

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Constantine 1
Département de Microbiologie
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Filière de biotechnologie des mycètes



Présenté par : **BOULARES Dounia**
BOULHAM Soumia
Pour l'obtention du diplôme Master2

Production de la cellulase par *Trichoderma longibrachiatum* sur milieu solide à base de la paille de blé et le son de blé

Soutenu le : 24/06/2014.

Devant le jury :

Président : Mme MIHOUBI Ilhem Professeur. Université Constantine 1.

Encadreur : Mme LEGHLIMI Hind Maître de conférences B. Université Constantine 1.

Examinatrice : Mme KASSAH LAOUAR Mounia Maître Assistant A. Université Constantine 1.

Année Universitaire : 2013/2014

Remerciement

Nous remercierons dieu tout puissant qui nous a donné la force pour réaliser ce modeste travail.

Le travail exposé dans notre mémoire est réalisé dans la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Constantine 1

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à Madame Leghlimi Hind notre encadreur, pour toute son aide, sa patience, son soutien ses suggestions et ses précieux conseils qui nous permis de réaliser ce travail.

Nous tenons à nos profondes gratitudees a tout ceux qui nous avons aidé de prés ou de loïn pour élaborer notre travail.

Nous remercierons aussi tous nos collèges et nos amis.

Table des matières

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

Synthèse Bibliographique

Partie 1 : Etude des cellulases

1 -Définition de la cellulase	3
2. Enzymes cellulolytiques.....	3
2.1. Exo β (1-4) glucanase ou Cellobiohydrolase : Ec (3.2.1.91).....	3
2.2. Endo β (1-4) glucanase ou Endocellulase : Ec (3.2.1.4).....	3
2.3. β (1-4) glucosidase ou Cellobiase : Ec (3.2.1.21).....	4
3. Synergie des activités cellulolytiques	4
4. Applications industrielles des cellulases	6
4.1. Industrie de Pâte à papier.....	6
4.2. Industrie des textiles et des détergents	7
4.3. Industrie du bioéthanol	7
4.4 Industries alimentaires	7
4.5. Nutrition animale.....	7
4.6. Industrie agricole.....	8
4.7. La gestion des déchets	8

Partie 02 : Etude des microorganismes cellulolytiques

1. Les microorganismes cellulolytiques	9
2. Les champignons du genre <i>Trichoderma</i>	11
2.1-Définition.....	11
2.2. La taxonomie de <i>Trichoderma</i>	13
2.3. Caractères culturels.....	14
2.4. Morphologie microscopique	15
2.5. Habitat de <i>Trichoderma</i>	16
2.6. Cycle de vie.....	16

3. <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	16
3.1. Production de la cellulase par <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	18

Partie 3 : Fermentation sur milieu solide

1. Définition :	20
2. Avantages et inconvénients de la fermentation en milieu solide (FMS).....	20
3. Son de blé :	21
3.1. Structure macroscopique	21
3.2. Composition chimique des sons de blé.....	22
4. Pailles de blé :	23
4.1. Structure macroscopique de la paille :	23

Matériels et méthodes

1. Matériel biologique	25
1.1. Origine et entretien de la souche :	25
1.2. Préparation de l'inoculum	25
1.2.1. Préparation de la suspension de spores	25
1.2.2. Dénombrement des spores	26
2. Production de la cellulase par la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	26
2.1. Milieux de production	26
2.2. Conduite de la fermentation solide.....	26
2.3. Effet du taux de l'humidité sur la production de la cellulase	27
3. Méthodes analytiques.....	27
3.1. Dosage des activités cellulolytiques	27
3.2. Mesure de l'humidité.....	30

Résultats et discussion

1. Production de la cellulase par la souche <i>Trichoderma longibrachitum</i>	31
1.1. Effet du taux de l'humidité.....	31
1.2. Détermination de l'humidité à la fin de la fermentation	37

Conclusion et perspective	38
--	----

Références bibliographique	40
---	----

Résumés

Annexes

Abréviations

APF : Activité Papier Filtre.

CMC : Carboxyméthylcellulose.

DNS : Acide 3,5 dinitrosalicylique

T : *Trichoderma*

FMS:fermentation sur milieu solide

FML:fermentation sur milieu liquide

SmF : Submerged Fermentation.

SSF : Solide State Fermentation

E.C. Enzyme Commission

Ghl : *Trichoderma longibrachiatum*

Ph : potentiel d'Hydrogène

DS : le degré de synergie

PDA: potato dextrose agar

DSMZ: deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen

Pro: Proline

Ser: Serin **Thr**: Thrionine

CBHI : Cellobiohydrolase 1

CBHII : Cellobiohydrolase 2

Liste des figures

Figure 01 : Représentation schématique de l'action des enzymes cellulolytiques	5
Figure 02 : Caractéristiques des espèces de <i>Trichoderma</i>	12
Figure 03 : Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	15
Figure 04 : T. longibrachiatum sur PDA (à gauche) et PDA (à droite), 5 jours, 25° C. (b) jaune pigment diffusible produites par T. longibrachiatum au verso du SDA 5 jours, 25° C	18
Figure 05 : Aspect microscopique de T. longibrachiatum produisant plus courtes branches latérales se terminant par phialides	18
Figure 06 : Branches latérales, phialides et phialoconidies de T. longibrachiatum.	18
Figure 07 : Phialides terminales de T. longibrachiatum.....	19
Figure 08 : Phialoconidies de T. longibrachiatum.	19
Figure 09 : Clamidoconidies lisse, à parois épaisses de T. longibrachiatum.	19
Figure 10 : La souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i> après 7 jours d'incubation à 30°C sur milieu Sabouraud.....	25
Figure 11 : Courbe étalon de glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase	29
Figure 12 : Activité endoglucanase produite par <i>Trichoderma longibrachiatum</i> sur paille de blé et son de blé.....	32
Figure 13 : Activité papier filtre produite par <i>Trichoderma longibrachiatum</i> sur paille de blé et son de blé.....	33

Liste des tableaux

Tableau 01 : les microorganismes cellulolytiques.....	10
Tableau 02 : Sections systématiques de <i>Trichoderma</i> sp et quelques- unes des espèces y appartenant	14
Tableau 03 : Avantages et inconvénients de la fermentation en milieu solide (FMS) par rapport à la fermentation en milieu liquide (FML)	20
Tableau 04 : Compositions chimiques de sons de blé de différentes origines.....	22
Tableau 05 : Composition chimique de pailles de blé de différentes origines.	23
Tableau 06 : Comparaison de la production de la cellulase par <i>Trichoderma longibrachiatum</i> sur les deux milieux à différents taux d'humidité.....	35
Tableau 07 : Aspect de la croissance de la moisissure <i>trichoderma longibrachiatum</i> après 07 jours de fermentation.....	36
Tableau 08 : Humidité à la fin de la fermentation.	37

Introduction Générale

Introduction Générale

Les moisissures et les levures, regroupées sous le nom de "Mycètes" ou "champignons", forment un groupe imposant de micro-organismes. Comme les bactéries, les mycètes sont présent un peu partout, on les rencontre dans le sol et les substances organiques en décomposition, dans l'eau, et dans l'air qui véhicule de grandes quantités de spores. (Boudih, 2011).

Au cours des deux dernières décennies, le développement de la microbiologie a abouti à l'obtention de matériels biologiques très divers, modifiés génétiquement ou non et susceptibles d'être utilisés dans des procédés de production de vitamines, d'hormones, de vaccins et d'enzymes. Les enzymes d'origine microbienne, présentent des propriétés et des spécificités diverses (Botton *et al.*, 1999). Il existe d'innombrables voies d'utilisation des enzymes. En effet, les enzymes fongiques peuvent être utilisées dans plusieurs l'industrie.

Parmi les enzymes d'intérêt industriel, il existe des cellulases (*- *Nom codifié de la Cellulase Ec : 3.2.1.4* *- *Nom systématique : 1,4 - (1,3 ; 1,4) - beta-D - Glucan4 – glucanohydrolase*) pour les quelles l'industrie porte une attention toute particulière grâce à leur grand potentiel biotechnologique (Industrie de Pâte à papier, de textile, bioéthanol, alimentaires, nutrition animale, industrie agricole, gestion des déchets et l'industrie des détergents.

Ainsi, l'application croissante de l'enzyme appelle à un besoin urgent pour l'exploration des microorganismes issus de milieux extrêmes, comme source précieuse de cette enzyme commerciale.

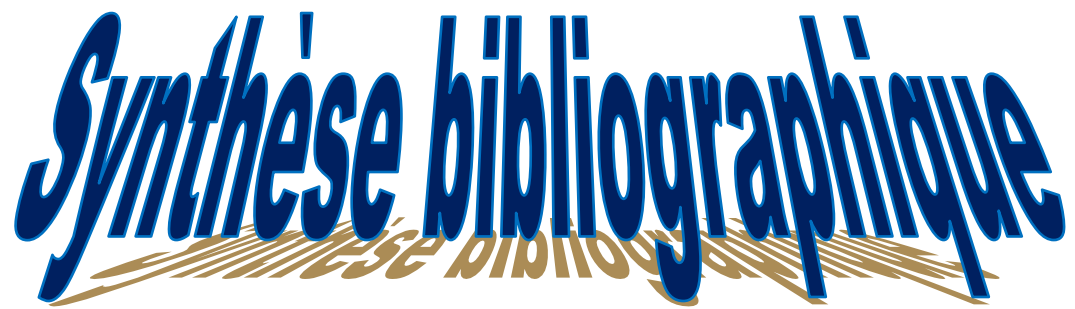
Une grande variété de microorganismes produit les enzymes cellulolytiques, que ce soit par fermentation sur milieu liquide ou bien sur milieu solide. En effet, la fermentation solide présente un certain nombre d'avantages économiques et technologiques dont la faiblesse des couts et la simplicité des équipements (Durant, 2003).

Notre étude est portée sur la production de la cellulase par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum*, en fermentation sur milieu solide, on utilise des substrats naturelles « paille de blé et son de blé ». Afin d'atteindre notre objectif, nous avons optés pour ce plan de travail :

Introduction Générale

- * Préparation de l'inoculum.
- * Préparation des milieux de culture « milieu solide » : Paille de blé et son de blé
- * Etude de l'effet du taux d'humidité (40%, 50%, 60% et 70%) sur la production de la cellulase par la souche *Trichoderma longibrachiatum*.

Synthèse bibliographique

The image features the title 'Synthèse bibliographique' in a bold, blue, cursive font. The text is slanted to the right and has a gold-colored shadow or outline effect that gives it a three-dimensional appearance. The shadow is composed of multiple parallel lines, creating a sense of depth and movement. The background is plain white.

Partie 1 : Les cellulases

1 -Définition de la cellulase

On désigne sous le terme de cellulases une large classe d'enzymes capables d'hydrolyser à différents degrés divers substrats cellulosiques et apparentés contenant des liaisons glycosidiques β -1,4 (Béguin and Aubert, 1992; 1994; Tomme *et al.*, 1995).

La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés acides (Beldman *et al.*, 1985) et ne sont pas des métalloprotéines (Saha *et al.*, 1994). Elles ont généralement une structure modulaire avec 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 » (Paulo, 1998; Receveur *et al.*, 2002; Hasper *et al.*, 2002). La présence du domaine de fixation est essentielle pour la dégradation de la cellulose cristalline de coton, car elle augmente la concentration de l'enzyme autour du substrat et de ce fait améliore la catalyse enzymatique (Din *et al.*, 1991; Boraston *et al.*, 1998). Le site actif situé dans le domaine catalytique, a la forme d'un tunnel où la réaction hydrolytique a lieu (Henrissat et Bairoch, 1996), le domaine de fixation des cellulase fongiques comporte 36 acides aminés et se fixe de façon réversible à la cellulose (Linker et Teeri, 1996), grâce à la tyrosine qui joue un rôle important dans la fixation du substrat par une interaction hydrophobe (Reinikainen, 1994).

Elles sont classées en différentes familles selon la séquence en acides aminés de leur domaine catalytique. Les membres de ces familles ont un repliement similaire et la position des résidus catalytiques est conservée (Bayer *et al.*, 1998).

2. Enzymes cellulolytiques

2.1. Exo β (1-4) glucanase ou Cellobiohydrolase : Ec (3.2.1.91)

Exoglucanases: Elles catalysent le clivage successif de sous-unités glucose (glucohydrolase ou 1,4- β -D-glucosidase, EC (3.2.1.74) ou cellobiose (cellobiohydrolase ou 1,4 β -D-glucane cellobiohydrolase, EC (3.2. 1.91) à partir de l'extrémité non réductrice des chaînes cellulosiques.

2.2. Endo β (1-4) glucanase ou Endocellulase : Ec (3.2.1.4)

Elles procèdent par hydrolyse aléatoire à l'intérieur des chaînes de cellulose. Elles ne sont généralement pas actives sur la cellulose cristalline et sont mises en évidence sur la

carboxyméthylcellulose (CMC), forme soluble de la cellulose. On les appelle également CMCases.

2.3. β (1-4) glucosidase ou Cellobiase : Ec (3.2.1.21)

Elles libèrent du glucose à partir de l'extrémité non réductrice de β -glucosides de petite taille (cellobiose, cellodextrines) (Bayer *et al.*, 1998).

3. Synergie des activités cellulolytiques

La synergie entre les enzymes est un phénomène essentiel lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Elle se produit lorsque l'action combinée de deux ou plusieurs enzymes conduit à une activité supérieure à la somme des activités des enzymes séparées. On exprime souvent le degré de synergie (DS) comme le ratio de l'activité du mélange d'enzymes sur la somme des activités des enzymes utilisées séparément.

Deux types de synergies ont été mis en évidence dans la littérature: (i) la synergie entre les cellobiohydrolases et les endoglucanases appelée synergie Exo-Endo, (ii) la synergie entre les deux cellobiohydrolases CBHI et CBHII appelée synergie Exo-Exo. La synergie Exo-Endo s'explique facilement car l'attaque aléatoire par les endoglucanases conduit à la libération de nouveaux bouts de chaînes de cellulose qui deviennent alors disponibles pour l'attaque par les cellobiohydrolases (Medve *et al.*, 1998 ; Nidetzky *et al.*, 1994) (figure.1).

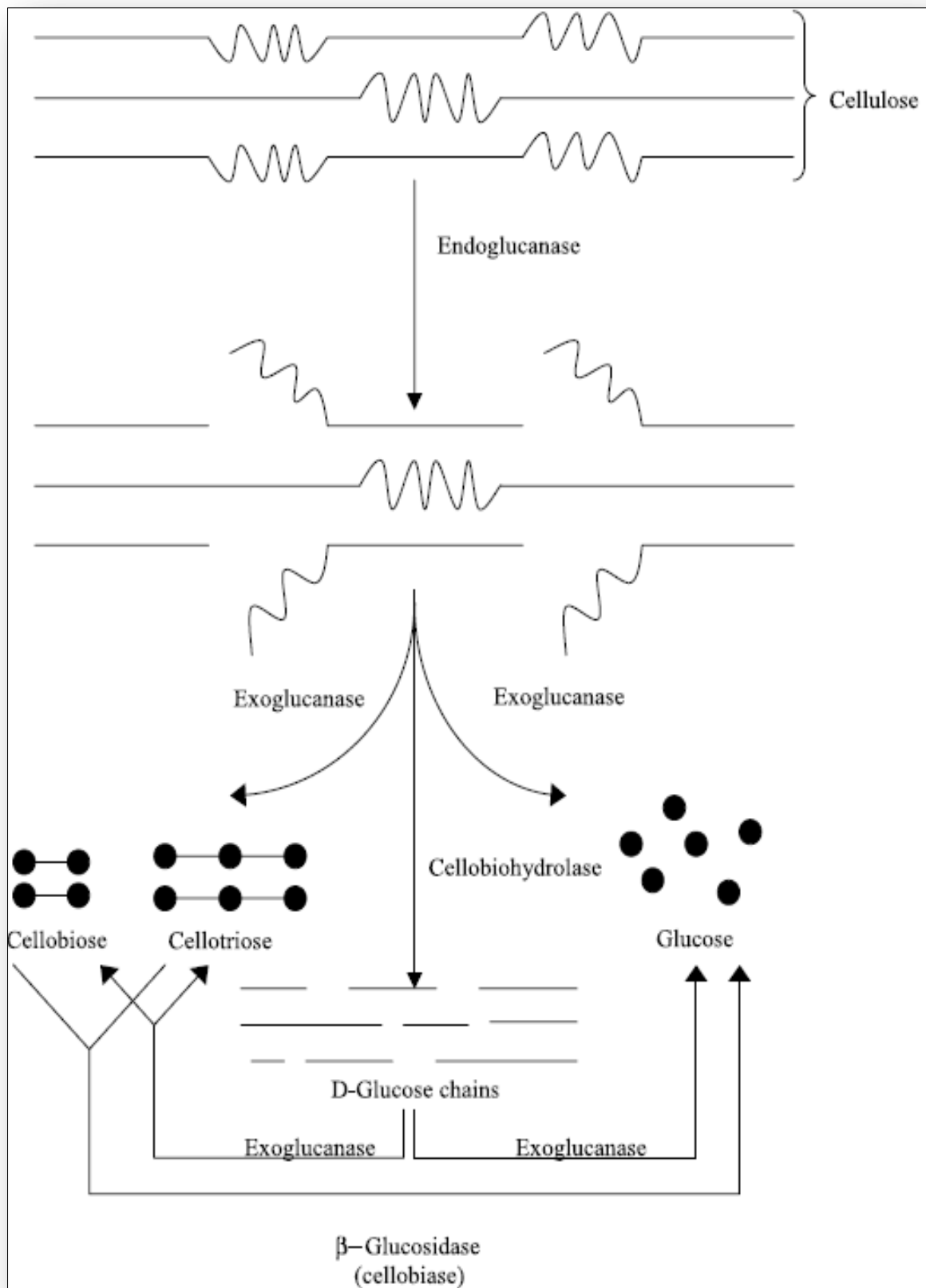


Figure 01 : Représentation schématique de l'action des enzymes cellulolytiques (Krause *et al.*, 2003).

La synergie Exo-Exo a également été observée mais aucun mécanisme n'a été clairement établi pour expliquer ce phénomène et plusieurs théories sont proposées. Tomme et al (Tomme P *et al.*, 1990) ainsi que (Kim *et al.*, 1998) l'expliquent par la formation en solution d'un 'loose complex' (complexe lâche) CBHI/CBHII qui aurait pour les premiers une activité catalytique importante et permettrait pour les seconds d'augmenter l'affinité d'adsorption des enzymes. Enfin, d'autres auteurs évoquent la possibilité d'une activité de type "Endo" pour CBHI (Kim *et al.*, 2001) ou pour CBHII (Woodward *et al.*, 1991) Plusieurs paramètres semblent influencer la synergie a savoir :

- la concentration totale en enzymes : plus la saturation du substrat par les enzymes est importante, plus le degré de synergie est faible (Nidetzky *et al.*, 1994 ; Woodward *et al.*, 1988).
- l'influence du ratio de chaque enzyme : ceci est plus discute, certains auteurs. (Nidetzky *et al.*, 1994 ; Henrissat *et al.*, 1985) ayant montre que le ratio influence la synergie tandis que Woodward et al (Woodward *et al.*, 1988) ont montre que le degré de synergie était indépendant de ce ratio.
- les propriétés morphologiques du substrat : l'augmentation de la cristallinité du substrat entrainant l'augmentation de la synergie. (Hoshino *et al.*, 1997)

4. Applications industrielles des cellulases

Malgré de nombreuses recherches effectuées dans le domaine de l'application industrielle des cellulases, elles restent encore essentiellement utilisées expérimentalement. Cependant, des souches mutantes produisant de grandes quantités de cellulases sont disponibles, Au niveau industriel, les applications des cellulases peuvent intervenir: au niveau de l'extraction de la cellulose de certaines structures, au niveau de la production de sucres solubles à partir de la cellulose, comme le glucose (Receveur *et al.*, 2002).

Les cellulases microbiennes ayant des applications dans diverses industries :

4.1. Industrie de Pâte à papier

L'intérêt de l'application des cellulases dans l'industrie des pâtes à papiers a augmenté au cours des dix dernières années (Scriban, 1993). L'addition de cellulases aux suspensions de pâtes (en cours de lavage) ou en suspension de pâtes de papiers de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1999).

4.2. Industrie des textiles et des détergents

Depuis 1990, les textiles et les détergents constituent les plus grands marchés mondiaux pour l'utilisation des cellulases. Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par élimination des tâches (Gusakov *et al.*, 2000). Elles sont utilisées aussi dans les lessives afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (Maurer, 1997) des fibres et dans la préparation de « stone washed jeans » (Scriban, 1993 ; Gusakov *et al.*, 2000 ; Ando *et al.*, 2002).

4.3. Industrie du bioéthanol

Le bioéthanol est l'éthanol élaboré à partir de la biomasse végétale, son rendement énergétique est voisin de celui de l'essence, il est obtenu à partir de substrats fermentescibles (canne à sucre, betterave sucrière, maïs, orge, blé, pomme de terre...), ce biocarburant est appelé carburant de première génération (Thérien, 2006), le carburant de deuxième génération est obtenu à partir de la cellulose (résidus agricoles : la paille ou les cannes de maïs, résidus forestiers) (Pimentel et Patzek, 2005).

4.4 Industries alimentaires

Les cellulases ont une large application dans la biotechnologie alimentaire. Aussi bien, La production de jus de fruits et de légumes nécessite des méthodes améliorées pour l'extraction, la clarification et la stabilisation. Les cellulases utilisées sous forme de mélange avec d'autres enzymes (xylanases et pectinases) (Odier et Rouau, 1985), et sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993).

4.5. Nutrition animale

Les applications des cellulases et hémicellulases dans l'industrie de nutrition animale ont reçu une attention considérable en raison de leur potentiel dans l'amélioration des performances de la nutrition animale (Kolarova et Farkas, 1981 ; Odier et Rouau, 1985).

Ces enzymes utilisées comme additifs dans l'alimentation animale car l'addition des cellulases, aux aliments pour volailles ou porcins, améliore leur digestibilité, ce qui réduit l'excrétion de cellulose non digérée (et donc diminue la charge polluante des excréta). (Scriban, 1993 ; Gusakov *et al.*, 2000).

4.6. Industrie agricole

Diverses préparations enzymatiques constituent par différentes combinaisons de: cellulases, hémicellulases et pectinases qui ont des applications dans le secteur agricole pour améliorer la croissance des cultures et le contrôle des maladies des plantes (Bhat *et al.*, 2000).

Les protoplastes fongiques ou végétaux produites par des hydrolases microbiennes peuvent utiliser pour produire des souches hybrides avec des propriétés souhaitables. Les cellulases et les enzymes appartient de certains champignons sont capables de dégrader la paroi cellulaire des agents pathogènes des plantes dans la lutte contre la maladie des plantes. . (Singh *et al.*, 2007).

4.7. La gestion des déchets

Les déchets des forêts, des champs agricoles et l'industrie agricole contiennent une grande quantité de cellulose inutilisée causant la pollution de l'environnement (Peitersen et Andersen., 1978). Ces déchets sont utilisées pour la production des enzymes, des sucres, des biocarburants, des produits chimiques, les sources d'énergie de bon marché pour la fermentation et l'amélioration des nutriments des animaux et des humains (académie des technologies., 2010).

Partie 02 : Etude des microorganismes cellulolytiques

1. Les microorganismes cellulolytiques

Les micro-organismes cellulolytiques, qui interviennent au niveau de la première étape du processus (qui s'avère être l'étape limitante), constituent un large groupe très disparate comprenant des champignons et des bactéries pouvant être aérobies ou anaérobies, thermophiles ou mésophiles. On distingue, chez les bactéries, les cellulolytiques vrais des pseudocellulolytiques selon la capacité du micro-organisme à sécréter ou non toutes les enzymes nécessaires à l'hydrolyse de la cellulose cristalline (Béguin et Aubert, 1992; 1994).

Tableau 01 : les microorganismes cellulolytiques. (Béguin et Aubert, 1992; 1994)

Les microorganismes cellulolytiques	
1- Champignons	<p>*Champignons de pourriture molle : <i>Aspergillus niger; A. nidulans; A. oryzae; A. terreus; Fusarium solani; F. oxysporum; Humicola insolens; H. grisea; Melanocarpus albomyces; Penicillium brasilianum; P. occitanis; P. decumbans; Trichoderma reesei; T. longibrachiatum; T. harzianum; Chaetomium cellulyticum; C. thermophilum; Neurospora crassa; P. fumigosum; Thermoascus aurantiacus; Mucor circinelloides; P. janthinellum; Paecilomyces inflatus; P. echinulatum; Trichoderma atroviride</i></p> <p>*Champignons de la pourriture brune: <i>Coniophora puteana; Lanzites trabeum; Poria placenta; Tyromyces palustris; Fomitopsis sp.</i></p> <p>*Champignons de pourriture blanche: <i>Phanerochaete chrysosporium; Sporotrichum thermophile; Trametes versicolor; Agaricus arvensis; Pleurotus ostreatus; Phlebia gigantean</i></p>
2- Bactéries	<p>*Bactéries aérobies: <i>Acinetobacter junii; A. amitratus; Acidothermus cellulolyticus; Anoxybacillus sp.; Bacillus subtilis; B. pumilus; B. amyloliquefaciens; B. licheniformis; B. circulans; B. flexus; Bacteriodes sp.; Cellulomonas bioazotea; Cellvibrio gilvus; Eubacterium cellulosolvens; Geobacillus sp.; Microbispora bispora; Paenibacillus curdlanolyticus; Pseudomonas cellulosa; Salinivibrio sp.; Rhodothermus marinus</i></p> <p>*les Bactéries anaérobies: <i>Acetivibrio cellulolyticus; Butyrivibrio fibrisolvens; Clostridium thermocellum; C. cellulolyticum; C. acetobutylium; C. papyrosolvens; Fibrobacter succinogenes; Ruminococcus albus.</i></p>
3-Actinomycètes	<p><i>Cellulomonas fimi; C. bioazotea; C. uda; Streptomyces drozdowiczii; S. lividans; Thermomonospora fusca; T. curvata.</i></p>

2. Les champignons du genre *Trichoderma*

2.1-Définition

Les espèces de *Trichoderma* sont des champignons ubiquitaires saprophytes imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycète. La forme parfaite appartient à la classe des Ascomycètes (*Hypocrea*), aérobies et mésophiles, métaboliquement polyvalents, qui sont retrouvées couramment dans le sol. Ce genre comprend 20 espèces environ, cellulolytiques (<http://mycota-crcc.mnhn.fr> consulté le 25 mars 2014). Ce sont habituellement contaminants des cultures et classiquement dénués de tout pouvoir pathogène. On signale cependant de rares cas de mycoses à *Trichoderma* (otites, pneumopathies et péritonites chez l'immunodéprimé) (Chabasse *et al.*, 2002; Schuster *et al.*, 2010).

Diverses espèces produisent des métabolites antifongiques tels que les trichoriazines et de nombreuses mycotoxines (trichothécènes et peptides cycliques, gliotoxine, isocyanides, toxine T-2, trichodermine) (Schuster *et al.*, 2010).

Les *Trichoderma* ont un intérêt dans la production d'enzymes, certaines espèces sont utilisées en lutte biologique pour la protection d'arbres et cultures végétales contre l'attaque d'agents phytopathogènes. (Papavizas., 1985).

Certaines caractéristiques des différentes espèces de *Trichoderma* sont montrés dans la (Figure 02) (Schuster *et al.*, 2010).

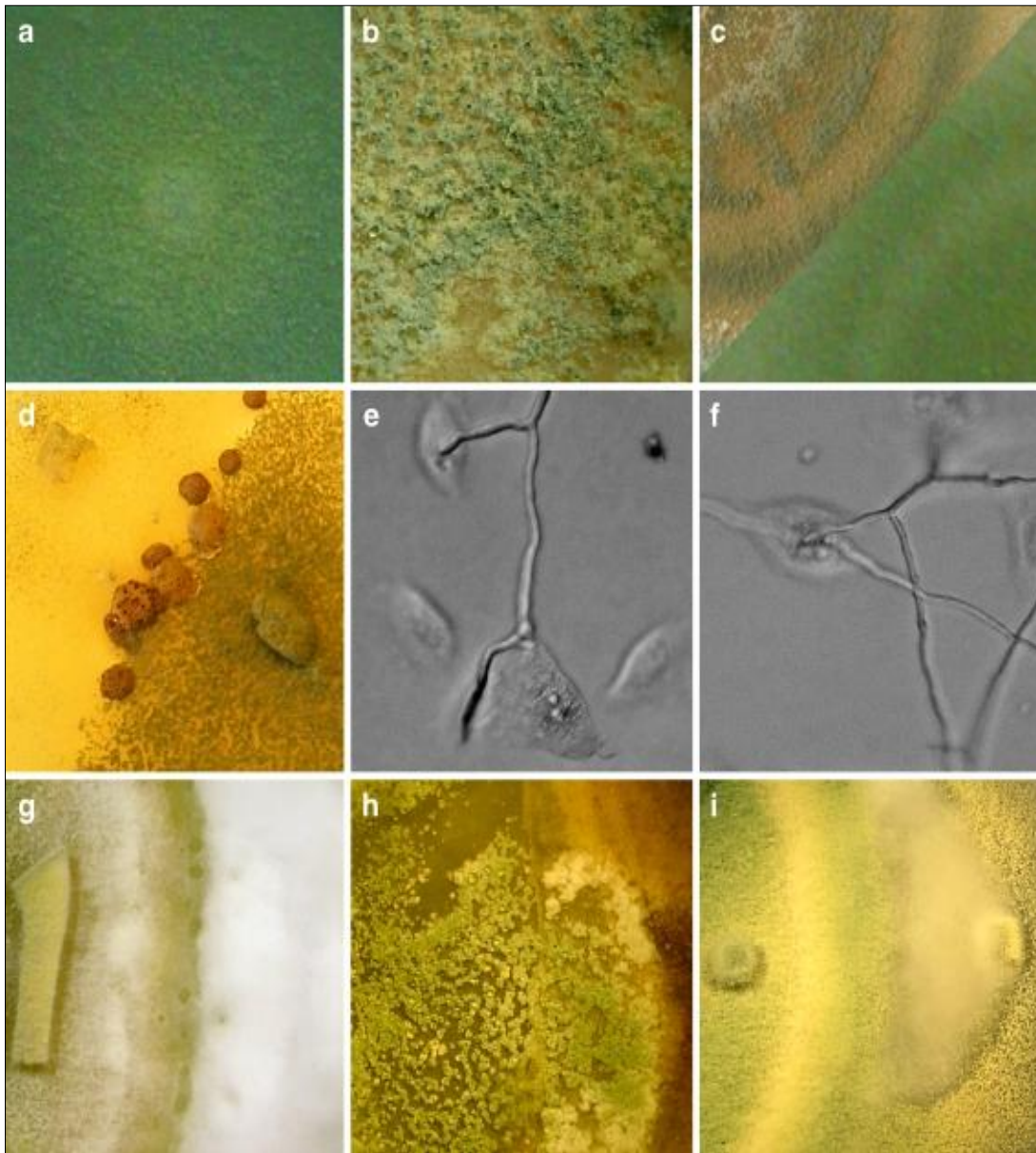


Figure 02 : Caractéristiques des espèces de *Trichoderma* ; a: *T. reesei* et b : *T. atroviride* qui poussent sur les plaques c : *T. reesei* ou *H. jecorina* . sa croissance augmente de plus en plus dans la lumière du jour, formation d organe de fructification de *T. reesei* lors de croisement avec un isolat de nature de *H. jecorina*. (e, f) *T. longibrachiatum* qui germent et poussent sur des cellules humaines, g : *T. reesei* (à gauche) au cours de la confrontation avec *Pythium ultimum h* (à droite) *T. atroviride* (à gauche) lors d'affrontement avec *R. solani* (à droite) (Schuster *et al.*, 2010).

2.2. La taxonomie de *Trichoderma*

La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études et de beaucoup de polémiques. Dans le règne vivant les limites de «l'espèce» reposent sur la possibilité de croisement entre individus. Or, les champignons anamorphes du genre *Trichoderma*, en tant que tels, n'ont pas de reproduction sexuée connue, et ce caractère ne peut donc être utilisé pour leur systématique. On se base alors sur les aspects culturels et la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert, 1996).

La taxonomie moderne des champignons a aboli l'embranchement des Deuteromycotina, auquel appartenait le genre *Trichoderma*. La position taxonomique actuelle des *Trichoderma sp.* Présente comme suit (Bissett, 2004).

Embranchement	<i>Eumycètes</i>
_ Sous embranchement	<i>Ascomycotina</i>
_ Classe	<i>Sordariomycètes</i>
_ Ordre	<i>Hypocréales</i>
_ Famille	<i>Hypocraceae</i>
_ Genre	<i>Trichoderma</i>

Synthèse bibliographique

Tableau 02 : Sections systématiques de *Trichoderma sp* et quelques-unes des espèces y appartenant, selon Bisset (1991 a et b). * Les espèces agrégées de Rifai (1969)

Trichoderma				
Section 1	Section 2	Section 3	Section 4	Section 5
Trichoderma	Pachybasium	Hypocrea	Longibrachiatum	Saturnisporum
<i>T.viride*</i>	<i>T.virens</i>	<i>T.lactea</i>	<i>T.longibrachiatum*</i>	<i>T.saturnisporum</i>
<i>T.koningii*</i>	<i>T.hamatum*</i>	Comprend les	<i>T.pseudokoningii*</i>	<i>T.ghanense</i>
<i>T.aureoviride*</i>	<i>T.harzianum*</i>	formes	<i>T.citrinoviride</i>	
<i>T.atroviride</i>	<i>T.piluliferum*</i>	anamorphiques		
	<i>T.polysporum*</i>	d'hypocrea		
	<i>T.fasciculatum</i>			
	<i>T.flavofuscum</i>			
	<i>T.crasum</i>			
	<i>T.croseum</i>			
	<i>T.minutisporum</i>			
	<i>T.tumentosum</i>			
	<i>T.fertile</i>			
	<i>T.longipilis</i>			
	<i>T.oblongisporum</i>			
	<i>T.strigosum</i>			
	<i>T.strictipillis</i>			
	<i>T.pubescens</i>			
	<i>T.spirale</i>			

2.3. Caractères cultureux

Ces champignons ont une croissance très rapide et extensive sur milieu de Sabouraud à 25 °C. (Chabasse *et al.*, 2002). Ils produisent des colonies laineuses, de couleur blanches au départ, apparaissent en vieillissant des touffes verdâtres isolées ou disposées en anneaux concentriques sur le milieu de culture.

Les colonies laineuses, à croissance rapide sont de couleur blanche, jaune-verte ou verte. Les conidiophores hyalins, en touffe plus ou moins compactes, sont septés, régulièrement et abondamment ramifiés à angle droit par rapport à l'axe principal. Les phialides, ovoïdes à ellipsoïdales, isolées ou groupées en petit nombre (2-3) sont disposées sur les branches,

Synthèse bibliographique

généralement perpendiculaires à l'axe. Les conidies unicellulaires, rondes ou ellipsoïdales, lisses ou verruqueuses, sont produites en masses mucilagineuses formant des glomérules au sommet des phialides (Roquebert, 1996; Chabasse *et al.*, 2002).

2.4. Morphologie microscopique

Multiplication végétative sur des hyphes bien différenciés simples ou ramifiés. Ils portent des phialides, également de petites tailles, en forme de quille. Renflées à leur base, solitaire ou groupées par 3, les phialides sont fixées à angle droit sur les conidiophores.

Les conidies, lisses ou échinulées, globuleuses, mesurent de 2.5 à μm de diamètre. Elles se rassemblent en amas au sommet des phialides, et forment ainsi des « fausses têtes ».

Reproduction sexuée :

Les formes sexuées appartiennent au genre *Hypocrea* (ascomycètes .dothidéales).

Les *Trichoderma* sont des saprophytes du milieu extérieur (bois en décomposition) (Chabasse *et al.*, 2002) (Figure.3).

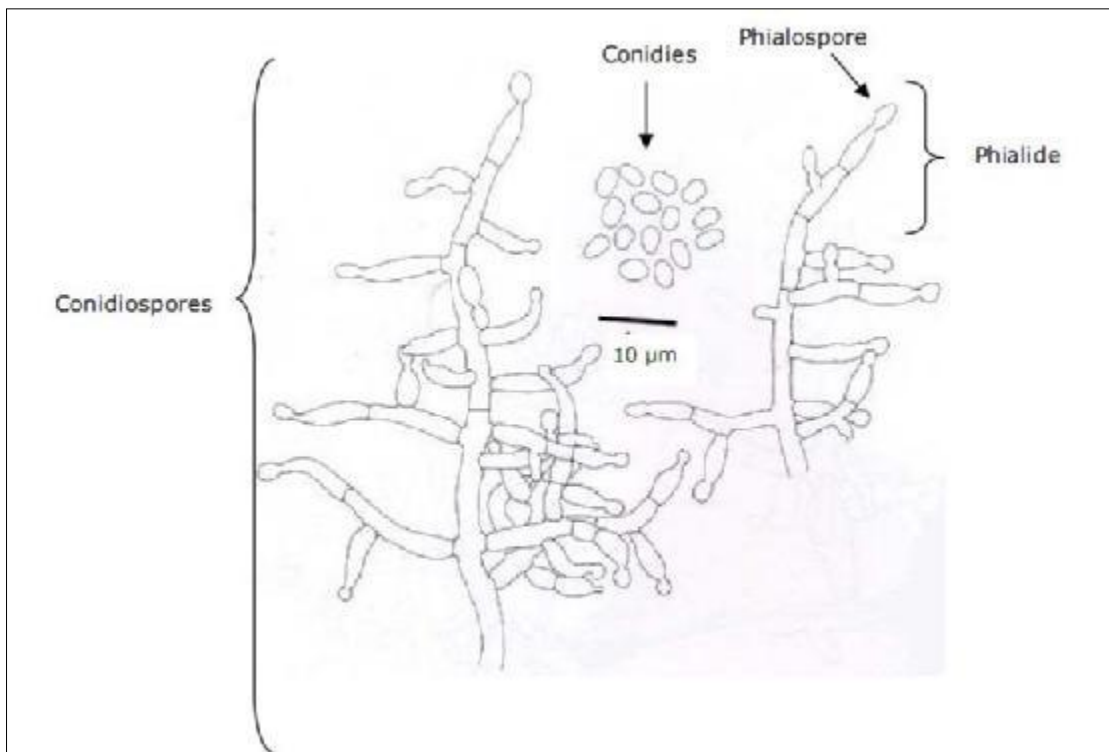


Figure 03 : Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma longibrachiatum* (Benkada, 2006; Roquebert, 1996).

2.5. Habitat de *Trichoderma*

Les espèces de *Trichoderma* sont des champignons qui sont présents presque dans tous les sols et autres habitats diversifiés. Dans le sol, Ils sont favorisés par la présence de niveaux élevés de racines de plantes, qu'elles colonisent aisément. Certaines souches sont fortement rhizosphère compétente, c'est-à-dire capable de coloniser et de pousser sur les racines, car une fois qu'ils entrent en contact avec des racines, ils colonisent la surface de la racine ou du cortex, selon les souches. Ainsi, si ajouté dans le traitement des semences, des meilleures variétés coloniseront la surface des racines, même lorsque les racines un mètre ou plus au-dessous de la surface du sol et ils peuvent persister à numéros utiles jusqu'à 18 mois après l'application. Cependant, la plupart des souches n'ont pas cette capacité. (Harman, 2014)

2.6. Cycle de vie

Trichoderma viride est un champignon asexuée .Les conidiospores représentent la phase dominante de la multiplication .Dans des conditions appropriées, les spores germent, donnant un mycélium, constitué des hyphes ramifiés, les conidiospores sont formés dans des phialides (Rifai, 2004).

3. *Trichoderma longibrachiatum*

Trichoderma longibrachiatum est un champignon filamenteux saprophyte (Alanio *et al.*, 2008 ; Gangneux, 2008).

Dans les années 1980 et le début des années 1990, (Bissett, 1984 ; Bissett, 1991) Bissett a proposé une classification infragénérique de *Trichoderma* par laquelle le genre a été divisé en sections : section *Trichoderma pachybasium* section *Trichoderma saturnisporum*, section *Trichoderma longibrachiatum* et section *Trichoderma hypocreanum*. Les caractéristiques principales de la section *Longibrachiatum* inclus ce qui suit:

- ✓ Des colonies se développent rapidement et sont de 6 à 9 cm après 4 jours à 20° C
- ✓ l'inverse des isolats frais est visiblement jaune-vert
- ✓ les chlamydo-spores sont présents ou absents
- ✓ les conidiophores sont ramifiés, rameaux primaires est longue et les branches secondaires sont généralement courtes
- ✓ Phialides ovoïdes à ellipsoïdales, atténuées au sommet
- ✓ Les conidies sont unicellulaire, verte, lisse fortifiée et ellipsoïde à obovoïde.

Synthèse bibliographique

Les espèces dans la section *Longibrachiatum* inscrites *T. citrinoviride*, *T. pseudokoningii*, *T. longibrachiatum*, et *T. atroviride*. Tandis que, (Bissett, 1984 ; Bissett, 1991) Bissett définit des caractéristiques spécifiques qui pourraient être utilisées pour séparer ces espèces, leur utilisation sans l'aide des plus récentes techniques moléculaires (Kuhls *et al.*, 1995; Kuhls *et al.*, 1997 ; Meyer *et al.*, 1993 ; Mitchell *et al.*, 1994 ; Turner *et al.*, 1997 ; van Belkum *et al.*, 1994)

Récente caractérisation moléculaire des espèces précédemment identifiés comme *T. pseudokoningii* trouvées en fait être *T. longibrachiatum* sur la base de l'analyse des séquences interne transcrit l'ADN ribosomal (Kuhls *et al.*, 1997). Les Caractéristiques macroscopiques utiles comprennent sa croissance rapide et une évolution rapide du blanc au vert, sa présence fréquente dans les zones en concentrique (Figure.4a). Et son jaune citron diffusant le pigment sur PDA, bien que toutes les souches peuvent ne pas être si intense (Figure.4b).

Au microscope, les hyphes sont lisses, cloisonnées et ramifiés et portent des conidiophores avec des principales longues branches (Figure.5), chacune se terminant dans une phialide. Les Phialides en forme de bouteille , pour la plupart solitaire, souvent un peu gonflé au milieu et plié à l'apex et légèrement resserrée à la base et mesurée principalement de 5 à 11 sur 2 à 3 μm (Figure 4 et 5). Phialides terminales plus allongées, n'étaient pas resserrées à la base et ont été jusqu'à 14 μm de longueur. (Figure.5).

Phialoconidies étaient lisses fortifiée, ellipsoïdales à cylindriques et vert et mesurée 3.4 à 6.4 sur 2,4 à 3,0 μm (Figure.6). Lisse, à parois épaisses, subglobuleux à chlamydoconidie ellipsoïde qui mesurait de 5 à 10 μm de diamètre ont été également observés (Figure.7) Sur la base des caractéristiques décrites ci-dessus, cet organisme a été placé dans la section *Longibrachiatum* et a été identifié comme *T. longibrachiatum*. Confirmation de l'espèce a été fournie par Gary Samuels (Agricultural Research Service, U.S. Département of Agriculture, Beltsville, Maryland). (M .A .Pfaller *et al.*, 1998) (Figure 8 et 9).

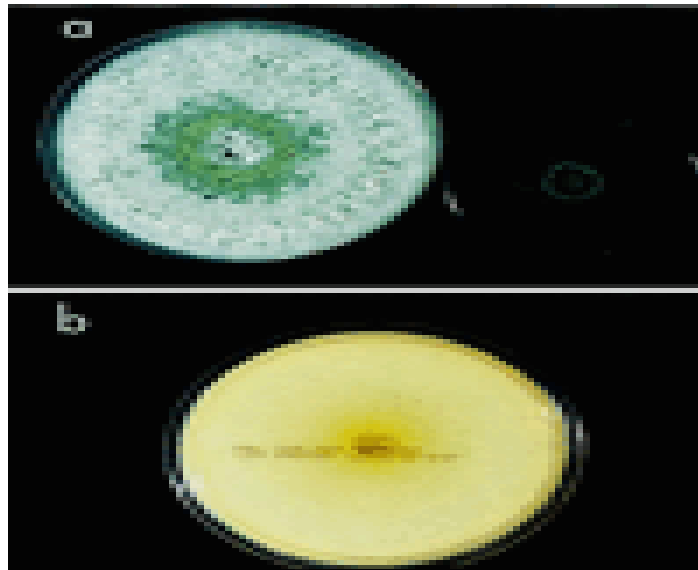


Figure 04 :(a), (b), *T. longibrachiatum* sur PDA après 5 jours à 25° C. (b) revers jaune pigment diffusible produites par *T. longibrachiatum* après 5 jours à 25° C. (M .A .Pfaller *et al.*, 1998)



Figure 05 : Aspect microscopique de *T. longibrachiatum* produisant plus courtes branches latérales se terminant par phialides. Grossissement, $\times 320$. (Bissett. J, 1984)

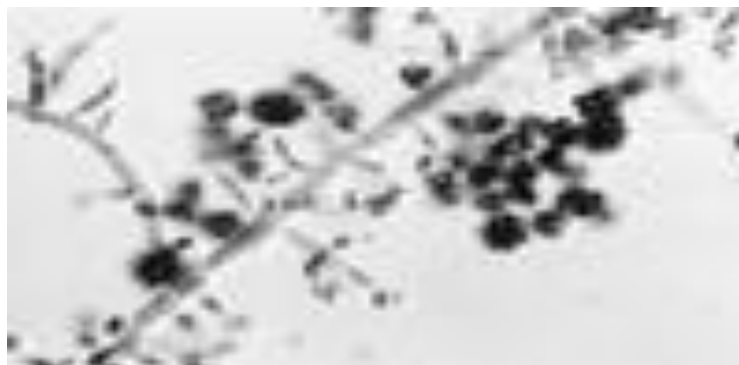


Figure 06 : Branches latérales, phialides et phialoconidies de *T. longibrachiatum*. Grossissement, $\times 920$. (Bissett. J, 1984)

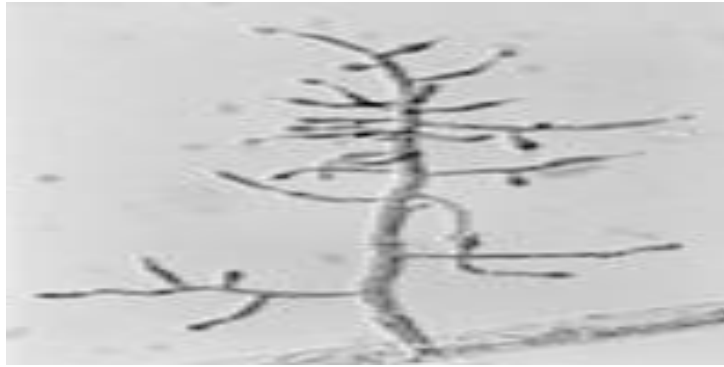


Figure 07 : Phialides terminales de *T. longibrachiatum*. Grossissement, $\times 920$. (Bissett, 1984)



Figure 08: Phialoconidies de *T. longibrachiatum*. Grossissement $\times 2,300$. (.Pfaller *et al.*, 1998)

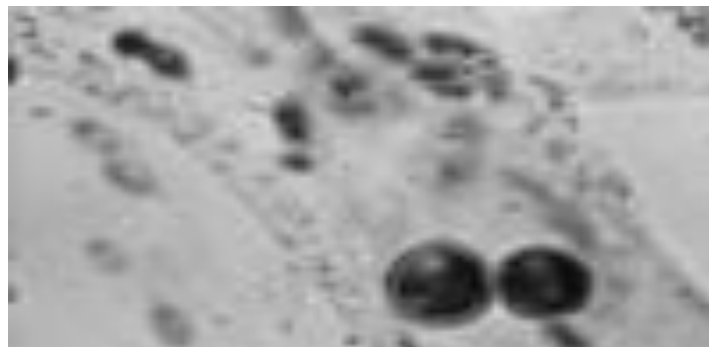


Figure 09 : Chlamydoconidies lisse, à parois épaisses de *T. longibrachiatum*. Grossissement $\times 2,300$. (.Pfaller *et al.*, 1998)

3.1. .production de la cellulase par *Trichoderma longibrachiatum*

Un large éventail de bactéries et de champignons filamenteux peut produire des cellulases. Un des plus étudiés micro-organismes cellulolytiques est le genre *Trichoderma* (*T. reesei* et *Trichoderma viride*) et surtout champignons de pourriture molle *T. reesei* et *T. longibrachiatum*, qui sont également utilisées industriellement pour la production d'enzymes (Kubicek, 1992).

Partie 3 : Fermentation sur milieu solide

1. Définition :

La fermentation en milieu solide présente de nombreux avantages (Tableau 3) pour la production d'enzymes, de produits chimiques et de la biomasse, par des souches fongiques, par rapport à la culture en milieu liquide (Givry, 2006).

La fermentation solide (fermentation de substrats solides, fermentation humide, culture solide, etc. et en anglais : *solid-state fermentation* ou *SSF*) est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre. De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. Expliquent la diffusion des moisissures filamenteuses dans le substrat solide humide. (Assamoi *et al.*, 2008).

Selon les substrats considérés, l'apparition d'eau libre se manifeste pour des teneurs en eau comprises entre 12 et 90 %, soit 0,65 et 0,98 d'activité d'eau (a_w) (Mathot, 1996 ; Gervais *et al.*, 2003).

2. Avantages et inconvénients de la fermentation en milieu solide (FMS)

Tableau 03 : Avantages et inconvénients de la fermentation en milieu solide (FMS) par rapport à la fermentation en milieu liquide (FML). (Givry, 2006).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">• Haute productivité• Meilleure régulation de l'oxygène• Faible coût du milieu• Facilité de préparation• Réduction des besoins en énergie et en nutriments.• Technologie simple• Ressemblance avec l'habitat naturel des microorganismes	<ul style="list-style-type: none">• Difficulté des mesures• Difficulté de mélange• Difficulté de contrôle des paramètres du procédé (pH, T°C, besoins en nutriments...)• Difficulté d'homogénéisation de la chaleur.• Produit final non pur, augmentation du coût pour récupération du produit finalMaîtrise des contaminants

Les moisissures sont le groupe des microorganismes le plus important utilisé dans les processus *SSF*. Pour cela, la paille de blé, et le son de blé ont été utilisés comme des substrats naturels, ce qui permet une valorisation de ces derniers et la préparation des milieux à moindre coût telle que l'exige la production d'enzymes industrielles.

3. Son de blé

3.1. Structure macroscopique

Pour comprendre la structure du son, il faut tout d'abord aborder plus en détail la structure des tissus maternels qui constituent le tégument, enveloppe du grain de blé. Ces tissus maternels sont constitués, de l'intérieur vers l'extérieur d'une assise aleurone, du tégument séminal, du péricarpe et d'une coque externe (cuticule).

La couche nucellaire (assise aleurone) recouvre directement le grain et constitue le plan de clivage lors du broyage du grain de blé. Lorsque le grain est à maturité, cette couche d'une épaisseur de 7 μm environ, est composée de cellules à parois fines et non lignifiées qui adhèrent fortement aux couches voisines. **Le tégument séminal** est épais d'environ 5 à 8 μm et est lui-même formé de plusieurs couches lui conférant une bonne perméabilité à l'eau (une cuticule interne, une couche contenant les pigments et une cuticule externe épaisse). **Le péricarpe** est lui aussi organisé en plusieurs couches :

- ✓ le péricarpe interne qui comporte une couche de cellules tubulaires à parois lignifiées et d'une couche de cellules transversales étroitement liées présentant des parois lignifiées alvéolées ;
- ✓ le péricarpe externe est formé d'une agglomération de cellules du parenchyme aplaties, recouvertes par l'hypoderme et l'épiderme. L'épiderme présente une cuticule relativement épaisse et subit une modification au niveau de l'apex du grain où les cellules deviennent excessivement épaisses pour former des « cheveux » qui constituent la « brosse »

Enfin, **la coque** se compose de couches cellulaires provenant des tissus de la feuille, généralement éliminée lors du battage des céréales. (Zeitoun, 2011).

3.2. Composition chimique des sons de blé

Du fait des variétés, des origines et des maturités différentes des grains de blé, ainsi que des techniques de mouture et de conservation variées qui sont employées, les sons de blé peuvent présenter des compositions très variables. De plus, les méthodes de dosage mises en œuvre vont aussi influencer sur la précision des mesures. Aussi, les travaux recensant la composition chimique des sons de blé présentent une hétérogénéité forte (Tableau.n°4).

Tableau 04: Compositions chimiques de sons de blé de différentes origines

	(Raynal-Ioualalen, 1996)		(Bataillon et al, 1998)		(Marechal, 2001)
	Son brut	Son désamidonné	Son brut	Son désamidonné	Son désamidonné
Cellulose *	9,2 (1)	15,5 (1)	11,0 (2)	25,0 (2)	18,7 (1)
Hémicelluloses *	37,0 (1)	60,0 (1)	19,0 (2)	45,0 (2)	62,3 (1)
Lignine *	6,7 (1)	8,0 (1)	6,0 (1)	3,0 (1)	3,8 (1)
Amidon *	20,0 (3)	n.d.**	29,0 (4)	1,0	n.d.**
Protéines *	14,8 (5)	15,2 (5)	14,0 (5)	9,0 (5)	15,6 (5)
Lipides *	n.d.**	n.d.**	6,0	6,0	n.d.**
Matières minérales *	5,3 (6)	1,0 (6)	4,0 (6)	1,0 (6)	1,5 (6)

* Les résultats sont exprimés en % de la matière sèche.

** n.d. = non déterminé.

1 Cellulose, lignine et hémicelluloses dosées par la méthode de Van Soest and Wine (ADF/NDF) (Van Soest et al., 1968).

2 Détermination simplifiée des monosaccharides neutres par chromatographie gaz-liquide (Hoebler et al., 1989; Gruppen et al., 1992).

3 Méthode planimétrique de Ewers (ISO, 1998).

4 Détermination après traitement termamyl et hydrolyse enzymatique.

5 Dosées par la méthode de Kjeldhal (N x 5,7 ou 6,25 selon les sources).

6 Calcination à 550 °C.

Les hémicelluloses sont, après l'amidon, les constituants majoritaires des sons de blé. Elles sont principalement constituées d'arabinoxylanes, comme en témoigne la composition en sucres.

4. Pailles de blé

4.1. Structure macroscopique de la paille

Lors de la récolte, la paille de blé est coupée par une moissonneuse-batteuse à une hauteur variable. Le grain est débarrassé de la paille et des feuilles qui sont rejetées au champ sous forme « d'andains ». La partie de la tige de faible hauteur qui reste au sol s'appelle le « chaume » et le terme de « paille » est alors utilisé pour désigner les tiges et feuilles sèches débarrassées de grains.

La paille est donc constituée de trois parties majeures : la tige, les nœuds et les feuilles. La tige a pour rôle de porter les organes reproducteurs et les feuilles, ainsi que le système de transport de l'eau et des nutriments. C'est un cylindre creux (lumen), constitué de couches concentriques et divisé par les nœuds sur lesquels se développent les feuilles (Stephen *et al.*, 1981). Dans le cas du blé, il y a 5 à 6 nœuds sur la plante à maturité. Les entre-nœuds, qui représentent environ 50 % de la masse de la paille, lui donnent sa résistance mécanique alors que les nœuds et les feuilles ont une moins bonne tenue mécanique, car ils contiennent plus de minéraux et moins de cellulose. Afin d'augmenter leur résistance à la verse, les blés cultivés de nos jours ont des pailles relativement courtes (70 à 90 cm) pour un diamètre compris entre 3,0 et 3,5 mm (Marechal, 2001).

De nombreux travaux ont été réalisés pour caractériser la composition chimique des pailles de blé, mettant en jeu des méthodes de dosage très variées (tableau n°5)

Tableau 05 : Composition chimique de pailles de blé de différentes origines

	(Magro, 1995)	(Marechal, 2001)	(Markessini <i>et al.</i> , 1997)
Hémicelluloses *	28,7 (1)	31,7 (\pm 2,2) (1)	34,0 (1)
Lignine *	12,7 (1)	10,0 (\pm 1,3) (1)	14,1 (1)
Cellulose *	43 (1)	40,8 (\pm 3,0) (1)	38,1 (1)
Protéines *	2,6 (2)	2,4 (\pm 0,4) (2)	n.d.**
Cendres *	3,2 (3)	5,9 (\pm 1,0) (3)	6,4 (3)
Rapport X/A	7,6	n.d.* *	n.d.* *

Synthèse bibliographique

* Les résultats sont exprimés en % de la matière sèche.

** n.d. = non déterminé.

1 Cellulose, lignine et hémicelluloses dosées par la méthode de Van Soest and Wine (ADF/NDF) (*Van Soest et al., 1968*).

2 Dosées par la méthode de Kjeldahl (N x 5,7 ou 6,25 selon les sources).

3 Calcination à 550 °C.

Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Origine et entretien de la souche :

La souche utilisée dans ce travail est la moisissure *trichoderma longibrachiatum* (GHL). elle est isolée au niveau du laboratoire de génie enzymatique université Constantine 1 Algérie, à partir d'échantillons de sol collectés proche de la source thermale (Hammam Debagh Ghelma), localisée dans le nord est de l'Algérie (février 2007).la souche est identifiée au niveau du laboratoire DSMZ en Allemagne, comme *Trichoderma longibrachiatum*.

La souche est repiquée sur le milieu sabouraud en boite de pétri à 30°C jusqu'à une bonne sporulation (7 jours). Les repiquages sont effectués tous les mois (kwak et rhee.1992).

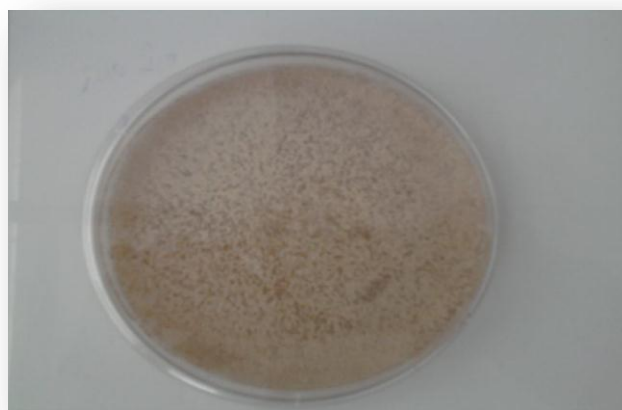


Figure 10 : la souche *Trichoderma longibrachiatum* après 7 jours d'incubation à 30°C sur milieu Sabouraud.

1.2. Préparation de l'inoculum

1.2.1. Préparation de la suspension de spores

La souche est maintenue sur milieu Sabouraud, incubée à 30°C jusqu'à ce que la surface de la boîte soit recouverte de spores (Figure 10). Après sporulation de la moisissure, les spores sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée stérile.

1.2.2. Dénombrement des spores

Une dilution de 1/100e est réalisée à partir d'une solution mère de spores. Le nombre de spores de cette dilution est déterminé par une technique de dénombrement à l'aide d'une cellule de comptage (la cellule de Thomas) (Guiraud, 1998) pour déterminer le taux d'inoculation. (la suspension de spores de la moisissures *T. longibrachiatum* représente l'inoculum). L'examen s'effectue au microscope optique au grossissement (x 40).

2. Production de la cellulase par la souche *Trichoderma longibrachiatum*

2.1. Milieux de production

Deux milieux naturels sont utilisés pour la production de la cellulase en mode de fermentation solide : La paille de blé (pré coupé en petit fragment de 0.5 à 2cm) et le son de blé (chelghoum el-aid. Mila). Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes avant inoculation.

2.2. Conduite de la fermentation solide

La production de l'enzyme est réalisée dans des erlens-meyers de 250 ml à raison de 5 gramme de substrat par erlen, imbibés par une solution starter (agent humidifiant), Les erlens meyers sont inoculés après refroidissement avec une suspension de spores à raison de 2.10^7 spores par gramme de milieu. Les erlens meyersensemencés sont ensuite incubés à 30°C dans une étuve, pendant 7 jours. Toutes les expériences sont réalisées en triplicate.

2.3. Effet du taux de l'humidité sur la production de la cellulase

L'étude de l'effet du taux d'humidité sur la production de l'enzyme par la souche *Trichoderma longibrachiatum* est réalisée par incubation des erlens contenant les milieux de production à 30°C. La gamme des taux d'humidité étudiée : 40%, 50%, 60% et 70%.

A la fin de la fermentation, une quantité connue (2.5 g) de substrat fermenté est mélangée avec 100 ml de solution tampon citrate 0.1M, pH 4.8 (Annexe 3). Après broyage à laide d'un mixeur pendant 1 à 2 minutes, le mélange est centrifugé à 20627g pendant 5 minutes. Le surnageant obtenu (représente l'extrait enzymatique) est utilisé pour le dosage des activités enzymatiques (endoglucanase et papier filtre) et la détermination de l'humidité. Les expérimentations sont réalisées en triplicate. Le surnageant est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

3. Méthodes analytiques

3.1. Dosage des activités cellulolytiques

□ *Activité papier filtre (APF)* : est utilisée pour déterminer l'activité totale dans un complexe cellulastique selon la méthode de Ghose (Ghose, 1987) dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés (lors de l'hydrolyse d'un substrat cellulosique). Le mélange réactionnel est constitué d'une solution d'enzyme (0.5 ml), d'1 ml de tampon citrate (0.1 M, pH 4.8) et de 50 mg de papier filtre Whatman N° 1 (des morceaux de 1x6 cm), incubé à 50°C, pendant 60 minutes.

□ *Activité Endoglucanase* : (CMCase, endo 1,4- β -D-glucanase ; EC 3. 2. 1. 4) est mesurée dans un volume total de 1 ml d'un mélange réactionnel contenant 0.5 ml d'extrait enzymatique dilué dans un tampon citrate 0.1 M, pH 4.8 et 0.5ml d'une solution de CMC (carboxyméthyl-cellulose) à 1% (W/V) préparé dans le même tampon que l'extrait enzymatique (Annexe5). Ce mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 30 minutes.

La quantité des sucres réducteurs libérée de l'hydrolyse du papier filtre et du carboxyméthyl-cellulose est mesurée selon la méthode de Miller (Miller, 1959) par une

Matériels et méthodes

réaction colorimétrique due à la présence du réactif : acide dinitrosalicylique (DNS) (Annexe n° 2).

* L'absorbance de la coloration développée est lue à 540 nm ; l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant le glucose comme standard avec une concentration de la solution mère de 0.005 moles (Figure 11). L'activité enzymatique est calculée en Unité par gramme (U/g).

Une unité de l'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent glucose (lorsque le glucose est utilisé comme étalon sucre réducteur) par minute et par gramme de matière sèche, à 50°C, pH 4.8. Le blanc est préparé de la même manière, sans l'addition de substrat. Chaque dosage est effectué en triplicate.

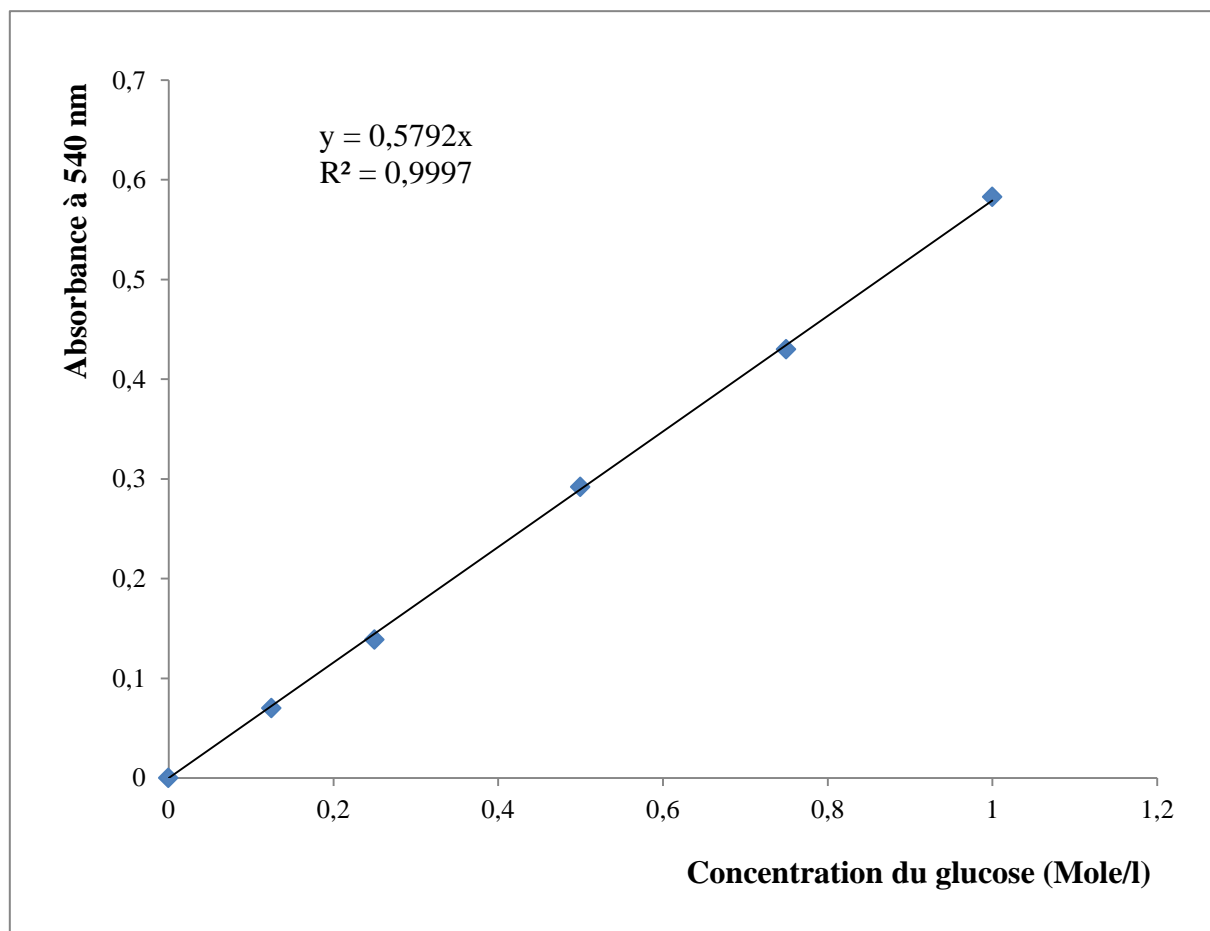


Figure 11 : courbe étalon de glucose pour le dosage des activités papier filtre et endogucanase.

3.2. Mesure de l'humidité

L'humidité des substrats fermentés (la paille de blé et le son de blé) est déterminée par la méthode de la mesure du poids sec, qui consiste à sécher des échantillons de 2.5 g dans une étuve à une température de 105 °C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Audigie *et al.*, 1984).

Résultats et discussion

Résultats et discussion

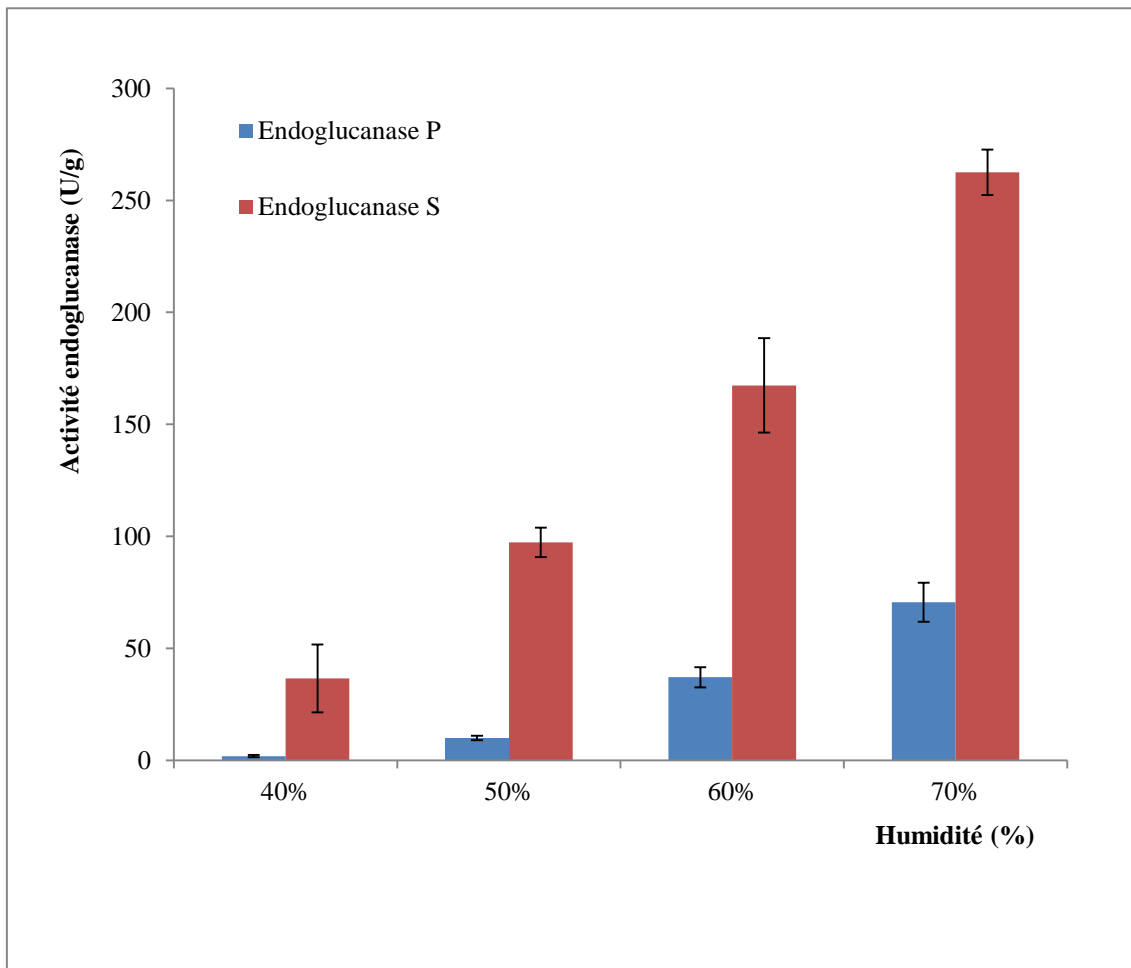


Figure 12: Activité endoglucanase produite par *Trichoderma longibrachiatum* sur paille de blé et son de blé, après 7 jours de fermentation à 30°C.

Résultats et discussion

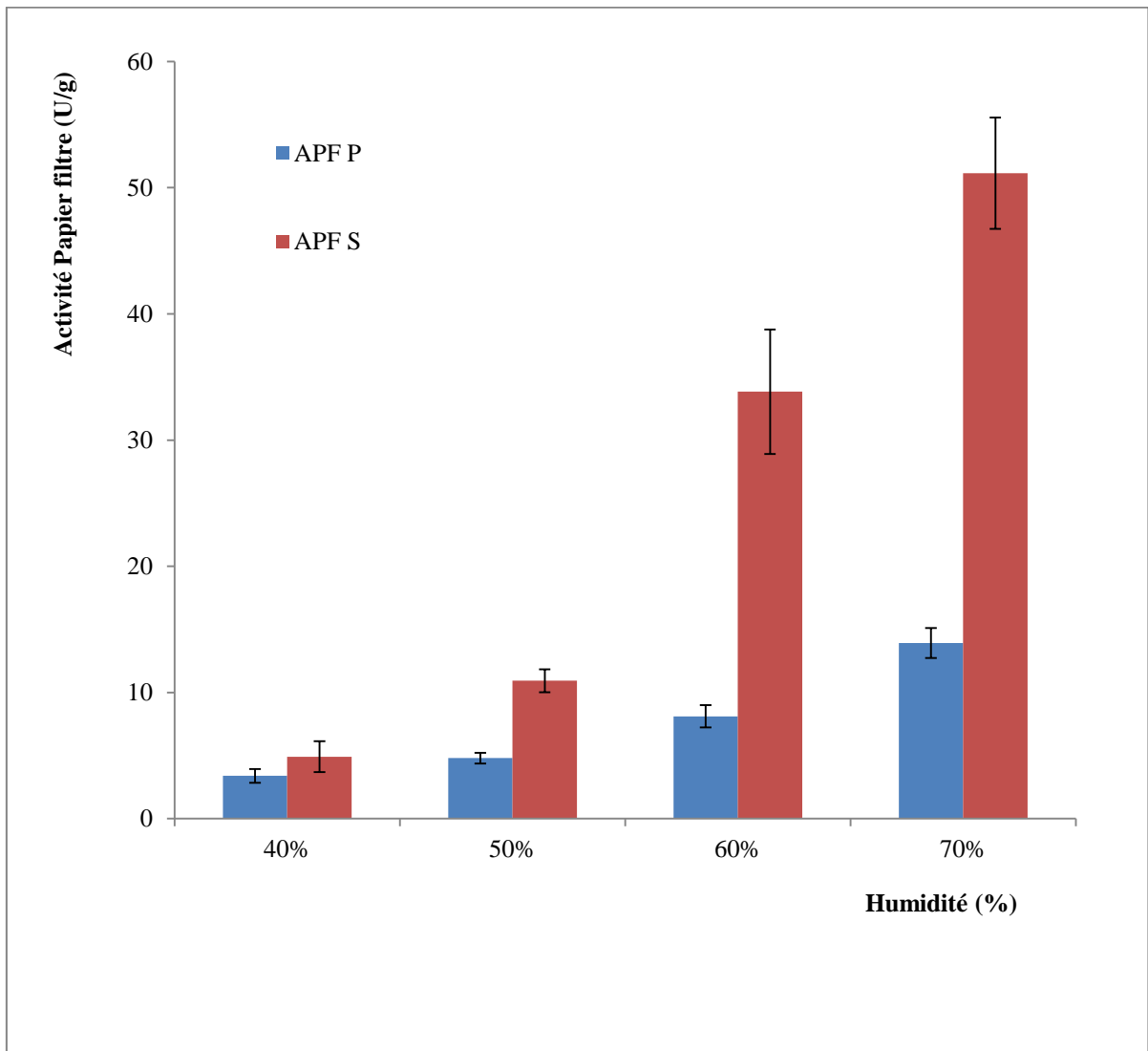


Figure 13: Activité papier filtre produite par *Trichoderma longibrachiatum* sur paille de blé et son de blé, après 7 jours de fermentation à 30°C.

Les résultats obtenus montrent que le niveau optimal de l'humidité correspond à 70%, pour la production des activités papier filtre et endoglucanase par la moisissure

Résultats et discussion

Trichoderma longibrachiatum. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par de nombreux auteurs, en particulier, Sun *et al.*, (2010), qui ont montré que l'humidité optimale pour la production de l'activité endoglucanase par *Trichoderma* sp, sur les résidus de pommes sous SSF correspond à 70 %. Supérieur à 70 % d'humidité, la production de la cellulase est diminuée. L'humidité à taux élevée provoque la diminution de la porosité, favorise l'adhésivité, change la structure du substrat et réduit l'aération, qui se traduit par le transfert d'oxygène abaissé et par conséquent la croissance du microorganisme est faible. En revanche, l'humidité à taux faible (inférieur à 40 %), réduit la solubilité des éléments nutritifs, qui deviennent alors inaccessibles aux microorganismes (Sun *et al.*, 2010).

Aussi, Majsov, (2010), a utilisé 70% d'humidité pour la production des activités papier filtre et endoglucanase, sur la paille de blé. Notre résultat est en parfait accord avec celui indiqué par Latifian *et al.*, (2007), qui reportent que le taux d'humidité a un effet significatif sur la production de la cellulase par *Trichoderma reesei*, et le maximum d'activité est observé à 70% d'humidité.

L'humidité initiale du milieu est un facteur critique en *SSF* car c'est elle qui détermine la croissance microbienne et le rendement en produit (Gervais et Molin, 2003). Des taux d'humidité faibles ou élevés affectent largement les activités métaboliques des cultures et par conséquent, la synthèse des produits. La paille de blé et le son de blé ont un taux d'humidité faible, à environ 7 - 13%, l'humidité initial de substrat est trop basse pour supporter la croissance de la moisissure et pour cela le substrat doit être humidifié pendant la préparation (Chutmanop *et al.*, 2008). Dans les cultures solides fongiques et bactériennes, des niveaux d'humidité inférieurs peuvent conduire à une réduction de la solubilité des éléments nutritifs, un faible degré de gonflement des substrats et une tension d'eau plus élevée dans les substrats solides (Gervais et Molin, 2003; Lazim *et al.*, 2009).

Par ailleurs, la nature du substrat utilisé a un effet sur la production de la cellulase, où on trouve que le milieu son de blé semble meilleur, par rapport à la paille, pour la production de taux élevés en enzymes recherchées (Tableau 6). Sur ce milieu, on note une

Résultats et discussion

croissance importante de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* (Tableau 7). En effet, la moisissure produit 97.3U/g d'activité endoglucanase sur son de blé à 50% d'humidité, un résultat largement supérieur à celui (26.6U/g d'endoglucanase) obtenu par *Aspergillus* sp. SU-M15 cultivé sur son de blé à 50% d'humidité (Vu *et al.*, 2011). Notre souche, à 70% d'humidité produit 51.15U/g d'APF et 262.47U/g d'endoglucanase, ces valeurs dépassent suffisamment celles produite par le mutant *Trichoderma reesei* QM 1914 (0.5U/g d'APF et 1.5U/g d'endoglucanase) (Neagu *et al.*, 2012).

Tableau 6 : Comparaison de la production de la cellulase par *Trichoderma longibrachiatum* sur les deux milieux à différents taux d'humidité.

Substrats % d'humidité	Paille de blé		Son de blé	
	APF (U/g)	Endoglucanase (U/g)	APF (U/g)	Endoglucanase (U/g)
40	0.53	1.88	6.58	36.58
50	1.02	9.97	10.15	97.3
60	4.55	37.07	15.16	197.4
70	13.90	70.61	51.15	262.47

Résultats et discussion

Les valeurs de l'humidité mesurées après 7 jours de culture de *Trichoderma longibrachiatum* sur paille de blé et son de blé, sont consignées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Humidité à la fin de la fermentation

Substrats % d'humidité	Paille de blé	Son de blé
	Humidité (%)	Humidité (%)
40	10	12
50	16.5	18.3
60	18	24
70	20	29.5

La diminution de l'humidité à la fin de la fermentation explique l'effet intéressant d'humidifier les substrats utilisés en fermentation solide pour la production de la cellulase par *Trichoderma longibrachiatum*.

1. Production de la cellulase *Trichoderma longibrachitum*

1.1.Effet du taux de l'humidité

L'effet de l'humidité sur la production des activités cellulolytiques par *Trichoderma longibrachiatum* est étudié après 7jours de culture sur 2 milieux naturelles : la paille de blé et le son de blé (Figures 12 et 13).

La production des enzymes est nettement influencée par les différents pourcentages d'humidité des milieux testés.









La variation des activités enzymatiques est proportionnelle avec le pourcentage d'humidité

En effet, le maximum des activités est obtenu après 7jours de fermentation avec un pourcentage de 70% sur les deux milieux, l'activité endoglucanase est mesurée à 70,61U/g et 262,47U/g sur la paille de blé et le son de blé, respectivement (Figure 12).

De même, L'activité papier filtre est mesuré à 13,92U/g et 51,15U/g à 70% d'humidité, sur la paille de blé et le son de blé, respectivement (Figure 13).

Résultats et discussion

Tableau 07 : Aspect de la croissance de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* après 7 jours de fermentation.

Taux d'humidité substrats	40%	50%	60%	70%
La paille de blé				
Le son de blé				

*La croissance de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* est proportionnelle avec le taux d'humidité.

Conclusion et perspective



Conclusion et Perspective

Le but de cette étude est la production de la cellulase par le champignon filamenteux, *Trichoderma longibrachiatum*, sur milieu solide (SSF). Pour cela, la paille de blé et le son de blé sont utilisés comme des substrats naturels, ce qui permet une valorisation de ces derniers et la préparation des milieux à moindre coût telle que l'exige la production d'enzymes industrielles.

De nombreux travaux ont été réalisés pour caractériser la composition chimique de la paille de blé et le son de blé. L'étude de la composition chimique de la paille de blé révèle sa richesse en cellulose (43%), une teneur importante en hémicelluloses (28,7 %) et Lignine (12,7 %). Les hémicelluloses (37%) sont, après l'amidon (20%), les constituants majoritaires des sons de blé. Elles sont Principalement constituées d'arabinoxylanes, comme en témoigne la composition en sucres. Ces proportions en sources carbonées et azotées conviennent donc aussi bien à la croissance microbienne qu'à la production de métabolites. Dans ce cas, la cellulase. La production des enzymes s'est poursuivie sur deux milieux de culture : La paille de blé et le son de blé.

L'influence des différents taux d'humidité sur la synthèse des enzymes par la souche *Trichoderma longibrachiatum* est étudiée.

Les valeurs maximales de l'activité endoglucanase : 70,61U/g et 262,47U/g sur la paille de blé et le son de blé, respectivement, sont obtenues avec le taux de 70% d'humidité.

Les valeurs maximales de l'activité papier filtre : 13,92U/g et 51,15U/g sur la paille de blé et le son de blé, respectivement, sont obtenues avec le taux 70%d'humidité.

Le milieu son de blé est meilleur pour la production des enzymes endoglucanase et papier filtre, par rapport à la paille de blé.

Compte-tenu de ces premiers résultats, nous sommes convaincus que cette souche devrait être un bon candidat pour la production de cellulases. Par conséquent, ces travaux doivent être poursuivis afin de confirmer nos premiers résultats à plus grandes échelles.

Conclusion et Perspective


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

- ❖ Optimiser le milieu de production pour un meilleur rendement.

- ❖ Etude cinétique de la production de l'enzyme, afin de déterminer le temps nécessaire pour un maximum de production.

- ❖ Purifier l'enzyme s'il est destiné à un usage alimentaire ou pharmaceutique.

Références Bibliographique



Références bibliographiques

Ando S., Ishia H., Kosugi Y., Ishikawa K. (2002). Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(1): 430-433.

Académie des technologies. (2010). grand palais des champs. elysées avenue Franklin D.Roosevelt porte C,Biotechnologies et environnement. 978-2-304-03347-2. 8, Paris.

Alanio A., Brethon B., Feuilhade de Chauvin M., Kervile E., Leblanc T., Lacroix C., Baruchel A., Menotti J. (2008). Invasive Pulmonary Infection Due to *Trichoderma longibrachiatum* Mimicking Invasive Aspergillosis in a Neutropenic Patient Successfully Treated with Voriconazole Combined with Caspofungin.

Ando S., Ishia H., Kosugi Y., Ishikawa K. (2002). Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(1): 430-433.

André Schuster., Monika Schmoll. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*.springer. *Appl Biochem* . 27: 97-102.

Audigie C L., Fagerella J., Zonszain F. (1984). Manipulation d'analyse biochimique. p : 270.Edition Tec et Doc, Lavoisier. Paris.

Ballerin D. (2006). Les biocarburants: état des lieux perspectives et enjeux du développement. technip,IFP. France.ISBN 2-7108-0869 2: 273.

Bataillon M., Mathaly P., Nunes Cardinali A P., Duchiron F. (1998). Extraction and Purification of arabinoxylan from destarched wheat bran in a pilot scale. *Industrial*.

Bayer E A., Chanzy H., Lamed R., Shoham Y.(1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. *CuIT. Opin. Struct. Biol.* 8: 548-557.

Béguin P., Aubert J P. (1992). La dégradation de la cellulose par les microorganismes. *Annales de l'Institut Pasteur* 3: 9 1- 11 5.

Béguin P., Aubert J P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbial. Rev.* 13: 25-58.

Belkum A V. (1994). DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev.* 7: 174–184.

Benkada M M. (2006).évaluation du risque fongique en zones conchylicoles :substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma* . Mention Sciences de la Vie et de la Santé Discipline Pharmacie Spécialité Mycologie marine. science pharmaceutiques. Université de nantes faculté, France.

Références bibliographiques

Bissett J A. (1991) revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Can J Bot. 69: 2418–2420.

Bissett J A. (1984) revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Can J Bot. 62:924–931.

Bissett J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*. (a) Can. J. Bot. 69: 2373-2417.

Bissett J. (2004). Commentaires de l'adresse internet suivante :

http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J P., Reymond P., Sanglier J J., Vayssier Y., Veau P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson, Paris : 12-426.

BOUDI H Sarah. (2011). Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro. Présentée pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université Paris EST Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé Ecole doctorale : Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé. Le 12 décembre, paris :13 .
cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. *Biotechnol.*

Chabasse D., bouchara J P., ludovic de gentile., brun S., bernard C P. (2002) les moisissures d'intérêt médicale, cahier de formation de biologie médicale .bioforma.laboratoire d'analyse biologique et médicale .25, France.

Chenel I P. (2004). Production d'enzymes protéolytiques par des bactéries non conventionnelles isolées de boues d'épuration municipales. Mémoire de Maîtrise présenté pour l'obtention du grade Maîtrès sciences .en sciences de l'eau. Institut National de la Recherche Scientifique - Eau, Terre et Environnement. Québec: 59.

Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y., Srinophakun P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83: 1012–1018.

Diana A. NEAGU, Jacqueline DESTAIN, Phillipe THONART, Carmen SOCACIU. (2012). *Trichoderma Reesei* Cellulase Produced by Submerged Versus Solid State Fermentations. Bulletin UASVM Agriculture, 69(2).

Enzymes in tetergency . Surfactant science series. 69 : 175-202.

Gangneux J P., Drogoul A S. (2008). Infections fongiques invasives : nouvelles données épidémiologiques et écologiques. Hématologie, 14, n° spécial 4: 9.

Références bibliographiques

- Gervais P., Molin P.** (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13: 85-101.
- Ghose T K.** (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem.* 59: 257-268.
- Givry S.** (2006). Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*. Thèse de doctorat. Microbiologie. Industrielle. Université de Reims Champagne-Ardenne: 28-29.
- Guiraud J.** (1998). Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris. P: 8-101.
- Gusakov A V., Sinitsyn A P., Markov A V., Skomarovsky A A., Sinitsyna O A., Berlin A G., Ankudimova N V.** (2000). Indigo-binding domain in cellulase molecule. *Biocatalysis fundamentals and applications.*
- Harman G E.** (1914). *Trichoderma spp.* including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). Cornell University, Geneva, NY 14456. Commentaires de l'adresse internet suivante: <http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.html>.
- Henrissat B., Driguez H., Viet C., Schulein M.** (1985). Synergism of Cellulases from Crops and Products, 8. 1: 37-43.
- Hoshino E., Shiroishi M., Amano Y., Nomura M., Kanda T.** (1997): Synergistic Actions of Exo-Type Cellulases in the Hydrolysis of Cellulose with Different Crystallinities. *Journal of Fermentation and Bioengineering.*
- Hospital S L.** Departments of Parasitology-Mycolology, Pediatric Hematology, and Radiology, Assistance Publique Ho[^]pitaux de Paris and University of Paris, France: 1.
- Jarrige R., Grenet E., Demarquilly C., Besle J M.** (1995). Les Constituants de l'appareil végétatif des plantes fourragères. Dans R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce, & M. Journet, *Nutrition des ruminants domestique: ingestion et digestion.* Paris : 25-81.
- Kim D W., Jang Y H., Jeong Y K.** (1998). Adsorption kinetics and behaviour of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. *Biotechnol Appl Biochem* , 27: 97-102 .
- Kim D., Hong Y.** (2001). Description of cellobiohydrolases Ce16A and Ce17A from *Trichoderma reesei* using Langmuir-type models. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 6: 89-94.

Références bibliographiques

- Kolarova N., Farkas V.** (1981). Sensitivity of various yeasts to crude cellulolytic enzyme complexes from *Trichoderma reesei*. *Euro.J.Appl. Microbiol. Biotechnol.* 13: 184-187.
- Krause D O., Denman S E., Mackie R. I., Morrison M., Rae A L., Attwood G T.** (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*:663-693.
- Kubicek C P.** (1992). The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 45: 1-27.
- Kuhls K ., Lieckfeldt E ., Borner T.** (1995). PCR-fingerprinting used for comparison of ex-type strains of *Trichoderma* species deposited in different culture collections. *Microbiol Res.* 150: 1–9.
- Kuhls K ., Lieckfeldt E ., Samuels G J ., Meyer W ., Kubicek C P ., Borner T.** (1997). Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia.* 89: 442–460.
- Kwak M Y., Rhee J S.** (1992). Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. *Biotechnol Bioeng.* 39: 903-906.
- Latifian M.** (2007). Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid- state fermentation conditions. *Bioresour Technol.* 98: 3634- 3637.
- Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I., Limam F.** (2009). Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 531–537.
- Lignine . Edition Gauthier-Villard, Paris : 199-214.
- Magro C.** (1995). Valorisation des pailles de blé par fractionnement thermo-mécanochimique dans un réacteur bi-vis. Ph.D thesis, Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle – UMR 1010 INRA / INP ENSIACET, Université de Toulouse: 247.
- Maréchal P.** (2001). Analyse des principaux facteurs impliqués dans le fractionnement combiné de pailles et de sons de blé en extrudeur bivis: obtention d'agromatériaux. PhD thesis, Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle - UMR 1010 INRA / INP ENSIACET, Université de Toulouse : 350

Références bibliographiques

- Markessini E., Roffael E., Rigal L.** (1997). Panels from annual fibers bonded with Urea- Formaldehyde Resins. 31st International Particleboard Composite material Symposium.
- Maurer K.** (1997). Developpement of new cellulases. In : *EeJE*, Misset O., Baas E.J., editors .Enzymes in tetergency . Surfactant science series. 69 : 175-202.
- Medve J., Karlsson J., Lee D ., Tjerneld F.** (1998): Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: Adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 59: 621-634.
- Meyer W ., Lieckfeldt K ., Kuhls K ., Freezman Z ., Borner T ., Mitchell T G.** (1993). DNA and PCR fingerprinting in fungi. *Exp Suppl.* 67: 311–320.
- Mitchell T G ., Sandin R L ., Bowman B H ., Meyer W ., Merz W G.** (1994). Molecular mycology: DNA probes and application of PCR technology. *J Med Vet Mycol.*;32(Suppl. 1): 351–356.
- Nidetzky B., Steiner W., Claeysens M.** (1994). Cellulose Hydrolysis by the Cellulases from *Trichoderma-Reesei* - Adsorptions of 2 Cellobiohydrolases, 2 Endocellulases and Their Core Proteins on Filter-Paper and Their Relation to Hydrolysis. *Biochemical Journal*, 303: 817-823.
- Odier E., Rouau X.** (1985). Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine. Edition Gauthier-Villard, Paris: 199-214.
- Papavizas G C.** (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol*, 23: 23-54
- Peiterson N., Anderson B.** (1978). Fermentation of barley straw by *Trichoderma viride*: Recovery and nutritive value of the fermentation product. *Aiche. Symposium. Series.* 74 (172): 100-104.
- Philippe T., Allah Antoine Assamoi., Jacqueline Destain.** (2008). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β 1,4-xylanases de moisissures: le cas de *Penicillium canescens*. Gembloux Agricultural University – FUSAGx. Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI). Unité de Bio-industries. 2. B-5030 Gembloux ,Belgium.
- polaina J., Andrew p maccabe.** (2007). structure, functions and applications in *industrial enzymes*. springer: 55-59.

Références bibliographiques

- Raynal-Ioualalen R.** (1996). Procédé de fractionnement des sons de blé. Extraction et étude des propriétés fonctionnelles des arabinoxylanes. PhD thesis, Laboratoire de Chimie Agro- Industrielle - UMR 1010 INRA / INP ENSIACET, Université de Toulouse: 324.
- Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B.** (2002). Dimension, shape, and conformational flexibility of two domaine fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *The journal of Biological Chemistry*. 277 (43): 40887-40892.
- Rifai.** (2004). Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma*, Paris: 55-56-58.
- Roquebert M F.** (1996). Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. Dans les systèmes telluriques: Systématique, bilogie et écologie des organismes. Comptendu des 4èmes Rencontres en Toxinologie, Paris, 13-15.
- Sandgren M., Stahlberg J., Mitchinson C.** (2005). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Biophys. Mol. Bio*, 89: 246-291.
- Scriban R.** (1993). Biotechnologie. Technique de documentation- Lavoisier (éd.) 4: 32-690.
- Singh A., Kuhad R C., Ward O P.** (2007). Industrial application of microbial cellulases, in *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*, Kuhad R C., Singh A. I.K.International Publishing House, New Delhi, India: 345– 358.
- Stephen H T H., James M L.** (1981). The chemical components and decomposition of wheat straw leaves, internodes and nodes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 32(11): 1057-1062.
- Sun H., Ge X., Hao Z., Peng M.** (2010). Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. *African J. Biotech.* 9. 2: 163-166.
- Tomme P., Warren A J., Gilkes N R.** (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.* 37: 1-81.
- Tomme P., Heriban V., Claeysens M.** (1990). Adsorption of 2 Cellobiohydrolases from *Trichoderma-Reesei* to Avicel - Evidence for Exo-Exo Synergism and Possible Loose Complex-Formation. *Biotechnology Letters*. 12: 525-530.
- Turner D., Kovcs W., Kuhls K., Lieckfeldt E., Peter B., Arisan-Atac I., Strauss J., Samuels G J., Borner T.** (1997). Kubicek C P. Biogeography and phenotypic

Références bibliographiques

variation in *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and associated *Hypocrea* species. *Mycol Res.*101: 449–459.

Van Hanh Vu., Pham A T., Keun Kim. (2011). Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solide state fermentation. *Mycobiology.* 39 (1): 20-25.

Woodward J. (1991): Synergism in Cellulase Systems. *Bioresource Technology.* 36: 67-75.

Woodward J., Hayes MK., Lee NE. (1988). Hydrolysis of Cellulose by Saturating and Non- Saturating Concentrations of Cellulase - Implications for Synergism. *Bio-Technology,* 6: 301-304.

Woodward J., Lima M., Lee NE. (1988). The Role of Cellulase Concentration in Determining the Degree of Synergism in the Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose. *BiochemicalvJournal.* 255: 895-899.

Zeitoun R. (2011). Procédés de fractionnement de la matière végétale - Application à la production des polysaccharides du son et de la paille de blé. PhD. thesis, Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle - UMR 1010 INRA / INP ENSIACET, Université de Toulouse: 281.

Sites web

<http://mycota-crcc.mnhn.fr>. (consulté le 24/04/2014).

Résumé

Abstract

Cellulases are the enzymes which hydrolysis cellulosic biomass and are being produced by the microorganisms grown over cellulosic materials. Cellulase is an important enzyme which can be obtained from cheap agrowastes, as well as cellulose as substrates by using submerged fermentation and solid state fermentation. Cellulose can be degraded by cellulase enzymes produced by cellulolytic bacteria and fungi.

The production of cellulase by *Trichoderma longibrachiatum*, cultivated on 2 natural substrates: wheat bran and wheat straw, is studied by using different moisture content (40%, 50%, 60% and 70%).

The study of got results, reveals that the fungi *T. longibrachiatum* produces high quantities of cellulase (APF: 51.15U/g and endoglucanase: 262.47U/g) with the substrate wheat bran at 70% moisture.

Keywords: *Trichoderma longibrachiatum*, cellulase, production, activity cellulasique.

ملخص

cellulases هي الإنزيمات التي تحلل السليلوز ويتم إنتاجها بواسطة الكائنات الحية الدقيقة التي نمت على مواد السليلوز. وهو إنزيم هام يمكن الحصول عليها من النفايات الزراعية، ثم بخص بالتخمير بواسطة التخمير السائل أو الصلب. cellulase التي تنتجها الفطريات والبكتيريا سيلولوليتيكية، تستطيع أن تحلل السليلوز. إنتاج cellulase من *Trichoderma longibrachitum*، نمت على ركيزتين طبيعيتين التي هي نخالة القمح وقش القمح، في نسب مختلفة من الرطوبة (40%، 50.60%، 70%)، و تمت دراستها. وكشفت النتائج، *Trichoderma longibrachitum* تنتج كميات عالية من cellulase (تصفية الورق: 51.15 U/g، اندوجلوكاناسي: 262.47 U/g)، على نخالة القمح في الرطوبة 70% بعد 7 أيام من التخمير في 30 درجة مئوية.

الكلمات الرئيسية: *Cellulase*، *Trichoderma longibrachitum*، إنتاج، سيلولاسي النشاط.

Annexe

Annexes

Annexe 1

Milieu Sabouraud

- Peptone..... 10 g
- Glucose massé..... 20 g
- Agar-agar..... 15 g
- Eau distillée (qsp)..... 1 000 ml
- vitamines et facteurs de croissance
- pH = 6,0

Annexe 2

Méthode de dosage

1/ Réactif DNS :

100ml de NaOH 2N : dissoudre 8g de NaOH dans 100 d'eau distillée.

Dissoudre 1g de DNS dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée. Ajouter 30g de tartrate double Na, K. Compléter à 100ml avec l'eau distillée, agité. Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière. Il se conserve environ un mois (Miller, 1959).

Annexe 3

Préparation de la solution tampon citrate 0.1 M, pH 4.8

1000ml acide citrique (0.1M) :23g A.citrique dans1000 ml d'eau distillée.

2000ml citrate de sodium (0.1M) :58.8g citrate de sodium dans 2000ml d'eau distillée.

Titration jusqu'à Ph 4.8. La solution tampon est conservée à 4°C jusqu'a utilisation.

Annexe 4

Préparation de l'agent humidifiant :

Dissoudre 1 g de glucose, 0.046g de sulfate d'ammonium et 0.046g de tartrate double Na,K dans 100 ml d'eau distillée et bien mélanger jusqu'à l'homogénéisation complète .

Annexes

Annexe5

Préparation de la solution de carboxyméthylcellulose (CMC) à 1% :

1 g de CMC est dissout dans 100mL de tampon citrate 0.1M PH 4.8, compte-tenu de la grande viscosité et afin d'avoir une solution homogène, il faut agiter et chauffer jusqu'à dissolution complète.

BOULARES DOUNIA

Date de soutenance : 24/06/2014

BOULHAM SOUMIA

Thème :

*Production de la cellulase par *Trichoderma longibrachiatum* sur milieu solide à base de la paille de blé et de son de blé.*

Résumé :

Les cellulases sont les enzymes qui hydrolysent la cellulose et sont produits par les micro-organismes cultivés sur des matières cellulosiques. C'est une enzyme importante qui peut être obtenue à partir de déchets agricoles, à moindre coût par fermentation en milieu liquide ou par fermentation en milieu solide.

La cellulase produite par des champignons et des bactéries cellulolytiques, est capable de dégrader la cellulose.

La production de la cellulase par *Trichoderma longibrachiatum*, cultivée sur 2 substrats naturels qui sont le son de blé et la paille de blé, à différents pourcentages d'humidité (40%.50%.60%.70%), est étudiée.

Les résultats obtenus, révèle que la souche *T. longibrachitum* produit des quantités élevées en cellulase (papier filtre : 51.15U/g, endoglucanase : 262.47U/g), sur son de blé à 70% d'humidité après 7 jours de fermentation à 30°C.

Mots-clés : *Trichoderma longibrachiatum*, cellulase, production, activité cellulasique.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de zoologie .Université Constantine 1. Algérie.

Membres du jury :

Président : Mme.I.Mihoubi. Professeur. Université Constantine 1. Algérie.

Encadreur : Mme. H.LEGHLIMI. Maître de Conférences B. Université Constantine 1. Algérie.

Examinatrice : Mme M Kassah Laouar. Maître Assistant A. Université Constantine 1. Algérie.