



**République Algérienne Démocratique et populaire**  
**Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Constantine 1**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**  
**Filière : Microbiologie**  
**Spécialité : Biotechnologie des mycètes**  
**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des mycètes**

**Intitulé**

**Activités cellulolytiques de *Trichoderma longibrachiatum* cultivée  
sur son de blé**

**Présenté par FERGANI Khadidja**

**LAKHEL Romayssa**

**Soutenue le : 17/05/2015**

**Devant le jury :**

**Président : Mme MIHOUBI Ithem.** Professeur. Université Constantine 1.

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

**Examineur: Melle ABDELAZUZ WIDED.** Maitre assistante A. Université Constantine 1.

**Année Universitaire 2014-2015**

## *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Ma tante Sabah...les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.*

*Mes frères Ahmed, Islem et mes petites sœurs Wissal, Dounia*

*Mes adorables copines :*

*Manwilla, Khadoujati, Norhien, Sara, Roukia, Amina, Wided*

*Mes camarades de promotion*

*Tous ceux qui sont proche de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom*

*A la mémoire de ma sœur Basma*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.*

*A tous ceux que j'aime*

*Romayssa*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail :*

*A la personne la plus chère à mon cœur à ma maman, qui a le droit de recevoir mes chaleureux remerciements pour tous les sacrifices qu'elle a consenti pour me permettre de suivre mes études dans les meilleures conditions possibles et n'avoir jamais cessé de m'encourager tout au long de mes années d'études en lui souhaitant une longue vie pleine de joie et de santé.*

*A toi papa rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être ; j'espère avoir répondu aux espoirs que tu as fondé en moi, que Dieu tout puissant te garde santé, bonheur et longue vie pour que tu demeureras le flambeau illuminant mon chemin.*

*A ma grand-mère qui a fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leurs vies et leurs études ; j'espère que sa bénédiction m'accompagnera toujours.*

*A mes frères ALLAA EDDINE et ABED EL HAMIDE et ma petite sœur RAWNK CHAIMA puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.*

*A mes oncles, tantes et toute ma famille.*

*A mes adorables copines : Radia, Hadjoura, Marwa, Manwila, pour leurs gentillesse, leur tendresse et leur grands cœur, merci les filles vous entiez toujours là pour me soutenir, m'aider et m'écouter.*

*À mon binôme on a passé des bons moments ensemble que Dieu garde notre amitié pour toujours.*

*A mes camarades de promotion.*

*A tous ceux qui sont proche de mon cœur de dont je n'ai pas cité le nom*

*Je fais une dédicace très spéciale à une personne très chère à mon cœur. Je me dois de considérer ma réussite comme une œuvre commune.*

*KHADIDJA*

## **Remerciement**

*Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude avant tous au bon Dieu qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail. Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Zoologie, faculté des sciences de la nature et de la vie. J'exprime ma reconnaissance a toute personne ayant contribué à sa réalisation.*

*Je me fais un immense plaisir d'adresser également mes remerciements à Mme MIHOUBI ILHEM Professeur à l'Université Constantine 1 pour le grand honneur de présider le jury.*

*En fin pour terminer cette liste nous adressons un remerciement particulier à tout qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Table des matières

**Abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction générale** ..... 01

### Synthèse bibliographique

#### Partie 1 : Cellulases et Champignons du genre *Trichoderma*

1. Définition de la cellulose.....	03
2. Etude de la cellulase.....	05
2.1. Nomenclature.....	05
2.2 Définition de la cellulase.....	05
2.3 Enzymes cellulolytiques.....	05
2.3.1. Les endoglucanases (EGs) ou 1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4).....	05
2.3.2. Les exoglucanases ou 1,4- $\beta$ -D-glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) ou cellobiohydrolases (CBHs).....	05
2.3.3. Les $\beta$ -glucosidases (BGs) ou cellobiases ou $\beta$ -D-glucoside glucohydrolases (EC 3.2.1.21 .....	06
2.4 Mécanisme de dégradation de la cellulose.....	06
2.5 Origines de la cellulase.....	07
2.5.1. <i>Origine animale</i> .....	07
2.5.2. <i>Origine végétale</i> .....	08
2.5.3. <i>Origine microbienne</i> .....	08
2.5.3. a. Les bactéries cellulolytiques.....	08
2.5.3. b. Les champignons cellulolytiques.....	08
2.6. Applications industrielles de la cellulase.....	09
2.6.1. Industries alimentaires.....	10
2.6.2. Industrie des textiles et des détergents.....	10
2.6.3. Papeterie.....	10
2.6.4. Nutrition animale.....	10
2.6.5. Domaine thérapeutique.....	11
2.6.6. Industrie du bioéthanol.....	11
3. Champignons du genre <i>Trichoderma</i> .....	11

3.1. Morphologie.....	11
3.2. Taxonomie.....	12
3.3. Ecologie.....	15

## **Partie 2 : Fermentation sur milieu solide et son de blé**

1. La fermentation en milieu solide.....	16
1.1. Définition.....	16
2.2. Diverses étapes suivies en fermentations solides.....	17
2.2.1. La préparation du substrat carboné.....	17
2.2.2. L'inoculation du milieu de culture.....	<b>18</b>
2.2.3. Optimisation de la température, de la teneur en eau, du pH et de l'aération de la culture.....	18
2.3. Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et de fermentation en milieu liquide ou submergé.....	20
2.4. Les facteurs environnementaux et les paramètres de culture.....	23
2.4.1. La température.....	23
2.4.2. L'humidité relative et l'activité de l'eau.....	23
2.4.3. L'aération.....	24
2.4.4. Le pH.....	24
2.4.5. La biomasse.....	24
2.5. Domaine d'application de FMS.....	25
2.6. Avantages et inconvénients du FMS.....	26
<b>3. Le son de blé.....</b>	<b>28</b>
3.1. Composition du son de blé.....	28
3.2. Utilisation du son de blé.....	31
3.3. Effet du son de blé sur la santé.....	32

## **Matériels et Méthodes**

1. Matériels biologique.....	33
1.1. Origine et entretien de la souche.....	33
1.2. Préparation de l'inoculum.....	34
1.2.1. Préparation de la suspension de spores.....	34
1.2.2. Dénombrement des spores.....	34
1.2.3. Conservation de la souche.....	34

2. Cinétique de production de la cellulase par la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i> .....	34
2.1. Milieu de production.....	34
2.2. Conduite de la fermentation solide.....	35
2.3. Etude de la stabilité thermique des activités cellulolytiques.....	37
3. Méthodes analytiques.....	37
3.1. Dosage des activités cellulolytiques.....	38
<b>Résultats et discussions</b>	
1. Composition biochimique du son de blé.....	39
2. Production de la cellulase.....	42
2.1. Cinétique de production de la cellulase par la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i> .....	42
2.2. Mesure de l'humidité à la fin de la fermentation .....	43
2.3. Etude de la stabilité à la température.....	45
<b>Conclusion et perspective</b> .....	47
<b>Références bibliographiques</b> .....	48
<b>Annexe</b> .....	51
<b>Résumés</b> .....	56

## Abréviations

**APF** : activité papier filtre.

**CMC** : Carboxyméthylcellulose.

**DNS** : Acide 3,5 dinitrosalicylique.

**T** : *Trichoderma*.

**FMS** : fermentation sur milieu solide.

**Aw** : activités en eau.

**EGs** : Endoglucanase.

**CBHs** : Cellobiohydrolases.

**BGs** :  $\beta$ -glucosidase.



## Liste des figures

<b>Figure 01 :</b> Structure de la cellulose. a/ Représentation de la chaîne de cellulose ; b/ Liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires au sein de la fibre de cellulose .....	4
<b>Figure 02 :</b> Aspect microscopique de <i>Trichoderma</i> .....	12
<b>Figure 03 :</b> Les 5 sections systématiques de <i>Trichoderma sp.</i> Et quelques-unes des espèces y appartenant. ....	14
<b>Figure 04 :</b> Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS.....	17
<b>Figure 05 :</b> Les différentes couches cellulaires constitutives du son de blé industrie.....	29
<b>Figure 06 :</b> la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i> après 21 jours d'incubation (a : mycélium, b : revers) et après 7 jours d'incubation (c : mycélium, d : revers) à 30°C sur milieu Sabouraud.....	33
<b>Figure 07 :</b> Courbe étalon de glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase .....	36
<b>Figure 08 :</b> Cinétique de production des activités cellulases par la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i> sur son de blé à 30°C. <b>a</b> : activité APF, <b>b</b> : activité endoglucanase.....	41
<b>Figure 09 :</b> La stabilité thermique des activités APF (a) et Endoglucanase (b) produites par <i>Trichoderma longibrachiatum</i> à deux températures : 60°C et 70°C.....	44

## Liste des tableaux

<b>Tableau n° 01 :</b> Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et milieu Submerge.....	21
<b>Tableau n° 02:</b> Principaux domaines d'applications de la fermentation en milieu solide.....	26
<b>Tableau n° 03:</b> Pourcentage des monosaccharides dans le son de blé.....	30
<b>Tableau n° 04 :</b> Composition en fibres des farines et des sons.....	30
<b>Tableau n° 05 :</b> Teneur en minéraux et en vitamines du son de blé .....	31
<b>Tableau n° 06 :</b> Composition biochimique du son de blé.....	39
<b>Tableau n° 07 :</b> Humidité mesurée après chaque prélèvement.....	43

# Introduction Générale

## Introduction Générale

---

La biotechnologie microbienne est une science en plein essor avec des applications diversifiées dans différents domaines, par la production de métabolites, en particulier les enzymes pour les industries.

Parmi les enzymes d'intérêt industriel, nous avons les cellulases où elles représentent environ 20 % du marché mondial des enzymes, et la plupart sont produites par les moisissures du genre *Trichoderma* (Miettinen-Oinonen, 2004; Wang *et al.*, 2004 ; Lekhchir, 2006) et *Aspergillus* (Miettinen-Oinonen, 2004; Lekhchir, 2006). Ces enzymes attirent une attention particulière grâce à leur grand potentiel biotechnologique, industriel (industries du textile, des détergents, du papier, les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et de l'alimentation animale) et le recyclage de la biomasse cellulosique (Korish, 2003; Moussa et Tharwat, 2007). A ce titre, la cellulase fut naturellement au centre des recherches pour la production de carburants de substitutions (méthane, alcools) et même pour étudier de nouvelles filières de production de molécules chimiques à partir de la cellulose, étant présentée comme une alternative à la pétrochimie dans la fabrication de nouveaux biopolymères, biosolvants et biodétergents (Roussos, 1987). La perspective de production d'alcool à partir de la cellulose est plus intéressante. Cependant, la rentabilité économique est étroitement liée à la production de cellulases et les technologies enzymatiques de la saccharification de la cellulose. En effet, la dégradation de la cellulose par les microorganismes cellulolytiques a fait l'objet de nombreux travaux, en ce qui concerne la sélection des microorganismes cellulolytiques, les mutations génétiques pour l'obtention de souches hyperproductrices et les conditions de culture des microorganismes impliqués. Par ailleurs, la bioindustrie exige l'emploi d'enzymes spécifiques et thermostables, non dénaturés à des températures supérieures ou égale à 70°C (Bhat, 2000; Peciulyte, 2007).

De plus en plus, les cellulase commerciales sont produites aussi bien par fermentation liquide que solide (Haltrich *et al.*, 1997). Mais, actuellement la fermentation solide présente un certain nombre d'avantages économiques et technologiques dont la faiblesse des couts et la simplicité des équipements (Durand, 2003).

Notre travail de recherche s'insère dans cette préoccupation et consiste à valoriser le son de blé provenant de l'unité de production de Hamma BOUZIANE. Constantine, par son

## Introduction Générale

---

utilisation comme substrat de fermentation en mode solide pour la production de la cellulase par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum*.

Dans ce cadre, les objectifs de notre étude sont :

- En premier objectif, une étude de la composition biochimique du son de blé, s'impose.
- L'étude des profils cinétiques de production des activités enzymatiques par la souche utilisée, dont le but est de déterminer le temps de culture pour une production maximale.
- Enfin, terminer ce travail par l'étude de la stabilité à la température, de l'extrait enzymatique brut, qui s'avère utile pour la mise en application industrielle ultérieure de cette enzyme.

# Synthèse Bibliographique

## Partie 1 : Cellulases et Champignons du genre *Trichoderma*

### 1. Définition de la cellulose

La cellulose est le plus important polysaccharide de la planète. Elle représente entre 20 et 50% de la matière sèche des parois cellulaires végétales (Gidenne, 2003 ; Percival *et al.*, 2006) et confère à la plante une grande résistance à la flexion et à la traction. D'un point de vue biochimique, la cellulose est un homopolysaccharide linéaire et insoluble, composé d'unités D-anhydroglucopyranose reliées entre elles par des liaisons osidiques de type  $\beta$ -1,4. Selon l'origine végétale, son degré de polymérisation varie de 100 à 10 000 unité, et peut atteindre 15 000 unités dans le cas du coton (Lopes, 2008 ; Chundawat *et al.*, 2011 ; Percival *et al.*, 2006). Les unités de base constituant ce polyccaharide sont alternativement inversées de 180° par rapport au plan de la molécule, faisant du cellobiose le plus petit motif de répétition de cette structure. Les chaînes de glucanes ou fibrilles élémentaires, composées de ce motif, sont regroupées pour former des microfibrilles de 3 à 5 nm de diamètre. Dont le nombre peut varier de 36 chaînes de glucanes à plus de 200 chaînes chez les algues. Ces chaînes sont reliées entre elles par des liaisons répétitives de type Van der Waals et de type hydrogènes, à la fois intermo léculaires, entre l'O3 et l'O5, et intramoléculaires (Chundawat, 2011 ; Cosgrove, 2005).

Les microfibrilles de cellulose sont composées de trois groupes de chaînes de glucanes différant selon leur degré d'organisation :

- des chaînes cristallines rigides avec un degré d'organisation important (6 chaînes).
- des chaînes sous-cristallines avec un degré d'organisation modéré (12 chaînes).
- des chaînes de surface sous-cristallines avec un faible degré d'organisation (18 chaînes).

Le cœur de cette structure est hydrophobe (interactions hydrophobes entre les feuillets de cellulose), rigide et hautement résistant à l'hydrolyse chimique et enzymatique, tandis que la surface est amorphe. Cette structure confère solidité, stabilité, rigidité, mais aussi élasticité à la fibre de cellulose. Enfin, la cellulose existe sous, deux formes thermodynamiques (type I ou II), différant selon l'orientation des chaînes de glucanes :

- La cellulose de type I représente la forme native et la plus répandue avec des chaînes de glucanes exclusivement parallèles. Elle se compose de deux formes : la forme I $\alpha$

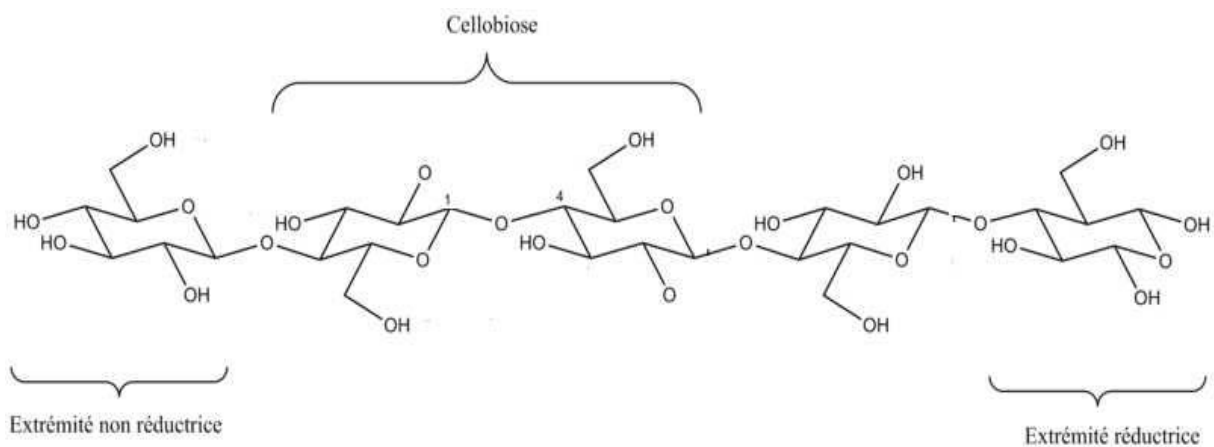
## Synthèses Bibliographique

composant majoritairement les algues et les bactéries, et la forme I $\beta$  composant majoritairement les plantes (Brown et Malcom, 1999).

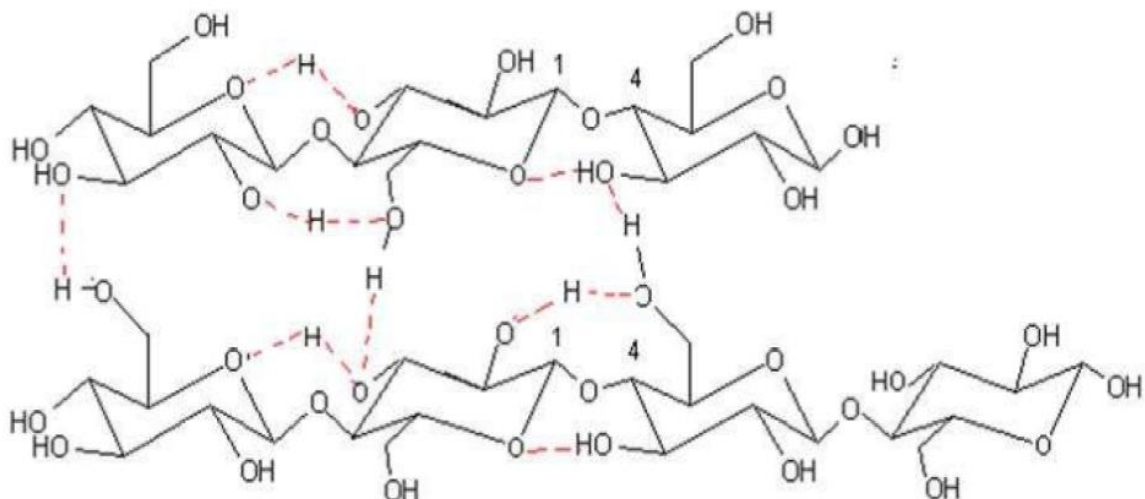
- La cellulose de type II : qui est une forme modifiée obtenue après traitement chimique (à la soude par exemple).

La cellulose étant la seule source de carbone renouvelable sur terre. Elle peut être la solution aux problèmes d'énergie, de chimie et d'alimentation (Romero *et al.*, 1999).

a /



b /



**Figure n°01 :** Structure de la cellulose. a/ Représentation de la chaîne de cellulose ; b/ Liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires au sein de la fibre de cellulose. (Stryer et al., 2003).



### 2. Etude de la cellulase

#### 2.1. Nomenclature

*Nom codifié de la Cellulase* Ec : 3.2.1.4

*Nom systématique* : 1,4 - (1,3 ; 1,4) - beta-D - Glucan4 –glucanohydrolase

*Nom recommandé* : cellulase

**-Synonymes** : Endoglucanase, Endo-1,4- $\beta$ -Glucanase, Cellulase carboxyméthylrique,  $\beta$ -1,4-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase, ect. (Schamburg 1991).

#### 2.2 Définition de la cellulase

Les cellulases des champignons filamenteux se présentent sous la forme de complexes enzymatiques sécrétés dans le milieu de culture. Ces enzymes sont des protéines modulaires constituées d'un module catalytique, permettant l'hydrolyse d'une liaison osidique, d'où l'appellation de glycosides hydrolases, et d'un module de liaison ou CBM (*Carbohydrate Binding Module*), permettant à la fois de localiser et de déstructurer le substrat, facilitant ainsi l'interaction enzyme-substrat. Ces deux modules sont reliés entre eux par un pont peptidique (Lopes, 2008 ; Ballerini, 2011 ; Saddler *et al.*, 2010).

#### 2.3. Enzymes cellulolytiques

Le système cellulolytique chez *Trichoderma* est repose principalement sur l'action complémentaire de trois types d'enzymes :

**2.3.1. Les endoglucanases (EGs) ou 1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4)** qui hydrolysent de manière aléatoire les parties amorphes de la cellulose, principalement les chaînes de surface des microfibrilles, générant des oligosaccharides de différentes tailles, ainsi que de nouvelles extrémités de chaînes. Ces enzymes n'agissent pas sur la cellulose cristalline et sont mises en évidence sur la carboxyméthylcellulose (CMC), forme de la cellulose. On les appelle également CMCases (Bayer *et al.*, 1998).

**2.3.2. Les exoglucanases ou 1,4- $\beta$ -D-glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) ou cellobiohydrolases (CBHs)**

qui agissent de manière processive et s'adsorbent sur la cellulose en hydrolysant à partir des extrémités réductrices (type I ou CBHI) ou à partir des extrémités non réductrices (type II ou

CBHII) pour libérer du cellobiose. Ce sont les seules enzymes agissant sur la cellulose cristalline.

### 2.3.3. Les $\beta$ -glucosidases (BGs) ou cellobiases ou $\beta$ -D-glucoside glucohydrolases (EC 3.2.1.21)

qui hydrolysent le cellobiose ou les cello-oligosaccharides (DP inférieur à 6) en glucose. Elles n'ont pas d'action sur la cellulose insoluble.(Ballerini, 2011 ; Saddler *et al.*,2010). Le complexe cellulolytique de *Trichoderma reesei* se compose de 80% de CBH (50- 60% de CBHI et 12-20% de CBHII par rapport aux cellulases totales), de 20% d'EG (5-10% de EGI et 1-10% de EGII) et de moins de 1% de  $\beta$ -glucosidase (puisque la plupart de ces enzymes sont intracellulaires) (Lopes, 2008).

## 2.4 Mécanisme de dégradation de la cellulose

Le mécanisme de dégradation de la cellulose ou cellulolyse, tout comme celui d'un polysaccharide pariétal, est un phénomène de catalyse enzymatique hétérogène et suit les étapes suivantes :

- Etape 1 : transfert de l'enzyme du milieu aqueux vers le polysaccharide insoluble et adsorption des enzymes (cellulases) sur le substrat à l'interface liquide-solide via le module de liaison grâce à des interactions non covalentes (hydrogène, électrostatique ou hydrophobe)
- Etape 2 : localisation d'une liaison susceptible d'être hydrolyser à la surface du substrat ;
- Etape 3 : formation du complexe enzyme-substrat (par insertion de l'extrémité de chaîne dans le tunnel catalytique pour initier l'hydrolyse) ;
- Etape 4 : hydrolyse de la liaison  $\beta$ -glycosidique et glissement simultanée vers l'avant de l'enzyme le long de la chaîne de cellulose ;
- Etape 5 : désorption des cellulases du substrat ou répétition de l'étape 4 ou des étapes 2/3 si ce n'est que le domaine catalytique se détache de la chaîne ;
- Etape 6 : transfert des produits de dégradation du polysaccharide vers le milieu aqueux et hydrolyse du cellobiose en glucose par la  $\beta$ -glucosidase (si cette enzyme est présente dans le cocktail enzymatique) (Bansal *et al.*, 2009 ; Beaugrand, 2004). L'attaque initiale de la cellulose est la plus lente et la réaction d'hydrolyse des différents produits

s'accélère. Au cours de cette hydrolyse, les produits d'inhibition (cellobiose, glucose) et les changements de propriété du substrat affectent les différentes étapes.

Lors de la cellulolyse, un certain nombre de synergies vont se produire entre :

- les exoglucanases et les endoglucanases ;
- les exoglucanases processives par l'extrémité réductrice et celles processives par l'extrémité non réductrice,
- les exoglucanases et les  $\beta$ -glucosidases qui hydrolysent le cellobiose, produit final inhibiteur des cellobiohydrolases,
- le module catalytique et le module de liaison composant les cellulases (endoglucanases et exoglucanases) pour produire des oligosaccharides et/ou du Cellobiose (Ballerini, 2011 ;Schulein, 1985).

### 2.5 Origines de la cellulase

Les cellulases sont largement répandues dans la nature (Xu *et al.*, 2000). Elles sont recensées chez des organismes très divers : bactéries, champignons, plantes, protozoaires, vers, mollusques, insectes etc...(Odier et Rouau, 1985). De ce fait, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale ou microbienne.

#### 2.5.1. 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 (Smant *et al.*, 1998). Ainsi, peu de cellulases endogènes ont été décrites chez des organismes supérieurs (Xu *et al.*, 2000). Des cellulases ont été isolées à partir du suc digestif d'escargot comestible *Helix pomatia* (Rebeyrotte *et al.*, 1976 ; Kubicek., 1981), de la glande digestive d'une moule verte *Perna viridis* (Marchall.,1973), de la moule bleue *Mytilus edulis* (Xu *et al.*, 2000) et du mollusque marin *Littorina brevicula* (Purchon, 1977 ; Kiesov, 1982). De plus, l'amibe *Dictyostelium discoideum* produit une cellulase extra -cellulaire pendant la germination de ses spores (Blume et Ennis., 1991). Des cellulases ont également été identifiées dans les glandes de l'oesophage de kyste des nématodes *Globodera restochiensis* et *Heterdora glycines*, parasites obligatoires des plantes (Smant *et al.*, 1998).

### 2.5.2. Origine végétale

Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes (Cordonnier *et al.*, 1986). Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces (Riccio *et al.*, 1999), de l'avocat *Persea americana* (Blume et Ennis, 1991), des céréales tels que l'orge (Dan *et al.*, 2000) et le riz de la variété *Oryza sativa* (Xu *et al.*, 2000).

Les préparations cellulasiques d'origine végétale sont dépourvues d'exo- $\beta$ -glucanases (Mandels *et al.*, 1976). Néanmoins, la fabrication d'enzyme végétale est soumise aux contraintes d'approvisionnement de la matière première (caractère saisonnier des récoltes, spéculations dues aux incertitudes économiques et politiques des pays producteurs) (Joyeau, 1982).

### 2.5.3. Origine microbienne

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 (Béguin *et al.*, 1992 ;1994).

#### a. Les bactéries cellulolytiques

De nombreuses bactéries sont capables de se développer sur un substrat cellulosique dans la nature ou en symbiose avec certains animaux vertébrés (ruminants) ou invertébrés (termites et certains mollusques) (Vidaud, 1984). Le système cellulolytique des bactéries est plus simple que celui des champignons ; il se compose uniquement des activités endo-glucanase et  $\beta$ -glucosidase (Bekhouche *et al.*, 1991). Parmi les bactéries cellulolytiques, certaines sont aérobies (*Sporocytophaga*, *Myxococcoides*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas* et *Pseudomonas*, d'autres sont anaérobies strictes (*Clostridium thermocellum*, *Clostridium stercorarium*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefasciens* et *Bactéroides succinogenes*) (Vidaud, 1984) ou encore des anaérobies facultatives (*Erwinia chrysantharum*) qui possèdent un seul complexe multienzymatique extracellulaire appelé cellulosome (Schwarz, 2001). Cette dernière et le *Clostridium sp* ont été étudiés du fait de leur potentialité à transformer la cellulose en éthanol (Nevalainen et Palva, 1978). Les meilleurs résultats ont été obtenus en associant deux bactéries : *Cellulomonas flavefasciens* et *Xanthomonas*, *Cellulomonas* et *Arthrobacter*, *Cellulomonas* et *Bacillus subtilis*. (Bekhouche *et al.*, 1991).

De plus, les cellulases ont été identifiées chez des actinomycètes tels que *Thermomonospora fusca* (Tuncer *et al.*, 1999), *Streptomyces reticuli* (Schlochtermeyer *et al.*, 1992), quelques archaebactéries *Pyrococcus orikoshii* (Ando *et al.*, 2002) et *Thermotoga neapolitana* (Bok *et al.*, 1998) qui constituent une source importante de cellulases thermostables.

### **b. Les champignons cellulolytiques**

Les mycètes sont des agents bien connus pour la décomposition de la matière organique, en général, et des substrats cellulotiques, en particulier (Carlile *et al.*, 1997). De nombreux champignons sont cellulolytiques. Ils produisent des endoglucanases, des exoglucanases et des  $\beta$ -glucosidases (Bèguin, 1990). *Trichoderma reesei* est le champignon le plus étudié. Il produit au moins 2 exoglucanases (Shomaker *et al.*, 1983 ; Chen *et al.*, 1987), 5 endoglucanases (Pentilla *et al.*, 1987) et 2  $\beta$ -glucosidases (Barnett *et al.*, 1991 ; Takashima *et al.*, 1999). Chez les levures, les genres pouvant présenter une activité cellulosique, sont beaucoup plus rares, néanmoins on peut citer le genre *Trichosporon* (Scriban, 1999), *Candida wickerhamii* dont l'activité cellulosique est uniquement de type  $\beta$ -glucosidase (Gunata *et al.*, 1990), ainsi que *Khryveromyces lactis* avec deux endoglucanases Egl A et Egl B (Hasper *et al.*, 2002). Tous ces microorganismes sont capables de dégrader la cellulose native (Williams et Orpin, 1987 ; Hebraud, 1988). Chez des champignons aérobies stricts, il a été mis en évidence (*Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* et *Piromonas communis*) un équipement enzymatique très complet leur permettant d'hydrolyser les polysaccharides des parois cellulaires végétales. D'autres espèces anaérobies telles que les *Chytridomycètes* sont connues pour leur capacité à dégrader la cellulose dans les appareils gastro-intestinaux des ruminants (Carlile *et al.*, 1997).

### **2.6. Applications industrielles de la cellulase**

L'intérêt que porte la biotechnologie à la cellulase s'explique par ces vastes applications. En effet, son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui une fois fermenté permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques notamment des acides gras volatiles d'où l'importance, écologique et industrielle, considérable des cellulases (Receveur *et al.*, 2002) ce qui revoie à différentes applications industrielles.

### **2.6.1. Industries alimentaires**

Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993). Des traitements de différents produits pour améliorer leurs qualités, où les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes, le plus souvent en association avec les pectinases (Odier et Rouau, 1985) pour la digestion qui précède les extractions (protéines de soja, amidon de pomme de terre ou de maïs, jus de fruits, huiles végétales etc...) (Odier et Rouau, 1985). Elle améliore l'arôme des jus de fruits et du vin (Riccio *et al.*, 1999).

### **2.6.1. 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 ; Cavako-Paulo, 1998) des fibres et dans la préparation de « stone washed jeans » (Scriban, 1993 ; Gusakov *et al.*, 2000 ; Ando *et al.*, 2002).

### **2.6.2. Papeterie**

Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en 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 (Scriban, 1993). Elles contribuent également à l'amélioration de la qualité du papier (Odier et Rouau, 1985).

### **2.6.3. Nutrition animale**

C'est un autre marché qui pourrait s'ouvrir pour 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 excréments) (Scriban, 1993 ; Gusakov *et al.*, 2000) et améliore la valeur nutritive de l'aliment (Kolarova et Farkas, 1981 ; Odier et Rouau, 1985).

### 2.6.5. *Domaine thérapeutique*

Certaines cellulases sont utilisées dans des formules médicamenteuses comme aides digestives (Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1993). Ainsi, des cellulases de *Trichoderma viridae* sont utilisées en association avec des  $\alpha$ -amylases fongiques, pour éviter les dysepsies et fermentations intestinales (Rivière, 1975).

### 2.6.6. *Industrie du bioéthanol*

Le bioéthanol et l'éthanol élaboré à partir de la biomasse végétal, on rendement énergétique et voisin de celui de l'essence, il est obtenu à partir de substrats fermentescible (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 agricole : la paille ou les cannes de maïs, résidus forestiers) (Pimentel et Patzek, 2005) .

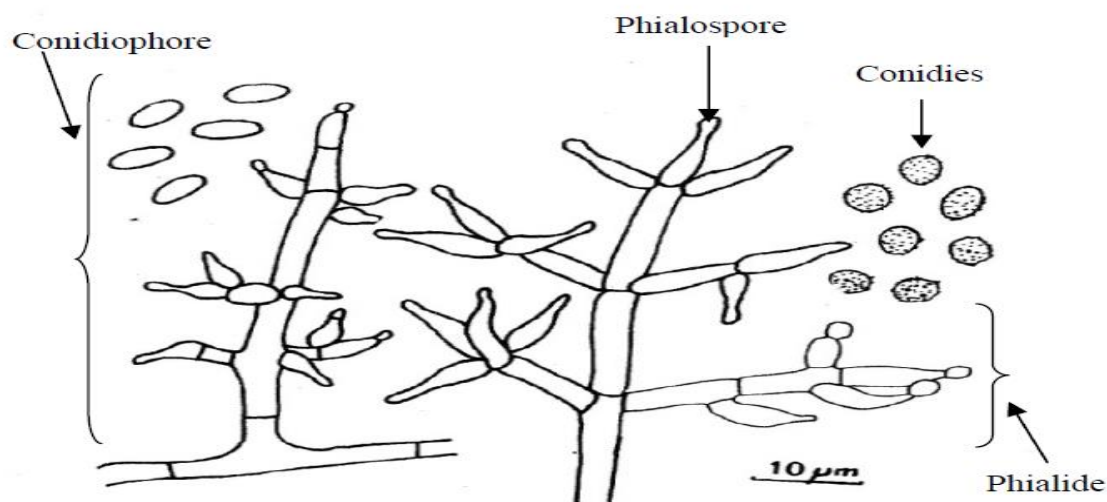
## 3. Champignons du genre *Trichoderma*

Le terme « *Trichoderma* » a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon (Roussos, 1985 ; Bissett, 1991). Il désigne des champignons microscopiques considérés durant 200 ans comme étant des « Gastéromycètes ». Ces organismes cosmopolites appartient à un grand ensemble de champignons sans reproduction sexuées connue (Roquebert, 1996).

### 3.1. Morphologie

La majorité des espèces de *Trichoderma* sont morphologiquement très semblables et difficiles à distinguer. L'aspect macroscopique des *Trichoderma* sp est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogenèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> jour un feutrage épais se superpose à la culture. Au microscope optique on peut observer un

mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Kubicek et al., 2003).



**Figure n° 02** : Aspect microscopique de *Trichoderma* (Botton *et al.*, 1990).

### 3.2. Taxonomie

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 la systématique. On se base alors sur les aspects cultureux et la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert, 1996).

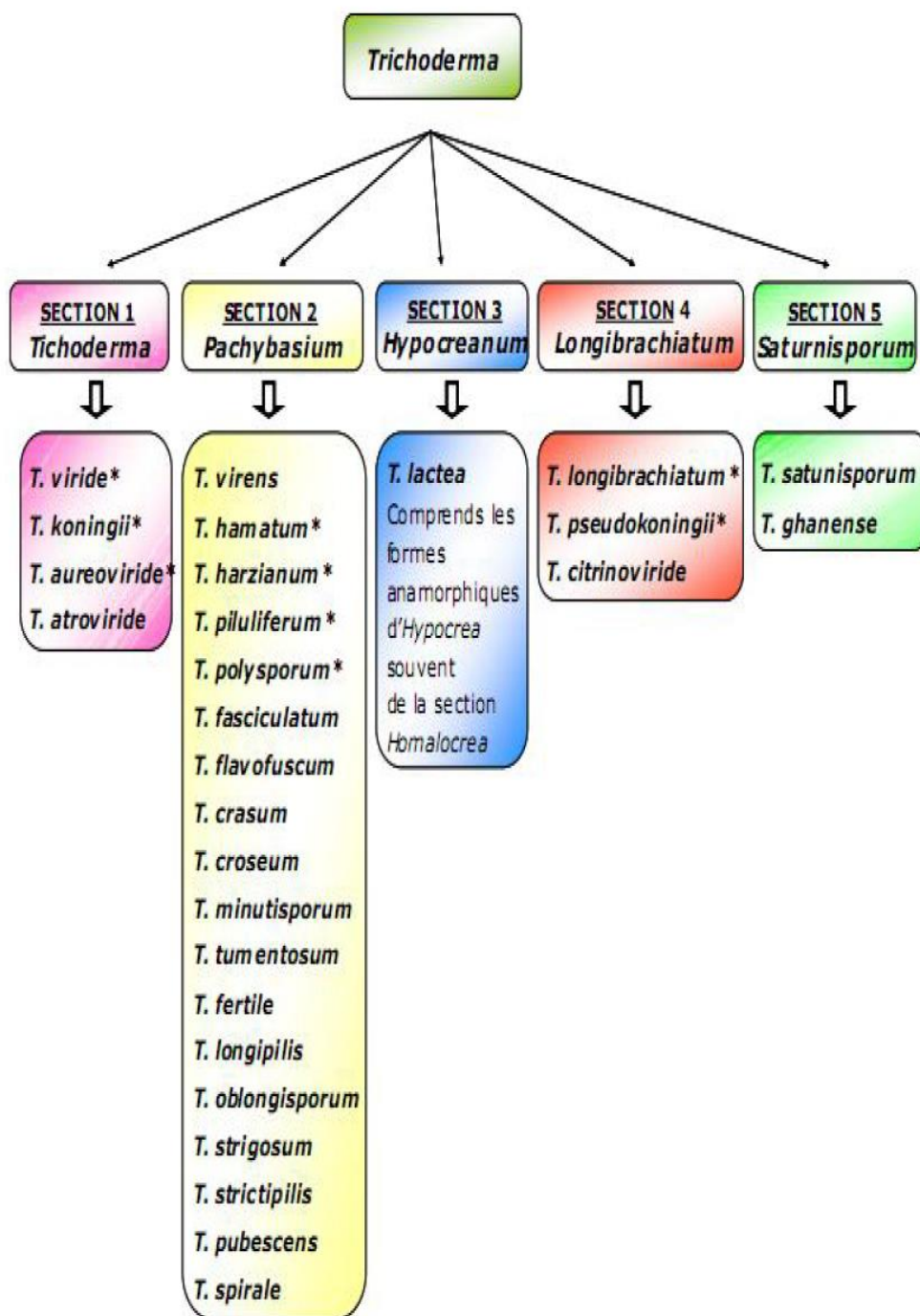
La taxonomie moderne des champignons a aboli l'embranchement des Deuteromycotina, auquel appartenait le genre *Trichoderma*. La position taxonomique actuelle des *Trichoderma* sp se présente comme suit (selon Bissett, 2004) :



## Synthèses Bibliographique

---

**Embranchement :** Amastigomycota et/ou Eumycètes  
**Sous embranchement :** Ascomycotina  
**Classe :** Sordariomycètes  
**Ordre :** Hypocréales  
**Famille :** Hypocracea  
**Genre :** Hypocrea mitosporique \*\* (*Trichoderma*).



**Figure n°03 :** Les 5 sections systématiques de *Trichoderma sp.* Et quelques-unes des espèces y appartenant, selon Bisset (1991 a et b). Les espèces agrégées de Rifai (1969).

### 3.3. Ecologie

Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998).

Les *Trichoderma* spp. sont des champignons cosmopolites, caractérisés par leur croissance rapide, leur capacité d'utiliser divers substrats et leur résistance à des agents chimiques nocifs (Klein et Eveleigh, 1998). Ils constituent les éléments prédominants de la mycoflore des sols de divers écosystèmes (forêts, champs agricoles, prairies, marécages, déserts, lacs salés ..... ) (Klein et Eveleigh, 1998). Le genre *Trichoderma* renferme des espèces les plus utilisées en tant qu'agents de lutte biologique contre les phytopathogènes et comme source d'enzymes et de métabolites secondaires d'intérêts biotechnologique ( Penttilä et al., 1998 ).

L'abondance des *Trichoderma* sp. Dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (Kubicek et al., 2003).

### Partie 2 : Fermentation sur milieu solide et son de blé

#### 1. La fermentation en milieu solide

##### 1.1 Définition

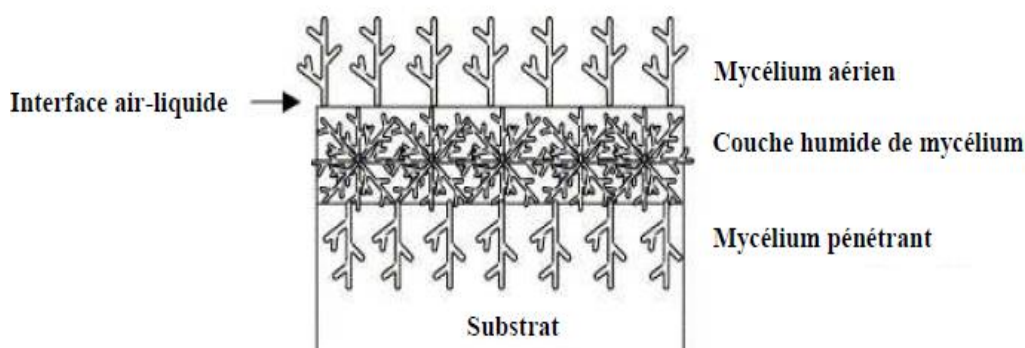
La fermentation solide (fermentation de substrats solides, fermentation humide, culture solide, etc. et en anglais : *solid-state fermentation* ou SSF) est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (Durand, 2003 ; Gervais *et al.*, 2003 ; Rahardjo *et al.*, 2006).

Elle diffère de la fermentation en milieu liquide, où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau, et de la fermentation en milieu submergé où le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide (Dandey, 2003 ; Duchinon, 2011). La principale différence entre ces procédés réside dans la variation des proportions (de l'équilibre) des phases solide, liquide et gazeuse.

La FMS est donc constituée de trois phases : une matrice (phase) solide, une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. La capacité de rétention en eau des supports solides est variable et peut aller de 12 à 90%, soit une activité de l'eau ( $A_w$ ) comprise entre 0,65 et 0,98 (Thonart, Philippe, 2009). Ils doivent posséder une humidité relative, ou plutôt une activité de l'eau, suffisante pour permettre la croissance et l'expression du métabolisme des souches (Pandey, 2003). Les champignons filamenteux sont particulièrement bien adaptés à ces cultures du fait de leur résistance à une faible  $A_w$  et à une pression osmotique élevée.

Le développement des champignons filamenteux en FMS se fait par extension et ramification des filaments formant le mycélium. Après l'inoculation d'un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. A partir de ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules (de la matrice solide) ou dans les espaces inter particulaires (par croissance) à la recherche de composés nutritifs, notamment

dans les pores remplis de liquide. A des taux normaux d'humidité, les espaces entre les filaments aériens sont remplis de gaz (aérobie), tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d'eau (anaérobie). Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Pour finir, les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon.



**Figure n°04** : Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS (Yovita *et al.*, 2006).

### 2.2. Diverses étapes suivies en fermentations solides

Les différentes étapes suivies au cours d'une fermentation solide sont : la préparation du substrat ou du milieu de culture, la stérilisation facultative du milieu (généralement à 121 °C pendant 21 minutes) suivie par le refroidissement de celui-ci, l'inoculation du milieu de culture, l'incubation du milieu inoculé en maintenant dans la mesure du possible les conditions environnementales optimales (température, pH, teneur en eau).

#### 2.2.1. La préparation du substrat carboné

Les substrats carbonés utilisés en fermentation solide proviennent essentiellement des résidus agricoles et agroalimentaires. Ce sont les substrats lignocellulosiques (sous forme de

paille, de son, de bagasse, de pulpe, etc.), les féculents (résidus de banane, de soja, les graines, etc.), les supports synthétiques (mousse de polyuréthane, résine polymérique, etc.), etc. La préparation du substrat carboné vise à lui faire subir divers traitements physique, chimique ou biologique (enzymes) afin de favoriser une grande accessibilité des constituants aux microorganismes. Le traitement physique peut se faire soit mécaniquement (broyage, concassage, hachage, aplatissage), soit thermiquement (chauffage, autoclavage, traitement à la vapeur), soit par irradiation. Le traitement chimique se fait par la voie des alcalis, acides, oxydants, gaz et solvants.

### **2.2.2. L'inoculation du milieu de culture**

L'inoculation du milieu de culture se fait le plus souvent à partir d'une suspension de spores (Mathot, 1996). Celles-ci restent viables plus longtemps que du mycélium, sont moins sensibles aux conditions externes et se conservent plus facilement. La quantité optimale de spores à inoculer diffère selon les cas. Un excès de spores peut parfois inhiber la germination. Les spores sont cependant métaboliquement dormantes, impliquant que la dégradation du substrat ne peut s'installer qu'après la germination. Pour minimiser cet inconvénient, une pré-germination des spores est parfois envisagée. Des inoculum (spores + mycélium + substrat) de production peuvent être utilisés également.

### **2.2.3. Optimisation de la température, de la teneur en eau, du pH et de l'aération de la culture**

À l'échelle industrielle, les contrôles de la température de culture et de l'humidité du milieu sont très importants pour le *scaling up* (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). La faible conductibilité thermique des substrats utilisés et leur faible teneur en eau réduisent le transfert de chaleur, qui lui-même dépend de la taille des particules de la couche solide. Une élévation de la température dans la masse fermentable due à un dégagement de chaleur métabolique peut aller jusqu'à atteindre 80° C, causant un assèchement de la culture et une baisse de l'*aw* et de la disponibilité en nutriments. La mesure de la température se fait souvent dans la couche solide et dans la phase gazeuse entrant et sortant du réacteur grâce à des thermosenseurs, ou des sondes métaboliques Pt. La température de la culture à l'échelle industrielle est généralement régulée par l'injection d'air forcé, l'agitation du réacteur ou par le phénomène d'évaporation. Au laboratoire, la température du milieu de culture est

généralement régulée par un bain d'eau thermostatisée ou par une simple régulation de la température de la pièce où se trouve le bioréacteur (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

L'eau est impliquée dans la croissance cellulaire et les réactions métaboliques, les activités enzymatiques, les transports des éléments nutritifs, des métabolites extracellulaires et des gaz au cours de la fermentation solide (Bellon-Maurel *et al.*, 2003 ; Gervais *et al.*, 2003). Les variations de la teneur en eau sont dues à l'évaporation causée par la chaleur métabolique, à l'hydrolyse du substrat et aux productions d'eau métabolique. La teneur en eau est habituellement déterminée par les mesures de la matière sèche, laquelle, cependant, ne différencie pas l'eau disponible pour les activités microbiennes (c'est-à-dire l'activité d'eau  $a_w$ ) de l'eau liée au substrat indisponible aux microorganismes. À l'échelle du laboratoire, l'activité d'eau est contrôlée en plaçant le bioréacteur dans une chambre de culture dont l'humidité de l'atmosphère est régulée par des solutions salines saturées. À grande échelle, le bioréacteur est généralement aéré avec de l'air saturé en eau.

Des variations de valeur du pH résultent d'une consommation en substrat (exemple de l'hydrolyse des protéines) et/ou des synthèses métaboliques (exemple des acides organiques). Les variations de pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

En fermentation solide, il n'existe pas d'électrode pouvant enregistrer le pH des milieux solides à cause de l'absence d'eau libre. Certains auteurs utilisent des électrodes potentiométriques ou une électrode à pH standard, après suspension de l'échantillon dans de l'eau distillée. Il est ainsi difficile de contrôler le pH efficacement en fermentation solide. Lorsque cela est nécessaire, la méthode standard est de tamponner le milieu de culture avec un mélange adéquat de composés azotés (urée, sels ammoniacaux), des sels de  $Ca^{2+}$  ou des solutions alcalines. Pendant la fermentation, le pH peut être régulé par l'addition d'acides ou de bases à l'eau de refroidissement de la masse fermentable.

L'aération des cultures solides joue quatre fonctions, à savoir le maintien des conditions d'aérobies, l'élimination du dioxyde de carbone, la régulation de la température de culture et la régulation de la teneur en eau (Raimbault, 1998). En fermentation liquide, l'aération est souvent le facteur limitant de la croissance microbienne à cause de la faible solubilité de l'oxygène dans l'eau. L'aération en fermentation solide est plus facile qu'en fermentation liquide à cause d'une part, de la diffusion rapide de l'oxygène dans le film humide entourant les particules de substrat, et d'autre part à cause aussi des grandes surfaces de contact entre la phase gazeuse, le substrat et les mycéliens aériens. Généralement,

l'oxygène ne constitue pas un facteur limitant en fermentation solide lorsque le substrat est particulaire.

### **2.3. Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et de fermentation en milieu liquide ou submergé**

Un tableau comparatif (tableau n°01) présentant les forces et les faiblesses de chaque Technologie est présentée à la page suivante.



## Synthèses Bibliographique

**Tableau n°01** : Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et milieu submergé (Thonart, 2009; Manpreet, 2005; Raimbult, 2005 ; Krishna, 2005).

Paramètres	Fermentation en milieu solide	Fermentation en milieu liquide ou submergé
<b>Température</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Contrôle compliqué (transfert de chaleur limité par le support, l'air et l'absence d'eau libre).</li> <li>- Risque de formation de gradients dans le milieu.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contrôle aisé.</li> <li>- Température homogène.</li> </ul>
<b>PH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contrôle compliqué.</li> <li>- Régulation partielle possible (ajout de solutions acides ou basiques, utilisation de systèmes tampon : solutions, supports au pouvoir tampon).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contrôle aisé.</li> <li>- Régulation par l'ajout de solutions acides ou basiques.</li> </ul>
<b>Aération</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Passive (de surface) ou active (forcée).</li> <li>- Pas ou peu de contrainte d'aération (oxygénation).</li> <li>- Circulation de l'air aisé et aération (transfert d'oxygène) élevée.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessaire et compliquée.</li> <li>- Contrainte d'aération (oxygénation) élevée, liée à la solubilité/au transfert de l'oxygène (fonction de la température) et à la rhéologie des milieux (viscosité).</li> </ul>
<b>Agitation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absente, discontinue ou continue.</li> <li>- Contrainte de cisaillement limitée.</li> <li>- Peut limiter l'hétérogénéité du milieu.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessaire (homogénéisation du milieu + aération pour les cultures aérobies).</li> <li>- Contrainte de cisaillement importante (limitation des souches cultivables).</li> <li>- Problème lié à la rhéologie des milieux (nature du substrat + culture de moisissures).</li> </ul>
<b>Capteurs et contrôle du procédé/de la culture</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contrôle et régulation compliqués des paramètres environnementaux (T°, pH, humidité, biomasse, conditions nutritives,...).</li> <li>- Absence de capteurs <i>on line</i> pour le contrôle des paramètres environnementaux (pH, humidité, concentration en nutriments).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Contrôle et régulation aisés des paramètres environnementaux.</li> <li>- Capteurs <i>on line</i> disponibles.</li> </ul>
<b>Scale-up</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Besoin d'ingénierie et de conception de fermenteurs au niveau de l'échelle industrielle due à une faible standardisation, à l'hétérogénéité du système (gradients de T°, pH,...), à une reproductibilité limitée (nécessité de robustesse), et à des problèmes de compaction.</li> <li>- Problème d'extrapolation (en Occident surtout réacteur de 20 T disponible au Japon).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Equipements industriels disponibles.</li> </ul>

## Synthèses Bibliographique

<b>Micro organismes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Favorable aux organismes pluricellulaires et/ou aux organismes adaptés à une faible Aw et une forte pression osmotique (champignons filamenteux, supérieurs).</li> <li>- Favorable aux souches sauvages.</li> <li>- Culture pure et possibilité de cultures mixtes avec synergie des métabolismes.</li> <li>- Culture hétérogène.</li> <li>- Inoculation en conidies ou en mycélium.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Favorable aux organismes unicellulaires (bactéries, levures).</li> <li>- Favorable aux souches mutées ou modifiées génétiquement.</li> <li>- Cultures pures, peu favorable aux cultures mixtes.</li> <li>- Culture homogène.</li> <li>- Inoculation en cellules ou en volume de culture.</li> </ul>
<b>Milieu de culture</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hétérogène.</li> <li>- Matière première abondante et bon marché.</li> <li>- Polymères solides insolubles.</li> <li>- Prétraitement limité ou inexistant (déchets agricoles).</li> <li>- Quantité de substrat importante (concentration élevée, mais problème de diffusion des nutriments ; risque d'une concentration élevée en inhibiteurs).</li> <li>- Quantité d'eau limitante.</li> <li>- Quantité d'air non limitant.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Homogène (souche, nutriments, métabolites)</li> <li>- Matière première coûteuse.</li> <li>- Soluble ou sous forme de fines particules en suspension.</li> <li>- Prétraitement parfois nécessaire.</li> <li>- Quantité de substrat limitée (faible concentration).</li> <li>- Quantité d'eau non limitante.</li> <li>- Quantité d'air limitante.</li> </ul>
<b>Répression catabolique ou dégradation par des protéases</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible ou inexistante.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Elevée.</li> </ul>
<b>Antimousse</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas nécessaire.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessaire.</li> </ul>
<b>Type de culture</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cultures principalement en <i>batch</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Cultures en <i>batch</i> en <i>fed-batch</i> ou en continues.</li> </ul>
<b>Produits</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Productivité élevée (rendement similaire ou supérieur et/ou temps de culture plus court que pour la FML).</li> <li>- Performances accrues : stabilité plus élevée (T°, pH même extrême), optimum plus large (T, pH), résistance à l'inhibition, affinité pour le substrat</li> <li>- Expression de molécules inédites (profil protéique riche).</li> <li>- Produit fermenté concentré si utilisation directe et donc pas de nécessité de concentration.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Produit (très) dilué.</li> </ul>

### 2.4. Les facteurs environnementaux et les paramètres de culture

#### 2.4.1. La température

La température est l'un des facteurs les plus difficiles à réguler en fermentation en milieu solide. La faible conductivité thermique de l'air (en comparaison de celle de l'eau), des supports et l'absence d'eau libre limite le transfert de chaleur et son élimination favorisant ainsi une élévation de la température pouvant aller jusqu'à 20°C au dessus de la température d'incubation (Pandey, 2003). Cette élévation de la température dépend du type de microorganisme, de la porosité, de la taille des particules et de la profondeur du support.

#### 2.4.2. L'humidité relative et l'activité de l'eau

En FMS, l'eau est présent sous deux formes : sous la forme d'eau complexée à l'intérieur de la matrice solide, et sous la forme d'une couche mince qui peut être absorbée à la surface des particules ou contenue dans les régions capillaires (Raimbault Maurice, 1998). La teneur en eau nécessaire pour les cultures est avant tout dépendante des souches utilisées, mais sa limite basse serait fixée à 12%, duquel les activités métaboliques cessent, et sa limite haute dépendrait principalement du support et de sa capacité de rétention (mais elle serait de 90% pour les substrats lignocellulosiques) (Thonart, Philippe. 2009, Edward Arnold, 1983).

Le contenu en eau, ou plutôt la quantité d'eau disponible, est vraiment très important puisqu'une faible humidité limiterait l'hydrolyse du substrat, la solubilisation et la diffusion des nutriments et/ou l'accumulation de composés inhibiteurs dans les particules solides, tandis qu'une forte humidité réduirait la porosité (espace inter particulaire), le volume des gaz et les échanges gazeux, tout en favorisant la contamination bactérienne (Duchiron, 2011). Le maintien d'une teneur en eau optimale est par conséquent essentiel. Cependant, des variations dues au développement du champignon (phénomène de respiration qui produit de l'eau), à l'aération, à l'hydrolyse du substrat et à la production de chaleur métabolique (augmentation de la température) peuvent provoquer un assèchement du milieu.

### 2.4.3. L'aération

L'aération est un facteur important (essentiel) en fermentation en milieu solide puisqu'elle va permettre : l'oxygénation (surtout pour les organismes aérobies comme les champignons filamenteux), la dissipation de la chaleur métabolique (régulation de la température du milieu) et l'élimination des produits du métabolisme (CO<sub>2</sub>, vapeur d'eau, composés volatils) (Duchiron, 2003 ; RAIMBAULT, Maurice, 1998). Le choix d'un support poreux et la calibration de la taille des particules par broyage (de 1 mm à 1 cm) permettra d'optimiser l'aération du milieu de culture en facilitant la circulation de l'air (Manpreet *et al.*, 2005). Il faut cependant noter qu'un changement dans la porosité du support (pour les supports organiques) se produit lors de la dégradation du substrat avec le risque d'un tassement ou d'une compaction des particules, provoquant la formation de chemins préférentiels et une réduction de l'apport d'oxygène.

### 2.4.4. Le pH

Le pH est très difficile à homogénéiser et à contrôler en FMS. En effet, au cours de la culture, l'activité métabolique des souches va modifier le pH du milieu soit en l'acidifiant, par la production d'acides ou par l'absorption d'ions ammonium, soit en l'alcalinisant, par la libération d'ammoniac provenant de la dégradation de protéines, d'urée ou d'autres amines (PANKAJ, 2005). Une régulation partielle de ce facteur au cours de la fermentation peut cependant être réalisée par l'ajout d'acide ou de base à l'eau utilisée pour ajuster le taux d'humidité du milieu. Un autre système de régulation (passif) consiste à utiliser des systèmes tampon, comme l'emploi de résidus agro-industriels présentant naturellement un excellent pouvoir tampon ou l'utilisation d'un mélange de sels d'ammonium et d'urée (RAIMBAULT, 1998 ; SANDHYA *et al.*, 2005).

### 2.4.5. La biomasse

L'estimation de la biomasse pour le suivi des cinétiques de croissance est délicate car les microorganismes sont (presque) inséparables du support. Il existe cependant :

- des méthodes d'estimation directes : Elles sont très difficiles et consistent en une séparation de la biomasse (uniquement pour les organismes unicellulaires) ou en une

suppression de la matrice solide (organique) ;

- des méthodes d'estimations indirectes : Elles se font soit par le dosage de composés spécifiques de la biomasse (protéines, acides nucléiques, glucosamine, ergostérol), soit par le suivi de l'activité métabolique de la biomasse (respirométrie : oxygène consommé ou CO<sub>2</sub> produit, production d'ATP, d'enzymes extracellulaires).

### 2.5. Domaine d'application de FMS

De manière générale, les applications de la fermentation solide concernent 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.).

Cependant, la fermentation en milieu solide s'est également progressivement développée à d'autres domaines d'applications. De plus, il faut rappeler que la première production industrielle d'enzymes a été réalisée par Jokichi Takamine à l'aide de la fermentation en milieu solide (sur du son de blé et avec la souche *Aspergillus oryzae*).

## Synthèses Bibliographique

**Tableau n°02 :** Principaux domaines d'applications de la fermentation en milieu solide (Manpreet, 2005 ; Durand, 1998).

Domaine d'application	Produits	Microorganismes
<b>Alimentaire</b>	-Champignons supérieurs	- <i>Agaricus bisporus</i> (Champignon de Paris) - <i>Lentinus edodes</i> (Shiitaké) - <i>Pleurotus ostreatus</i> (Pleurotes)
	-Fromages à pâte persillées, fromages à croûte fleurie (camembert, brie,...)	- <i>Penicillium roquefortii</i> - <i>Penicillium camembertii</i> - <i>Penicillium caseicolum</i>
	-Pain	- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Acides organiques</b>	-Acide citrique -Acide lactique	- <i>Aspergillus niger</i> - <i>Rhizopus oryzae</i>
<b>Enzymes</b>	-Amylases, glucoamylases -Cellelases, xylanases, Pectinases, -Protéases	- <i>Aspergillus spp.</i> - <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i> - <i>Aspergillus spp.</i> - <i>Rhizopus oligosporus.</i>
<b>Enrichissement nutritif (protéines) des aliments pour animaux</b>	-Canne à sucre, manioc, pulpe de betterave,.....	- <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Trichoderma spp</i>
<b>Métabolites secondaires</b>	-Aromes	- <i>Penicillium spp.</i> , <i>Trichoderma spp.</i>
	-Antibiotiques (pénicilline)	- <i>Penicillium notatum</i>
	-Hormones végétales (acides gibbérellique)	- <i>Gibberella fujikuroi</i>
	-Alcaloïdes (ergot)	- <i>Claviceps purpurea</i>
<b>Lutte biologique (biocontrôle/biopesticide)</b>	-Biofongicides, Bioinsecticides,....	- <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Coniothyrium minitans.</i>

### 2.6. Avantages et inconvénients du FMS

La fermentation est associée à l'origine à la respiration anaérobie. De nos jours, par abus de langage, dans le monde industriel, elle désigne l'opération unitaire qui va permettre de

produire de la biomasse cellulaire et d'effectuer des réactions de bioconversion anaérobie ou aérobie (Vincent P, 2013).

Les enzymes industrielles sont obtenues par fermentation en milieu solide ou par fermentation submergée (SmF) ou en milieu liquide (FML).

La fermentation submergée (biomasse immergée dans un milieu liquide) est plus adaptée pour le développement bactérien et est très largement utilisée. Cependant son application aux micro-organismes fongiques possède des inconvénients non négligeables. En effet, leur développement sous forme micellaire altère les transferts de matière et thermique au sein des fermenteurs. Elle augmente la viscosité. Les systèmes d'agitation mis en place affectent le développement de ces micro-organismes.

La fermentation en milieu solide apparaît comme la technique la plus adaptée pour les microorganismes fongiques. Elle est décrite comme un procédé microbiologique se déroulant sur une surface de matière solide pouvant absorber ou contenir de l'eau, avec ou sans éléments nutritifs solubles. Le milieu solide constitue à la fois le milieu de fermentation et le substrat.

Ce procédé existe depuis plusieurs siècles, elle a pour origine la fermentation traditionnellement effectuée en Asie et au Japon, appelée fermentation « Koji ».

Comparativement à la fermentation submergée, on observe en fermentation en milieu solide :

- Une réduction de la diffusion du substrat et des produits ;
- Une amélioration de la solubilité et de la diffusion de l'oxygène et d'autres gaz non polaires ;
- Une diminution de la conduction thermique ;
- Une diminution de la teneur en eau.

On note également une différence qualitative entre les deux méthodes dans les productions de spores, d'enzymes et de métabolites secondaires.

Dans le cas de la production de spores de moisissures, la sporulation est plus facile à obtenir en fermentation en milieu solide tandis qu'elle est difficile à obtenir et à contrôler en fermentation submergée.

Dans le cas de la production d'enzymes, les biocatalyseurs obtenus par fermentation en milieu solide présentent des modifications biochimiques notables et des propriétés différentes. Il a été démontré par exemple que les amylases produites par *A.niger* sur du manioc sont plus résistantes à la dénaturation thermique que celles de la fermentation submergée avec la même souche et le même substrat. (Alazard et Raimbault, 1981).

Il apparaît clairement que la fermentation en milieu solide est plus adaptée pour la production d'enzymes industrielles à cause de sa productivité élevée et la simplicité de l'équipement (Vincent P, 2013).

### 3. Le son de blé

Le son de blé est l'un des sous-produits de la mouture sèche du blé tendre. Il se compose de couches extrêmes du grain de blé. Il représente 10 à 17% du blé moulu (Hassan et *al.*, 2008). Maternels (bande hyaline, testa, péricarpe et cuticule), au sens anatomique du terme, additionné de la couche aleurone et de restes de l'endosperme, au sens industriel du terme). Il représente entre 11 et 15% de la masse totale du grain de blé et son rôle est de protéger la graine. La composition biochimique du son de blé industriel comprend de 22 à 25% de (glucurono) arabinoxylyanes, de 14 à 17% de protéines, de 7 à 11% de cellulose, de 3 à 10% de lignine, des  $\beta$ -glucanes à liaisons mixtes et de 11 à 30% d'amidon résiduel selon le mode de fractionnement. Au total, les polysaccharides hors amidon représentent environ 46% du son de blé industriel, dont près de 70% sont des (glucurono) arabinoxylyanes. (Zaddem, 2014). Sa composition varie en fonction de ses variabilités génétiques, éco-physiologiques ainsi que le mode de fractionnement et de mouture, laissant des quantités d'amidons résiduels plus ou moins grandes. (Zeitouni 2011).

#### 3.1. Composition du son de blé

Le son de blé est principalement formé par les enveloppes et la couche à aleurone riches en carbohydrates, cellulose, hémicellulose protéines.

La couche interne du son, l'aleurone, est enlevée lors de la mouture et elle retrouve dans le son (Peyron *et al.*, 2003). Elle constitue 6 à 7 % du poids du grain et contient des

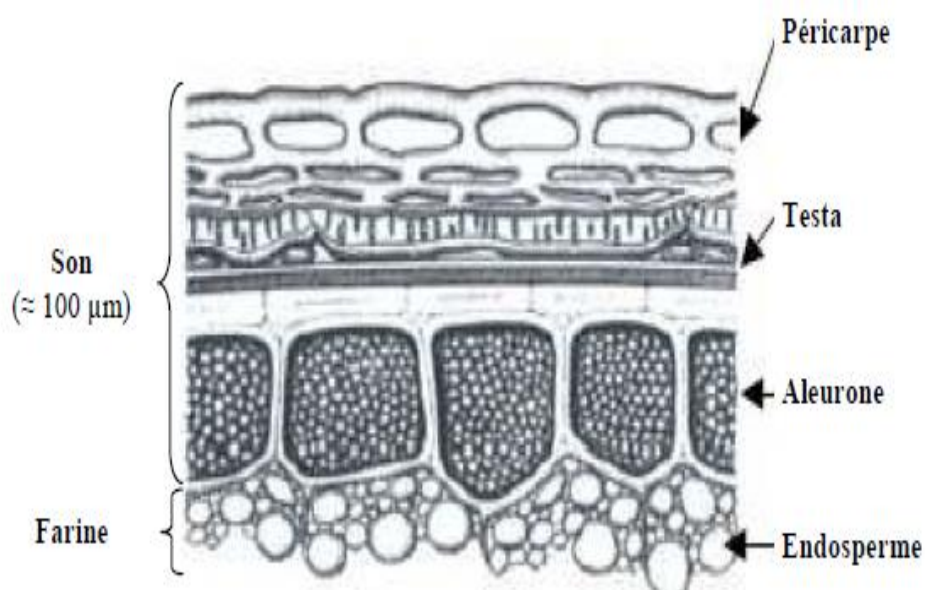


## Synthèses Bibliographique

cellules riches en protéines (Pylar, 1988) et renferme des concentrations importantes de molécules d'intérêt nutritionnel, soit 40 % de minéraux (Antoine *et al.*, 2002) et 20 % de protéines du son (Pomeranz, 1988). Elle contient aussi d'autres composantes bioactives comme la lignine (phytoestrogène) et les acides phénoliques (Javed *et al.*, 2011).

Les enveloppes sont constituées de cellulose, hémicellulose (pentosane) et de lignine formées par un ensemble de monosaccharides dont la teneur est variable (tableau n° ). Il s'agit d'une source de fibres alimentaires insolubles et d'acides phénoliques (Rouau *et al.*, 2010). Elles contiennent aussi des composés bioactifs comme la bétaine et la choline (Javed *et al.*, 2011).

Les pentosanes sont des polysaccharides appartenant à deux familles : les arabinoxylanes et les arabinogalactanes. La cellulose est un homopolysaccharide cristallin, principalement retrouvé dans le péricarpe, mais absent dans la couche à aleurone. Les chaînes de celluloses confèrent aux parois du grain une résistance chimique et physique. (figure n°2)



**Figure n°05** : Les différentes couches cellulaires constitutives du son de blé industrie (Surget *et al.*, 2005 ; Henry *et al.*, 2009).

**Tableau n°03:** Pourcentage des monosaccharides dans le son de blé (Benamrouche *et al.*, 2002).

Monosaccharides	Pourcentages %
Xylose	43.7
Arabinose	23.7
Glucose	23.1
Galactose	2.1

Le son de blé est très riche en fibres par rapport aux variétés de la farine.

**Tableau n°04 :** Composition en fibres des farines et des sons (Feillet, 2000).

	Fibres totale (%)	Hémicellulose (%)	Cellulose (%)	Lignine (%)
<b>Farine blanche (72%)</b>	3-4	80	19	1,0
<b>Farine bise (90-95%)</b>	8-10	72	18	10
<b>Farine complet (100%)</b>	12-15	74	20	6,0
<b>Son fin</b>	28-32	75	16	9,0
<b>Gros son</b>	40-50	74	18	7,0

Les parties périphériques du grain de blé représentent une source importante en protéine et en minéraux (**tableau n°05**). En effet, l'assise d'aleurone, représentant l'une des couches formant le son de blé, est très riche en vitamines (B1, B2, B3, B6, B9 et E) et en minéraux (P, K, Mg, Mn et Fe) (Pomeranz, 1988 ; Feillet, 2000 ; Antoine *et al.*, 2002 ; McKeivith, 2004).

**Tableau n° 05** : Teneur en minéraux et en vitamines du son de blé (Feillet, 2000)

Minéraux (mg/100g de son)		Vitamines (mg)	
<b>potassium</b>	1000-1500	<b>Vitamine E</b>	2-6
<b>magnésium</b>	500-700	<b>Vitamine B1</b>	0,4 -0,8
<b>Calcium</b>	100	<b>Vitamine B2</b>	0,1-0,2
<b>Sodium</b>	5-30	<b>Vitamine B6</b>	0,5 -1

Les protéines présentent 10 à 20% de la matière sèche du son de blé. Elles sont liées aux acides aminés aromatiques et aux arabinoxylanes (Rhodes et Stones, 2002). Ils se situent dans le cytoplasme des cellules aleurones. Les protéines du son de blé ont un rôle important dans la mise en place de la structure des parois.

Le son contient aussi une faible quantité de lipides. On les trouve au niveau de l'épiderme sous forme d'une fine couche et au niveau de la testa sous forme de couches épaisses. Les lipides jouent un rôle important dans la résistance au stress biotique et abiotique. Ils représentent une barrière physico-chimique sélective au passage de nombreux composés.

### 3.2. Utilisation du son de blé

Dans l'industrie alimentaire, le son de blé est utilisé comme alternative des substrats synthétiques utilisés dans le processus de fermentation (Pandey, 1992) ainsi que dans la production d'enzymes et de métabolites secondaires. Il est aussi utilisé dans la production de plusieurs types de moisissures, dont la *Trichoderma* (Javed *et al.*, 2011) et la production biologique par fermentation (Hawkes *et al.*, 2008).

Cependant, l'application principale du son de blé concerne l'alimentation animale : en raison de ses propriétés nutritionnelles, il permet d'améliorer la qualité nutritionnelle des produits alimentaires de source animale.

### 3.3. Effet du son de blé sur la santé

Contrairement à la farine blanche qui est dépourvue de la partie externe du grain de blé, le son de blé est riche en antioxydants, en polyphénols et en d'autres composés qui peuvent être bénéfiques pour l'organisme et prévenir plusieurs maladies. En effet, le son est une source de fibres, de protéines, de vitamines et de minéraux (Salvin, 2003).

L'acide phytique par exemple, qui se localise dans les couches extérieures du grain de blé d'où sa présence dans le son, présente des propriétés anti cancérogène, prévient le diabète type 2 ainsi que les problèmes cardiaques. Les fibres du son agissent essentiellement au niveau des intestins. En effet, ils augmentent le poids des selles, ce qui réduit le temps du transit intestinal, diluent les 9 composants qui se trouvent dans le colon et stimulent aussi la fermentation bactérienne (Bingham *et al.*, 2003) ainsi que la production d'acides gras à chaînes courtes qui sont facilement absorbés par le colon et qui contribuent à l'absorption d'eau et de sodium (Hébuterne, 2002). De plus ces acides gras à courtes chaînes présentent

une importante source d'énergie pour les bactéries de l'intestin ce qui améliore la digestion (Chaplin, 2004). Plus particulièrement, les fibres sont fermentées dans le colon et permettent la prolifération bactérienne et l'augmentation de la masse des fèces (Rosado, 2000 ; Chaplin, 2004). Et augmentent ainsi la viscosité de l'estomac et le contenu de l'intestin (Caballero *et al.*, 2004). Rosado (2000) pense que certains produits qui résultent de la fermentation des fibres pourraient avoir un effet laxatif. Ils ralentissent aussi l'absorption du glucose mais ne provoquent pas son mal absorption (Hébuterne, 2002).

Les fibres sont conseillées aussi dans les régimes alimentaires pour la perte de poids. En effet, elles augmentent la sensation de satiété et ils diminuent la valeur énergétique consommée par l'organisme car la majorité des produits de dégradation des fibres sont utilisées par les bactéries de l'intestin. Plusieurs études ont aussi montré qu'une alimentation riche en fibres peut réduire le risque de cancer colorectal. (Zaddem, 2014).

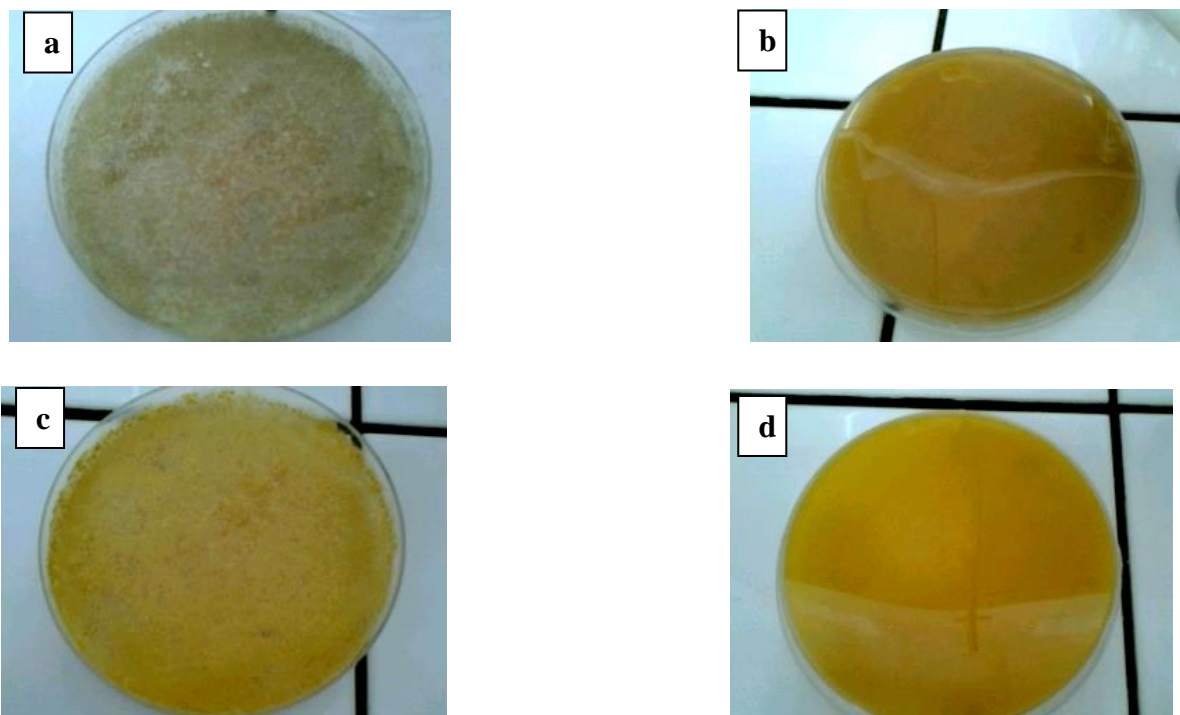
# Matériels et Méthodes

### 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 I Algérie, à partir d'échantillon de sol collectée proche de la source thermique (Hammam Debbagh Guelma), 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 boîte de pétri à 30°C jusqu'à une bonne sporulation (figure n°06). Les repiquages sont effectués tous les mois (kwak et rhee.1992).



**Figure n°06:** la souche *Trichoderma longibrachiatum* après 21 jours d'incubation (a : mycélium, b : revers) et après 7 jours d'incubation (c : mycélium, d : revers) 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. Après sporulation de la moisissure, les spores sont récupérées par addition de 10ml d'eau distillée stérile.

#### 1.2.2. Dénombrement des spores

Une dilution de 1/100° est réalisée à partir d'une solution mère de spores. Le nombre de spore 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 moisissure *T.longibrachiatum* représente l'inoculum). L'examen s'effectue au microscope optique au grossissement (x 40).

#### 1.2.3. Conservation de la souche

La moisissure *Trichoderma longibrachiatum* est maintenue sur milieu Sabouraud (incubation à 30°C jusqu'à une bonne sporulation). Les spores sont récupérées par addition de 10ml d'eau distillée avec le glycérol à 20% (agent cryoprotecteur). Ces suspensions de spores sont ensuite stockées au congélateur jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990).

## 2. Cinétique de production de la cellulase par la souche *Trichoderma longibrachiatum*

### 2.1. Milieu de production

Un milieu de culture est utilisé pour la production de la cellulase en mode de fermentation solide : le son de blé (Hamma Bouziane. Unité 314. Constantine), avec une humidité initiale de 13.7%. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes avant inoculation.

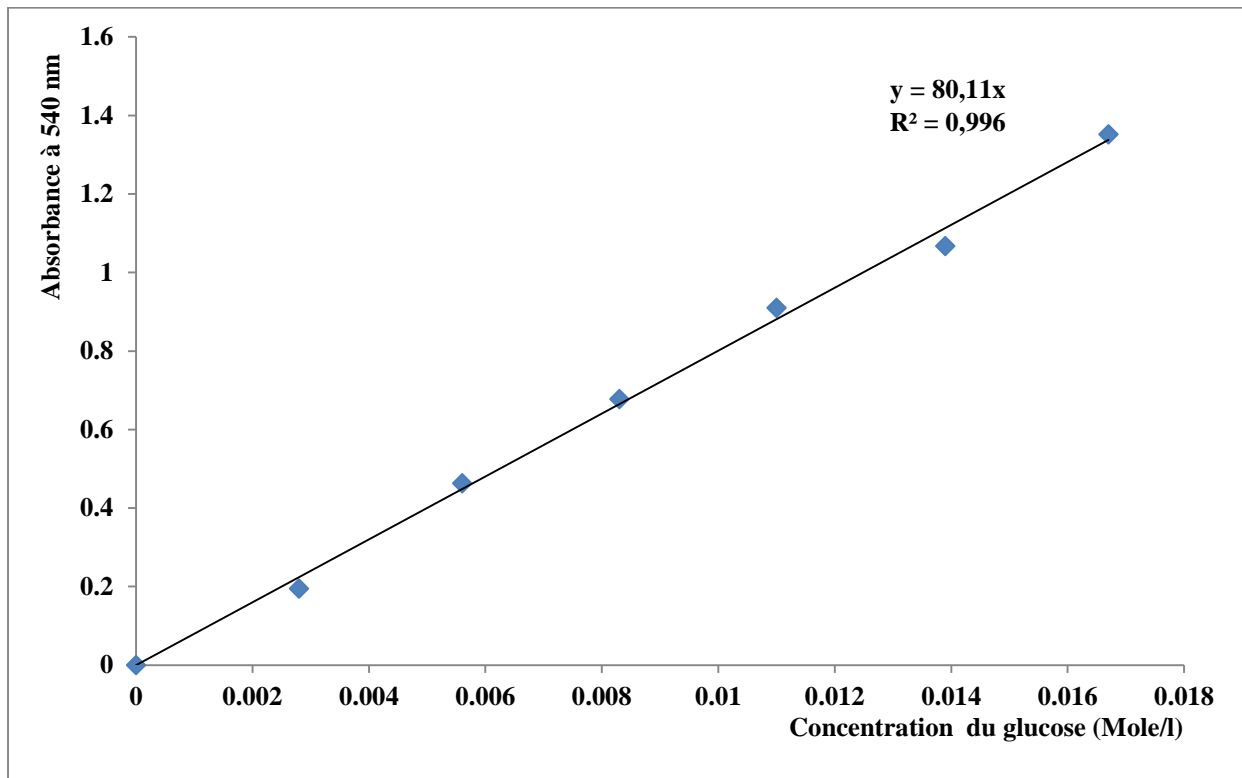
### 2.2. Conduite de la fermentation solide

La production de l'enzyme est réalisée dans des erlens-meyers de 250 ml à raison de 5 grammes de substrats par erlens, imbibés par une solution starter (agent humidifiant à 70%), les erlens meyers sont inoculés après refroidissement par une suspension de spores à raison de  $2 \cdot 10^7$  spores par grammes de substrat. Les erlens meyersensemencés sont ensuite incubés à 30°C dans une étuve, pendant 7 jours. Des prélèvements sont effectués tous les jours, à partir du 2<sup>ème</sup> jour d'incubation (2 jours, 3 jours, 4 jours, 5 jours, 6 jours et 7 jours). Toutes les expériences sont réalisées en triplicate.

A la fin de la fermentation, une quantité connue (2.5g) de substrat fermenté est mélangée avec 100 ml de solution tampon citrate 0.1M, pH 4.8 (Annexe 3). Après broyage à l'aide d'un mixeur pendant 1 à 2 minutes, le mélange est centrifugé à 20627g pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu (représente l'extrait enzymatique) est utilisé pour le dosage des activités enzymatiques (papier filtre et endoglucanase). Les expérimentations sont réalisées en triplicate. Le surnageant est conservé à 4 °C jusqu'à utilisation.







**Figure n°07** : Courbe étalon de glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase.

### 2.3. Etude de la stabilité thermique des activités cellulolytiques

La thermo stabilité des enzymes est testée par incubation de l'extrait enzymatique brut, d'une culture de 3 jours, à deux températures différentes : 60°C et 70°C pour une durée de temps d'une heure, des prélèvements sont effectués chaque 15 minutes.

Les activités enzymatiques résiduelles de chaque prélèvement (APF et endoglucanase) sont déterminées selon les conditions standards.

## 3. Méthodes analytiques

### 3.1. Dosage des activités cellulolytiques

- **Activité papier filtre (APF)** : est utilisée pour déterminer l'activité totale dans un complexe 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 (0.1M, pH 4.8) et de 50 mg de papier filtre Watman N° ( des morceaux de 1 x 6 cm ), incubés 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 totale de 1 ml d'un mélange réactionnel contenant 0.5 ml d'extrait enzymatique dilué dans du tampon citrate 0.1 M, pH 4.8 et 0.5 ml d'une solution de CMC (carboxymethylcellulose) à 1 % (W/V) préparé dans le même tampon que l'extrait enzymatique (Annexe 5). Ce mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 30 minutes.

## Matériels et Méthodes

---

La quantité des sucres réducteurs libérés de l'hydrolyse du papier filtre et du carboxyméthyl-cellulose est mesurés selon la méthode de Miller (Miller, 1959) par une réaction colorimétrique due à la présence du réactif : acide dinitrosalicylique (DNS) (Annexe 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 0.0167Moles/litre (figure n°07). 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.

### 3.2. Mesure de l'humidité

L'humidité est déterminée par la méthode de la mesure du poids sec. 2.5g de substrat fermenté de chaque prélèvement est séché par incubation dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant (Audigie *et al.* 1984). L'humidité correspond au pourcentage que représente la masse d'eau obtenue par calcul après dessiccation par rapport à la masse initiale.



# Résultats et Discussion

### 1. Composition biochimique du son de blé

Le son de blé est utilisé comme substrat de fermentation pour la production de la cellulase par fermentation solide, sa composition biochimique est réalisée au niveau du laboratoire **d'Analyses et d'Essais Microbiologique et Physico-chimie. Constantine**. Les résultats de cette analyse sont récapitulés dans le tableau n°06.

**Tableau n°06 :** Composition biochimique du son de blé.

Paramètre	Résultats
Humidité (%)	13.7
Taux de calcium (mg/g)	1.58
Taux de sodium (mg/g)	6.27
Taux de potassium (mg/g)	4.94
Matière azotée (%)	2.65
Cellulose (%)	17

L'humidité initiale est mesurée à 13.7%, valeur insuffisante pour la croissance de la moisissure et la production d'enzymes. Pour cela, l'humidification de ce substrat est importante pour la fermentation en milieu solide.

Le son de blé est riche en sels minéraux (calcium, sodium et potassium), les valeurs trouvées sont proches de celles citées par la littérature (Feillet, 2000). Ces éléments constituent des micronutriments requis en faibles concentration pour la croissance des microorganismes.

La teneur en azote total de 2.65 % du son de blé, explique la richesse du blé en azote qui est un élément majeur indispensable à la croissance microbienne.

## Résultats et Discussion

---

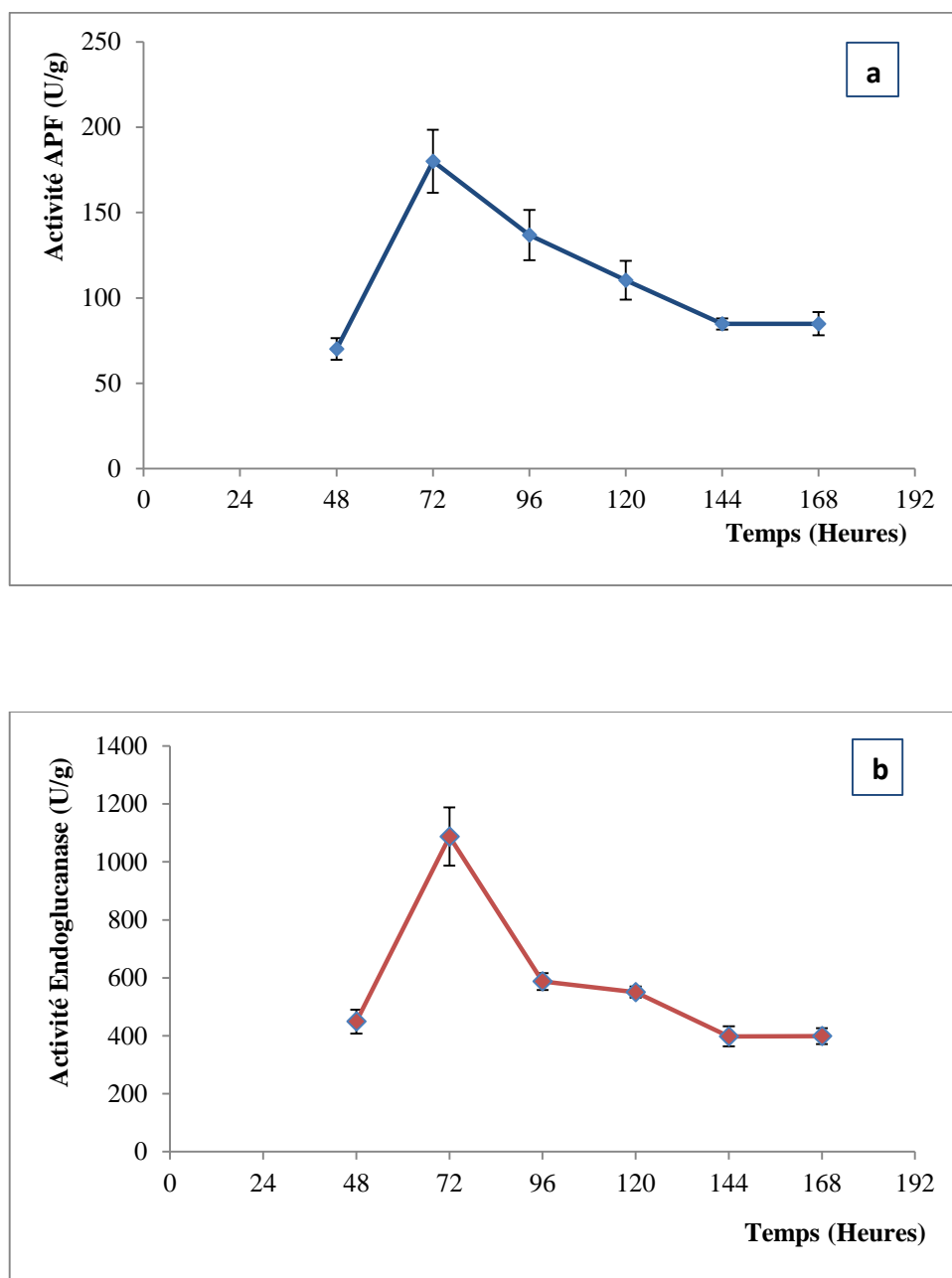
La cellulose à 17% représente une valeur moyenne par rapport à celle citée dans la littérature (Feillet, 2000). C'est la source de carbone suffisante pour une bonne croissance microbienne et constitue l'inducteur pour la production de l'enzyme cellulase.

### □ *Conclusion*

Par sa teneur élevée en matières carbonée et azotée, et sa richesse en sels minéraux, le son de blé peut être aisément utilisé comme milieu de base pour la culture des microorganismes et la production de cellulases.



## Résultats et Discussion



**Figure n°08 :** Cinétique de production des activités cellulasiqes par la souche *Trichoderma longibrachiatum* sur son de blé à 30°C. **a :** activité APF, **b :** activité endoglucanase.

### 2. Production de la cellulase

#### 2.1. Cinétique de production de la cellulase par la souche *Trichoderma longibrachiatum*

La production des enzymes par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* est présentée dans la figure n°06.

L'activité papier filtre est mesurée à 70.07U/g après 48 heures de culture, et atteint sa valeur maximale de **180.02U/g** au bout de **72 heures** d'incubation. Elle diminue ensuite, progressivement jusqu'à la fin de la fermentation avec une valeur de **84.92U/g**.

L'activité endoglucanase présente la même allure que celle obtenue par l'activité globale papier filtre. Elle est à son niveau maximum de **1087.29U/g** à **72 heures**. Au-delà de ce temps, une diminution progressive est observée pour atteindre une valeur de **398.7U/g** à **168 heures**.

Les résultats obtenus par notre souche sont comparable aux travaux de Vu *et al.*, (2011), qui ont obtenus en erlens, un maximum d'endoglucanase au bout de 72 heures de fermentation sur son de blé, par la moisissure *Aspergillus* sp. SU 14, mais la quantité d'endoglucanase produite par notre souche dépasse largement celle obtenue par cette souche (28.31U/g). Cependant, l'activité endoglucanase obtenue dans ce travail dépasse largement celle (131.5U/g) produite par *Trichoderma reesei* NCIM 992 après 6 jours de culture sur son de blé (Maurya *et al.*, 2012). Par contre, un maximum d'activité papier filtre (140U/g) est produit par *Trichoderma reesei* NRRL 11460 après 96 heures de culture sur son de blé traité (Singnania *et al.*, 2006).

On peut dire que, l'activité des enzymes cellulolytiques dépend de l'origine de la souche et de la composition des milieux de culture.

## Résultats et Discussion

---

### 2.2. Mesure de l'humidité à la fin de la fermentation

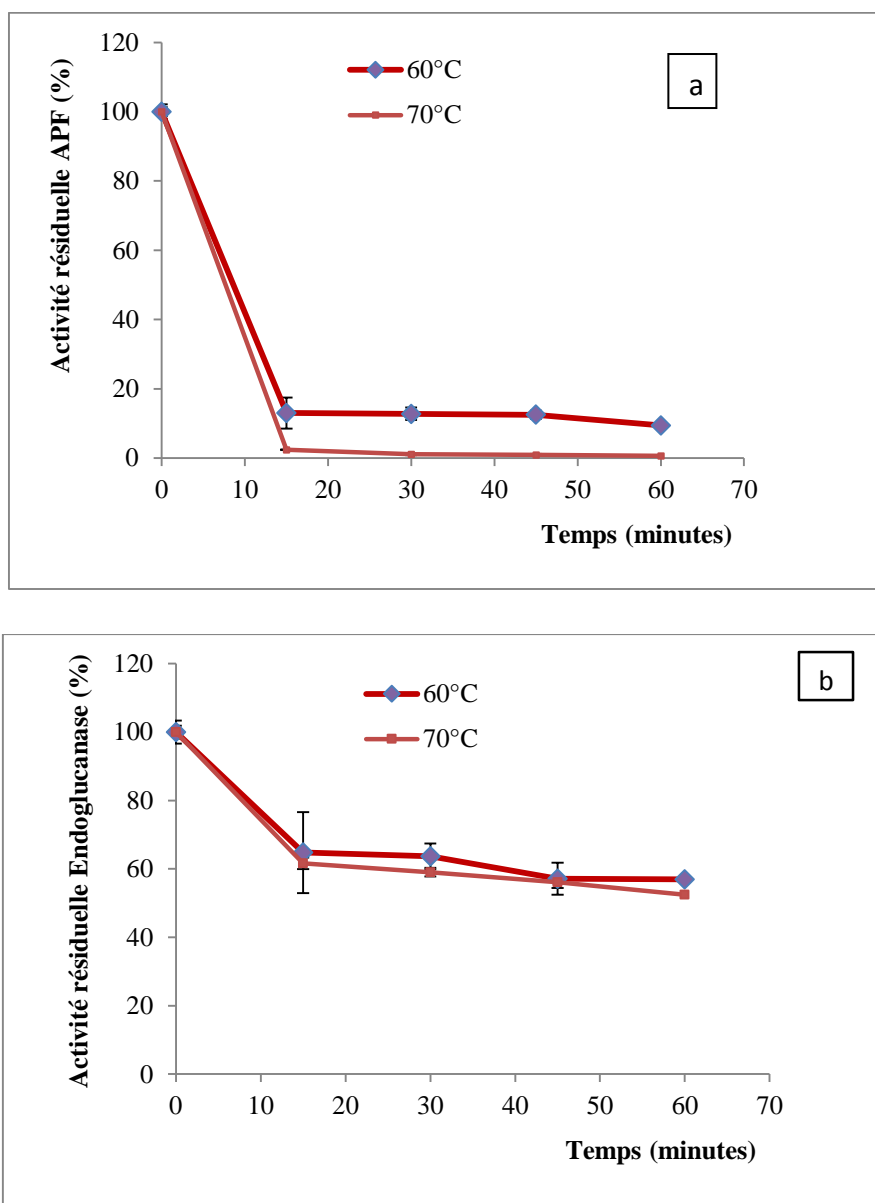
Les valeurs de l'humidité mesurées après chaque prélèvement de culture de la moisissure *T. longibrachiatum* sur son de blé sont consignées dans le tableau n°07.

**Tableau n°07 :** Humidité mesurée après chaque prélèvement.

Prélèvement (Heures)	Humidité (%)
48	53.5
72	53.1
96	49.2
120	55.5
144	53.5
168	53.1

La diminution de l'humidité à chaque prélèvement par rapport à l'humidité initiale avant inoculation (83.7%), explique le besoin en eau pour la croissance de la moisissure et la production de l'enzyme recherché en fermentation solide.

## Résultats et Discussion



**Figure n°09 :** La stabilité thermique des activités APF (a) et Endoglucanase (b) produites par *Trichoderma longibrachiatum* à deux températures : 60°C et 70°C. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types. N=3. L'absence de barres indique que les erreurs sont inférieures aux symboles.

### 2.3. Etude de la stabilité à la température

L'étude de la stabilité à la température des enzymes produites par notre souche *Trichoderma longibrachiatum* est testée après un traitement thermique d'une durée d'une heure de l'extrait enzymatique à deux températures différentes : 60 et 70°C.

L'activité papier filtre est très affectée par le traitement thermique. 10% de l'activité originale est retenu, après 1 heure d'incubation à 60°C, environ 99% de l'activité papier filtre est perdu après 1 heures d'incubation à 70°C (figure n° 9 a).

Cependant l'activité endoglucanase est stable à 60 et 70°C, et l'activité totale retenue est 57% et 53%, respectivement, après 1 heure d'incubation à ces deux températures. La demi-vie de cette activité égale à **une heure** d'incubation à **70°C** (figure n°9 b).

Selon Jun *et al.*, (2009), les enzymes APF et endoglucanase produites par le mutant NU6 *Trichoderma reesei* Rut C-30 sont stables uniquement à 50°C, avec une activité résiduelle de 80% après 30 minutes d'incubation à cette température, mais leur inactivation thermique est rapide au-delà de 60°C. Notre enzyme endoglucanase semble moins résistante que celle produite par la moisissure de la pourriture blanche *Pycnoporus sanguineus*, qui garde 80% de son activité originale après 1 heure d'incubation à 60°C, mais cette activité est perdue après 1 heure d'incubation à 70°C (Quiroz-Castaneda *et al.*, 2009). Par contre, notre activité retient 53% de son activité originale après un traitement d'une heure à 70°C. Cependant, Kaur *et al.*, (2015) décrivent une endoglucanase d'*Aspergillus nidulans* stable à 50 et 60°C pendant 3 heures, mais son activité est perdue après 30 minutes à 70°C.

## Résultats et Discussion

---

Compte tenu de ces valeurs, l'activité globale APF produite par *Trichoderma longibrachiatum*, s'avèrent relativement sensible.

Notons que, les enzymes cellulolytiques thermostables ont un grand potentiel dans les processus industriels tels que l'industrie alimentaire, l'industrie de textile et la bioconversion (Bhat et Bhat, 1997 ; Murray *et al.*, 2004). L'endoglucanase produite par cette souche trouve ici une application intéressante.

# Conclusion et Perspectives

## Conclusion et Perceptives

---

Dans le cadre de ce travail concernant l'étude de la production de cellulases par le champignon filamenteux *Trichoderma longibrachiatum* provenant de sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Nous avons effectué : cinétique de production et étude de la stabilité thermique des activités cellulolytiques recherchées.

Nous avons choisi le son de blé comme milieu de base pour la production de la cellulase en mode de fermentation solide. L'analyse de la composition biochimique de ce substrat révèle un taux d'humidité initiale de 13.7%, cellulose à 17%, azote totale à 2.65% et sels minéraux. De ces résultats, le son de blé peut être aisément utilisé comme substrat pour la culture des microorganismes et la production de cellulases.

Par ailleurs, l'étude cinétique de production de la cellulase sur ce milieu montre, qu'au bout de 72 heures de fermentation, la souche *Trichoderma longibrachiatum* produit, d'une façon concomitante, le maximum des activités cellulasiques APF et endoglucanase : **180.02U/g** et **1087.29U/g**, respectivement.

Le traitement thermique à 60°C et 70°C de l'extrait enzymatique révèle que l'activité APF est très sensible : 10% de l'activité originale est retenu, après 1 heure d'incubation à 60°C, environ 99% de l'activité papier filtre est perdu après 1 heures d'incubation à 70°C. L'enzyme endoglucanase garde 57% et 53%, respectivement, après 1 heure d'incubation à ces deux températures, avec une demi-vie d'**une heure** à **70°C**. Ces performances thermiques permettent de classer l'endoglucanase produite par *Trichoderma longibrachiatum* parmi les enzymes thermostables pour une utilisation industrielle éventuellement.

Enfin ces résultats sont encourageants et ouvrent de nouvelles perspectives:

- Optimisation des paramètres de la production de la cellulase : pH du milieu, température d'incubation et nature de l'agent humidifiant.
- Caractérisation des enzymes produites : pH et température optimums.
- Purification de la cellulase produite si elle est destinée à des usages pharmaceutiques ou dans les IAA.



# Références Bibliographiques

## Références Bibliographiques

---

- Murray P., Aron., Collins C., Grassick A., Penttila M., Saloheimo M., Tuohy M. (2004).** Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3 $\beta$ -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. Protein Expression and Purification. 38(2): 248-257.
- Quiroz-Castaneda R., Balcazar-Lopez E., Dantan-Gonzalez E., Martinez A., Folch-Mallol J., Martinez 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.
- Hemery, Youna, Rouau, Xavier, Dragan, Ciprian, Bilici, Mihai, Beleca, Radu, Dascalescu, Lucian. (2009).** Electrostatic properties of wheat bran and its constitutive layers: Influence of particle size, composition, and moisture content. Journal of Food Engineering, vol. 93, n°1, p: 114-124.
- Singhania RR, Sukumaran RK, Pillai A, Prema P, Szakacs G, Pandey A. (2006).** Solide state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulase production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460. India journal of biotechnology . 5: 332:336.
- Vincent prevot. (2013).** comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. THESE Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne. Discipline : microbiologie industrielle, Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE U.F.R. Sciences Exactes et Naturelles Ecole Doctorale Sciences Technologies Santé.
- Pandey, Ashok. (2003).** Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal vol. 13, n°2-3, p. 81-84
- Duchiron, Francis, Copinet, Estelle. (2011).** Fermentation en milieu solide (FMS). Techniques de l'ingénieur. Référence BIO620.

## Références Bibliographiques

---

- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., Banerjee, U.C. (2005).** Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, vol. 1, n°2, p. 1-9.
- Krishna, Chundakkadu. (2005)** . Solid-State Fermentation System-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 25, n°1-2, p. 1-30.
- Durand, Alain. (1998)** .La fermentation en milieu solide. *Biofutur*, n°181, p. 41-43.
- Raimbault, Maurice. (1998)** .General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 1, n°3, p. 174-188.
- Smith, John E., Berry, David R., Kristiansen. (1983)** .Bjorn. *The Filamentous Fungi: Fungal Technology*. Londres (Royaume-Uni) :416 p. ISBN : 978- 0713128574
- Sandhya, Chandran, Sumantha, Alagarsamy, Szakacs, George, Pandey, Ashok. (2005)** .Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, vol. 40, n°8, p. 2689-2694.
- Krishna, Chundakkadu. (2005)** .Solid-State Fermentation System-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 25, n°1-2, p. 1-30.
- Vu VH, Pham TA, Kim K. (2011).** Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solide state fermentation. *Microbiology*. 39 (1): 20-25.
- Jun H., Bing Y., Keying Z., Xuemei D., Daiwen C. (2009).** Strain improvement of *Trichoderma reesei* Rut C-30 for increased cellulase production. *Indian J Microbiol*. 49: 00-00.
- Bhat M K., Bhat S. (1997).** Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*. 15(3-4): 583-620.
- Surget, Anne, Barron, Cécile, (2005).** Histologie du grain de blé. *Industries des Céréales*. n°145, p :3-7.
- Maurya DP, Single D, Pratap D, MauryaI JP. (2012).** Optimization of solide state fermentation conditions for the production of cellulose by *Trichoderma ressei* .*J. Ewiron . Biol* . 33 P:5-8.
- Allah Antoine ASSAMOI, Jacqueline DESTAIN, Philippe THONART (2008).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*.

## Références Bibliographiques

---

### Sites web

[http : //www.agrogroup.unblog.fr/2007/04/28/fermentation-en-milieu-solide/](http://www.agrogroup.unblog.fr/2007/04/28/fermentation-en-milieu-solide/) consulté le 15 mars 2015.

# Annexes

### Annexe 1

#### Milieu Sabouraud

- Peptone.....10g
- Glucose massé.....20g
- Agar-agar.....15g
- Eau distillée (qsp).....1000ml
- Vitamines et facteurs de croissance
- pH = 6.0

### Annexe 2

- NaOH(2N).....8g
- DNS.....1g
- Eaudistillé.

#### Méthodes de dosage

##### 1/ Réactif de DNS

1000ml de NaOH 2N : dissoudre 8g de NaOH dans 100ml d'eau distillé.

Dissoudre 1g de DNS dans 20ml de NaOH (2N) et 50ml d'eau distillée, agitée. Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière. Il se conserve environ 1 mois (Miller, 1959).

### Annexe 3

- Acide citrique (0.1M).....23g
- Citrate de sodium.....58g
- Eau distillé.
- PH 4.8

#### Préparation de a solution tampon citrate 0.1M, pH= 4.8

1000ml acide citrique 0.1M : 23g A. citrique dans 1000 ml d'eau distillée.

2000ml citrate de sodium (0.1M) : 58g citrate de sodium dans 2000ml d'eau distillée.

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

### Annexe 4

- Glucose.....1g
- Sulfate d'ammonium.....0.046g
- Tartrate double Na,K.....0.046g
- Eau distillé.

#### **Préparation de l'agent humidifiant :**

Dissoudre 1 g de glucose, 0.046g de sulfate d'ammonium et 0.046 g de tartrate double Na, K

Dans 100 ml d'eau distillée et bien mélanger jusqu'à l'homogénéisation complète.

### Annexe 5

- CMC.....1g.
- Tampon citrate.....100ml.
- PH 4.8.

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

1 g de CMC est dissoudre dans 100 ml de tampon citrate 0.1 M 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.

# Résumés



## Résumé

Les activités cellulolytiques produites par le champignon filamenteux microscopique *Trichoderma longibrachiatum* isolé de sols environnant la source thermale de Guelma (Hammam DEBAGH), cultivé sur son de blé en fermentation solide, a donné une production maximale des activités APF et endoglucanase : **180.02U/g** et **1087.29U/g**, respectivement à 72 heures de fermentation.

L'étude de la thermostabilité de l'extrait enzymatique brut révèle que l'activité APF est très sensible : 10% de l'activité originale est retenu, après 1 heure d'incubation à 60°C, environ 99% de l'activité papier filtre est perdu après 1 heures d'incubation à 70°C. Par contre, l'enzyme endoglucanase s'avère plus stable et garde 57% et 53% après 1 heure d'incubation à 60 et 70°C, respectivement, avec une demi-vie d'**une heure à 70°C**.

Par ces caractéristiques, production de l'enzyme, thermostabilité de l'endoglucanase, notre souche *Trichoderma longibrachiatum* peut être attractive en industrie pour la production de la cellulase.

**Mots clés** : cellulase, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation solide, son de blé, thermostabilité.

## **Abstract**

Cellulolytic activities produced by the microscopic filamentous fungus *Trichodema longibrachiatum* isolated from surrounding soil hot spring Guelma (Hammam Debagh) grown on wheat bran by solid state fermentation, gave maximum production of APF and endoglucanase activities: 180.02U/g and 1087.29U/g at 72 hours of fermentation, respectively.

The study of the thermal stability of the crude enzyme extract reveals that the APF activity is very sensitive: 10% of the original activity is retained after incubation for 1 hour at 60 and 70°C, respectively, with a half-life of one hour at 70°C. With these characteristics, production of the enzyme and thermostability of the endoglucanase, the *Trichoderma longibrachiatum* strain should be an attractive producer for cellulases production.

**Keywords:** cellulase, *Trichoderma longibrachiatum*, solid state fermentation, wheat bran, thermal stability.

## المخلص

النشاط الأنزيمي السيلولوزي المنتج من طرف الفطر الخيطي *Trichoderma longibrachiatum* المجهري المعزول من عينات التربة المحيطة بالمنبع الحار لمنطقة قالمة حمام دباغ و المنمات على نخالة القمح عن طريق التخمير في وسط صاب أعطت النشاط الأنزيمي لأعظمي APF. و على التتابع 180.02 . 1087.27 دراسة التبات الحراري للمستخلص الإنزيمي اتبنت ان النشاط الكلي APF يحافظ على 10% من نشاطه الاصلي بعد ساعة من المعالجة في 60 درجة مئوية و هذا النشاط يفقد تماما بعد ساعة من المعالجة في 70 درجة مئوية . من هذا نستخلص ان الإنتاجية للانزيم و التبات الحراري لل *endoglucanase* يبين ان الفطر *T.longibrachiatum* له اهمية في انتاج *cellulase*.

**الكلمات المفتاحية** التبات الحراري. الإنتاجية. النشاط الأنزيمي السيلولوزي. التخمير في وسط صاب. نخالة القمح.

**Lakhel Romayssa**

**Fergani Khadidja**

**Thème :** Activités cellulolytiques de *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur son de blé.

**Résumé:**

Les activités cellulolytiques produites par le champignon filamenteux microscopique *Trichoderma longibrachiatum* isolé de sols environnant la source thermale de Guelma (Hammam DEBAGH), cultivé sur son de blé en fermentation solide, a donné une production maximale des activités APF et endoglucanase : **180.02U/g** et **1087.29U/g**, respectivement à 72 heures de fermentation.

L'étude de la thermostabilité de l'extrait enzymatique brut révèle que l'activité APF est très sensible : 10% de l'activité originale est retenu, après 1 heure d'incubation à 60°C, environ 99% de l'activité papier filtre est perdu après 1 heures d'incubation à 70°C. Par contre, l'enzyme endoglucanase s'avère plus stable et garde 57% et 53% après 1 heure d'incubation à 60 et 70°C, respectivement, avec une demi-vie d'**une heure à 70°C**.

Par ces caractéristiques, production de l'enzyme, thermostabilité de l'endoglucanase, notre souche *Trichoderma longibrachiatum* peut être attractive en industrie pour la production de la cellulase.

**Mots clés :** cellulase, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation solide, son de blé, thermostabilité.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Zoologie. Université Constantine 1. Algérie.

**Membres du jury :**

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

**Encadreur :** Mme.H.LEGHLIMI. Maitre de conférences B. Université Constantine 1.

**Examinatrice :** Melle.W.ABDELAZIZ. Maitre assistante A. Université Constantne 1.