amélioré. De plus, elles sont utilisées pour l'amélioration de la

qualité des produits d'extraction, de filtration ou de clarification des jus de fruits, des arômes, des protéines du soja, de l'amidon de pomme de terre et du maïs, des huiles végétales (Baret, 1987 ; Pourquoié et Vandecasteele, 1993 ; Rolf, 2005).

Nutrition animale

D'après Raimbault (1981) ainsi que Odier et Rouau (1985), les cellulases sont utilisées comme supplément dans des rations alimentaires du bétail et dans l'amélioration de la valeur nutritionnelle des fourrages pour ruminants. Selon Pourquoié et Vandecasteele (1993), l'addition de cellulases aux aliments pour volailles ou porcins devrait améliorer la digestibilité de leurs fraction cellulosique, et permettre donc de réduire à la fois les consommations de sources d'énergie (amidon) et l'excrétion de cellulose non digérée (et donc la charge polluante des excréta).

Industrie du textile et détergents

Les cellulases sont utilisées dans le traitement des toiles de coton, en particulier pour la préparation de « stone washed jeans » (Pourquoié et Vandecasteele, 1993 ; Xu & *al.*, 2007). Pendant le cycle de lavage, les cellulases hydrolysent (cela concerne des textiles qui contiennent de cellulose comme le coton) les microfibrilles qui se trouvent à la surface des fibres. Cela a pour effet que les textiles restent plus doux au toucher et également que leurs couleurs restent plus soutenues. En plus, elles relarguent les pigments adsorbés sur les fibres. Les cellulases utilisées dans les lessives en poudre sont issues d'*Humicula insolens* et de certaines espèces de *Bacillus* (Rolf, 2005).

Fabrication de pâte à papier

L'addition de cellulases aux suspensions de pâte au cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Pourquoié et Vandecasteele, 1993). Elle contribue également à l'amélioration de la qualité de papier. Les cellulases sont aussi utilisées pour le désencrage, améliorant de drainage. Dans le cadre de la récupération (recyclage) du papier, on les utilise pour éliminer les encres (Rolf, 2005).

Domaine thérapeutique

Selon Pourquoié et Vandecasteele (1993), certaines cellulases sont utilisées dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive.

3. Microorganismes cellulolytiques

La biodégradation de la cellulose est un des paramètres majeurs contrôlant le cycle du carbone sur terre. Elle est assurée par des microorganismes cellulolytiques qui secrètent à cet effet des enzymes aux propriétés très particulières : les cellulases. La biodégradation de la cellulose a lieu aussi bien en aérobie (par exemple à la surface du sol) qu'en anaérobie (le rumen animal) (Lekchiri et *al.*, 2006 ; Zermane, 2008).

Les microorganismes lignocellulolytiques sont retrouvés dans tous les biotopes où les déchets celluloseux s'accumulent : les composts, les fumiers pailleux, les litières, le rumen. Parmi les microorganismes cellulolytiques, on distingue : les bactéries, les levures et les moisissures (Coleman, 1978).

3.1. Bactéries

Selon Arnaud et Guiraud (1993), les microorganismes cellulolytiques sont rencontrés dans une grande variété de genres bactériens : *Cytophaga*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora* et *Ruminococcus*.

3.2. Levures

Très peu de levures ont une activité cellulolytique c'est le cas de la souche d'*Aureobasidium pullulans*. Par contre, un grand nombre de levures est capable d'utiliser le cellobiose tel que : *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*. Toutefois *T. wickerhamii* produit une exo 1-4- β -D glucosidase plus active sur le cellotétraose que sur le cellotriose et le cellobiose (Bouix et Leveau, 1993).

3.3. Moisissures

Les champignons sont les principaux acteurs de la dégradation de la matière organique, principalement les polymères structuraux tels que la lignine, la cellulose et les hémicelluloses. En dépit de la concurrence sérieuse des bactéries et des levures, les moisissures occupent une place importante dans le marché des enzymes, il s'agit presque exclusivement d'hydrolases dont les producteurs principaux appartiennent aux Zygomycètes (genres *Mucor* et *Rhizopus*) et aux Deutéromycètes (genres *Aspergillus* et *Trichoderma*) (Bouix et Leveau, 1993 ; Lekounougou, 2008).

Selon Arnaud et Guiraud (1993), les moisissures jouent un rôle de premier plan dans le cycle du carbone ; les plus étudiées sont : *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Schizophyllum*, *Trichoderma*, *Fusarium*.

Beaucoup de mycètes sont cellulolytiques, et la plupart de ces derniers produisent les cellulases une fois développées sur la cellulose (Mandales et Weber, 1969). Le champignon mésophile aérobie *Trichoderma reesei* et ses mutants ont été les plus étudiés pour la production de cellulases. Les cellulases de *T. reesei* présentent l'avantage de posséder les trois classes d'enzymes, bien qu'elles présentent souvent un déficit en β -glucosidase. De plus, elles sont inhibées rapidement par les produits formés (glucose et cellobiose) (Ogier et *al.*, 1999).

Seuls les microorganismes de pourritures blanches (champignons supérieurs) minéralisent complètement la matière lignocellulosique. Des analyses microscopiques ont montré que *Phanerochaete chrysosporium* dégrade la cellulose, les hémicelluloses et la lignine de manière simultanée, alors que *Ceriporiopsis subvermispora* tend à enlever la lignine avant les polyosides (Daniel et *al.*, 1994). *Trametes versicolor* cause, quant à lui, une dégradation simultanée de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses (Enoki et *al.*, 1988). Néanmoins aucun micro-organisme n'est capable d'utiliser la lignine comme seule source de carbone et d'énergie et il est donc généralement admis que la dégradation de la lignine est nécessaire aux micro-organismes pour pouvoir accéder à la cellulose et aux hémicelluloses (Cullen and Kersten, 2004).

II. Fermentation solide

1. Définition

Selon Raimbault (1981), la fermentation solide est définie comme étant la croissance de micro-organismes sur des substrats solides en absence totale ou presque d'eau libre. Dans cette fermentation, le substrat n'est ni solubilisé ni en suspension dans un grand volume d'eau (Aidoo et *al.*, 1982 ; Pandey, 2003).

2. Substrats

Tous les substrats solides ont une caractéristique commune, leur structure macromoléculaire de base étant de l'amidon, la cellulose, la lignocellulose, la pectine, et d'autres polysaccharides (Krishna, 2005).

Le support solide doit combler les besoins nutritifs du microorganisme, mais aussi assurer quelques impératifs physiques essentiels au bon déroulement de la FMS comme le transfert de chaleur et de masse, la granulométrie, la porosité, la capacité d'absorption de l'eau et la résistance à la compression et à l'agitation (Raimbault, 1981). La sélection du substrat dépend de son coût et de sa disponibilité. Sur le plan économique, il faut considérer le prix du milieu, le coût du fonctionnement de la fermentation et la valeur du produit final. Le plus économique est d'utiliser des substrats naturels comme les résidus de l'agriculture ou de l'agro-industrie. Grâce à la FMS, de nombreuses recherches ont été menées dans le but d'assurer une valorisation des sous-produits industriels pour différentes finalités telles que la détoxification, l'enrichissement en protéines microbiennes, ou la production de produits à forte valeur ajoutée (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

3. Applications de la fermentation solide

D'une manière générale, les applications de la fermentation solide concernent, selon Assamoi *et al.*, (2009), l'alimentation humaine (fromages, production de champignons comestibles, koji, choucroute et saucissons secs), le compostage et l'ensilage, la bio-filtration de gaz malodorants, la production d'aliments riches en protéines pour l'alimentation animale, la production d'enzymes (amylases, cellulases, xylanases, etc.) et de métabolites spécifiques (éthanol, acides organique, citrique, etc.).

Dans les applications industrielles, la fermentation à l'état solide peut être utilisée d'une manière contrôlée pour fabriquer le produit désiré. Le développement de bioprocédés, comme la biorestauration et biodégradation des composés dangereux, désintoxication biologique des résidus agro-industriels, la bioconversion de la biomasse, la biotransformation des résidus de culture pour l'enrichissement nutritionnel des production de produits à valeur ajoutée, tels que les produits biologiquement actifs, y compris les antibiotiques, les alcaloïdes, les enzymes, les acides organiques, les biopesticides, les biocarburants etc (Singhania, 2009). Quelques exemples des applications de la fermentation solide sont rapportés dans le tableau III.

Tableau III : Principales applications des processus de la fermentation solide dans les divers secteurs économiques (Rimbault, 1981).

	Applications	Exemples
Industrie alimentaire	Fermentations traditionnelles d'aliments	Koji, Trempeh, Fromages fermentés.
	Les sous produits de bioconversion	Ensilage, pulpe de café, compostage, désintoxication
	Additifs	Saveurs, colorants, acides organiques essentiels.
Agriculture	Biocontrol, bio insecticide	<i>Beauveria metarhizium</i>
	Croissance des plantes, hormones	Gibbérelline
Fermentation industrielle	Production d'enzymes	Amylases, cellulases, protéases, pectinases, xylanases
	Production d'antibiotiques	Pénicilline
	Production d'acides organiques	Acide lactique, acide gallique, acide fumarique, acide citrique.
	Production d'éthanol	Maltage et brassage d'espèce <i>Schwanniomyce</i>
	Métabolites fongiques	Hormones, alcaloïdes.

4. Microorganismes utilisés en fermentation solide

D'après Keith (2007) ainsi que Duchiron et Copinet (2011), les bactéries, les levures et les mycètes peuvent se développer sur les substrats solides, et trouvent l'application dans des processus de la fermentation solide. Cependant, les champignons filamenteux (et supérieurs) restent le groupe de microorganismes le plus utilisé en fermentation en milieu solide avec des applications très variées, grâce à leurs propriétés physiologiques, enzymologiques et biochimiques. Ils sont considérés comme les mieux adaptés à ce type de culture, car proche de leur habitat naturel. Quelques exemples des processus de la fermentation solide pour chaque catégorie des microorganismes sont rapportés dans le tableau IV.

Tableau IV: Principaux groupes de microorganismes impliqués dans les processus de fermentation solide (Raimbault, 1998).

Flore microbienne	Processus de la fermentation solide
Bactéries	
<i>Bacillus</i>	Le compostage, le natto, l'amylase.
<i>Pseudomonas sp.</i>	Compostage
<i>Serratia sp</i>	Compostage
<i>Streptococcus sp</i>	Compostage
<i>Lactobacillus sp</i>	L'ensilage, les aliments.
<i>Clostridium sp</i>	L'ensilage, les aliments.
Champignons	
Levures	
<i>Endomycopsis burtonii</i>	Tape, manioc, le riz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alimentation, l'éthanol.
<i>Schwanniomyces castelli</i>	L'éthanol, l'amylase.
Champignons filamenteux	
<i>Altermaria sp.</i>	Compostage
<i>Fusarium sp.</i>	Compostage, production de métabolites secondaires (acide gibbérellique).
<i>Aspergillus sp.</i>	Compostage, l'alimentation, les enzymes, acides organiques.
<i>Monilia sp.</i>	Compostage
<i>Mucor sp.</i>	Compostage
<i>Rhizopus sp.</i>	Compostage, l'alimentation, les enzymes.
<i>Phanerochaete chrysosporium.</i>	Compostage, dégradation de la lignine.
Champignons supérieurs	
<i>Pleurotus oestreatus, sajor-caju</i>	Champignons
<i>Lentinus edodes Shii</i>	Champignons
<i>Penicillium notatum, Penicillium requafortii</i>	La pénicilline, fromage.

5. Valorisation biologique des substrats celluloseux

Certains sous-produits agricoles (cossettes de betterave, paille de blé, rafles de maïs, bagasse de canne à sucre, râpures d'ananas) peuvent être utilisés pour l'alimentation du bétail, la fertilisation des sols et la production d'énergie par combustion. Toutefois, leur valorisation pourrait être améliorée par de nouveaux procédés permettant une exploitation plus approfondie de l'énergie potentielle que représente cette biomasse celluloseuse. Ceux-ci nécessitent la disponibilité des sucres simples obtenus par hydrolyse chimique ou enzymatique de la cellulose. Les cellulases capables de réaliser cette hydrolyse, peuvent être obtenues par la croissance de microorganismes sélectionnés, sur les substrats lignocelluloseux (Roussos et Hannibal, 1984).

La bioconversion de la cellulose offre une alternative intéressante pour la valorisation des déchets urbains et agroindustriels, en fournissant des carburants de substitution, des protéines microbiennes ou des métabolites à haute valeur ajoutée tels que les enzymes et les antibiotiques. Cependant, la rentabilité économique de toutes ces transformations biologiques est étroitement liée à la production de cellulases ainsi que les technologies enzymatiques de la saccharification de la cellulose (Roussos, 1987). Parmi les résidus agroindustriels, valorisés dans le but de produire des cellulases, le son d'orge dont la composition est donnée dans le tableau V.

Tableau V: Composition biochimique globale de son d'orge
(Antongiovanni et Sargentini, 1991).

Constituants	Teneur en %
Protéines	38
Cellulose	44
Hémicellulose	17
Lignine	0,7
Cendres	0,93

Matériel et
Méthodes



I. Matériel

1. Matériel analytique (Annexe I).

2. Matériel biologique

Au cours de notre expérimentation, deux souches fongiques ont été utilisées : *Trichoderma reesei* RUT C30, souche de référence provenant du laboratoire de microbiologie industrielle (Université de Reims Champagne-Ardenne, France) et *Bjerkandera sp.*, souche locale, isolée et sélectionnée par Belhamiche et *al.*(2011) et faisant partie de la collection des souches lignocellulolytiques du laboratoire de biochimie microbienne (université A/Mira de Bejaïa, Algérie).

Le choix de ces souches repose essentiellement sur leurs aptitudes à produire les cellulases. Les souches sont entretenues par un repiquage bimestriel sur milieu malt incliné et les milieux ensemencés sont incubés à 30°C pendant 5 à 7 jours puis conservés à 4°C afin de garder la viabilité des souches.

3. Milieu de culture

Un milieu de culture de type solide (fermentation en surface) est utilisé pour chaque souche. Il est composé de son d'orge comme seule source de carbone dont l'humidité du départ était de 10 %. Son humidité a été ajustée à 50% avec de l'eau distillée. Le milieu de culture préparé est reparti à raison de 20 g dans des Erlenmeyers de 500 ml à col large (10 Erlen pour chaque souche), puis autoclavé à 121°C pendant 20 min.

II. Méthodes

1. Etude morphologique

1.1. Macromorphologie

Dans le but de déterminer l'aspect, le développement et la couleur du mycélium des deux espèces étudiées, *Bjerkandera sp* et *Trichoderma reesei*, des observations à l'œil nu ont été réalisées après culture des deux souches pendant 5 jours à 30°C sur milieu malt gélosé dont la composition est donnée en annexe I.

1.2. Micromorphologie

Les deux souches fongiques ont fait l'objet d'une observation microscopique en utilisant la méthode de scotch. Cette étude a pour but la détermination des structures et la fragmentation ou non du mycélium, ainsi que la présence ou non de spores pour chaque espèce.

2. Conduite des cultures sur le milieu solide

2.1. Préparation des inocula

Après ensemencement des deux souches sur des boîtes de Petri contenant le milieu malt gélosé et leur incubation à 30°C pendant 10 jours, et à l'aide d'une solution stérile de tween 80 à 0,2 % (v/v), le mycélium ou les spores sont grattés sur chaque boîte de Pétri. Les suspensions mycéliennes (ou sporales) sont récupérées dans un flacon stérile (20 boîtes de Pétri soit environ 200 ml d'inoculum).

2.2. Ensemencement du milieu de culture

3 ml de l'inoculum mycélien (soit 8.62 mg /g substrat) de *Bjerkandera sp.*, ou sporal (8.10^8 spores /ml) du *T. reesei* servent à inoculer le milieu de culture, à base de son d'orge, réparti dans des Erlenmeyer de 500 ml. Le milieu ainsi ensemencé est incubé à 30°C pendant 10 jours (Belhamiche et al., 2011).

2.3. Obtention des extraits enzymatiques

A la fin de l'incubation, 10 g du substrat fermenté sont mixés avec 200 ml d'eau distillée pendant 2 minutes. Le mélange est centrifugé à 5000 tours/min à 4°C pendant 30 minutes. Les surnageants obtenus constituent les extraits enzymatiques bruts.

3. Suivi des paramètres de fermentation

3.1. Evaluation de la matière sèche (croissance) au cours de la fermentation

La matière sèche a été évaluée, au cours de la fermentation, par séchage des prises de 0.5 g de milieu de culture fermenté à 105° C jusqu'à poids constant.

3.2. Evaluation du pH au cours de la fermentation

La mesure de la variation du pH au cours de la fermentation est effectuée directement sur 5 g du substrat fermenté remis en suspension dans 100 ml d'eau distillée à l'aide d'un pH mètre.

4. Etude des extraits enzymatiques

4.1. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales dans les extraits enzymatiques est réalisé selon la méthode de Lowry et *al.* (1951). Le principe de cette méthode est basé sur la coloration bleu développée par les protéines suite à une réaction entre le réactif de Folin et les acides aminés, principalement la tyrosine et le tryptophane et un degré moins la cystéine et cystine. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration protéique contenue dans les extraits. Cette concentration est déterminée par référence à une courbe étalon (Annexe II, figure 1) en utilisant le protocole suivant :

- Préparation des solutions de B.S.A. diluées de concentrations croissantes 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 µg/ml ;
- Prélever de chaque tube 0,5 ml ; le tube témoin contient 0,5 ml de l'eau distillée ;
- Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de la solution (D) et 2,5 ml de la solution (C) ;
- Laisser reposer pendant 10 minutes ;
- Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de la solution (E) ;
- Incuber pendant 30 minutes à l'obscurité.
- La lecture de l'absorbance est effectuée à 750 nm après avoir étalonner le spectrophotomètre avec le témoin.

4.2. Dosage des activités enzymatiques

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

4.2.1. Dosage des sucres réducteurs (Miller, 1959)

Le principe de cette méthode est basée sur la coloration rouge développée suite à une réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (D.N.S.) en acide 3-amino-5-

Tableau VI : Différentes étapes de dosage de l'activité papier filtre.

	Gamme	Témoin enzyme	Enzyme
Papier filtre	/	/	1
Tampon (µl)	500	500	500
Equilibrer à 50°C pendant 10 min			
Glucose (µl)	250	/	/
Enzyme (µl)	/	250	250
Incuber pendant 60 min			
Arrêter la réaction en ajoutant 1.5 ml de DNS			
Placer 5 min à 100°C			
Refroidir dans un bain d'eau glacée			
Attendre 20 min			
Prélever 500 µl de milieu réactionnel et ajouter 1.0 ml d'eau déminéralisée			
Mesurer l'absorbance à 540 nm contre de l'eau déminéralisée			

4.2.3. Dosage de l'activité carboxyméthyl cellulase (CMCase)

L'activité de CMCase est déterminée selon la méthode de Ghose (1987). Dans un tube à essai, 0,25 ml de la solution C.M.C. 2% sont équilibrés à 50°C pendant 10 minutes. 0,25 ml de l'extrait enzymatique brut sont additionnés à la solution de CMC.

Après incubation à 50°C pendant 30 minutes, la réaction est arrêtée en ajoutant le DNS, puis le mélange réactionnel est porté à ébullition pendant 5 minutes à 100°C, puis refroidi dans un bain d'eau glacée. Le glucose libéré est dosé par la méthode de D.N.S. (Miller, 1959) le tableau VII résume les différentes étapes de dosages de l'activité CMCase selon Ghose (1987).

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose contenant dans les extraits. Cette concentration est déterminée par référence à une courbe étalon (Annexe III, figure 3) en utilisant le glucose à 2 g/l établit avec des concentrations variables en glucose de 0,5 à 2 mg/ml. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm.

Tableau VII : Différentes étapes de dosage de l'activité CMCCase.

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

Les activités papier filtre et CMCCase sont exprimées en unité internationale/ml. Une unité internationale représente la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer à partir du substrat (papier filtre ou carboxyméthyl cellulose) une μmol de glucose par min.

Résultats et Discussions



I. Etude morphologique

1. Macromorphologie

Sur le milieu malt gélosé, le mycélium de *Trichoderma reesei* présente une croissance très rapide et envahit complètement le milieu de culture, il est de couleur vert-jaunâtre après quelques jours d'incubation. La souche de *Bjerkandera sp* présente une croissance mycélienne rapide de texture floconneuse et de couleur blanche (Figure 5).

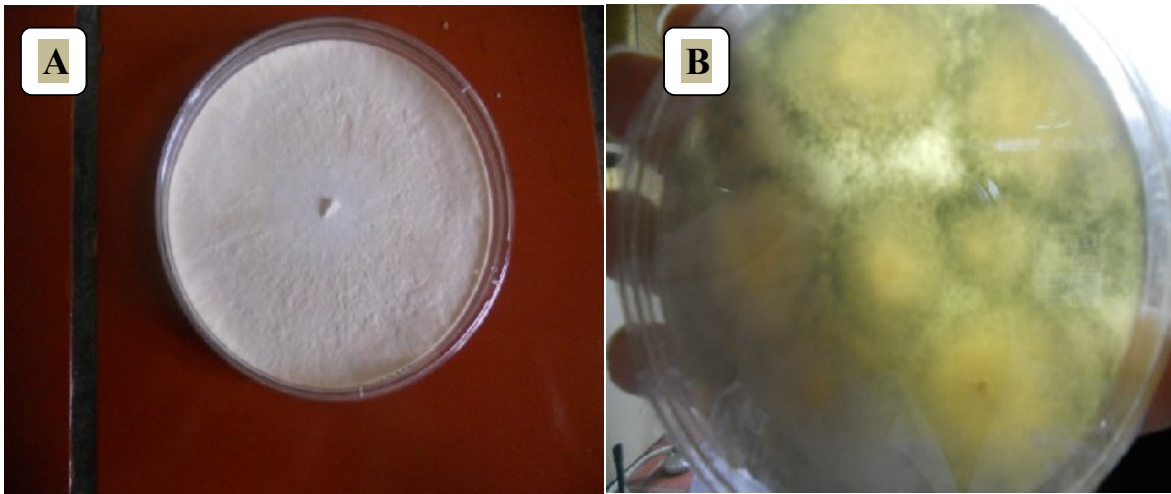


Figure 5 : Observation macroscopique des souches étudiées (à l'œil nu).

A : *Bjerkandera sp* (7 jours d'incubation à 30°C)

B : *Trichoderma reesei* (4 jours d'incubation à 30°C)

2. Micromorphologie

L'observation microscopique (G x 40) des deux souches fongiques étudiées fait apparaître les hyphes de *Trichoderma reesei* septées, très allongées et ramifiées. Les conidiospores sont ramifiées et les phialides sont sous forme ovoïde ou sphériques et sont directement insérées sur les conidiophores. Les spores sont de forme ovoïde et de couleur verte. En revanche, les hyphes de *Bjerkandera sp* sont cloisonnés et peu ramifiées. La présence de spores n'a pas été constatée. De plus, la culture ne montre pas de boucles aux septa des hyphes (figure 6).

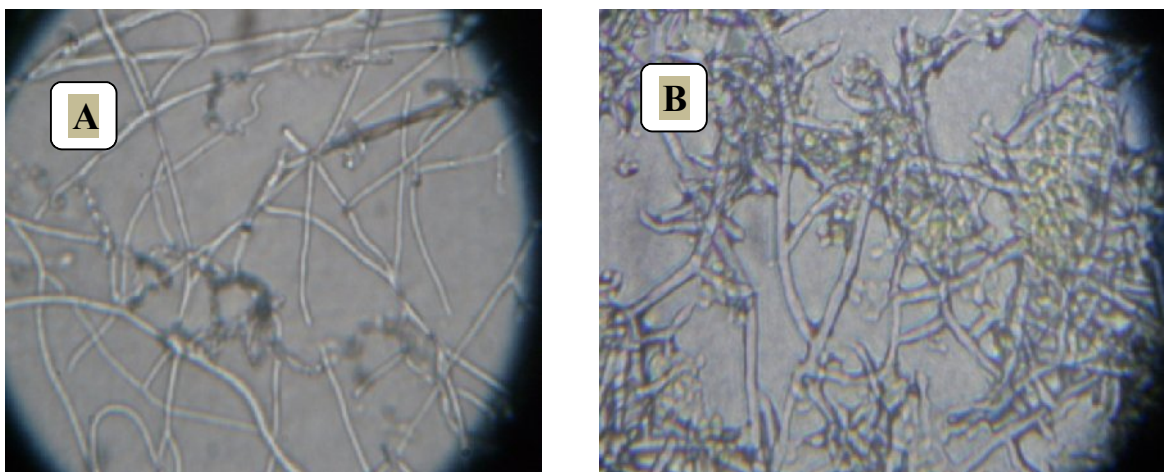


Figure 6: Observation microscopique des deux souches étudiées (G x 40)

A : *Bjerkandera sp* après 7 jours d'incubation à 30°C

B : *Trichoderma reesei* après 4 jours d'incubation à 30°C

II. Obtention des extraits enzymatiques

1. Culture des souches

L'aspect de la culture des souches fongiques étudiées sur le milieu solide à base de son d'orge, pendant 10 jours à 30°C, est représenté dans la figure 7.



Figure 7: Aspect de la culture des souches fongiques sur le son d'orge

A: *Bjerkandera sp*

B : *Trichoderma reesei*

La croissance visible de *Trichoderma reesei*, sur le son d'orge débute au bout de 24 h, par contre celle de *Bjerkandera sp* commence après 48 heures. Cette observation, peut être expliquée par le degré d'assimilation du son d'orge qui est reliée directement à la quantité des éléments entrants dans la composition du milieu de culture utilisé et la teneur

en eau de ce substrat. Certains paramètres peuvent aussi influencer la culture des souches sur un substrat solide entre autres la densité de l'inoculum. En effet, selon Raimbault (1981), l'inoculation par les spores fongiques doit être suffisante pour assurer un ensemencement homogène du substrat et un démarrage rapide de la croissance de façon à éviter une éventuelle compétition avec des contaminants.

La température d'incubation et le pH initial de milieu de culture peuvent avoir un rôle important dans l'initiation de la croissance. Selon Roussos (1987), les champignons filamenteux se développent sur des milieux de culture acides plutôt qu'alcalins. De plus, l'étude menée par Singh et *al.* en 1989 avec une culture d'*Aspergillus niger* en milieu solide à base des épis de maïs, a montré que le pH de milieu de culture affecte d'une manière directe la croissance des microorganismes et leurs activités métabolique et enzymatique. La même observation a été constatée par Irfan et *al.* en 2011.

Pendant la période d'incubation, le microorganisme se développe en utilisant les produits à faible masse moléculaire présents dans le substrat, et secrète différentes enzymes extracellulaires. De plus, selon Roussos (1987), la teneur en eau du substrat joue un rôle capital lors de la fermentation en milieu solide car elle affecte de façon directe la germination de l'inoculum et la croissance du mycélium. D'après Arnaud et Guiraud (1999), le développement, et souvent la survie d'un microorganisme sont conditionnés par la présence d'une certaine quantité d'eau libre dans le milieu. Cependant, cette exigence varie avec les espèces. Les champignons filamenteux aiment les environnements humides pour leur croissance. La quantité d'eau disponible (ou libre) dans le substrat et dans l'air environnant est très importante pour initier leur développement (Duchiron et Copinet, 2011). D'après les travaux de Raimbault (1981), les microorganismes ont une bonne croissance sur des substrats dont l'humidité varie entre 50 à 55%. En revanche, Gervais et Molin (2003), ont montré que la quantité en eau dans une fermentation solide influence d'une façon directe la germination et la sporulation des champignons filamenteux ainsi que leurs activités métaboliques.

De nombreux nutriments peuvent réguler la sporulation par des effets métaboliques. Ces nutriments incluent des sources de carbone, d'azote, des sels minéraux, des vitamines ou des cofacteurs. Le carbone représente la source d'énergie qui sera disponible pour la croissance du micro-organisme. La source d'azote stimule la formation des conidies chez les champignons. En outre, certains composés synthétisés par le microorganisme lui-même se sont avérés également capable d'induire sa propre sporulation (Krishna, 2005).

2. Suivi des paramètres de la fermentation

2.1. Evolution de la matière sèche

L'évolution de la matière sèche au cours de la fermentation solide des deux souches fongiques étudiées est suivie chaque 24 heures d'incubation.

Les résultats, illustrés par la figure 8, indiquent que les deux champignons s'adaptent rapidement au substrat, on remarque que la phase de latence est presque réduite. A partir de 2^{ème} jours d'incubation, la vitesse de croissance est nettement accélérée et représente la phase exponentielle qui dure 5 jours, on aboutit à une phase stationnaire au bout du 6^{ème} jour durant laquelle la matière sèche varie légèrement entre 53,2% à 53,9% pour la souche *Bjerkandera sp.* Cependant, on n'observe pas de phase de déclin.

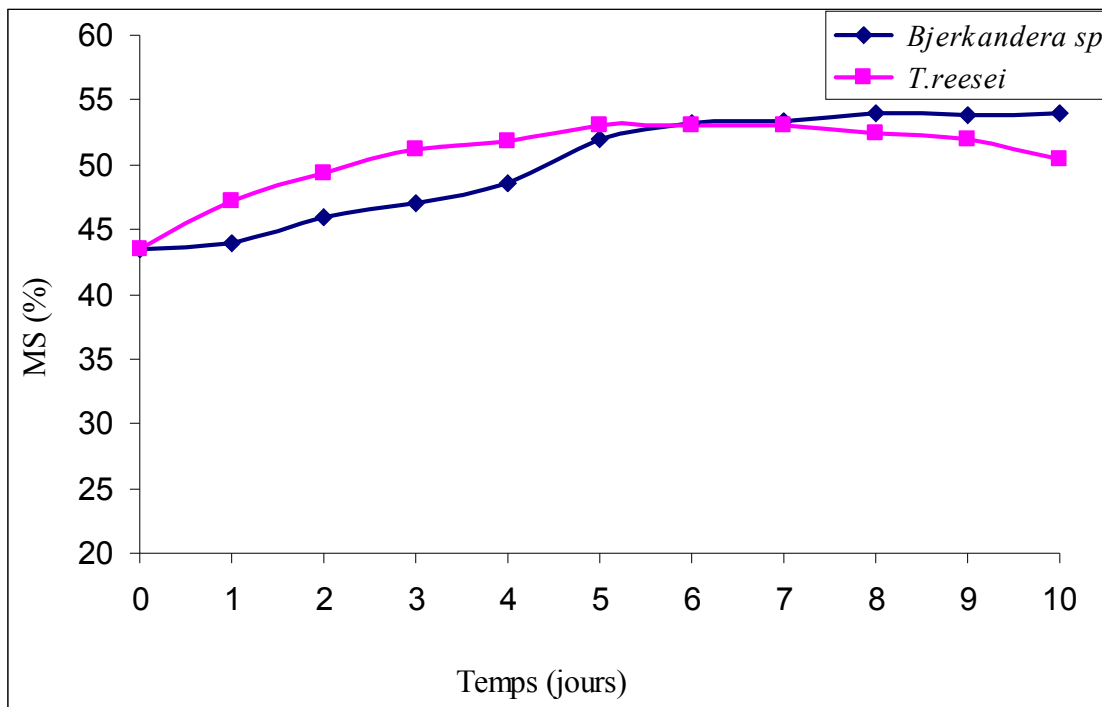


Figure 8 : Evolution de la matière sèche au cours de la fermentation

Par ailleurs, pour la croissance du *Trichoderma reesei* on remarque que la vitesse de la croissance augmente progressivement dès le premier jour d'incubation, le taux de matière sèche atteint un maximum au bout du 5^{ème} jour avec une valeur de 53%. En revanche, une phase de déclin a été enregistrée à partir du 8^{ème} jour durant laquelle la matière sèche varie de 52,45 % à 50,39 %.

Selon Leveau et Bouix (1999), la phase de latence suit immédiatement l'ensemencement du microorganisme dans le milieu de culture. Il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle le micro organisme synthétise, en particulier, les enzymes qui lui sont nécessaires pour métaboliser le substrat présent. Au cours de cette première phase, il n'y a pas de reproduction cellulaire. La durée de cette phase varie principalement avec la taille de l'inoculum ayant servi à l'ensemencement, l'âge des cellules qu'il renferme mais aussi et surtout avec leur état physiologique et biochimique.

Contrairement aux bactéries et aux levures, la phase de croissance exponentielle n'est pas toujours observée pour les champignons filamenteux. Cette phase est souvent relativement courte et se maintient habituellement pendant 3 à 6 doublements de la biomasse. Elle est suivie d'une phase de ralentissement pendant laquelle la cinétique de croissance est linéaire. Cependant, selon Raimbault (1981), l'explication de cette limitation de la phase exponentielle n'a pas encore été fournie. En revanche, la phase de déclin qui commence à apparaître dans la culture de *Trichoderma reesei* est peut être due, selon Bensmira (2006), à la concentration des cellules viables qui a diminué du fait de leur lyse causée par les conditions devenues défavorables dans le milieu (accumulation de produits d'excrétion métabolique, autolysines...etc).

2.2. Evolution du pH du milieu

Le suivi du pH au cours de la fermentation a été réalisé après mise en suspension du substrat fermenté dans de l'eau distillée. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 9. Le pH reste relativement stable pour la souche *Bjerkandera sp.* Par contre, Une augmentation de pH a été constatée pour la souche de référence qui atteint une valeur de 8,55 au 8^{ème} jour de culture. Au delà, le pH diminue.

L'activité métabolique des microorganismes provoque une variation du pH du milieu de culture influençant par la suite leur croissance. L'acidification du milieu est peut être due à la production d'un métabolite acidogène qui acidifient progressivement le milieu de culture. La majorité des produits de la fermentation de cellulose sont l'acétate, le lactate, l'éthanol, le CO₂ et H₂ (Botton et *al.*, 1990 ; Salhi-Mouhand Oussaid, 2004 et Lakhtar, 2009).

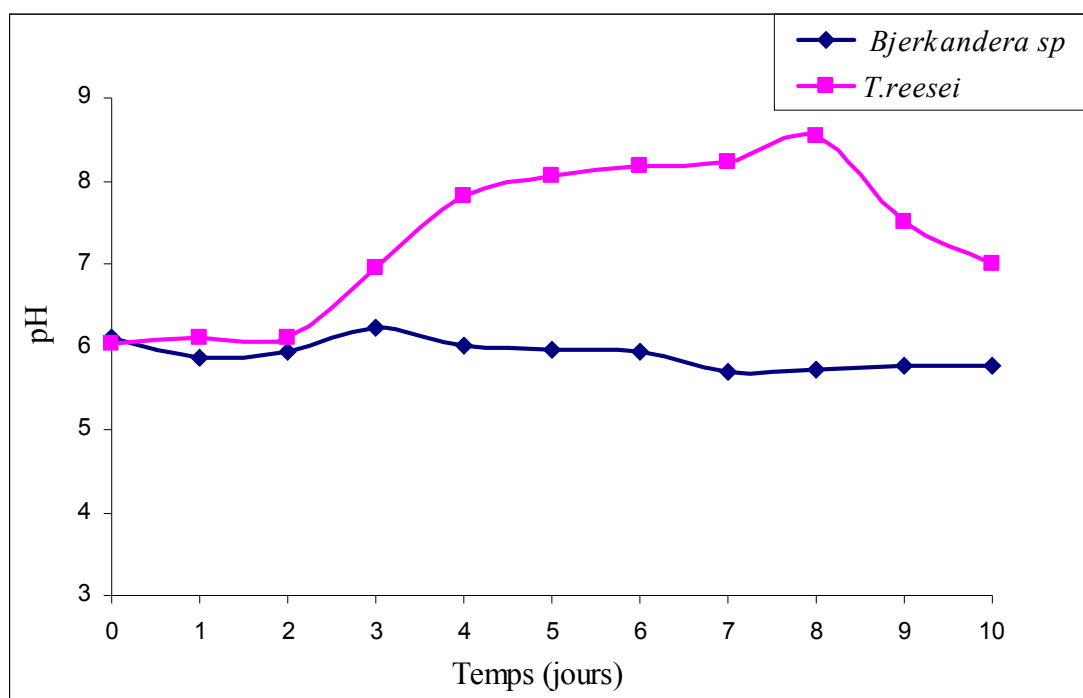


Figure 9 : Evolution de pH au cours de la fermentation

Par ailleurs, l'augmentation du pH du milieu, est due, selon Bensmira (2006) et Belmessikh (2011), à la dégradation protéique et des acides aminés qui libèrent l'ammoniaque, ce qui rendent le milieu basique. De plus, la nature du substrat affecte le pH de milieu de culture au cours de la croissance.

III. Etude des extraits enzymatiques

1. Evolution des protéines totales

Les protéines synthétisées par *Bjerkandera sp* et *Trichoderma reesei*, au cours de leur croissance sur le son d'orge, ont été dosées selon la méthode de Lowry et *al.*, (1951). Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 10.

La concentration en protéines varie relativement de la même manière au cours de la fermentation pour les deux souches fongiques. La synthèse des protéines débute dès les premières heures de la fermentation. La teneur en protéines atteint une valeur maximale de 714,28 µg/ml au bout du 9^{ème} jour de culture pour la souche *Bjerkandera sp*. En revanche, une valeur maximale de l'ordre de 674,28 µg/ml est constatée pour la souche de référence le 7^{ème} jour. On peut considérer que la teneur en protéines produite par *Trichoderma reesei* 674,28 µg/ml, se situe dans la moyenne par rapport aux teneurs relevées par certains auteurs, qui varient entre 420 µg/ml, 1775 et 1230 µg/ml sur le grignon d'olive, la pulpe de

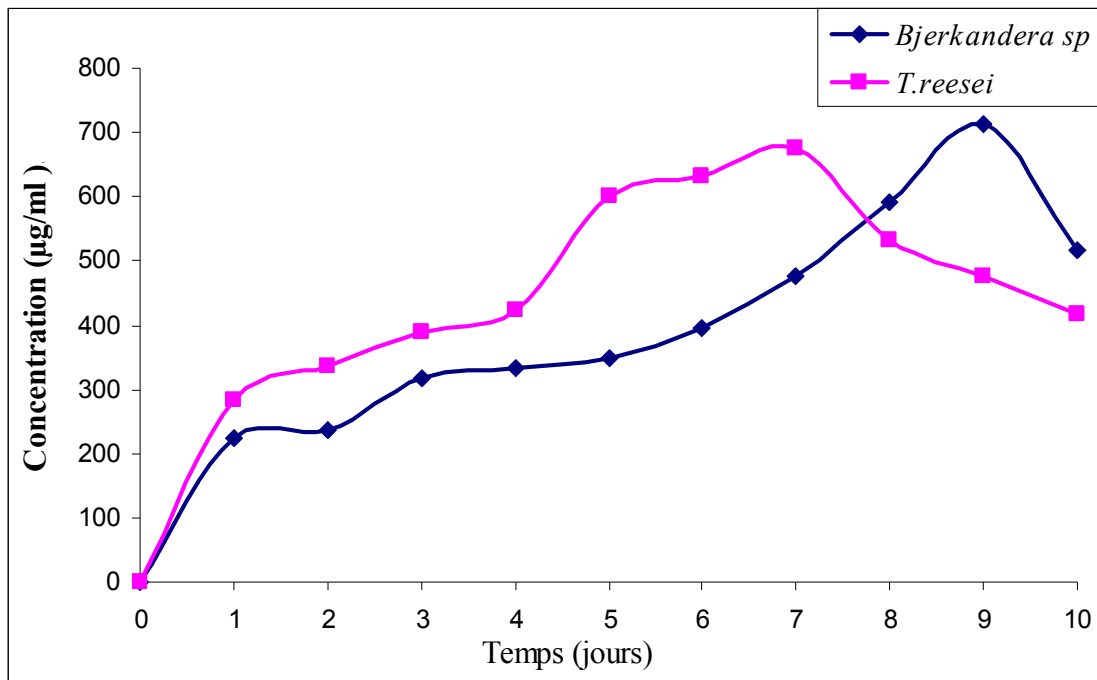


Figure 10 : Evolution des protéines totales au cours de la fermentation

betterave et le lactose respectivement (Illanes et *al.*, 1988 ; Salhi, 2004). Cependant, Roussos et Raimbault (1982) ont obtenu une valeur de 1000 µg /ml au cours d'une culture liquide de *Trichoderma harzianum*. Par ailleurs Palma et *al.* (2000) ont rapporté une valeur de 1140 µg/ml pour *Bjerkandera sp* cultivée en milieu liquide à base de glucose et peptone.

Selon Bensmira (2006), l'augmentation de la teneur en protéines au cours de la fermentation se traduit par la synthèse protéique, entre autres les enzymes.

Une légère diminution de la concentration en protéines a été observée au cours de la croissance ; elle atteint la valeur de 516,66 µg/ml et de 476,19 µg/ml pour *Bjerkandera sp* et *Trichoderma reesei* respectivement. Dans une étude similaire réalisée par certains auteurs (Raimbault, 1981 ; Saradouni, 1994 ; Roméro et *al.*,1999 ; et Belmessikh, 2011), cette diminution est due à l'épuisement de la source d'azote exogène ou à une hydrolyse partielle par des protéases libérées au cours de la lyse cellulaire.

2. Evolution des activités cellulolytiques

2.1. L'activité papier filtre (cellulases totales)

La figure 11 illustre la cinétique de l'activité papier filtre (cellulases totales) de *Bjerkandera sp* et *Trichoderma reesei* cultivées par fermentation solide sur le son d'orge.

L'activité papier filtre commence à apparaître dans le milieu de culture après 24 heures d'incubation. Cette synthèse se poursuit de manière accélérée pour atteindre un maximum d'activité de 0,474 UI/ml au bout du 6^{ème} jour de fermentation pour *Trichoderma reesei*. Par rapport à la souche de référence, la souche *Bjerkandera sp* atteint une valeur de 0,185 UI/ml au bout du 5^{ème} jour de culture. Au delà, l'activité diminue pour les deux souches.

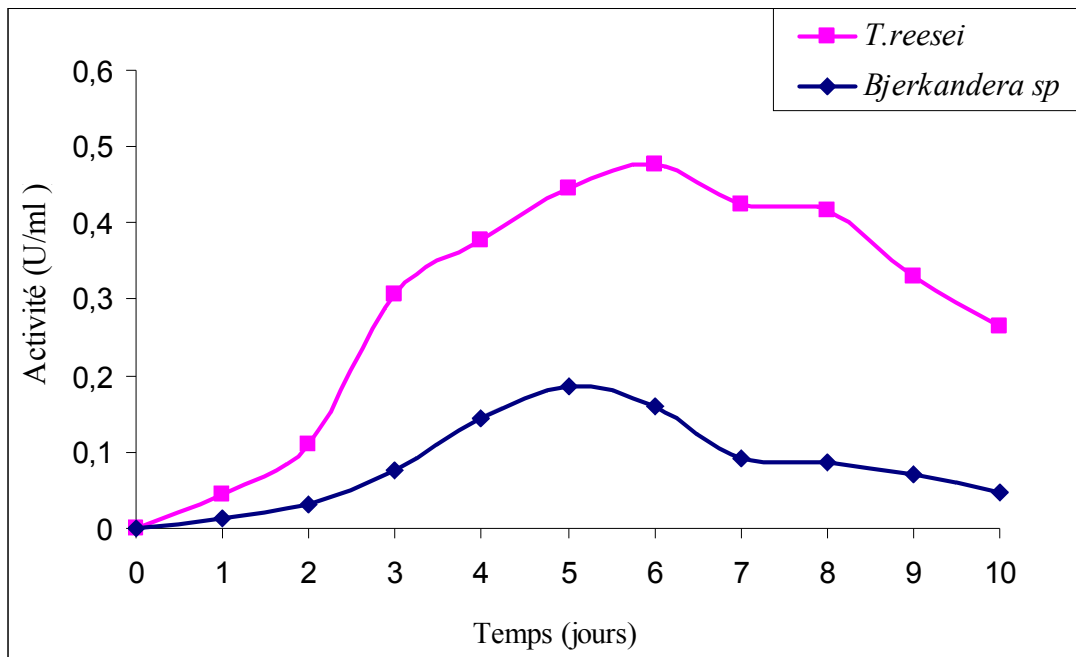


Figure 31 : Evolution de l'activité papier filtre (cellulases totales).

Le maximum d'activité s'explique probablement par les changements morphologiques et physiologiques des souches fongiques affectant la production des cellulases. D'après Kang et al., (2004), la nature de substrat utilisé en fermentation solide s'avère inductrice et affecte d'une manière directe la synthèse des cellulases. Ainsi, Gautam et al. en 2011 en étudiant la *Trichoderma reesei*, ont rapporté une valeur de 2,3 U/ml sur les déchets municipaux. Une valeur de 6,14 UI/ml sur la bagasse a été enregistrée par Madamwar et Patel en 1992. Par ailleurs, Kang et al. (2004) ont obtenu une valeur de 7,7 UI/ml sur la paille de riz pour *Trichoderma reesei*.

Toutefois, les valeurs obtenues dans notre étude sont relativement faibles par rapport à celles observées sur certains substrats cellulosiques plus facilement dégradables ainsi que sur les déchets municipaux solides. Dans une étude similaire, Belhamiche et al. (2011) ont obtenu une valeur de 45,76 UI/g MS soit 1,32 UI/ml au cours de la croissance de *Bjerkandera sp* sur le son de blé. En revanche, nos résultats concordent avec ceux de

certain auteurs. En effet, une valeur de 0,26UI/ml et de 0,07UI/ml ont été obtenues par Maninder et *al.* en 1984 respectivement sur la paille de blé et la bagasse durant la culture de *Trichoderma harzianum* en milieu solide.

2.2. L'activité carboxyméthylcellulase (endoglucanases)

La cinétique de production des carboxyméthylcellulases par les souches fongiques étudiées est illustrée par la figure 12.

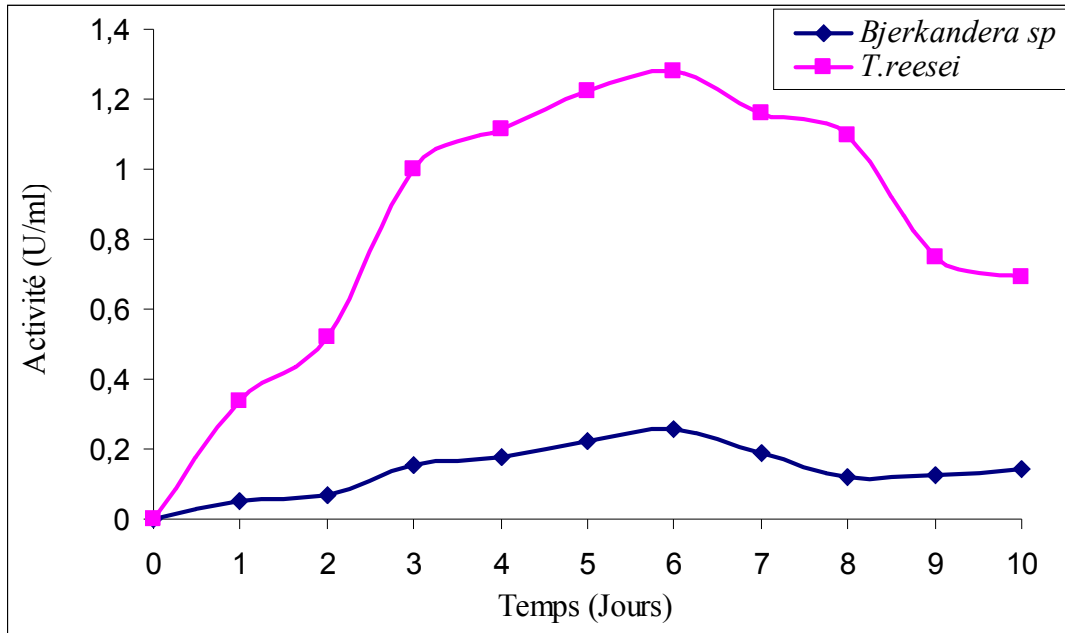


Figure 12 : Evolution de l'activité carboxyméthylcellulase.

La synthèse des carboxyméthylcellulases apparaît dans le milieu après quelques heures de fermentation. Cette synthèse se poursuit de manière plus accélérée pour atteindre un maximum d'activité de 1.28 UI/ml au bout du 6^{ème} jour de culture pour la souche de référence. En revanche, cette activité atteint seulement 0,256 UI/ml pour *Bjerkandera sp.* Par ailleurs, l'activité carboxyméthylcellulase diminue à partir du 7^{ème} jour de fermentation et elle se poursuit pour atteindre la valeur de 0,691 UI/ml pour *Trichoderma reesei* et une valeur de 0,117 UI/ml pour *Bjerkandera sp.*

Avec des substrats plus récalcitrants tels que les déchets municipaux solides et le grignon d'olive, nos résultats concordent avec ceux rapportés par certains travaux de recherche. En effet, l'étude menée par Gautam et *al.* en 2011 sur *Trichoderma reesei* cultivé sur les déchets municipaux produit 1,95 UI/ml, tandis que les valeurs rapportées par Salhi (2004) en étudiant les cellulases des champignons des pourritures blanches, sont de

l'ordre de 1,4 et 3 UI/ml pour *Trametes versicolor* et *Phanerochaete chrysosporium* respectivement.

De plus, Saradouni et al. (1999), ont rapporté des valeurs de 2,6 UI/ml au 7^{ème} jour de la fermentation d'*Aspergillus fumigatus* en milieu solide à base de paille d'avoine. Par ailleurs, selon les travaux de Maninder et al. en 1984 ainsi que Madamwar et Patel en 1992, des activités de 11,1 UI/ml sur la paille de blé et 19,6 UI/ml sur la bagasse ont été rapportées en cultivant une souche de *Trichoderma harzianum* en milieu solide.

Dans une étude similaire, Dinis (2009) a obtenu des faibles activités lors de la culture de quelques champignons de pourritures blanches (*Bjerkandera adusta*, *Ganoderma applanatum*, *Phlebia rufa*, *Trametes versicolor*), sur le son de blé, de l'ordre de 0,006 UI/ml, 0,067 UI/ml, 0,028 UI/ml et 0,054 UI/ml respectivement.

Toutefois, l'activité élevée de CMC_{ase} est dû à la sécrétion d'endoglucanase, pour hydrolyser le nombre maximum d'emplacements accessibles dans les composants de cellulose aux étapes initiales. La diminution de l'activité papier filtre et CMC_{ase} est due certainement à l'épuisement du milieu en nutriments nécessaires à la croissance (Roméro et al., 1999) et d'autre part, à l'autolyse du mycélium suite à la libération des protéinases (Bensmira, 2006). Selon Arnaud et Guiraud (1999), la production des métabolites est régulée par le produit d'hydrolyse. De ce fait, les cellulases sont faibles par suite des phénomènes d'inhibition exercés par les produits d'hydrolyse de cellulose (glucose, cellobiose). D'après Roussos (1987), le glucose bloque principalement la synthèse de β -glucosidase et les endocellulases et le cellobiose inhibe les exoglucanases.

Les activités obtenues papier filtre et CMC_{as} sur le son d'orge est due certainement aux éléments constitutifs de base de ce substrat, sa texture relâchée dans des conditions humides et sa surface de croissance. D'après Vidaud et al., (1982), l'accessibilités des cellulases à la cellulose dépend des propriétés de surface des fibres, des liaisons entre les divers constituants et de la taille des particules, tandis que sa dégradation est liée à son degré de cristallinité.

Certains paramètres, dans la fermentation solide, ont un rôle important dans la sécrétion des cellulases, qui sont dans certains cas des facteurs limitant. Quiroz et al.(2009) ont montrés que la variation des conditions de culture de quelques champignons de pourritures blanches sur la paille de blé modifie le rendement en activités cellulolasiques. Ainsi, la température affecte l'activité cellulase ; la culture de *Bjerkandera adusta* à 20°C,

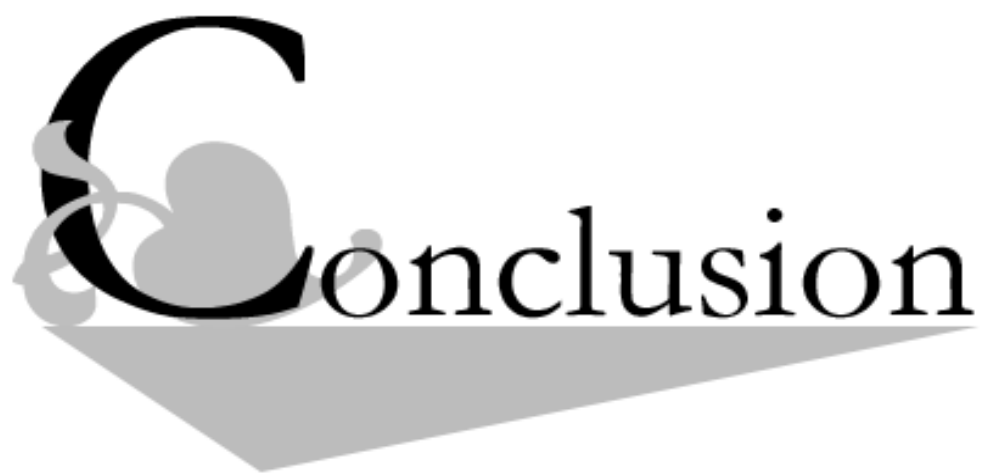
25°C et 28°C ont montré des activités de 1UI/mg ; 1,7 UI/mg à et de 2,4 UI/mg de matière sèche

Le pH de milieu de culture influence aussi d'une manière remarquable l'activité enzymatique. D'après les travaux de Shu-bin et *al.* en 2012 en cultivant *Bacillus subtilis* et en variant le pH initial du milieu de culture, ont montré que le meilleur rendement en activité est obtenu au voisinage de la neutralité.

D'un autre coté, la richesse de substrat de fermentation en matière cellulosique est considérée comme l'un des plus importants facteurs agissant sur la production des cellulases et cela a été confirmé par les recherches menées par certains auteurs. En effet, Singh et *al.* en 1989, ont montré que la concentration du milieu de culture en substrat affecte la synthèse enzymatique, avec *Aspergillus niger* cultivé en milieu solide à base des épis de maïs, la concentration de substrat allant de 4, 8, 12, 16 et 20% montre des activités maximales de papier filtre et CMCCase de l'ordre de 1,58 et 2,16 UI/ml respectivement.

En effet, selon les travaux de Gal, (1997) ainsi que ceux de Matthews et *al.* (2006) cités par Alarcon –Gutiérrez (2007), l'une des principales limitations de l'activité des cellulases est l'insolubilité de la structure cristalline de la cellulose qui constitue un obstacle pour la fixation des différentes cellulases sur leur substrat respectifs. Ainsi, la première étape de la dégradation de cellulose vise à dénaturer sa structure cristalline pour la rendre amorphe et permettre ainsi l'attaque des différentes cellulases. A noter néanmoins, que la proportion de cristallinité des microfibrilles est très variable chez les végétaux. Par contre, il existe dans les microfibrilles de cellulose, des zones naturellement amorphes qui constituent des substrats directement disponibles pour l'attaque séquentielle des différentes cellulases.

C Conclusion



Conclusion

L'objectif principal visé dans notre travail consiste en l'étude de la croissance et de la production des cellulases, par fermentation sur substrat solide à base de son d'orge, à partir d'une souche locale *Bjerkandera sp* et d'une souche de référence *Trichoderma reesei*.

Certains paramètres de la fermentation des deux souches fongiques étudiées ont été suivis, tels que la croissance (matière sèche), le pH du milieu de culture, la synthèse protéique ainsi que la production des cellulases.

La cinétique de croissance a montré qu'au bout du 5^{ème} jours de la fermentation, la souche de référence produit un maximum de biomasse de l'ordre de 53% tandis que celle de *Bjerkandera sp* atteint une valeur de 53,9 % au bout du 8^{ème} jours de culture.

Le suivi de la variation du pH du milieu au cours de la fermentation indique que le pH reste relativement stable pour la souche *Bjerkandera sp*. Par contre, Une augmentation de pH a été constatée pour la souche de référence qui atteint une valeur de 8,55 au 8^{ème} jour de culture.

Par ailleurs, la production de protéines atteint un maximum de 714,28 µg/ml pour *Bjerkandera sp*, tandis que celle de *Trichoderma reesei* est estimée à 674,28 µg/ml. Cependant, une diminution au-delà des optima a été enregistrée.

L'étude de la synthèse des cellulases, durant la fermentation a montré une activité papier filtre de 0,185 UI/ml et CMC ase de 0,256 UI/ml et ce pour la souche *Bjerkandera sp*. Cependant, des activités supérieures ont été obtenues par la souche de référence ; de l'ordre de 0,474 UI/ml et de 1,28 UI/ml pour l'activité totale et CMCase respectivement.

A travers ces résultats, nous remarquons donc l'intérêt de poursuivre les investigations des champignons à usage industriel pour la production de métabolites, particulièrement les cellulases tout en valorisant les déchets agroindustriels.

Au terme de cette étude, nous constatons la possibilité d'obtenir des cellulases à partir de *Bjerkandera sp* et *Trichoderma reesei* sur le son d'orge. Cependant, ces résultats restent partiels et préliminaires et d'autres travaux s'imposent car les approches sont globales. Aussi, il serait intéressant d'approfondir cette étude par :

- 👉 Une optimisation de la production des cellulases ; il s'agit de chercher les conditions optimales de croissance et de production telles que la taille de l'inoculum, température de croissance, pH initial du milieu...etc.
- 👉 Dosage de l'activité β -glucosidase ;
- 👉 Rechercher la production des enzymes dégradant la lignine (laccases) ;
- 👉 Ajout des sels minéraux pour enrichir le milieu de culture et par conséquent la production des cellulases ;
- 👉 Réalisation d'une coculture entre les champignons cellulolytiques, ceci peut entraîner une augmentation de protéines et également une amélioration de la dégradation de la cellulose. De plus, ce type de culture peut réduire ou éviter le prétraitement physique ou chimique généralement préconisé avant la culture de champignons sur les substrats cellulosiques ;
- 👉 Une caractérisation des enzymes cellulolytiques ;
- 👉 Tester d'autres déchets utilisés tels que les pailles des céréales, les sciures et le grignon d'olive.

Références
bibliographiques

A

- Aidoo KE, Hen Dry R, et Wood BJB. (1982).** Solid Substrate Fermentations. In: Laskin IA. Advances in Applied Microbiology. Vol: 28. Edition Academic Press. New York, London, Paris, San Diego, San Francisco, São Paulo, Sydney, Tokyo et Toronto, pp. 201-237.
- Alais C, Linden G et Miclo L. (2008).** Biochimie alimentaire. 6^{ème} Ed. Edition : Dunod. Paris. 260p.
- Alarcon- Guitiérrez. (2007).** Influence de facteurs abiotiques sur la regulation des parameters microbiens impliqués dans la defradation de la matiere organique d'une litiere forestiere méditerranéenne. Thèse doctorat en biologie des populations et ecologie. Université Paul Cezanne Marseille. 195p.
- Ando S, Ishia H, Kosugi Y et Ishikawa K. (2002).** Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. Applied and Environmental Microbiology. **68** (1), 430-433.
- Antongiovanni M et Sargentini C. (1991).** Variability in chemical composition of straws. dipartimento di scienze zootecniche universita di Firenze. Italy. **16**, 49-53.
- Arnaud A et Guiraud JP. (1999).** le métabolisme microbien. In : Biotechnologie. Scriban R. 5^{ème} Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp. 43-192.
- Arnaud A et Guiraud JP. (1993).** le métabolisme microbien. In : Biotechnologie. Scriban R. 4^{ème}. Edition : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp. 59-180.
- Assamoi AA, Destain J et Thonart P. (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. Biotechnol Agron Soc Environ. **13** (2), 281-294.

B

- Baret JL. (1987).** Le point sur les actions enzymatiques qui valorisent les aliments-intérêt, limites, espoir. In : Coleou MJ. Biotechnologie et alimentation animale. Edition : Apria, pp. 143-154.
- Barnoud F. (1980).** La cellulose. In : Monties B. les polymères végétaux. Edition : gauthier-villars, Paris, pp. 66-85.
- Belhamiche N, Duchiron F et Benallaoua S.** Screening of fungal strains producing cellulases by solid fermentation. *Proceeding of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7). 4 – 7 October 2011, Arcachon,*

France, Volume 2. Edited by Jean-Michel Savoie, Marie-Foulongne Oriol, Michèle Largeteau et Gérard Barosso. INRA UR1264, Mycology and food safety, Bordeaux, France: p 163-167.

Bellon-Maurel V, Orliac O et Christen P. (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*. **38**, 881-896.

Belmessikh A. (2011). Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Thèse magister. Université Mentouri Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biochimie – Microbiologie, 101p.

Bensmira S. (2006). Isolement et caractérisation de souches fongique de milieux extrêmes (Sol Sebkh de la région de Biskra) productrice de cellulase thermostable à l'intérêt industriel. Thèse magister en biochimie-microbiologie appliquées. Université de Mentouri-Constantine, Faculté des sciences, 88p.

Bonnin E, Renard C, Thibault J-F et Ducroo P. (1997). Les enzymes de dégradation des parois végétales : mode d'action et utilisation alimentaires. In : Larreta-Garde V. Enzyme en agroalimentaire. Edition : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp. 168-200.

Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthier S, Guy PH, Reymond P, Sanglier JJ, Vayssier Y et Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2^{ème} Ed. Edition : Masson. Collection Biotechnologie. 512p.

Bouix M et Leveau JY. (1993). Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Edition : technique et documentation Lavoisier. Paris. 612p.

Buchholz K Rapp P et Zadrzil F. (1983). Methods of enzymatic analysis. Edition Bergmaeyer, HU. Verlag Chemie, Weinheim. **2**, 178-180.

C

Coleman GS. (1978). The metabolism of cellulose, glucose, and starch by rumen ciliate protozoa *Eudiphodinium maggii*. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 359-366.

Cullen D et Kersten P. (1992). 4 Fungal enzymes for lignocellulose degradation. In: Kinghorn, JR et Turner G. Applied molecular genetics of filamentous fungi. Chapman et Hall. New York, pp. 100-131.

Cullen D et Kersten PJ. (2004). Enzymology and molecular biology of lignin degradation. *Biochem. Mol Biol.* **13**, 249-263.

D

Daniel G, Volc J et Kubatova E. (1994). Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* and *Oudemansiella mucida*. Appl. Environ. Microbiol. **60**, 2524-2532.

Dinis BJM. (2009). Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. Université de Trás-os-Montes e Alto Douro. p 53.

Duchiron F et Copinet E. (2011). Fermentation en milieu solide (FMS). BIO 620. pp. 1-13.

E

Enoki A, Tanaka H and Fuse G. (1988). Degradation of lignin-related compounds, pure cellulose, and wood components by whit-rot and brown-rot fungi. Holzfors. **42**, 85-93.

G

Gautam SP, Bundela PS, Pandey AK, Khan J, Awasthi MK et Sarsaiya S. (2011). Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. Biotechnology Research International. **10**, 1-8.

Gervais P et Molin P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. **13**, 85–101.

H

Hasper AA, Dekkers E, Mil MV, Van de Vondervoort Pji et De Graaff LH. (2002). Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. Appl. Environ. Microbiol. **68** (4), 1556-1560.

Howard RL, Abotsi E, Jansen van Rensburg EL, et Howard S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African journal of biotechnology. Vol. **2** (12), 602-619.

I

Illanes A, Gentina GC et Marchese MP. (1988). Stabilization of cellulase from *Trichoderma reesei*. MIRCEN Journal. **4**, 407-417.

Irfan M, Irfan U, Razzaq Z, Syed Q et Nadeem M. (2011). Utilisation of agricultural wastes as a substrate for carboxymethyl cellulase production from *Aspergillus niger* in submerged fermentation. IJAVMS. **5**, 464-471.

J

Juwaied AA, Hussain Al-amiery AA, Abdumuniem Z et Anaam U. (2011). Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* and *Tricoderma viride* using sugar cane waste. Journal of Yeast and Fungal Research. **2(2)**, 19 - 23.

K

Kang SW, Park YS, Lee JS, Hong SI et Kim SW. (2004). Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. Bioresource technology. **91**, 153-156.

Keith F. (2007). Production of enzymes for the feed industry using solid substrate fermentation. Process biochemistry. **4**, 312-322.

Khennaoui B. (2009). Etude, synthèse et obtention de matériaux Composites à partir de Cellulose de Polyacrylamide et de Polystyrène. Thèse Magister en Chimie Analytique et Physique. Université Mentouri Constantine, Faculté des sciences, 118p.

Kolman J et Rohm KH. (2004). Atlas de poche de biochimie. 3^{eme} Ed. Edition : Flammarion Médecine- Sciences. Paris. 462p.

Krishna C. (2005). Solid state fermentation systems-An Overview. Critical Reviews in Biotechnology. **25**, 1-30.

L

Lakhtar H. (2009). Culture du *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide : Transformation des polyphénols des margines. Thèse de doctorat. Université de Paul Cézanne, Aix Marseille III, 170p.

Lekchiri S, Moueqqit M et Lekchiri A. (2006). Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum. sp albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Congrès international de biochimie, Agadir. p. 175-178.

Lekounougou ST. (2008). Evaluation et Compréhension des Mécanismes fongiques impliqués dans la dégradation du bois. Thèse doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy-I, 147p.

Leveau JY et Bouix M. (1999). Cinétiques microbiennes. In : Biotechnologie. Scriban R. 5^{ieme} Edition Tec et Doc, Lavoisier. Paris, pp. 193-228.

Linden G, Lorient D. (1994). Biochimie agro-industrielle : Valorisation alimentaire de la production agricole. Edition: MASSON. Paris, Milan, Barcelane. 367p.

Lynd L R, Weimer PJ, Van Zyl WH et Pretorius IS. (2002). Microbial Cellulose

Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. **66** (3), 506-577.

M

Madamwar D et Patel S. (1992). Formation of cellulases by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. World Journal of Microbiology and Biotechnology. **8**, 183-186.

Mandels M, Weber J. (1969). Production of cellulases. Adv. Chem. Ser. **95**, 391- 414.

Maninder KK, Mohinderjit SS, Dhanwant KS et Rajindar SS. (1984). Production and regulation of cellulases in *Trichoderma harzianum*. Microbiol Biotechnol. **20**, 427-429.

Mario P. Adinugraha, Djagal W, Marseno et Haryadi. (2005). Sunthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from Cavendish banana pseudo stem (*Musa canendishii* LAMBERT). **62**, 164-169.

Marouf A et Tremblin G. (2009). Abrégé de biochimie appliquée. Edition: EDP science. France. 483p.

Mazza M. (2009). Modification chimique de la cellulose en milieu ionique et CO₂ supercritique. Thèse doctorat. Université de TOULOUSE, 171p.

Miettinen-Oinonen A. (2007). Cellulases in the textile industry. In : Polaina J and Maccabe A-P. Industrielle enzyme : Structure, function, and application. Edition : Springer. Spain. pp. 51-63.

Mussatto SI et Teixeira JA. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. In: Méndez-Vilas A. Current research, Technology and education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Edition: Formatex. pp. 897-907.

O

Odier E, Rouau X. (1985). Les cellulases et les enzymes de polymérisation de la lignine. Edition Gauthier- Villard. Paris. pp. 199-214.

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

P

Paës G. (2005). Etude structure/fonction d'hémicellulases thermostables : la xylanase GH-11 et l'arabinofuranosidase GH-51 de *Thermobacillus xylanilyticus*. Thèse doctorat en

biochimie et biologie moléculaire. Université de Reims Campagne-Ardenne INRA UMR FARE 614, 218p.

Palma C, Martínez AT, Lema JM, Martínez MJ. (2000). Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: a comparison between *Bjerkandera* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*. **77**, 235–245.

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

Pourquié J et Vandecasteele J-p. (1993). Conversion de la biomasse lignocellulosique par hydrolyse enzymatique et fermentation. In *biotechnologie*, coord : Scriban R. 4^{ieme}. Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris. pp. 677-700.

Q

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

R

Raimbault M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrat fermentation, *EJB Electronic journal of biotechnology* Vol. **1** No. 3, Issue of August **15**, 1-15.

Raimbault M. (1981). Fermentation en milieu solide, croissance de champignons filamenteux sur substrats amylacé. Edition O.R.S.T.M. Bondy France. 291p.

Reguant et Rinaudo. (1999). Etude bibliographique sur les matériaux issus de la biomasse végétale. Centre national de la recherche scientifique, centre de recherche sur des macromolécules végétales. France. 163p.

Rolf D-S. (2005). Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique. Edition : Flammarion Médecine – Science. Paris. 335p.

Romero MD, Aguado J, Gonzalez L, Ladero M, (1999). Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol **25**: 244-250.

Roussos S. (1987). croissance de *Trichoderma Harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de la cellulases. Edition ORSTOM. Paris. 193p.

Roussos S et Rimbault M. (1982). Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. Production de cellulase de *Trichoderma Harzianum* par fermentation en milieu liquide. Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Centre de Recherche IRCHA. **133**, 465-474.

Roussos S et Hannibal L. (1984). Valorisation biotechnologique de la bagasse par la production au niveau pilote d'enzymes de champignons filamenteux cellulolytiques. Compte Rendu Final d'une Recherche financée par le CORDET 83. Institut Français de recherche scientifique pour le développement en coopération de Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Appliquée. p: 1-56.

S

Salhi-Mohand Oussaid O. (2004). Valorisation de sous produits lignocellulosiques par culture microorganismes cellulolytiques. Thèse de doctorat, institut national agronomique ELHARRACH, Alger, 138p.

Sanyal A, Kundu RK, Dube S et Dube DK. (1988). Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus*. Purification and characterisation of an inducible extracellular -glucosidase. *Enzyme. Microb. Technol.* **10**, 91-99.

Saradouni N. (1994). Isolement et sélection d'une souche de moisissure lignocellulotique thermophile, performante. Etude de son activité enzymatique. Thèse magister, Institut de biologie, Université M.MAMMERY, TIZI-OUZOU, 149p.

Saradouni N, Penninckx MJ et Salhi O. (1999). High level production of thermostable β -xylanase, CMCase and β -glucosidase by an *Aspergillus fumigates* (Fresenius) Albino mutant strain. *Science et technology.* **12**, 65-70.

Sasson N. (1986). Quelles biotechnologies pour les pays en développement. Edition biofutur/ Unesco. Diffusion TEC & Doc Lavoisier. Paris. 200p.

Schamburg D et Salzmann MGBF. (1991). Cellulase. In: *Enzyme HandBook.* Springer-Verlag, Berlin. **4**, 1-11.

Shu-bin L, Ren-chao Z, Xia L, Chu-yi C et Ai-lin Y. (2012). Solid-state fermentation with okara for production of cellobiase-rich cellulases preparation by a selected *Bacillus subtilis* Pa5. *African Journal of Biotechnology.* **11**(11), pp. 2720-2730.

Singh A., Agrawal KA, Abidi AB, Darmwal NS. (1989). Production of protein and cellulose by *Aspergillus niger* in solid state culture. *Mircen Journal.* **5**, 451-456.

Singh A., Agrawal K.A., Abidi A.B., Darmwal N.S. (1990). Properties of exoglucanase from *Aspergillus niger*. J. Gen. App. Microbiol. **36**, 245-253.

Singh PN, Pandey A, (2009). Solid-State Fermentation Technology for Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues. In Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation . Utilisation of Agro-Residues. Edition Springer. pp 197-216.

Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. **44**, 13–18.

Singhania RR. (2009). Cellulolytic enzymes. In : Biotechnology for agro-industrial Residues utilisation: utilization of agroresidues Singh née nigam P et Pandey A. Edition: Springer, pp. 372- 381.

Smant G, Stokkermans JPWG, Yan Y, De Boer JM, Baum TJ, Wang X, Hussey RS, Gommers FJ, Henrissat B, Davis EL, Helder J, Schots A et Bakker J. (1998). Endogenous celluloses in animals: isolation of β -1,4 endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. Biochemestery. **95** (9), 4906-4911.

Spinu M. (2010). Evaluation des paramètres physiques et physico-chimiques qui influencent l'accessibilité de la cellulose. Thèse de doctorat, l'école nationale supérieure des mines de Paris, 183p.

T

Tiebaud S. (1995). Valorisation chimique de composés lignocellulosiques: obtention de nouveaux matériaux. Thèse de doctorat en Sciences des Agroressources. Institut national de polytechnique Toulouse, 194p.

V

Vidaud C, Roussos S, Raimbault M et Deschamps F. (1982). Effet des divers prétraitements sur l'accessibilité de la cellulose de la paille de blé aux cellulases de *Trichoderma harzianum*. **46**, 17-23.

X

Xu B, Hellman U, Hellman U, Janson JC. (2000). Purification, characterisation and amino-acid sequence analysis of thermostable, low molecular mass endo- β -1,4 glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. Euro. J. Biochem. **267**, 4970-4977.

Xu Q., Adney W-S., Ding S-Y., and Himmel M-E. (2007). Cellulases for biomass conversion. In Industrielle enzyme : Structure, function, and application. Cood. Polaina J and Maccabe A-P. Edition: Springer. Spain. 641p.

Z

Zermane F. (2008). Étude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substrats pectiques et des composés organiques de synthèse. Mémoire de magistère en microbiologie appliquée. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université de Mentouri-Constantine, 126p.

Annexes

Annexe I

Tableau I : Matériel analytique utilisé.

Matériel	Marque
Bain Marie	Memmert
Balance	Scout pro
Balance analytique	ADAM AFA- 120 LC
Centrifugeuse	Sigma
Etuve	Memmert
Four Pasteur	Heraeus
Loupe binoculaire	Carl ZEISS
Micropipettes	Biocontrol
Microscope optique	Carl ZEISS
Mixeur	Moulinex
pH mètre	HANNA pH 210
Plaque agitatrice chauffante	VELP scientifica
Spéctrophotomètre UV -visible	Shimadzu UV mini. 1240
Vortex	VELP scientifica

✚ Milieu Malt gélosé

Extrait de Malt : 20 g

Agar : 15 g

pH 5

Eau distillée : 1000 ml

Autoclaver 20 minutes à 120° C.

✚ Réactif de DNS

DNS : 5 g

NaOH : 8 g

Tartrate de sodium- potassium : 150 g

} Ajuster à 500 ml de l'eau distillée.

✚ Tampon citrate (0,05 M ; pH 4,8)

Acide citrique : 10,5 g

Eau distillée : 1000 ml

NaOH : 50 à 60 g

Annexe II

Dosage des protéines (Lowry et al., 1951)

a) Les solutions à préparer :

- 1) Solution mère de B.S.A à 200 $\mu\text{g/ml}$.
- 2) Solution (A) : Na_2CO_3 à 5%.
- 3) Solution (B): 0, 5% CuSO_4 , 5 H_2O in 1% tartrate de sodium -potassium.
- 4) Solution (C) : 50 ml de (A) + 2 ml de (B) (A préparer au moment de la manipulation).
- 5) Solution (D) : NaOH (1N).
- 6) Solution (E) : réactif de Folin –Ciocalteu dilué 1/2.

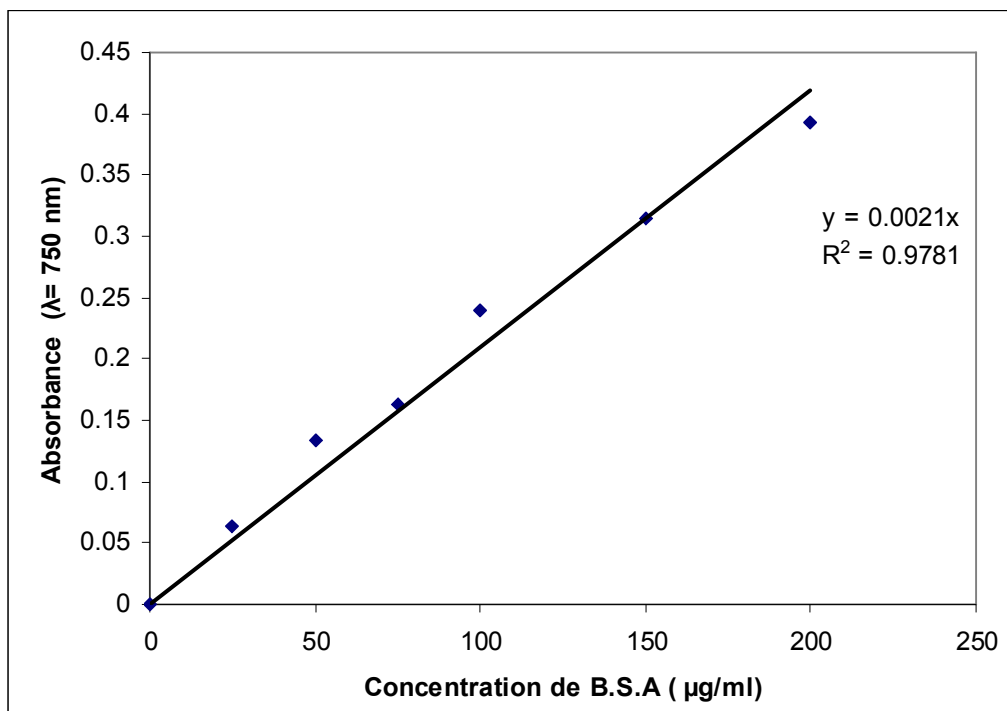


Figure 4: Courbe d'étalonnage de la B.S.A.

Annexe III

1) Activité totale (papier filtre)

✚ Substrat : Papier filtre Whatman n°1 (bandelette 1,0 X 3,0 cm soit 25mg).

Solution à préparer

Solution mère de glucose à 10 g/l

Réactif de D.N.S.

Tampon citrate de sodium (50 mM ; pH 4,8)

✚ Durée : 60 min

✚ Répétabilité : triplicate.

Gamme étalon : Solution mère de glucose anhydre 10g/l.

	1/5	1/3	1/2	1/1,5
[Glucose] en (mg/ml)	2,0	3,3	5,0	6,7
Quantité de glucose ($\mu\text{g}/250\mu\text{l}$)	500	825	1250	1675

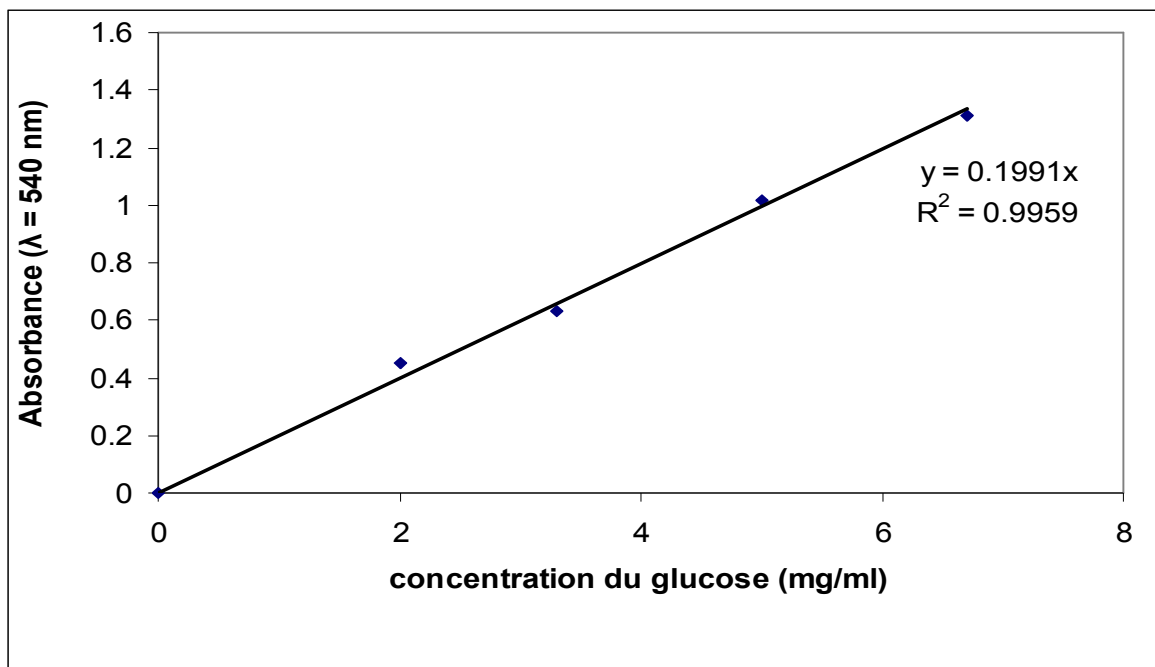


Figure 5: Courbe d'étalonnage du glucose (10g/L)

2) Activité CMCase (endoglucanases)

Solutions à préparer

Solution mère de glucose à 2 g/l

Réactif de D.N.S

Tampon citrate de sodium (50 mM ; pH 4,8)

Substrat : carboxyméthylcellulose (CMC) à 2%, préparé dans du tampon citrate (50 mM ; pH 4,8).

✚ Durée : 30 min

✚ Répétabilité : triplicate.

Gamme étalon : Solution mère de glucose anhydre 2 g/l

Dilution dans le tampon	Non dilué	1/1.5	1/2	1/4
[Glu] en (mg/ml)	2,0	1,33	1,0	0,5
Quantité de glucose ($\mu\text{g}/250\mu\text{l}$)	500	332,5	250	125

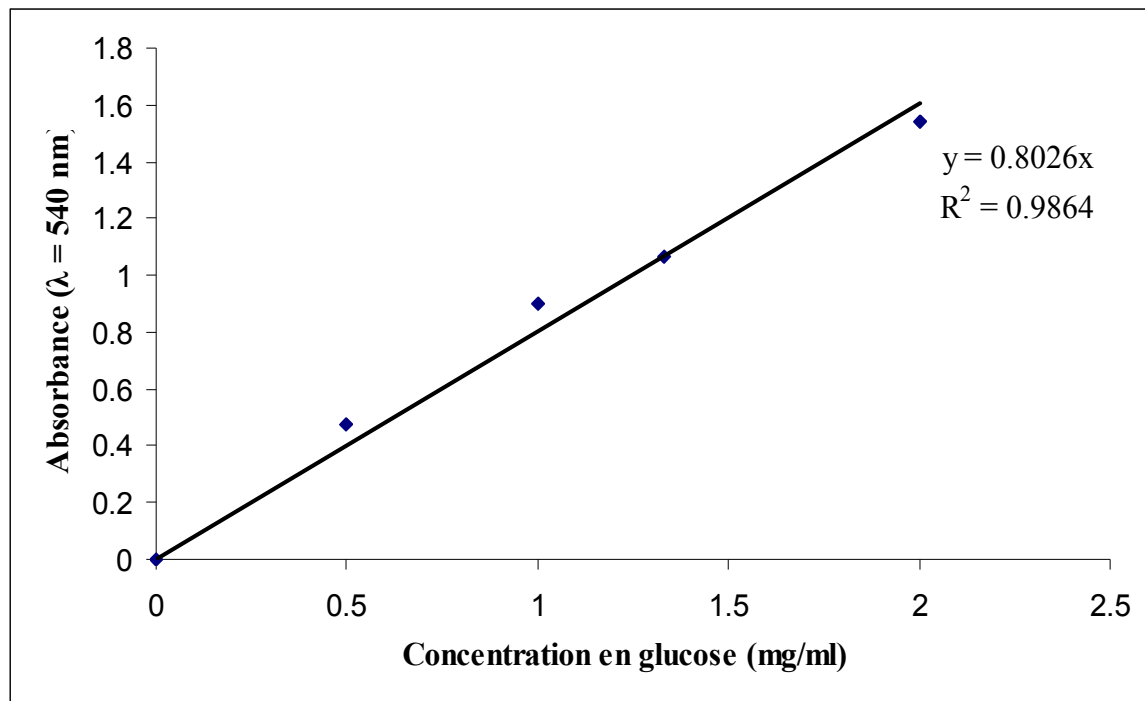


Figure 6: Courbe d'étalonnage du glucose (2g/l)

Résumé

L'objectif de notre travail est la croissance et production des cellulases (totales et carboxyméthyl cellulases) du *Trichoderma reesei* et *Bjerkandera sp* par fermentation solide.

Certains paramètres de fermentation ont été déterminés. Pour la souche *Bjerkandera sp* la croissance atteint un maximum de 53,9 % de MS. Parallèlement, la souche de référence atteint une croissance maximale de 53 % de MS.

Une alcalinisation du milieu de culture durant la fermentation a été constatée pour *T. reesei* (pH final de 7), tandis qu'un pH relativement acide a été enregistré pour *Bjerkandera sp*. (pH 5.7).

La synthèse des protéines a été estimée à 714,28 µg/ml et 674,28 µg/ml pour *Bjerkandera sp* et *T. reesei* respectivement.

Durant la période de fermentation, de faibles activités enzymatiques pour *Bjerkandera sp*, de l'ordre de 0,185 U/ml et 0,256 U/ml (cellulases totales et CMCCase respectivement) ont été notées par comparaison à la souche de référence dont les valeurs sont de l'ordre de 0,474 U/ml et de 1,28 U/ml (papier filtre et CMCCase respectivement).

Mots clés : *Trichoderma reesei*, *Bjerkandera sp*, croissance, carboxyméthyl cellulases, activité papier filtre, fermentation solide, son d'orge.

Abstract

The objective of our work is the growth and the production of the cellulases (total and carboxyméthyl cellulases) of *Trichoderma reesei* and *Bjerkandera sp* by solid fermentation.

Some parameters of fermentation were given. For the stock *Bjerkandera sp* the growth reaches a maximum of 53,9 % of MS. In parallel, the stock of reference reaches a maximum growth of 53% of MS.

An alkalization of the culture medium during fermentation was noted for *T reesei* (final pH 7), while a relatively acid pH was recorded for *Bjerkandera sp*. (pH 5.7).

The synthesis of proteins was estimated at 714,28 µg/ml and 674,28 µg/ml for *Bjerkandera sp* and *T reesei* respectively.

During the period of fermentation, weak enzymatic activities for *Bjerkandera sp*, about 0,185 U/ml and 0,256 U/ml (cellulases total and CMCCase respectively) were noted by comparison with the stock of reference in which values are about 0,474 U/ml and of 1,28 U/ml (filter paper and CMCCase respectively).

Key words: *Trichoderma reesei*, *Bjerkandera sp*, growth, carboxyméthyl cellulases, activity filter paper, solid fermentation, barley bran.