

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة قسنطينة 1
UNIVERSITÉ CONSTANTINE 1

Université Frère Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée



جامعة قسنطينة 1
UNIVERSITÉ CONSTANTINE 1

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Professionnalisant
Filière : Sciences biologiques, Spécialité: Bioindustrie, Analyse et Contrôle

Par : - DEBBACHE KENZA
-DERDOUR SARA

Thème

**Étude de la production de Xylanase par une souche
d'*Aspergillus sp* (S3)**

Jury d'évaluation:

Président de jury: Mr. KACEM CHAOUCHE N.

Rapporteur : Mme. KARA ALI M.

Examinatrice : Mme. MOSBAH A.

Tutrice : Mme GARES M.

Prof. Univ. Constantine 1.

Dr. Univ. Constantine 1.

Dr. Univ. Constantine 1.

Doctorante UFM. Constantine 1.

ANNEE UNIVERSITAIRE: 2018-2019

Remerciements

Nos remerciements s'adressent d'abord à Allah le tout puissant et à son prophète Mohamed (paix et salut sur lui) pour les chances qui nous sont offertes pour réaliser ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à Notre encadreur Madame Kara Ali Mounira, pour avoir accepté de diriger ce travail. Son soutien, sa clairvoyance et ses compétences nous ont été d'une aide inestimable et pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses précieuses directives tout au long de l'élaboration de ce travail nous ont beaucoup impressionnées.

Plein d'amour et beaucoup de reconnaissance à notre adorable tutrice GaresMaroua (Angel), qui nous aide toute la durée de ce travail pour sa présence, son aide et sa patience sa sincérité, son soutien, sa confiance.

Nous n'oublierons jamais tous ce que vous avais faits pour nous

On exprime toute notre gratitude aux membres du jury Mme Mosbah A, qui a su apprécier ce dernier. La pertinence de ses critiques et ses suggestions nous a permis d'être à la hauteur de ce travail.

Nos remerciements vont aussi au monsieur le président de jury et le chef de département Monsieur Kacem Chaouche Noreddine et à tous les enseignants de département biologie appliquée particulièrement, les enseignants de Bioindustrie Analyse et Contrôle.

On ne terminera pas sans avoir exprimé des remerciements envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail aux êtres les plus chers au monde :

*À mes très chers parents qui m'ont toujours soutenu
avec leurs encouragements et qui m'ont donné un magnifique modèle
de labeur et de persévérance*

À toute ma famille

Mon frère et ma sœur

A mes amis et surtout F4 et Kenza

A toute la promotion de M2 en Bioindustrie Analyse et Contrôle.

Kenza

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail aux êtres les plus chers au monde:

A ceux qui sont mon exemple de réussite, que j'ai tant aimé et respecté, qui m'ont donné de l'amour ; de la tendresse, du soutien et de la force, à mes très chers parents, que Dieu vous protège et vous prête longue et heureuse vie, que ce travail soit le témoignage profond de mon amour.

A mes très chers oncles et tentes cousins et cousines de la famille Derdour et Mammeri qui m'ont soutenu avec leurs encouragements qui m'ont mené à cet aboutissement, auxquels je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.

A toute la promotion de M2 en Bioindustrie Analyse et Contrôle.

Sara

Table des matières

1-Introduction.....	1
2- Revue Bibliographique.....	3
2.1- Biomasse lignocellulosique.....	3
2.1.1- Cellulose.....	3
2.1.2- Lignine.....	4
2.1.3- Hémicelluloses.....	5
2.1.3.1- Xylanes.....	6
2.2- Principaux déchets et coproduits lignocellulosiques.....	7
2.2.1- Biomasse humide.....	8
2.2.2- Biomasse sèche.....	8
2.2.3- Valorisation de l'Alfa comme déchet lignocellulosique.....	9
2.3- Procédés de transformation et de valorisation de la biomasse lignocellulosique.....	10
2.3.1- Prétraitements biologiques.....	11
2.3.2- Prétraitements physico-chimiques.....	12
2.4- Enzyme : hémicellulases.....	12
2.4.1- Xylanase.....	13
2.4.2- Caractéristiques de xylanase.....	14
2.5- Source de xylanase.....	15
2.5.1- Genre <i>Aspergillus</i>	16
2.5.1.1- Caractéristiques et taxonomie.....	16
2.6- Application des xylanase.....	17
2.7- Fermentation.....	18

2.7.1- Fermentation à l'état solide (FS)	18
2.7.2- Fermentation submergée / Fermentation Liquide (FL).....	18
3- Matériel et méthodes.....	20
3.1-Caractères cultureux et morphologiques de la souche (S3).....	20
3.1.1- Observation macroscopique.....	20
3.1.2- Observation microscopique.....	20
3.1.2.1- Observation microscopique à l'état frais.....	20
3.1.2.2- Observation microscopique avec coloration.....	21
3.1.2.3- Réactivation et conservation de la souche (S3).....	21
3.2- Mise en évidence de l'activité xylanolytique (hémicellulosique) de la souche (S3) sur milieu solide à base de xylane.....	21
3.3- Méthodes de fermentation.....	22
3.3.1- Fermentation liquide sur milieu à base de xylane de maïs.....	22
3.3.1.1- Préparation du milieu de fermentation.....	22
3.3.1.2- Préparation de l'inoculum.....	22
3.3.1.3- Comptage des spores.....	22
3.3.1.4- Inoculation et incubation.....	23
3.3.1.5- Méthodes analytiques.....	24
A- Biomasse.....	24
B- pH.....	24
C- Activité enzymatique.....	25
3.3.2- Production de xylanases par la souche (S3) sur milieu naturel à base de l'Alfa.....	28
4- Résultats.....	30
4.1- Caractères cultureux et morphologiques de la souche (S3).....	30

4.1.1- Observation macroscopique.....	30
4.1.2- Observation microscopique.....	31
4.2- Mise en évidence de l'activité hémicellulosiques (xylanolytique) de la souche (S3) sur milieu solide.....	31
4.3- Méthodes de fermentation.....	32
4.3.1- Fermentation liquide dans un milieu à base de xylane de maïs.....	32
A- Biomasse.....	34
B- pH.....	35
C- Activité enzymatique.....	36
4.3.2- Production de la xylanase par la souche (S3) sur milieu naturel solide à base de l'Alfa.....	38
5- Discussion.....	40
6- Conclusion et perspectives.....	44
Résumé.....	46
Abstract.....	47
المخلص.....	48
Références.....	49
Annexe	

Liste des figures

Figure 1 Structure de la biomasse lignocellulosique.....	3
Figure 2 Représentation de la molécule de cellulose.....	4
Figure 3 Structure de la lignine.....	4
Figure 4 Structure hypothétique d'un hémicellulose.....	5
Figure 5 Structure de xylane.....	7
Figure 6 Processus de traitement physico-chimique et biologique de la Biomasse.....	11
Figure 7 Structure de xylanase de la famille GH10.....	12
Figure 8 Hydrolyse enzymatique des arabinoxylanes des parois cellulaires.....	14
Figure 9 Représentation d'une tête aspergillaire.....	16
Figure 100 Microscope optique.....	21
Figure 11 Cellule de comptage Malassez.....	23
Figure 12 Dispositif expérimental : Incubateur agité.....	24
Figure 13 Filtration de la masse mycélienne par papier filtre wattman n°1.....	24
Figure 14 pH- mètre.....	25
Figure 15 Dosage de sucre réducteur par la méthode (NS) : (A), Réaction de sucre réducteur avec réactif Somogyi ; (B), Réaction de sucre réducteur avec réactif Nelson ; (C), Réaction stoppée par l'ajout de l'eau.....	26
Figure 16 Spectrophotomètre.....	27
Figure 17 Filtration de biomasse.....	29
Figure 18 Aspect macroscopique de la souche (S3), ensemencée sur milieu YPGA en stries (A) recto, (B) verso ; et par piqure centrale (C) recto, (D) verso.....	30
Figure 19 Observation microscopique de la souche (S3) : (A), état frais et (B), état coloré avec bleu de méthylène (G:10x40).....	31

Figure 20 Mise en évidence de l'activité xylanase de la souche (S3) sur milieu solide à base de xylane : (A) avant coloration, (B) après coloration.....	32
Figure 21 Suivi de l'évolution de la biomasse de la souche (S3) dans les deux cultures : CI30 et CI37.....	35
Figure 22 Suivi de l'évolution du pH de milieu de fermentation de la souche (S3) dans les deux cultures : CI30 et CI37.....	36
Figure 23 Activité xylanase de la souche S3 sur milieu à base de xylanase.....	37
Figure 24 Variation de biomasse et d'activité xylanolytique de la souche (S3). A, dans la culture d'incubateur à 30°C, B, dans la culture d'incubateur à 37°C.....	37
Figure 25 Productivité maximale de la souche (S3) dans les deux cultures (CI30 et CI37)..	38
Figure 26 Fermentation solide de la souche (S3) avant l'incubation (A) et après 15 jours de fermentation (B)	39

Liste des tableaux

Tableau 1 Groupes d'hémicellulose de la paroi végétale	6
Tableau 2 Composition chimique et production mondiale des principaux déchets Ligno Cellulolytiques (L.C).....	7
Tableau 3 Surfaces occupées par les quantités d'Alfa dans quelques pays de l'Afrique du nord.....	9
Tableau 4 Classification taxonomique de l'Alfa (<i>Stipa tenacissima L</i>).....	10
Tableau 5 Caractéristiques de certaines xylanases produites par <i>Aspergillus</i>	14
Tableau 6 Classification taxonomique d' <i>Aspergillus</i>	16.
Tableau 7 Comparaison entre fermentation solide et liquide.....	19
Tableau 8 Aspect de la souche (S3) cultivée sur milieu liquide à base de xylane.....	33

Liste d'abréviations

Aw	Activité water
CBM	Carbohydrate Binding Module
DNS	Acide 3,5-Dinitrosalicylique
EC	Commission des Enzymes
FL	Fermentation Liquide
FS	Fermentation Solide
GH	Glycosyle Hydrolase
GTs	Glycosyl Transférases
IE	Indice Enzymatique
KDa	kilo Dalton
L.C	Ligno-Cellulolytiques
M	mole/litre
MEM	Milieu essentiel minimal
NS	Nelson Somogyi
PDA	Potato- Dextrose- Agar
pH	Potentiel Hydrogène
q.s.p	quantité suffisante pour
rpm	Rotation par minute
S3	Souche 3
UI	unite international
YPGA:	Yeast-Peptone- Glucose-Agar

Introduction

1- Introduction

Des millions de tonnes de biomasse lignocellulosiques sont rejetés chaque année sous forme de déchets solides agro-industriels et forestiers sans traitements appropriés, ce qui engendre la prolifération de parasites et la pollution de l'environnement en général (Zha *et al.*, 2012; Dar *et al.*, 2013; Ang *et al.*, 2015). La biomasse ligno-cellulosique représente une des ressources renouvelables la plus abondante sur terre, et certainement une des moins coûteuses. Cette dernière est composée essentiellement de trois polymères à savoir : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. La teneur en ces constituants varie d'une espèce végétale à une autre. En effet, Les hémicelluloses, représentent environ 20 à 40 % de la biomasse végétale. et constituent le second polymère naturel et le plus abondant sur terre après la cellulose (Coughlan, 1992; Privas, 2014).

En 2010, représentait la première forme d'énergies renouvelables et la quatrième source d'énergies primaires consommées dans le monde (10,0%) après le pétrole (32,4%), le charbon (27,3%) et le gaz naturel (21,4%) (Key World Energy Statistics, 2012).

L'hydrolyse biologique de la biomasse lignocellulosique nécessite des réactions synergiques entre les enzymes ligninolytiques, cellulolytiques et hémicellulolytiques pour la dégradation complète de ce complexe (Woiciechowski *et al.*, 2013; Ang *et al.*, 2015). Le prétraitement de la biomasse lignocellulosique est nécessaire, car les enzymes ne peuvent pas accéder aux polysaccharides à cause de leur taille, d'une part, et d'autre part, en raison de la couverture des polysaccharides par la lignine (Watanabe, 2013).

De nombreux microorganismes s'impliquent dans l'hydrolyse biologique, les moisissures disposent des potentialités d'applications biotechnologiques très étendues, grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé, due à un patrimoine génétique particulier qui explique leur grande capacité d'adaptation (Leveau et Bouix, 1993). Les *Ascomycètes* qui sont des moisissures filamenteux retrouvés partout dans la nature jouent un rôle essentiel dans le recyclage des matières organiques en puisant leur énergie à partir des sources carbonées externes (Chabasse *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014).

Les principales enzymes capables de dégrader les hémicelluloses sont des hydrolases nommées hémicellulases. Dans le cas des xylanes, c'est la xylanase. En raison de la

complexité structurale des xylanes, leur dégradation complète implique tout un système xylanolytique comprenant une variété d'enzymes, dont les unes hydrolysent la chaîne principale et les autres clivent les liaisons entre les substituants et les résidus xylose de la chaîne principale (Puls et Schuseil, 1993; Ferreira, 2008).

L'objectif principal du présent travail vise à étudier la production de xylanase (hémicellulase), par une souche de moisissure xylanolytiques du genre *Aspergillus sp.* Et ce, dans le but de valoriser la biomasse lignocellulosique.

Pour ce faire, plusieurs informations concernant la biomasse lignocellulosique, les enzymes xylanases (hémicellulases) et les moisissures productrices de cette enzyme sont développés (revue bibliographique). L'étude expérimentale et la partie résultats sont scindées en deux grandes parties ; la première est consacrée à l'étude des aspects macroscopiques et microscopiques de la souche en question, alors que la deuxième partie a concerné la production de l'enzyme xylanase par cette souche sur deux milieux l'un synthétique et l'autre naturel (à base de l'Alfa). Les résultats ont fait l'objet d'une discussion approfondie pour comparer nos résultats à ceux, déjà, développés par des travaux antérieurs. Le mémoire se termine par une conclusion qui ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié.

Revue
Bibliographique

2- Revue bibliographique

2.1- Biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est une matière organique, constituée principalement, de trois polymères à savoir ; la cellulose, l'hémicellulose et la lignine en proportions variables. En effet, La cellulose est de l'ordre de 40 à 60 %, l'hémicellulose est de l'ordre de 20 à 40 %, enfin, la lignine est de l'ordre de 10 à 25 % (O'Donohue, 2008). D'autres matériaux tels que les pectines et les protéines peuvent être trouvés en petites quantités (Mathew *et al.*, 2008; Dashtban *et al.*, 2009). A l'intérieur de la biomasse lignocellulosique (figure1), ces macroéléments s'entremêlent et forment une structure tridimensionnelle complexe et très résistante, maintenue par des liaisons hydrogènes et des liaisons covalentes, qui résistent aux attaques de phytopathogènes en conférant de la rigidité aux plantes (Saidi, 2011).

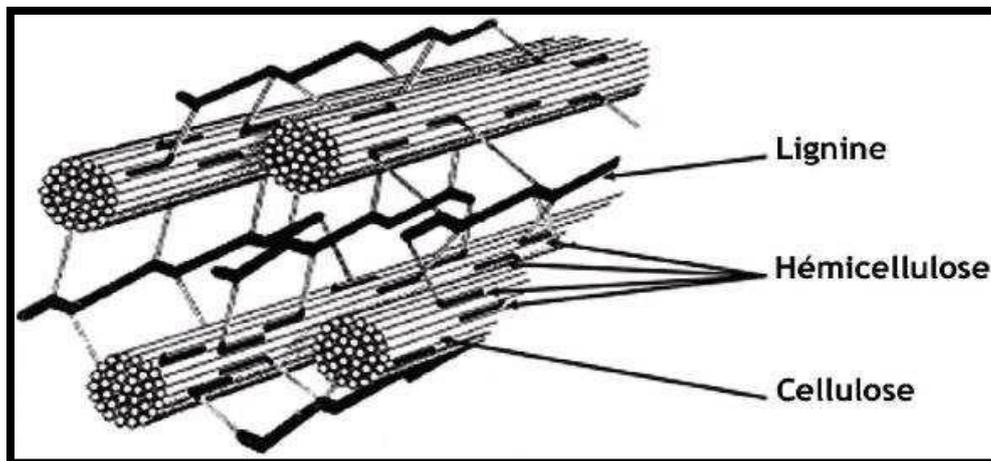


Figure 1 Structure de la biomasse lignocellulosique (Shleser *et al.*, 1994).

2.1.1- Cellulose

La cellulose est le composant principal de la biomasse lignocellulosique. C'est le biopolymère le plus abondant sur Terre. Il s'agit d'un homopolymère linéaire constitué d'unités de glucose liées entre elles par des liaisons β -1,4 glycosidiques au sein de structures cristallines appelées microfibrilles. Ces chaînes peuvent être liées les unes aux autres par des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes et des forces de van der Waals (Dashtban *et al.*, 2009). Les microfibrilles peuvent être empilées les unes sur les autres pour créer une structure cristalline très récalcitrante (figure 2) (Liu *et al.*, 2011).

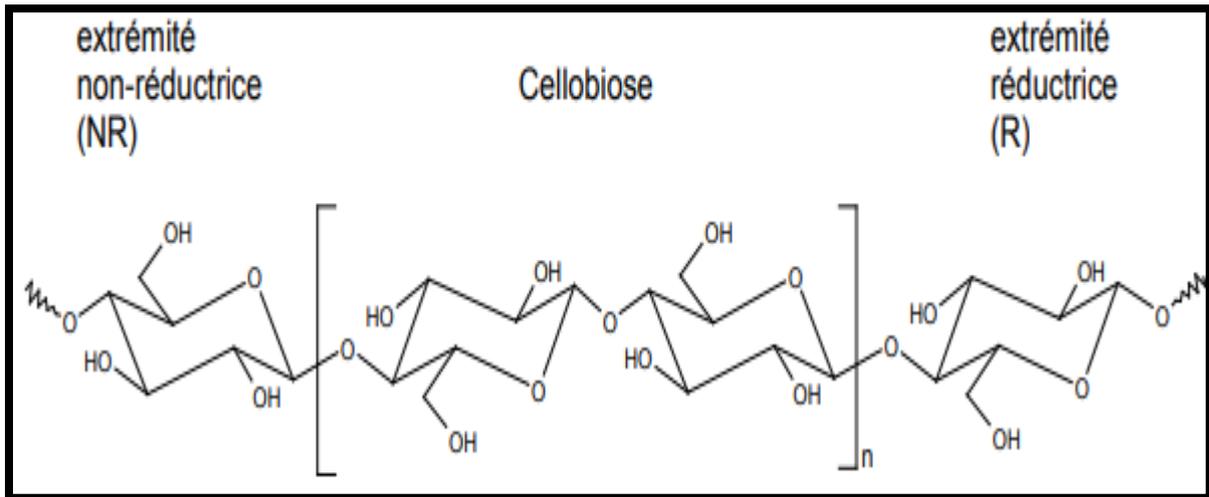


Figure 2 Représentation de la molécule de cellulose (Mazza, 2009)

2.1.2-Lignine

La lignine est la troisième composante majeure de la biomasse lignocellulosique et la composante principale de l'espace intercellulaire (figure 3). Elle est considérée comme une macromolécule réticulée composée principalement de trois alcools aromatiques: l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Dashtban *et al.*, 2009). C'est la matière la plus récalcitrant de la biomasse lignocellulosique (Raulo, 2016). Son rôle est de renforcer la structure de la paroi pour lui donner de la rigidité et agisse ainsi comme protecteur contre les enzymes dégradant la paroi cellulaire (Dodd et Cann, 2009).

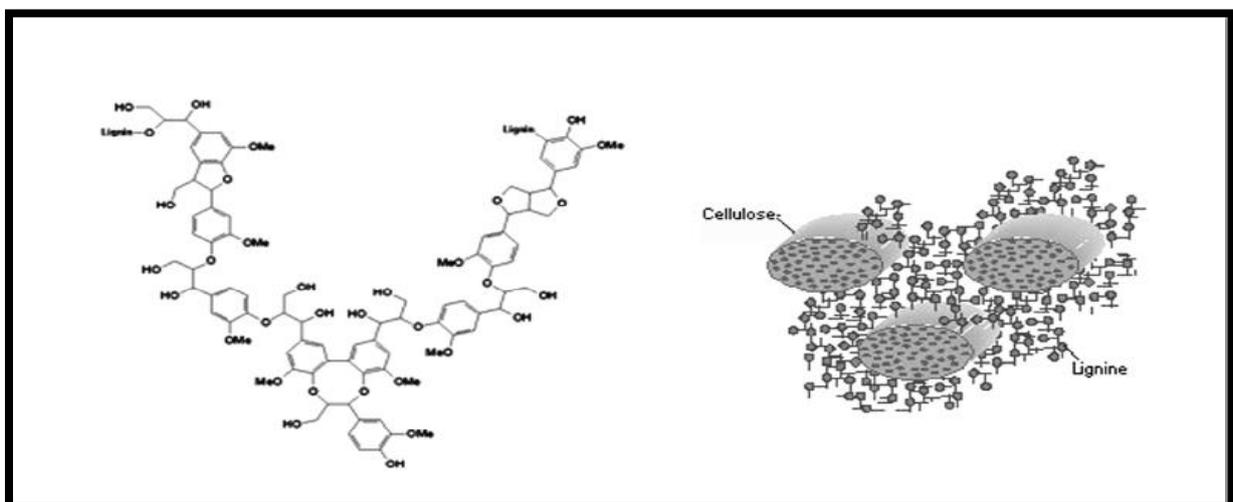


Figure 3 Structure de la lignine (Mussatto *et al.*, 2012).

2.1.3-Hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides (sucres majoritaires), complexes, linéaires ou ramifiés de faible Degré de Polymérisation (DP) (entre 150 et 200) (Mirande, 2009; Chauve, 2011). Alors que, les homopolysaccharides sont des hémicelluloses minoritaires, à savoir les xylanes, les glucanes et les mannanes (Joseleau, 1980). Le xylane représente le sucre le plus abondant des hémicelluloses et constitue par des monomères de xylose (Juhász *et al.*, 2005; Seiboth et Metz, 2011). Les hémicelluloses sont liées à la lignine, formant une structure très rigide par les groupes acétyles hémicellulosiques (figure 4)(Dodd et Cann, 2009).

Les hémicelluloses sont synthétisées à partir de nucléotides-sucres par des Glycosyl Transférases (GTs), localisées dans les membranes de Golgi et transportées à la paroi par des vésicules sécrétoires (Wertz, 2011). La majorité des enzymes impliquées dans la synthèse de polysaccharides hémicellulosiques sont des protéines membranaires intrinsèques (Somerville *et al.*, 2004). Les hémicelluloses sont très hydrophiles et se dégradent assez facilement par des traitements acides ou alcalins (Dashtban *et al.*, 2009).

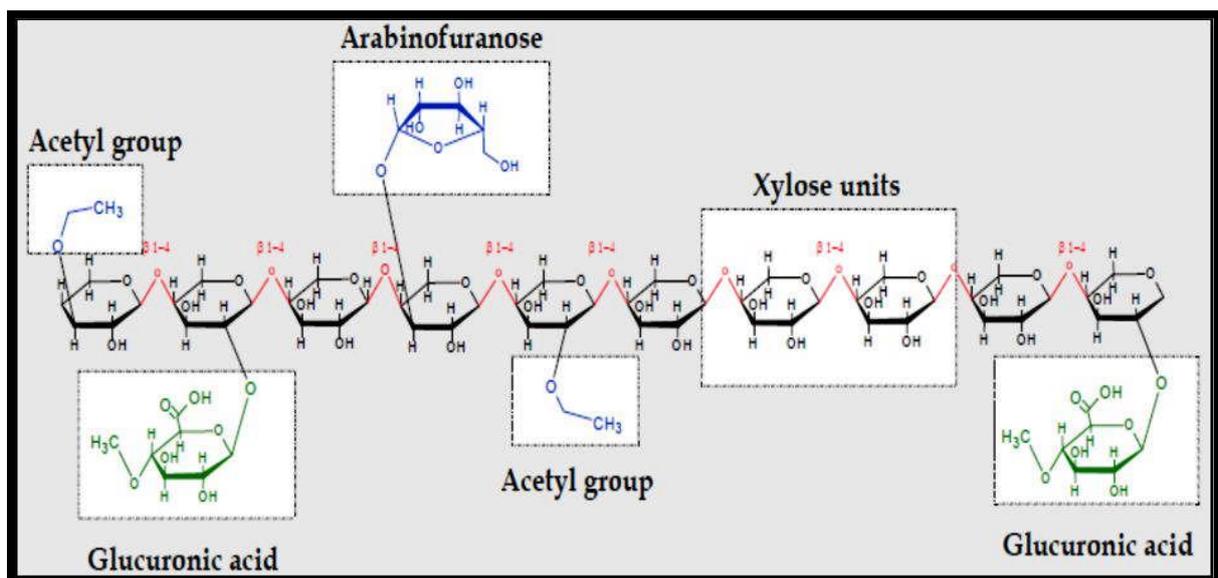


Figure 4 Structure hypothétique d'un hémicellulose (Mussatto *et al.*, 2012).

Les différents hétéropolysaccharides qui constituent l'hémicellulose sont présentés dans le tableau 1 (Joseleau, 1980).

Tableau 1 Groupes d'hémicellulose de la paroi végétale

Groupes	Hémicelluloses	Type de liaisons dans la chaîne principale
Xylanes	Arabinoxylanes 4-O-méthyl glucuronoxylanes Galactoarabinoxylanes Hétéroxylanes complexes	β (1-4)
Mannanes	Galactomannanes Glucomannanes Galactoglucomannanes	β (1-4)
Galactanes	acides de Galactanes	β (1-4) et β (1-6)
Arabinogalactanes	Glucuronoarabinogalactanes	β (1-3) et β (1-6)
Glucanes	Glucanes	β (1-6) et β (1-4)

2.1.3.1- Xylanes

La structure de base des xylanes est représentée par un squelette linéaire d'unités de xylose reliées entre elles par des liaisons β -(1-4) et le degré de polymérisation se situe entre 100 à 200 unités de xylose (Béguin et Aubert, 1994). Ces liaisons portent la plupart du temps des ramifications monomériques de type D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-glucose, D-galactose et de l'acide glucuronique. Selon la nature de ces substituant, ces polymères sont appelés arabino-xylanes, galacto-xylanes, glucurono-xylanes (Seiboth et Metz, 2011). La structure du xylane comporte diverses chaînes latérales telles que les groupements acétyl-arabinofuranosyl et méthyl-glucuronyl sur les quelles viennent se greffer des composés aromatiques (acide ferulique et acide para-coumarique) (figure 5)(Georis *et al.*, 2000 ; Dodd et Cann, 2009 ; Knob *et al.*, 2010).

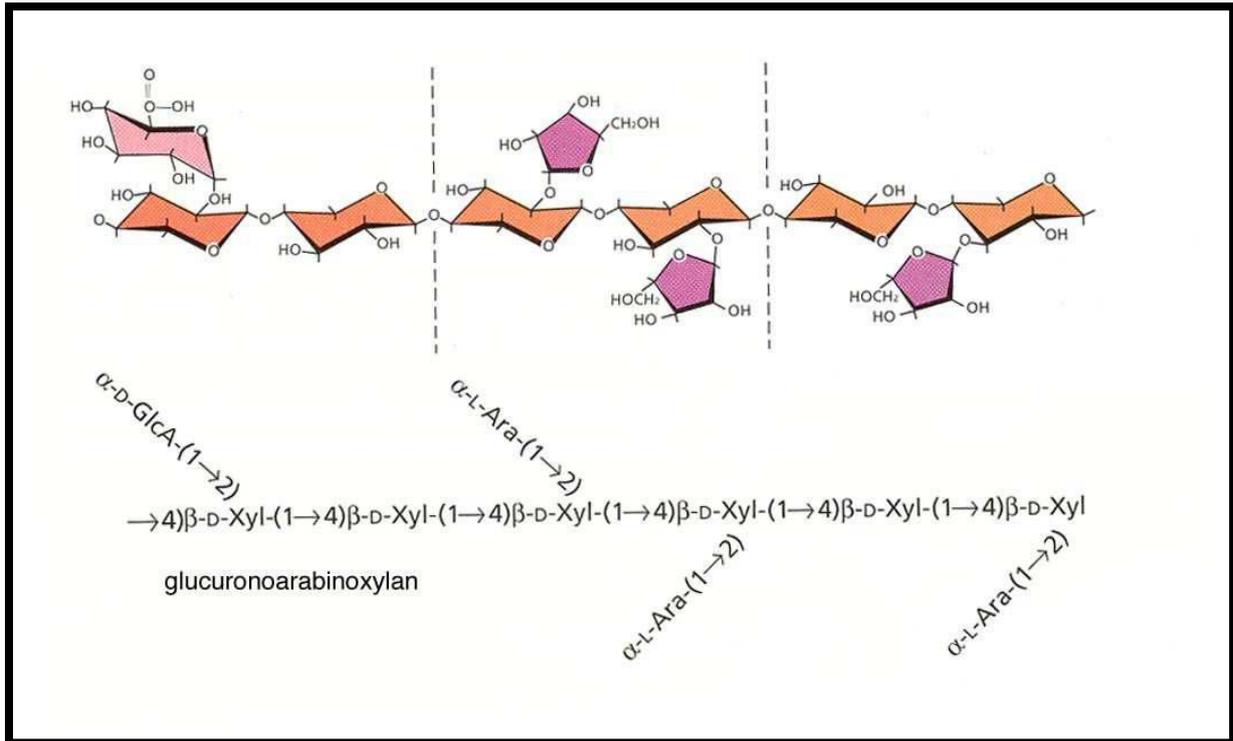


Figure 5 Structure de xylane (Haberre, 2014).

2.2- Principaux déchets et coproduits lignocellulosiques

Les déchets lignocellulosiques sont produits en grandes quantités par les différents secteurs comme la foresterie, la papeterie, l'agriculture et l'agroalimentaire, en plus de divers déchets ménagers (tableau2). L'accumulation de grandes quantités de cette biomasse dans la nature constitue une source de pollution organique qui nuit à l'environnement (Howard *et al.*, 2003). Les déchets issus de différents secteurs représentent le potentiel le plus important en biomasse et constituent actuellement un enjeu considérable, compte tenu de leur niveau de production élevé et de leur impact sur l'environnement (Yuan *et al.*, 2008).

Tableau 2 Composition chimique et production mondiale des principaux déchets Ligno-Cellulolytiques (L.C) (Dashtban *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2011).

	Composition (%)			Production mondiales (tonne/an)
	Cellulose	Hémicellulose	Lignine	
Résidus				–
Bagasse de canne à sucre	32-44	27-32	19-24	317-380.10 ⁶ (2005)

Paille de blé	29-35	26-32	16-21	154-185. 10 ⁶ (2006)
Paille d'orge	31-34	24-29	14-15	35-42.10 ⁶ (2006)
Paille de riz	31	24	18	157-188.10 ⁶ (2005)
Résidus de banane	13.2	14.8	14	13-15.10 ⁶ (2007)
Rafle de maïs	45	35	15	159-191.10 ⁶ (2005)
Coque d'arachide	45-55	25	28-30	9.5.10 ⁶ (2011)
Noyaux de datte	42	17.5	11	938.10 ³ (2011)
Pulpe de café	40-55	25-40	18-30	–
Papier journal	35	46.3	18.8	–

La biomasse lignocellulosique est répartie en deux grandes catégories ; la biomasse humide et la biomasse sèche (Didderen *et al.*, 2008).

2.2.1- Biomasse humide

La biomasse humide Regroupe les coproduits des industries agroalimentaires et les déchets d'origine agricole. Les principaux coproduits sont la paille des céréales, rafles et épis de maïs, balles de riz et d'avoine, son de blé et de riz, bagasse de canne à sucre, bagasse de manioc, différents tourteaux des graines et fruits oléagineux (soja, arachide, Coprah), pulpes de fruit, etc (Mussatto *et al.*, 2012).

2.2.2- Biomasse sèche

La biomasse sèche regroupe le bois et ses sous produits mais également les sous produits de l'industrie papetière et les déchets ménagers (Didderen *et al.*, 2008).

2.2.3- Valorisation de l'Alfa comme déchet lignocellulosique

Les différentes exploitations industrielles des végétaux entraînent souvent la formation de quantités considérables de déchets lignocellulosiques, nommés déchets de biomasse. La valorisation de ces déchets implique leur bioconversion en énergie ainsi que d'autres bioproduits (Eloutassi *et al.*, 2014).

Dans le présent travail l'Alfa a été utilisée comme déchet solide lignocellulosique de fermentation afin de produire la xylanase (hémicellulase).

L'Alfa est une herbe vivace typiquement méditerranéenne, qui est caractérisée par sa structure hétérogène, et est constituée principalement de cellulose (40 % – 50 %), de lignine (17,71 % – 24 %), d'hémicellulose (22,15 % – 28 %) et de 5% de cire (Paiva *et al.*, 2007; Bouiri et Amrani, 2010). Par ailleurs, cette espèce xérophile se situe à l'Afrique du Nord (Rhanem, 2009). La répartition territoriale connue est présentée dans le tableau (3):

Tableau 3 Surfaces occupées par les quantités d'Alfa dans quelques pays de l'Afrique du nord (Portail de l'agriculture marocaine, 2002).

Pays du grands Maghreb	Superficie (hectare)
Algérie	4.000.000
Maroc	3.186.000
Tunisie	600.000
Lybie	350.000

Les applications de l'Alfa sont multiples et diversifiées à cause de ses pouvoirs calorifiques supérieurs qui varie de 4666 Kcal/kg pour les brins âgés de un an et de 5160 et 5163 Kcal/kg pour les brins âgés de 2 ans et de 3 ans respectivement, ce qui lui confère un usage énergétique important sous forme de briquettes combustibles en remplacement ou d'appoint au bois de feu (Rhanem, 2009). Aussi, l'Alfa est considéré comme une matière première pour la production de diverses enzymes tel que l'hémicellulase, la cellulase, etc. et le bioéthanol (Semhaoui *et al.*, 2017). Le potentiel du rendement de conversion de l'Alfa en éthanol est élevée (10 kg de fibres d'Alfa engendre 1 litre de biocarburant (Zaafouri *et al.*, 2016).

La classification de cette plante est présentée dans le tableau (4) :

Tableau 4 Classification taxonomique de l'Alfa (*Stipa tenacissima L*)(Catalogue of Life, 2017).

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Tracheophyta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Ordre:	<i>Poales</i>
Famille	<i>Poaceae</i>
Genre	<i>Stipa L</i>
Espèce	<i>Stipa tenacissima L</i>

2.3-Procédés de transformation et de valorisation de la biomasse lignocellulosique

La transformation des sucres issus de la biomasse lignocellulosique permettant de produire une variété de biomolécules d'intérêt. Le glucose est le substrat majeur des micro-organismes, notamment pour la production de certains acides tels que 3- hydroxy propionique et aspartique (Koutinas *et al.*, 2008). Il est également le substrat privilégié pour la synthèse d'alcools, particulièrement l'éthanol, le butanol et le 1,3- propanediol (Clark *et al.*, 2009 ; Gibbons et Hughes, 2009 ; Gírio *et al.*, 2010; Hnain *et al.*, 2011), Ainsi, l'utilisation de pentoses par fermentation est moins courante, mais elle suscite de nombreuses recherches. A titre d'exemple, l'arabinose est réduit en arabinitol (Koutinas *et al.*, 2008). le xylose en xylitol (Carvalho *et al.*, 2007). Par ailleurs, pour maximiser les rendements, la co-fermentation des hexoses et des pentoses a été étudiée, notamment pour la production d'éthanol (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2010). À cet effet, L'utilisation de la biomasse lignocellulosique comme substrat de fermentation permettant la production d'une multitude de molécules aux applications diverses.

Les diverses voies pouvant être mises en œuvre pour transformer la biomasse lignocellulosique sont: les prétraitements biologiques et les prétraitements physico-chimiques (figure 6) (Eloutassi *et al.*, 2014).

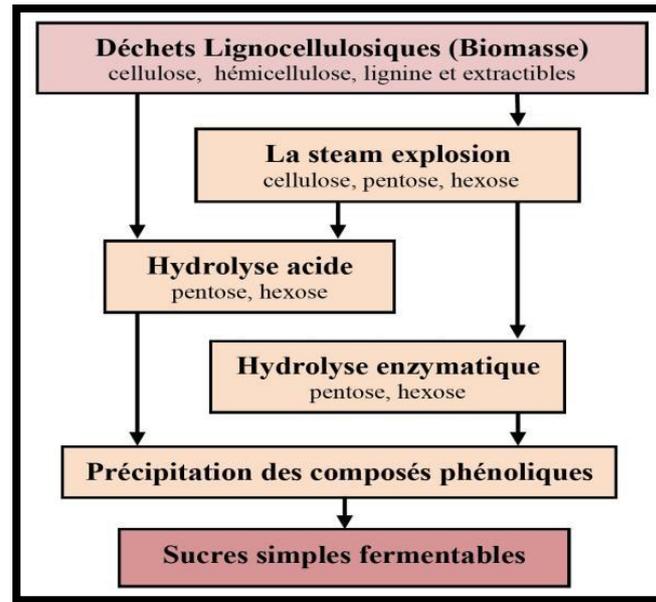


Figure 6 Processus de traitement physico-chimique et biologique de la Biomasse (Eloutassi *et al.*, 2014).

2.3.1- Prétraitements biologiques

Il existe plusieurs microorganismes qui produisent des enzymes de dégradation de la lignocellulose, en l'occurrence les bactéries, les levures, et les moisissures (Morosoli *et al.*, 1986; Morales *et al.*, 1995).

Les champignons qui sont responsables de la pourriture du bois constituent le groupe le plus intéressant pour la production des enzymes xylanolytiques. Et ce, à cause de leur large spectre d'activités (Bakri *et al.*, 2003), aussi, les espèces de la pourriture molle possèdent des capacités de dégrader l'hémicellulose rapidement (Moore *et al.*, 2011). Alors que, les champignons de la pourriture brune dégradent principalement la cellulose pour produire les cellulases. Les pourriture blanche et molle produisent des lignines peroxydase, des polyphénol oxydases et des laccases, capables de dégrader les lignines (Agbor *et al.*, 2011). Malgré la haute efficacité de ces micro-organismes pour délignifier la biomasse lignocellulosique, leur utilisation en tant que prétraitement seul n'est pas envisageable, car les vitesses de conversion sont trop lentes pour une application industrielle (Ochs, 2012).

l'hydrolyse enzymatique par l'utilisation des enzymes lignocellulolytiques, notamment des xylanases, des cellulases, des mannanases, des peroxydases et des laccases peuvent être utilisées lors des étapes de prétraitement comme moyen d'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique (Ramos *et al.*, 2004; Gírio *et al.*, 2010; You *et al.*, 2010). Généralement, les

enzymes, hémicellulases et les cellulases sont utilisées en complément des prétraitements physico-chimiques, pour convertir les oligosaccharides en monomères (Ochs, 2012).

2.3.2- Prétraitements physico-chimiques

L'étape de prétraitement physico-chimique a pour objectifs de séparer la lignine des hémicelluloses en coupant les complexes lignine-sucres, de diminuer la cristallinité de la cellulose et d'augmenter la porosité du matériel lignocellulosique. Ce prétraitement est réalisé par de nombreuses techniques différentes (prétraitements acides, alcalins, auto-hydrolyse et l'explosion à la vapeur, etc) (Kumar *et al.*, 2009).

2.4- Enzyme : hémicellulases

Les hémicellulases est un groupe varié d'enzymes hydrolysant de façon synergique les différentes structures composant l'hémicellulose afin d'obtenir une dégradation complète. Ce sont des protéines modulaires comportant un module catalytique et un module de liaison Carbohydrate Binding Module (CBM), facilitant l'accrochage des enzymes aux polysaccharides insolubles. Les hémicellulases sont présentés sous deux types ; des glycosides hydrolases, hydrolysant les liaisons glycosidiques et des carbohydres estérases, hydrolysant les liaisons ester des acétates ou des acides hydroxycinnamiques des chaînes latérales (Wertz, 2011).

Les similarités dans les séquences et l'hydrophobicité des acides aminés ont permis de classer les glycosyles hydrolases en 87 famille (Henrissat, 1991; Henrissat et Bairoch, 1993 et 1996) la plupart des xylanases connues appartiennent aux familles glycosyle hydrolase (GH10) (figure 7) et GH11, le reste est distribué dans les familles GH5, GH8 et GH43 (Shallom et Shoham, 2003).

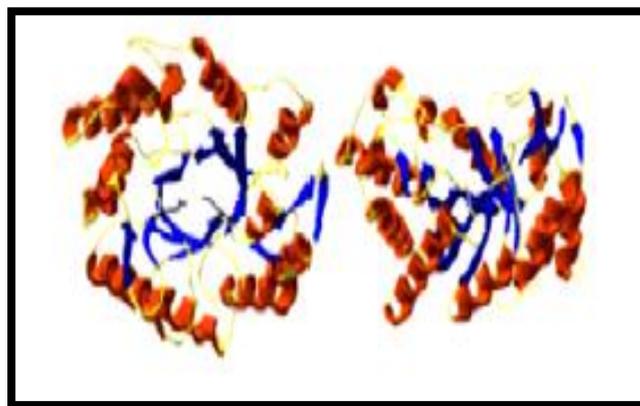


Figure 7 Structure de xylanase de la famille GH10 (Collins *et al.*, 2005).

La plupart des enzymes qui constituent le groupes d'hémicellulases sont les xylanases (EC 3.2.1.8), les β -mannanases (EC 3.2.1.78), les arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) et les β -xylosidases (EC 3.2.1.37) (Musoni *et al.*, 2015). Le xylane est hydrolysé par la xylanase en oligomères, qui sont ensuite dégradés en xylose par la β -xylosidase. De plus, d'autres hémicellulases comme la mannanase et l'arabinase sont également nécessaires à la dégradation complète de hémicelluloses, qui dépend de sa composition chimique (Georis *et al.*, 2000; Bakri *et al.*, 2003).

2.4.1- Xylanase

La xylanase est un glycoside hydrolase qui catalyse des liaisons (1-4)- β -D-xylosidiques dans les xylanes pour libérer du xylose (Beg *et al.*, 2001). Cette enzyme intervient donc dans la dégradation de l'hémicellulose, l'un des constituants principaux des parois cellulaires (Polizeli *et al.*, 2005). Deux types peuvent distinguer l'endoxylanase et l'exoxylanase :

Les endoxylanases β -D-(1,4)-xylane-4-xylanohydrolase (EC 3.2.1.8), dégradent leurs substrats par une attaque intramoléculaire (Moine, 2005). Alors que, Les exoxylanases β -D-(1,4)-xylane xylanohydrolase (EC 3.2.1.37) hydrolysent les polymères de xylose par récurrence à partir de leur extrémité non-réductrice. Les produits d'hydrolyse reflètent en partie la spécificité de ces hydrolases et permettent ainsi de classer les xylanases selon leur mode d'action en trois groupes :

Les endoxylanases ne libèrent pas d'arabinose et hydrolysent les xylanes principalement en xylose, en xylobiose et en oligomères de xylose de degrés de polymérisation supérieure à 2 et d'autres libèrent du L-arabinose (figure 8) et hydrolysent les xylanes principalement en xylose et en xylobiose et excessivement en oligomères de xylose. Tandis que, les exo-xylanases dégradent les xylanes et les xylo-oligosaccharides en libérant principalement du D-xylose par les β -xylosidases (Haberre, 2014).

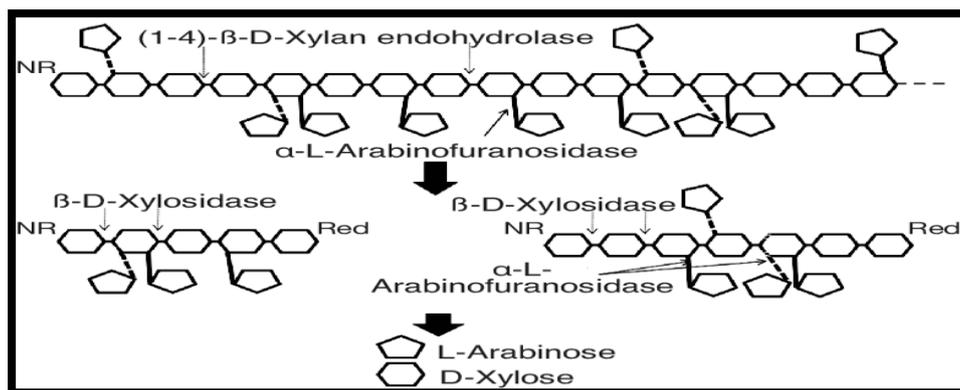


Figure 8 Hydrolyse enzymatique des arabinoxylanes des parois cellulaires (Jamar *et al.*, 2011).

2.4.2- Caractéristiques de xylanase

Selon Bakri *et al.*, (2003), la température optimale d'endoxylanase varie entre 40 et 60 °C. (Kulkarni *et al.*, 1999). La xylanase de bactéries est plus thermostable que la xylanase de moisissures. En général, la xylanase de différents microorganismes est souvent stable sur une gamme de pH 3-10 et montre un optimum de pH dans la gamme 4-7. Les points isoélectriques varient entre 3 et 10. Elle constitue une unité protéique de poids moléculaire variable entre 8-145 KDa. La composition en acides aminés est dominée par les acides aspartique, glutamique, glycine, sérine et thréonine (Bakri *et al.*, 2003 ; Assamoi *et al.*, 2009). Les caractéristiques de certaines xylanases sont mentionnées dans le tableau (5).

Tableau 5 Caractéristiques de certaines xylanases produites par *Aspergillus*.

Xylanase Microorganismes	Température Optimal (°C)	pH Optimal	Référence
<i>Aspergillus kawachii</i>	-	2	(Ito <i>et al.</i> , 1992)
<i>Aspergillus awamori</i>	45	4	(Kormelink <i>et al.</i> , 1993)
<i>Aspergillus nidulans</i>	62	8	(Fernández-Espinar <i>et al.</i> , 1994)

<i>Aspergillus sydowii</i>	60	5.5	(Ghosh et Nanda, 1994)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	50-70	5.6 - 9	(Fujimoto <i>et al.</i> , 1995)
<i>Aspergillus fischeri</i>	60	6	(Raj et Chandra, 1996)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	55	5.5	(Silva <i>et al.</i> , 1999)
<i>Aspergillus niveus</i>	55-65	5–5.5	(Betini <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	65	5	
<i>Aspergillus niger</i>	45	5.0	(Li <i>et al.</i> , 2015)
<i>Aspergillus terreus</i>	45	5.0	(Cunha <i>et al.</i> , 2018)

2.5- Source de xylanase

la xylanase est très répandue dans la nature, elle est produite par des procaryotes et des eucaryotes comme les bactéries marines et terrestres, des bactéries du rumen, des protozoaires, des champignons, des algues marines, des escargots, des insectes et des graines de plantes terrestres et de graines en germination (Annamalai *et al.*, 2009; Walia *et al.*, 2013). Mais, les moisissures sont considérées comme des grands producteurs de nombreux d'enzymes tel que ; cellulases, xylanases, chitinases, amylases, protéases, et d'autres (Braaksma *et al.*, 2010). Parmi les genres producteurs de xylanases: *Aspergillus*, *Neurospora*,

Penicillium, *Neocallimastix*, *Disporotrichum*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Coniothyrium*, *T. lanuginosus*, etc (Kumar *et al.*, 2017). Certaines de ces souches industrielles produisent plus de 100 g/l de cellulases et hémicellulase (Balan *et al.*, 2013).

2.5.1- Genre *Aspergillus*

La plupart des produits commerciaux cellulolytiques ou hémicellulolytiques sur le marché sont obtenus à partir des moisissures du genre *Aspergillus*. Ce dernier sécrète de très grandes variétés d'hémicellulases qui agissent en synergie et ainsi dégradent, en mono ou disaccharides, la totalité des polysaccharides qui les entourent (Botton *et al.*, 1990; Shallom et Shoham, 2003; Prevot, 2013).

2.5.1.1- Caractéristiques et taxonomie

Les champignons du genre *Aspergillus* sont caractérisées par leur forme microscopiques filamenteuses (figure 9) et se développent sur la matière organique en décomposition (Morin, 1994; Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). Elles présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25°C; les espèces thermophiles se développent à 37-40°C est parfois jusqu'à 57°C (Badillet *et al.*, 1987; Morin, 1994).

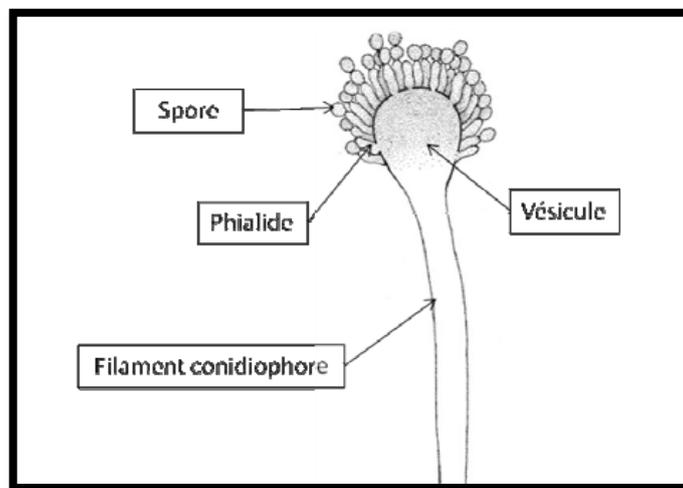


Figure 9 Représentation d'une tête aspergillaire (De Hoog *et al.*, 2000).

La classification du genre *Aspergillus* est résumée dans le tableau (6)

Tableau 6 Classification taxonomique d'*Aspergillus* (catalogue of life, 2019).

Règne	<i>Fungi</i>
Embranchement	<i>Ascomycota</i>

Sous-embranchement	<i>Peizizomycotina</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Ordre	<i>Eurotiales</i>
Famille	<i>Trichocomaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i> spp.

2.6- Application des xylanases

Au niveau industriel, les enzymes sont couramment utilisées particulièrement en raison de la spécificité de leur action et des températures relativement économiques auxquelles elles fonctionnent. Ces raisons en font des catalyseurs très compétitifs face aux procédés chimiques industriels classiques. Certaines enzymes sont utilisées sous forme soluble en milieu homogène et administrées en fin de réaction, d'autres sont immobilisées sur des supports insolubles et inertes permettant une réutilisation répétée et la mise en oeuvre de réacteur en continu (Haberre, 2014).

Les hydrolases constituent 75% du marché mondial des enzymes, dont, les protéases occupent la première place suivies des glycosidases comme les cellulases, les amylases, et les hémicellulases (Paës, 2005). Les xylanases trouvent des applications dans divers domaines industriels tels que la papeterie, l'alimentation animale, la boulangerie, l'industrie du jus, etc (Polizeli *et al.*, 2005).

En papeterie les xylanases rendent les fibres de papier plus accessibles pour le blanchissement chimique réduisant ainsi la consommation du chlore et le besoin en d'autres agents chimiques. Par conséquent, la pollution de l'environnement par les effluents de l'industrie papetière est considérablement réduite (Ryu et Kim, 1997).

Dans le domaine de la boulangerie, les xylanases sont utilisées comme additifs pour améliorer la qualité et le volume du pain en provoquant une meilleure rétention de l'eau (Harris et Ramalingam, 2010).

Dans l'industrie du textile, le dégraissage est réalisé en utilisant des xylanases qui éliminent spécifiquement les impuretés hémicellulosiques, inhibant la finition, le mouillage et la teinture, rendant la fibre textile lisse et souple. Ce procédé est meilleur que le traitement chimique traditionnel non spécifique qui s'opère à des concentrations élevées d'hydroxyde de sodium (Battan *et al.*, 2012).

Dans la pharmacologie, la production de polysaccharides actifs et des alkyl glycosides (Collins *et al.*, 2005).

Les xylanases sont aussi utilisées en combinaison avec d'autres enzymes, et en particulier avec d'autres hydrolases, mais aussi avec des protéases, oxydases, isomérases. L'objectif est de développer l'exploitation de la biomasse végétale (Assamoi *et al.*, 2009) pour produire l'énergie renouvelable (bioénergie) (Collins *et al.*, 2005; Saidi, 2011).

2.7- Fermentation

La fermentation a été largement utilisée pour la production d'une grande variété de substances extrêmement bénéfiques pour les individus et de l'industrie. Au fil des ans, les techniques de fermentation ont acquis une importance considérable en raison de leur coût économique et avantages environnementaux. Les techniques anciennes ont été modifiées et affinées pour optimiser la productivité. Cela a aussi impliqué dans le développement de nouvelles machines et processus. Deux grandes techniques de fermentation sont apparues à la suite de ce développement rapide: la fermentation submergée et la fermentation à l'état solide (Subramaniam et Vimala, 2012). La fermentation est la technique de conversion biologique de substrats complexes en composés simples par divers des microorganismes tels que des bactéries et des champignons. Dans le cadre du cours de cette dégradation métabolique, ils libèrent également plusieurs composés supplémentaires en dehors des produits habituels de fermentation, comme le dioxyde de carbone et l'alcool. Celles-ci des composés supplémentaires sont appelés métabolites secondaires. Les métabolites secondaires vont de plusieurs antibiotiques à peptides, enzymes et facteurs de croissance (Balakrishnan et Pandey, 1996 ; Robinson *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2004).

2.7.1- Fermentation à l'état solide (FS)

La fermentation solide (FS) utilise des substrats solides, comme le son de blé, la paille de blé, etc. La fermentation des substrats solides est opérée pour des périodes très longues. Cette méthode est la meilleure pour les techniques de fermentation impliquant des champignons et des micro-organismes qui nécessitent moins d'humidité. Cependant, il ne peut pas être utilisé dans les processus de fermentation impliquant des organismes qui nécessitent activité de l'eau (aw), élevée, tel que des bactéries (Babu et Satyanarayana, 1996).

2.7.2- Fermentation submergée / Fermentation Liquide (FL)

La fermentation liquide (FL) utilise des substrats liquides à écoulement libre, les composés bioactifs sont sécrétés dans le bouillon de fermentation. Cette technique de fermentation est la mieux adaptée pour des micro-organismes tels que des bactéries nécessitant une humidité

élevée. Un avantage supplémentaire de cette technique est que la purification des produits est plus facile. la FL est principalement utilisée dans l'extraction des métabolites secondaires qui doivent être utilisés sous forme liquide (Subramaniyam et Vimala, 2012).

Le tableau (7) montre une comparaison entre les deux types de fermentations

Tableau 7 Comparaison entre fermentation solide et liquide (Raimbault et Alazard, 1980; Assamoi *et al.*, 2009).

Facteur	Fermentation solide (FS)	Fermentation liquide(FL)
Substrat	Polymère insolubles	Substrats solubles (sucres)
Eau	Consommation limitée de l'eau ;(aw faible)	Des grands volumes d'eau sont consommés (aw élevée)
pH et Température	Contrôle aléatoire et transfert difficile de la chaleur	Contrôle facile
Aération (O ₂)	Aération facile et diffusion rapide de l'oxygène	Faible solubilité de l'(O ₂) dans l'eau
Fermentation	Fermentation (mode batch)	Fermentation mode batch fed-batch et continu)
Contamination	Risque de contamination, notamment par des espèces de moisissures	Risque de contamination élevée par les espèces microbiennes
Demande énergétique	Besoin énergétique faible	Consommation élevée d'énergie
Biomasse	Inséparable du substrat	Facilement séparable
Produit	Concentré	Très dilué

*Matériel et
Méthodes*

3- Matériel et méthodes

La présente étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri, Constantine1). Elle rentre dans le cadre de la valorisation de la biomasse ligno-cellulosique. En effet, la souche *Aspergillus sp (S3)* (fournie par le même laboratoire cité au-dessus), a été caractérisée pour ses performances de production de xylanase et ce, sur deux milieux différents, en l'occurrence : un milieu synthétique à base de xylane et un deuxième naturel à base de l'Alfa Algérienne (*Stipa tenascissima*).

3.1-Caractères cultureux et morphologiques de la souche(S3)

3.1.1- Observation macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique consiste en une observation à l'œil nu des différents caractères phénotypiques des souches tels que la taille, la texture, la couleur de la colonie et la vitesse de développement sur des milieux de culture riches et appropriés pour le développement des moisissures (Camille, 2007). Dans le présent travail, le milieu Yeast-Peptone-Glucose-Agar (YPGA) a été utilisé pour effectuer cette observation (Annexe 1).

3.1.2- Observation microscopique

L'observation microscopique de la souche *Aspergillus sp (S3)* a permis de visualiser des formes relatives aux têtes Aspergillaires et aux filaments conidiophores. Cette observation a été faite à l'aide d'un microscope optique.

3.1.2.1- Observation microscopique à l'état frais

Pour préparer un frottis humide, une anse de platine a été utilisée pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon a été prélevé sur la bordure de la colonie où les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. De plus, les structures qui peuvent renfermer les spores, près du centre de la colonie, où la probabilité de trouver des spores à maturité est plus grande, ont été aussi prélevées (Garg *et al.*, 2010).

Par la suite, les deux prélèvements ont été apportés et émulsionnés dans une gouttelette d'eau distillée préalablement déposée sur une lame. Enfin, le tout a été couvert par une lamelle et une observation, à l'aide d'un microscope optique, a été faite à l'objectif (x40), tout en augmentant le contraste petit à petit et en gardant une forte intensité lumineuse

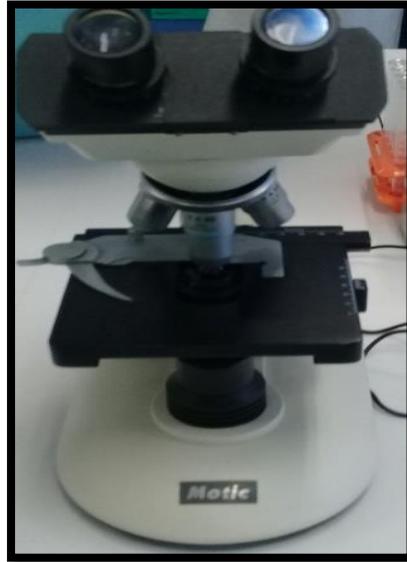


Figure 10 Microscope optique.

3.1.2.2- Observation microscopique avec coloration

Cet examen repose sur la méthode classique suivante : les frottis utilisés ont été étalés à l'aide d'une anse de platine sur des lames en verre propres. Les lames ont été ensuite séchées à l'air, à proximité d'un bec bunsen, puis fixées par la chaleur en les passant deux ou trois fois sur la flamme. Les frottis préparés ont été colorés pendant 2 minutes au bleu de méthylène (un colorant acide qui colore les membranes callosiques ainsi que le contenu cytoplasmique des hyphes)(Lachapelle, 2004). Ensuite, ces frottis ont été décolorés par lavage à l'eau du robinet, séchés par le papier filtre et examinés au microscope optique. Généralement, un examen à l'objectif X40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (Breton, 1990).

3.1.2.3- Réactivation et conservation de la souche (S3)

La(S3) a été réactivée en boîte de pétri sur milieu YPGA (Annexe 1) et incubée à 30 °C pendant 48h, pour effectuer le reste du travail. La méthode de conservation des souches fongiques la plus utilisée et la plus simple consiste à repiquer les souches en tube sur gélose inclinées comme PDA, YPGA, etc. Les cultures obtenues sont par la suite incubées à 30 °C pendant 3 à 4 jours pour permettre une croissance maximale puis stockées à 4°C (UI-Haq *et al.*, 2002).

3.2- Mise en évidence de l'activité xylanolytique (hémicellulosique) de la souche (S3) sur milieu solide à base de xylane

Afin de détecter l'activité xylanolytique directement sur milieu solide, la souche (S3) a été repiquée sur le milieu à base de xylane de maïs (1%) (Annexe 1)(Holker *et al.*, 2004), après 5 jours d'incubation à 30°C l'activité a été révélée par le colorant rouge Congo (Annexe 3) (Ahirwari *et al.* 2017), suivi du lavage des boîtes gélosées avec du NaCl (1 M) (Annexe3). L'activité de la xylanase a été calculée en mesurant l'indice enzymatique (IE) dont ; $IE = \frac{\text{diamètre de zone de lyse}}{\text{diamètre de colonie}}$ (Florenco *et al.* 2012).

3.3- Méthodes de fermentation

La fermentation est une technique de conversion biologique de substrats complexes en composés simples par divers microorganismes. Ces composés sont appelés métabolites comme ; les antibiotiques, les peptides, les enzymes, les acides, etc (Deb et Vimala, 2018).

Deux types de fermentation ont été utilisés dans le présent travail en l'occurrence : la fermentation submergée sur milieu synthétique à base de xylane de maïs ; et la fermentation solide sur milieu naturel à base de l'Alfa Algérienne *Stipa tenascissima*.

3.3.1- Fermentation liquide sur milieu à base de xylane de maïs

3.3.1.1- Préparation du milieu de fermentation

Afin d'étudier la production de xylanase par la souche (S3), un milieu de culture de base composé essentiellement de xylane de maïs a été utilisé (Annexe 1). Le milieu a été réparti dans des flacons (10 flacons) de 250 mL contenant 100 mL de milieu, puis stérilisé à 121°C pendant 20 min.

3.3.1.2- Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été réalisé par introduction de quatre colonies pures de la souche (S3) dans des tubes contenant de l'eau peptonée (Annexe 1). Les tubes ont été vortexés et les solutions obtenues sont servi d'inoculum pour la fermentation.

3.3.1.3- Comptage des spores

Le comptage ou la numération cellulaire est la détermination du nombre des cellules contenues dans un volume précis d'un milieu liquide. Pour ce faire, 0.1ml de l'inoculum obtenu précédemment, a été déposé sur le quadrillage de la cellule de comptage Malassez et recouverte par sa lamelle, et ce, à l'aide d'une micropipette. Ensuite, l'observation

microscopique a été effectuée pour compter le nombre de spores présent dans les petits carrés de la cellule Malassez (figure 11).

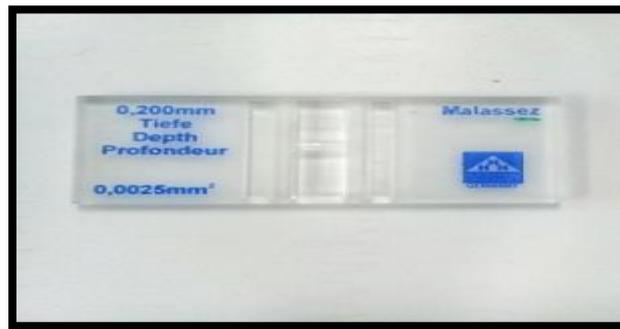


Figure 11 Cellule de comptage Malassez.

La formule suivante a été appliquée pour trouver le nombre de cellule dans un volume donné

$$N = n / V$$

Dont, N : nombre de cellules par litres, n : nombre de cellules comptées, V : volume de comptage.

Si la solution a été diluée : la formule est la suivante $N = (n / V) \times f$, sachant que f est le facteur de dilution.

3.3.1.4- Inoculation et incubation

Les 10 flacons préparés précédemment, ont été inoculés par 1 ml de suspension sporale (10^6 cellule/ml). Des échantillons ont été prélevés toutes les 24h, pour faire les analyses et le suivi des différents paramètres (biomasse, pH et l'activité xylanolytique). Ensuite, cinq flacons ont été incubés dans un incubateur agité (KS 4000 i control) à 30°C sous une agitation de 140 rpm et les cinq dans le même incubateur mais à 37°C (figure 12).



Figure 12 Dispositif expérimental : Incubateur agité.

3.3.1.5- Méthodes analytiques

A- Biomasse

Après fermentation, la masse mycélienne a été séparée du milieu de culture par filtration (figure 13) en utilisant un papier filtre wattman n°1 préalablement pesé, cette dernière est mise dans une étuve (BINDER) à 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant



Figure 12 Filtration de la masse mycélienne par papier filtre wattman n°1.

B- pH

Au cours de la fermentation, la mesure du pH a été effectuée sur le filtrat de culture et ce, après la séparation de la biomasse. Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Jenway) (figure 13).

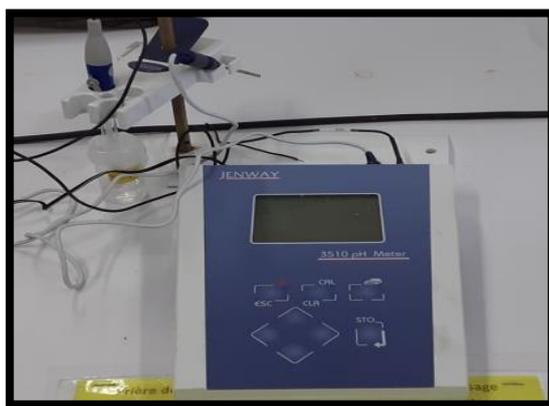


Figure 13 pH- mètre

C- Activité enzymatique

La plupart des méthodes de détermination de l'activité des glycosides hydrolases repose sur l'analyse des sucres réducteurs (SR) formé à la suite de la scission enzymatique de la liaison glycosidique entre deux glucides ou entre un glucide et un fragment non glucidique. D'après la littérature, plusieurs méthodes sont appliquées pour le dosage des SR à savoir ; méthode spectroscopique, méthode chromatographique et méthode viscométrique (Miller, 1959; Colombatto et Beauchemin, 2003; Gusakov *et al.*, 2011).

Il est important de signaler que dans le présent travail, le dosage des sucres réducteurs pour mesurer l'activité xylanolytique a été effectué, préalablement, par la méthode du DNS, et comme cette méthode n'a pas bien fonctionné, vu la réaction initiale établie entre le xylane et le DNS. A cet effet, une autre méthode colorimétrique, celle de Nelson-Somogyi (NS) (Nelson, 1944; Smogyi, 1952) a été utilisée.

- ***Préparation de la courbe d'étalonnage***

La courbe d'étalonnage (Annexe 3) a été effectuée comme suit : une série des dilutions de 1ml, 0.5ml, 0.25ml, 0.13ml, 0.06ml et 0.03ml d'une solution étalon de xylose à 0.25 g/l ont été mis dans des tubes à essais, puis le volume de chaque tube a été ajusté à 1 ml avec de l'eau distillée, ensuite 1 ml de réactif au cuivre de Somogyi(Annexe 3) a été ajouté (figure 15A). Les tubes fermés ont été placés au bain-marie (100°C) pendant 40 minutes puis refroidis sous un courant d'eau ensuite dans chaque tube, 1 ml de réactif d'arsénomolybdate de Nelson(Annexe 3) a été ajouté (figure 15B). La solution a été soigneusement mélangée et incubée pendant 10 min à la température ambiante. La réaction a été stoppée en ajoutant 7 ml d'eau distillée (figure 15 C).

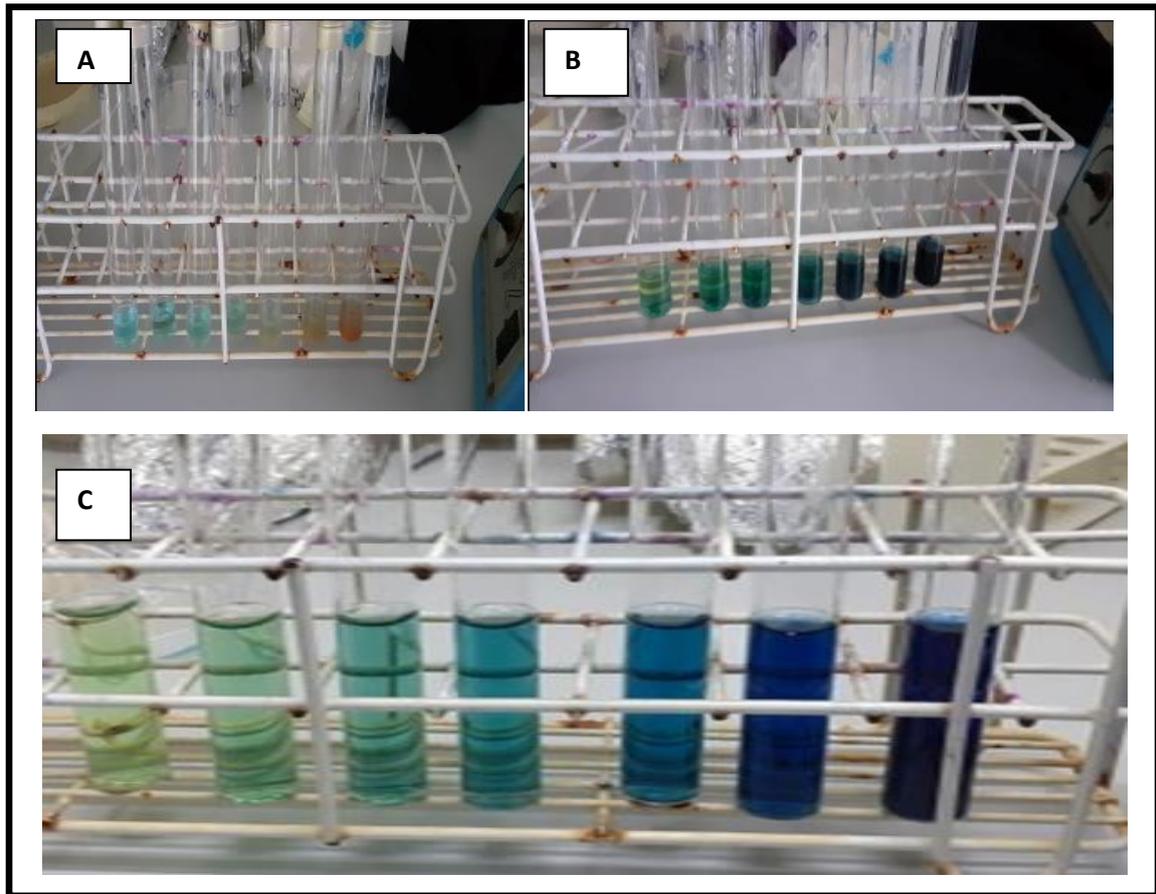


Figure 15 Dosage de sucre réducteur par la méthode (NS) : (A), Réaction de sucre réducteur avec réactif Somogyi ; (B), Réaction de sucre réducteur avec réactif Nelson ; (C), Réaction stoppée par l'ajout de l'eau.

L'absorbance a été mesurée à 610 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (figure 16).



Figure 16 Spectrophotomètre

- **Détermination de l'activité enzymatique**

L'activité a été mesurée selon la méthode de Nelson-Somogyi en suivant le protocole mentionné par (Gusakov *et al.*, 2011) avec quelques modifications ; Un mélange réactionnel contenant 200 μ l de filtrat enzymatique et 800 μ l du substrat 0.1% (0.1g de xylane dissous dans 100 ml de tampon citrate-phosphate 50 mM (pH 6,5), a été incubé à 40 °C pendant 5 minutes, et ensuite additionnée par 1 ml de réactif (cuivre de Somogyi). Les tubes ont été placés dans un bain-marie pendant 40 minutes à 100°C. Après refroidissement sous un courant d'eau, 1 ml de réactif d'arsénomolybdate de Nelson a été ajouté dans chaque tube. Le mélange a été incubé pendant 10 min (température ambiante) puis stoppé par l'ajout de 6 ml d'eau distillée. Le blanc a été traité de la même manière que le mélange réactionnel sauf que l'enzyme et le substrat ont été séparés et que la quantité nécessaire de substrat ou d'enzyme a été complétée par l'eau distillée. Les absorbances ont été mesurées à 610 nm. Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme ayant libéré 1 μ mol / ml d'équivalents de xylose par minute à 40 °C et pH 6.5. L'activité xylanolytique est calculée selon la formule suivante (1) ;

$$AE = (m / mM) / (V \times T) \times D = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} = \text{UI} / \text{ml} \dots (1)$$

AE = activité enzymatique.

m= la masse de xylose libéré (mg).

mM= la masse molaire de xylose (0.15013 mg/ μ mol).

V= le volume de filtrat enzymatique testé (0.2 ml).

T= le temps d'incubation du mélange réactionnel (5min).

D= facteur de dilution (10).

La mesure de la productivité finale entre l'activité enzymatique et la biomasse produite a été déterminée selon la formule suivante :

$$P = p_E / p_X = UI/mg$$

$$p_E = (AE_f - AE_0) / (t_f - t_0) = UI/ml/h$$

$$p_X = (X_f - X_0) / (t_f - t_0) = mg/ml/h$$

P= productivité d'enzyme par rapport la productivité de biomasse

p_E = productivité d'enzyme final par rapport au temps

p_X = productivité biomasse final par rapport au temps

3.3.2- Production de xylanase par la souche (S3) sur milieu naturel à base de l'Alfa

Afin de tester la capacité de la souche (S3) à se développer sur un milieu naturel solide à base de l'Alfa comme seule source de carbone (Annexe 1), la méthode de (Botella *et al.*, 2007) a été appliquée avec quelques modifications ; des milieux de fermentations contenant (6.25 g d'Alfa dans 25 ml d'eau distillé) ont été lancés. La stérilisation du milieu a été faite pendant 15 min à 120°C. Après cette période les fioles ont été inoculées par une concentration sporale de 1.84×10^7 spore/ml. L'incubation a été faite dans un incubateur statique à une température de 30°C pendant 15 jours. Le dosage de l'activité enzymatique a été réalisé à la fin de la période de fermentation (15 jours).

L'activité xylanolytique de la souche (S3) obtenu par fermentation solide sur un milieu à base de l'Alfa, a été mesurée par la même méthode NS citée précédemment après l'addition de 10 ml d'eau distillée aux milieux de culture à la fin du période d'incubation, pour récupérer l'enzyme, ensuite, le contenu de la culture est séparé de l'alfa et de la biomasse par filtration (figure 17).



Figure 17 Filtration de biomasse

La mesure de la productivité finale du produit a été déterminée.

Résultats

4- Résultats

Le présent travail porte sur l'étude de la production de xylanase par une souche de moisissure xylanolytique du genre *Aspergillus sp* (S3) et ce, dans le but de valoriser la biomasse lignocellulosique. La stratégie de la présente étude repose sur deux axes principaux à savoir ; la fermentation liquide dans un milieu à base de xylane de maïs et la fermentation solide dans un milieu à base de l'Alfa Algérienne (*Stipa tenascissima*) comme seule source de carbone.

4.1- Caractères cultureux et morphologiques de la souche (S3)

4.1.1- Observation macroscopique

Les résultats obtenus de l'observation macroscopiques de la souche (S3) ont montré que, cette dernière est de forme plate, veloutée, constituée de courts filaments aériens blancs. Le recto de la boîte présente une couleur blanche puis bleu-vert virant ensuite au vert foncé à gris noirâtre (figure 18 ; A et C), et son verso est beige jaunâtre (figure 18 ; B et D).

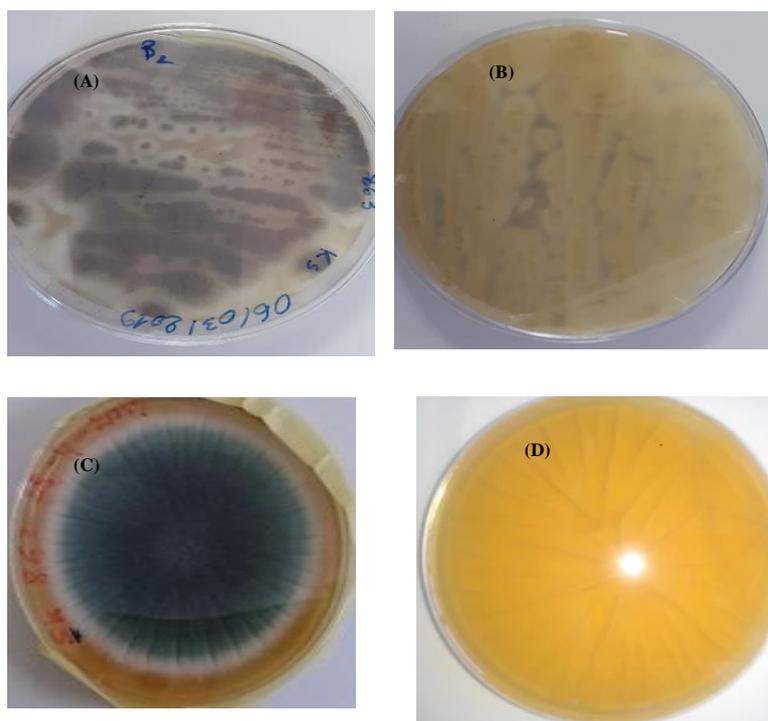


Figure 18 Aspect macroscopique de la souche (S3), ensemencée sur milieu YPGA en stries (A) recto, (B) verso ; et par piqure centrale (C) recto, (D) verso

4.1.2- Observation microscopique

L'observation microscopique, a permis de déterminer la structure du filament ainsi que, les conidiophores et les spores de la souche (S3) (figure 19).

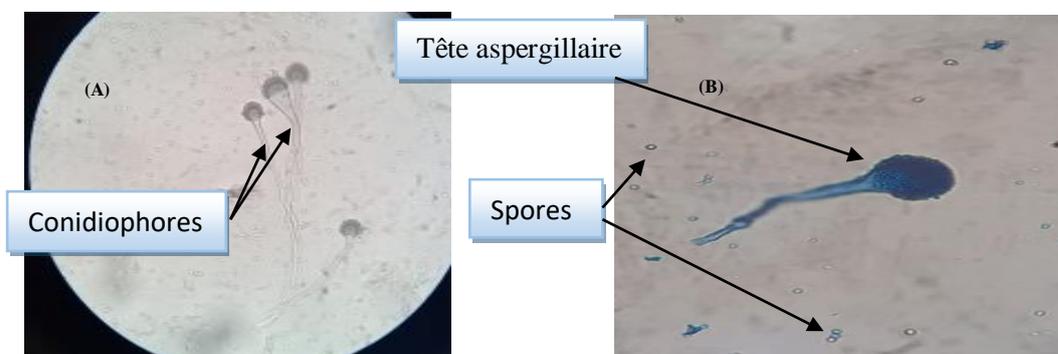


Figure 19 Observation microscopique de la souche (S3) : (A), état frais et (B), état coloré avec bleu de méthylène (G:10x40)

La souche (S3) est caractérisée par un filament mycélien septé et ramifié, des conidiophores courts, non cloisonnés, lisses et incolores avec évasement progressif au sommet et une vésicule hémisphérique ; des conidies globuleuses et petites ; et une tête aspergillaire unisériée en colonne compacte assez grande ; quant aux phialides, elles sont directement portées par la vésicule.

Ces caractères montrent clairement les caractères cultureux et morphologiques de la moisissure étudiée *Aspergillus sp* (S3).

4.2- Mise en évidence de l'activité xylanolytique de la souche (S3) sur milieu solide à base de xylane de maïs

Après 5 jours d'incubation à 30°C, la souche (S3) a montré un développement sur le milieu solide à base de xylane (figure 20A), le diamètre de la colonie est de 56.5 mm. Après coloration avec le rouge Congo et le lavage avec le NaCl 1M, un halo clair d'hydrolyse de 2 mm est apparu autour des colonies (Figure 20B). Le calcul de IE, exprimant le diamètre de la zone de lyse (60.5) sur le diamètre de colonie (56.5) est de **1.0708**.

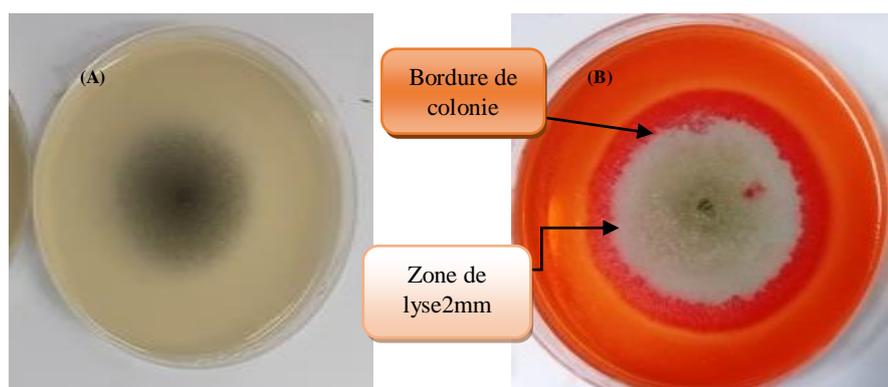


Figure 20 Mise en évidence de l'activité xylanase de la souche (S3) sur milieu solide à base de xylane : (A) avant coloration, (B) après coloration

Ces résultats montrent clairement la présence de l'activité enzymatique xylanolytique de la souche (S3).

4.3- Méthodes de fermentation

4.3.1- Fermentation liquide dans un milieu à base de xylane

Dans le but de tester la capacité de la souche (S3) à se développer dans un milieu submergé et à produire l'enzyme xylanase, des fermentations en fioles de 250 ml, contenant 100ml de milieu de culture composé essentiellement de xylane comme source de carbone, ont été lancées. Les résultats obtenus, pendant toute la période d'incubation (120h), ont montré, que l'aspect de la souche (S3) est sous forme de pellettes pour les deux cultures 1 et 2 incubées dans les incubateurs agités (140 rpm) à 30°C « CI30 » et 37°C « CI37 », respectivement. La formation des spores est repérée dès les premières 24h, elle s'est manifestée par l'apparition d'une croute flottante sur le milieu de culture (tableau 8).

Tableau 8 Aspect de la souche (S3) cultivée sur milieu liquide à base de xylane

Temps	Culture 1 Incubateur 30°C « CI30 »	Culture 2 Incubateur 37 °C « CI37 »
24 h		
48 h		
72 h		

Temps	Culture 1 Incubateur 30°C « CI30 »	Culture 2 Incubateur 37°C « CI37 »
96 h		
120 h		

Au cours de la fermentation liquide des deux cultures, un suivi de la cinétique de production de la biomasse, du pH et de l'activité enzymatique de la souche (*S3*), a été effectué chaque 24h. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

A- Biomasse

La croissance de la souche (*S3*), cultivée dans CI30, commence par une courte phase de latence, suivie d'un démarrage de la croissance pendant les 24 heures, où la mesure de la biomasse enregistre une valeur de 1.772 mg/ml. Puis une augmentation rapide caractérisée par un poids maximal de 11.815 mg/ml a été noté au bout de 96 h de fermentation, après cette période, la croissance se ralentit et cesse d'augmenter pour enregistrer une valeur de 9.323

mg/ml à la fin de fermentation (120 h). Tandis que, la cinétique de production de la biomasse de la souche (S3) cultivée dans CI37, a montré seulement deux phases de croissance (une phase exponentielle pendant 72h et une phase stationnaire durant les 48h qui suivent). Le poids maximum (11.146 mg/ml) a été enregistré au bout de 120 h (figure 21).

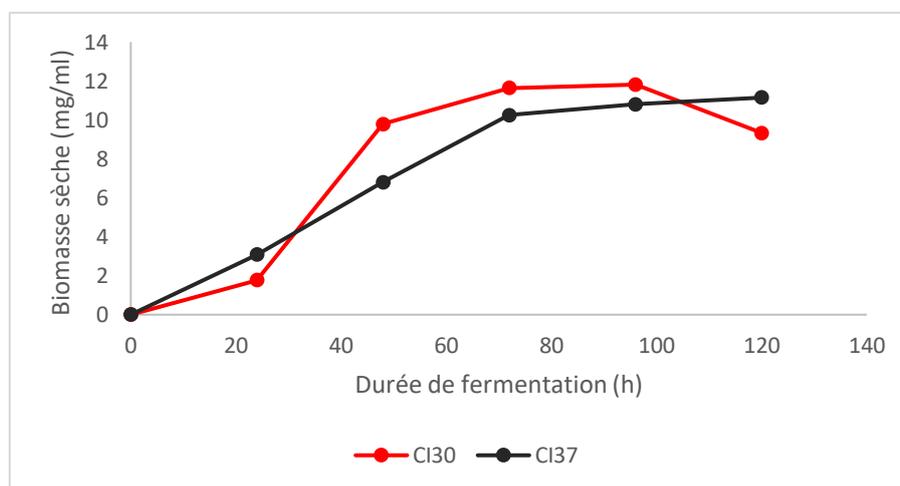


Figure 21 Suivi de l'évolution de la biomasse de la souche (S3) dans les deux cultures : CI30 et CI37.

A partir des résultats obtenus, le meilleur rendement en biomasse est observé dans le cas d'incubation de la souche (S3) à 30°C.

B- pH

Les résultats du suivi de l'évolution du pH de milieu de fermentation de la souche (S3) sont présentés dans la figure (figure 22). Quand la souche (S3) a été incubée dans « CI30 », une légère diminution du pH a été enregistrée après les premières 24h (de 6.5 à 6.38), suivi immédiatement par une augmentation du pH pour atteindre une valeur de 8.6 au bout des 120h. Ce pendant, le pH de milieu de fermentation de la souche (S3) incubée dans CI37 a augmenté progressivement dans le temps, jusqu'à atteindre une valeur de 8.32 à la fin de la période d'incubation.

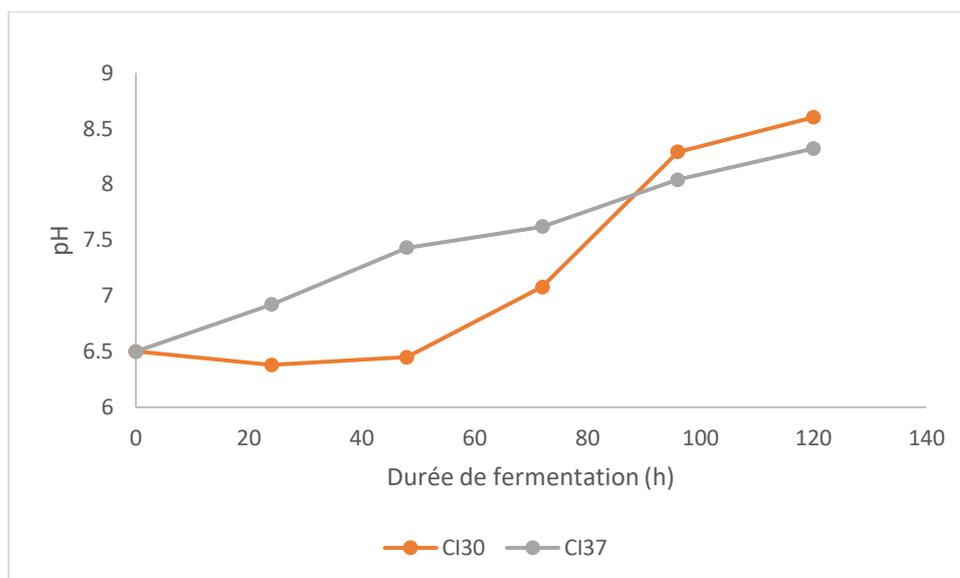


Figure 22 Suivi de l'évolution du pH de milieu de fermentation de la souche (S3) dans les deux cultures : CI30 et CI37.

D'après ces résultats, le pH du milieu de fermentation des deux cultures (CI30 et CI37) s'alcalinise toujours à la fin de la durée d'incubation.

C- Activité enzymatique

L'objectif de la recherche de l'activité enzymatique xylanolytique dans le milieu de fermentation est de déceler le pouvoir de dégradation du xylane par la souche (S3), étant donné que cette enzyme catalyse la dégradation de ce substrat.

Les résultats de suivi de l'activité xylanolytique ont prouvé que l'enzyme est sécrétée dans le milieu dès le début de la fermentation pour les deux cultures. Dans la CI30, la production de la xylanase augmente progressivement pour atteindre la valeur maximale (4.92 IU/ml), à 72h de fermentation et se stabilise après cette période. Ce pendant, dans la CI37, la cinétique de production de xylanase montre que la souche (S3) a présenté une activité maximale de (4.36 UI/ml) à 72 h. Après cette période une diminution a été enregistrée pour atteindre la valeur de 3,63 UI/ml à la fin de fermentation (120 heures) (figure 23).

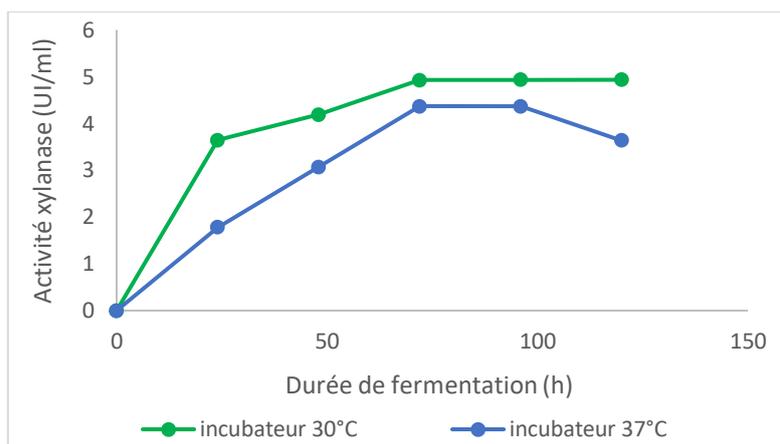


Figure 23 Activité xylanase de la souche S3 sur milieu à base de xylane

Dans le but d'évaluer les performances du processus fermentaire de la souche S3, la productivité finale de la fermentation submergée des deux cultures a été déterminée (figure 25) en calculant le rapport entre l'activité enzymatique et la biomasse formées (figures 24).

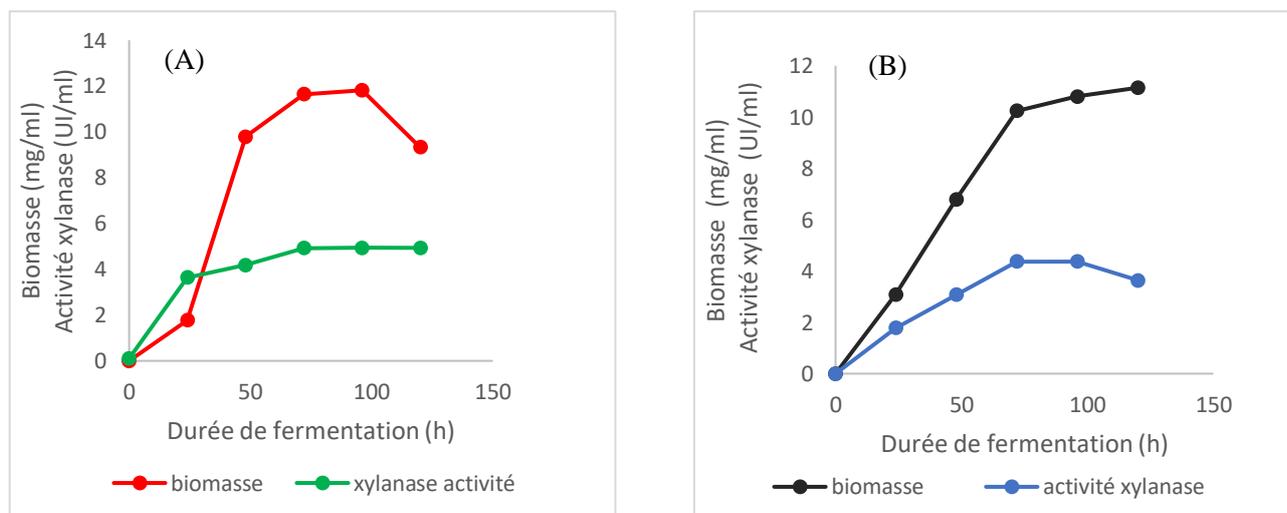


Figure 24 Variation de biomasse et d'activité xylanolytique de la souche (S3). A, dans la culture d'incubateur à 30°C, B, dans la culture d'incubateur à 37°C

Les résultats obtenus ont montré que la meilleure productivité finale de la souche (S3) est obtenue dans le cas d'incubation à 30°C (0,5292 UI/mg) vs (0,3260 UI/mg), dans le cas d'incubation à 37°C (figure 25).

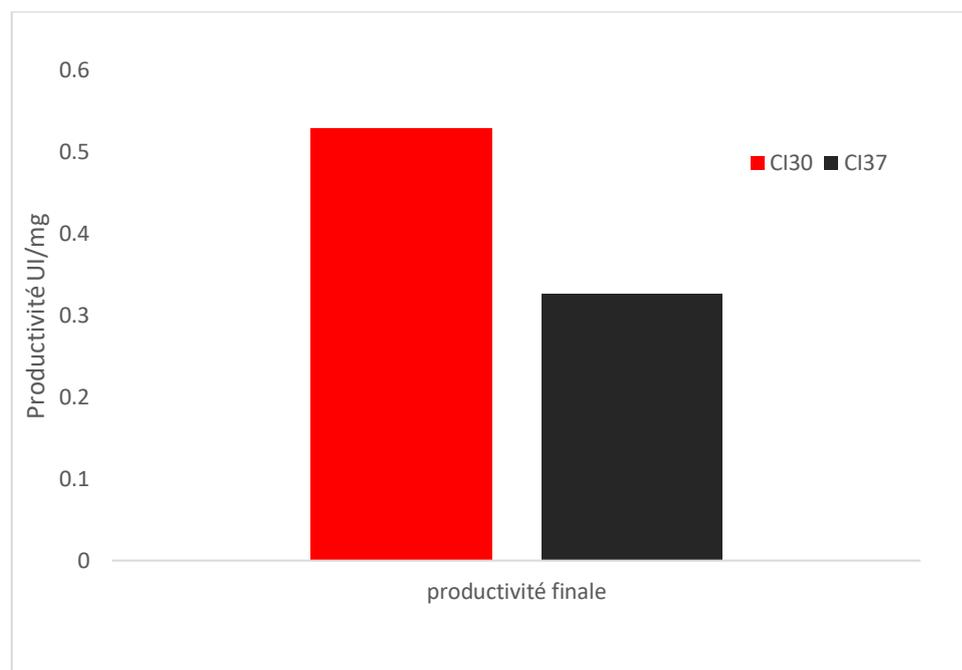


Figure 25 Productivité finale de la souche (S3) dans les deux cultures (CI30 et CI37)

4.3.2- Production de la xylanase par la souche (S3) sur milieu naturel solide à base de l'Alfa

L'utilisation de l'Alfa dans cette étude est motivée par sa richesse en hémicellulose notamment le xylane. La capacité de développement de la souche (S3) sur milieu de culture préparé à base d'Alfa comme seule source de carbone est due à son pouvoir de sécrétion des enzymes lignocellulosique tell que la xylanase. Les résultats obtenus à la fin de fermentation, ont montré que l'aspect de la souche (S3) est représenté par une grande colonie bleu-verte occupant toute la surface de milieu (figure 26).

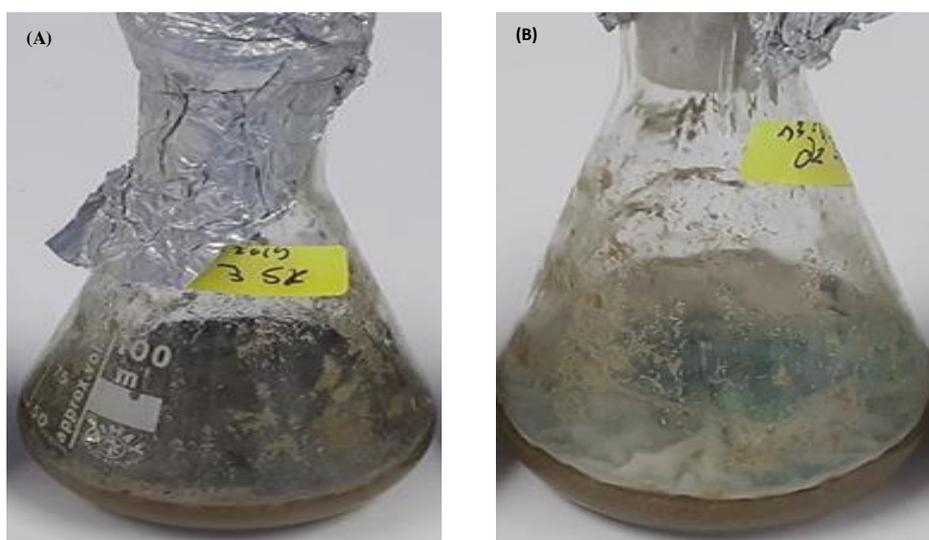


Figure 26 Fermentation solide de la souche (S3) avant l'incubation (A) et après 15 jours de fermentation (B)

Concernant l'activité enzymatique, la production de xylanase sur ce substrat est de **14.12 UI/ml (± 0.0148)** (au bout de 15 jours). Ce résultat, considéré préliminaire et ouvre la voie sur l'exploitation ultérieure de l'Alfa comme substrat du milieu de fermentation pour la production des enzymes lignocellulosique par la souche (S3). La productivité finale calculée après 15 jours de culture était de l'ordre de 0.0392 UI/ml/h.

Discussions

4-Discussions

Les lignocelluloses en tant que résidus agricoles, industriels et forestiers représentent la majorité de la biomasse totale présente dans le monde. Il s'agit d'une ressource renouvelable avec un potentiel de bioconversion important. L'accumulation de grandes quantités de cette biomasse chaque année entraîne à la fois la pollution de l'environnement et la perte de matières potentiellement précieuses qui pourraient autrement être traitées pour produire de l'énergie, des denrées alimentaires, des aliments pour animaux ou des produits chimiques (Howard *et al.*, 2003; Kim et Dale, 2004; Wen, 2004).

Les travaux de recherche publiés sur le prétraitement des biomasses lignocellulosiques à des fins de valorisation énergétique ont été principalement orientés vers les processus de fermentation à savoir la production d'éthanol de seconde génération (Dashtban *et al.*, 2009 ; Liu, 2015). Par ailleurs, l'usage d'agents chimiques (acides, bases, solvants) et la consommation élevée d'énergie pour assurer le prétraitement de la biomasse lignocellulosiques justifient le développement de techniques alternatives permettant de réduire les coûts et de minimiser les impacts environnementaux (Lee *et al.*, 2014 ; Liu, 2015). Les prétraitements biologiques et notamment fongiques sont attractifs sur ces critères car peu énergivores et nécessitant des conditions opératoires raisonnables en termes de consommation de réactifs. Ces traitements biologiques sont basés sur les propriétés hydrolytiques de nombreuses espèces microbiennes, qui se caractérisent par un large spectre enzymatique leur conférant la capacité d'hydrolyser les polymères constitutifs de la biomasse lignocellulosique (Liu, 2015). L'*Aspergillus* est une moisissure largement utilisée en industries grâce à son potentiel de sécrétion de très grandes variétés des enzymes notamment les cellulases et les xylanases (Dashtban *et al.*, 2009).

Dans ce contexte, la présente étude vise à étudier la production de laxylanase, par la souche fongique *Aspergillus sp. (S3)* (Fournie par le laboratoire LaMyBAM), et ce, sur deux milieux différents, en l'occurrence ; un milieu synthétique à base de xylane et un deuxième naturel à base de l'Alfa Algérienne (*Stipa tenascissima*).

La pureté de la souche a été vérifiée par l'observation macroscopique et microscopique de cette dernière. Les résultats obtenus ont montré que l'aspect macroscopique de la souche est sous forme d'une colonie bleu-vert à vert-gris, veloutées, à bordure blanche et revers jaune. Alors que l'observation microscopique a révélé la présence de filaments hyalins cloisonnés, ramifiés, petites conidies globuleuses et une tête aspergillaire unisériée en colonne. Ces

caractères confirment clairement que c'est une moisissure du genre *Aspergillus* (Schmidt et Wolff, 1997 ; Steinbach *et al.*, 2006).

Dans cette étude, les résultats de la mise en évidence de l'activité xylanolytique de la souche (S3) sur milieu solide à base de xylane de maïs ont montré un bon développement de cette souche sur ce substrat, ce qui prouve sa capacité de production de xylanases, enzymes responsables de la dégradation de xylane d'une part, et que le xylane de maïs est un bon inducteur de la synthèse de ces enzymes d'autre part. De plus, la révélation de l'activité par le rouge de Congo bien détecté une zone de lyse claire de 2 mm autour des colonies. Le colorant rouge de Congo s'attache sur la liaison β - (1,4) des polymères glucidiques pour donner la couleur rouge et comme cette liaison représente le site d'action des xylanase, les produits de cette action ne réagit pas avec ce réactif ce qui explique l'apparition de la zone claire autour des colonies. La souche (S3) a enregistré un indice enzymatique de l'ordre de 1.0708, sur ce milieu solide à base de xylane de maïs. Les travaux de (Saroj *et al.*, 2018) sur les moisissures lignocellulosique montrent qu'une variété de souches fongiques ont la capacité de produire les xylanases sur milieu solide à base de xylane où l'indice enzymatique d'*Aspergillus fumigatus* JCM 10253 (**1,18**) et celle de *Fusarium. Verticillioides* (**1,09**) présentaient les indices enzymatiques les plus performants suivis par celui de *Eurotium rubrum* (IE 1,08), *Fomitopsis africana* (IE 1,08), *Aspergillus sp.* (IE 1.03), *Aspergillus nomius* (IE 1.03), *P. pulmonarius* (IE 1.03) et *Aspergillus terreus* (IE 1.02).

La comparaison de ces indices avec celui de la souche (S3) révèle que cette dernière a une bonne activité xylanolytique.

Concernant la cinétique de croissance de la souche (S3) sur milieu à base de xylane durant 120h dans un incubateur à 30°C (CI30) et 37°C (CI37), les résultats obtenus ont révélé que le meilleur rendement en biomasse a été enregistré avec la culture de l'incubateur à 30°C (11.815mg/ml après 96h). Reeves *et al.* (2004) ont étudié le suivi de biomasse de cinq isolats d'*Aspergillus* cultivées sur un milieu essentiel minimal (MEM) pendant 96h à 37°C et ont montré que la phase de croissance exponentielle a commencé à 12 h et s'est étendue jusqu'à 48 h. La phase stationnaire a été atteinte au bout de 72 heures environ, avec une biomasse supérieure pour *A. fumigatus* ATCC 16424 (1,0 mg / ml de culture).

L'allure de la courbe de croissance de la souche (S3) à 37°C ressemble beaucoup à celle d'*A. fumigatus* étudié par ces chercheurs sauf que la phase exponentielle de la souche (S3) dure un peu plus long que celle d'*A. fumigatus* et le rendement en biomasse de (S3) à 96h est plus

important (10.8mg/ml de culture). Ce contraste est à cause du substrat utilisé (xylane) dans le milieu de culture qui est considéré plus riche que celui dans le milieu de *Reeves*.

Le suivi du pH de milieu de fermentation des deux cultures a montré que celui de CI37 a augmenté seulement au fil du temps par contre celui des de CI30 a subi une légère diminution dans les premières 24h. La variation de pH de milieu est liée directement avec les réactions métaboliques du microorganisme, selon Botton *et al.*, (1990) et Raimbault, (1998) une baisse de pH est souvent due à une libération d'acides organiques qui acidifient progressivement le milieu, la hausse pH par contre est souvent imputable à la dégradation des protéines et des acides aminés qui libèrent de l'ammoniaque.

Dans cette étude, les résultats de la cinétique de synthèse de la xylanase dans le milieu submergé à base de xylane de maïs par la souche (*S3*) ont révélé la sécrétion de xylanase dans le milieu dès le début de la fermentation, et la meilleure activité xylanolytique a été enregistrée (4.92 IU/ml), à 72h dans l'incubateur à 30°C. L'activité enzymatique estimée dans le présent travail est considérée comme étant importante par comparaison aux résultats de la littérature, publiés dans le même domaine. L'activité des xylanases de *Aspergillus glaucus* à 30°C pendant 8 jours dans la MS liquide (Mandels et sternburg) contenant 0,3% de bagasse de canne à sucre comme substrat, a été mesuré après 30 min d'incubation à 50°C et pH 4 ; l'activité est apparue le deuxième jour et a atteint une valeur maximale (16,3 U / ml), selon (Tao *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'activité maximale de la xylanase (7.5 U/ml) est obtenue par la fermentation d'*Aspergillus fumigatus* à 30 ° C pendant 9 jours dans un milieu liquide à base de xylane, à 45°C et pH 8, elle est observée le septième jour (Bajaj et Abbass, 2011)

Dans le présent travail, le dosage préalable de l'activité xylanolytique a été fait par la méthode DNS, dans laquelle plusieurs défauts ont été rencontrés. En effet, les résultats obtenus en appliquant cette méthode ont montré des réactions initiales entre le xylane et le DNS quise traduit par coloration dense et noirci, même pour les blancs. La méthode alternative choisie est la méthode NS, celle-ci est réalisée en s'assurant que la concentration en substrat est bien supérieure à celle de l'enzyme et en définissant les limites de la linéarité de la réponse colorimétrique à l'activité de l'enzyme (Cole et Sheehan, 2000). Cependant, les temps d'incubation ne doivent être ni trop courts ni trop longs (Colombatto et Beauchemin, 2003). Bailey *et al.* (1992) ont conclu qu'une période d'incubation de 5 min était appropriée pour la détermination de l'activité de la xylanase.

La dégradation du xylane selon la méthode NS provoque l'apparition de groupements réducteurs qui réduisent le sulfate de cuivre en oxyde cuivreux qui réduit à son tour le réactif

arséinomolybdique de Nelson avec formation du complexe arséinomolybdeux molybdique stable de coloration bleue, mesurable au spectrophotomètre à 650nm (Nelson, 1944; Somogyi, 1952). Bien que, l'analyse par la méthode DNS est plus rapide, moins toxique et connu approximativement étant dix fois moins sensible que la méthode de NS, elle ne fournit pas des données stœchiométriques significatives dans le cas de polymères de xylane étant donné que ce dernier est un polysaccharide instable d'une part et qu'une surestimation des activités de glucidases est enregistrée dans les conditions de test établies par la méthode DNS d'autre part (Breuil et Saddler, 1985 ; Chan *et al.*, 1989 ; Gusakov *et al.*, 2011).

Les résultats de la fermentation solide de la souche (S3) dans le milieu naturel à base d'Alfa comme seule source de carbone et d'azote, dont l'activité enzymatique est de 14.12 IU/ml, (à la fin de la période de fermentation) ont montré la capacité de cette souche à produire des xylanases sur ce déchet naturel. En effet, selon David *et al.* (2011), l'Alfa constitue une source riche et complexe d'éléments nutritifs idéaux pour les champignons filamenteux et peut constituer un déchet valorisable pour la production de divers métabolites à savoir ; les alcools et les enzymes. Ceci laisse suggérer la possibilité de l'exploitation ultérieure de l'Alfa pour la production des enzymes lignocellulolytiques à l'échelle industrielle

Il est important de signaler qu'il est difficile de déterminer directement la biomasse à partir d'un milieu de fermentation solide, car il est pratiquement impossible de séparer la biomasse du substrat de fermentation. En revanche plusieurs chercheurs ont donné de l'importance de ce type de fermentations, en particulier pour la dégradation enzymatique de la biomasse lignocellulosique en raison des avantages économiques et pratiques tels que la simplicité, les faibles coûts d'investissement pour l'équipement, etc (Pandey *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2002; Holker *et al.*, 2004).

*Conclusion et
perspectives*

6- Conclusion et perspectives

Les moisissures appartenant au genre *Aspergillus* sont largement connues pour leur capacité à produire différents types de métabolites bioactifs tels que ; les antibiotiques, les acides et les enzymes. Ces dernières possèdent une très grande importance dans le domaine médical, alimentaire, pharmaceutique, etc.

Le présent travail rentre dans le cadre de valorisation de la biomasse ligno-cellulosique. En effet, son objectif principal était de caractériser les performances de production de xylanases par la souche *Aspergillus sp* (S3), fournie par le laboratoire LaMyBAM.

L'analyse et l'interprétation des résultats des tests macroscopiques et microscopiques effectués sur cette souche ont bien confirmé qu'il s'agit d'un *Aspergillus sp*.

Dans cette étude, une mise en évidence de l'activité xylanolytique de la souche (S3) sur milieu synthétique solide à base de xylane de maïs a été effectuée. Les résultats obtenus ont montré un bon développement de cette souche sur ce substrat et aussi une zone de lyse très claire. Il a été conclu de cette partie que la souche *Aspergillus sp* (S3), a la capacité de produire les xylanases enzymes responsables de la dégradation de xylane d'une part, et que le xylane de maïs a provoqué une bonne induction de la synthèse de ces enzymes d'autre part.

Le taux de croissance de la souche *Aspergillus sp* (S3) sur milieu liquide à base de xylane de maïs ainsi que l'activité enzymatique maximale enregistrés (4.92 vs.4.36 mg/ml, et 0,5292 UI/mg vs. 0,326 UI/mg, dans IC30 et IC37, respectivement) ont bien confirmé le test semi-qualitatif de mise en évidence de l'activité xylanolytique de la souche sur milieu solide à base de xylane.

Par ailleurs, le test préliminaire de la production de xylanases par *Aspergillus sp* (S3), sur milieu de culture préparé à base d'Alfa comme seule source de carbone et dont l'activité enzymatique était de 14.12 UI/ml a bien montré que l'exploitation ultérieure de cette dernière, comme source de biomasse lignocellulosique dans la production industrielle de xylanases est possible.

De nombreuses perspectives résultent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies nécessaires concernant plusieurs points, à savoir :

- 1- Optimisation du milieu de fermentation par l'utilisation de l'Alfa comme seule source de carbone et d'azote pour la production de xylanase par cette souche ;

- 2- Purification et caractérisation des xylanases ;
- 3- Applications industrielles de xylanases dans les différents domaines biotechnologiques.

Résumé

Dans cette étude, la souche *Aspergillus sp* (S3) (Fournie par le laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'activité Microbienne (LaMyBAM)), a été caractérisée pour ses performances de production de xylanase sur deux milieux différents, en l'occurrence : un milieu synthétique à base de xylane et un deuxième milieu naturel à base de l'Alfa Algérienne (*Stipa tenascissima*) et ce, dans le but de valoriser la biomasse ligno-cellulosique.

La pureté de la souche (S3) a été vérifiée par l'étude macroscopique et microscopique. Les résultats obtenus confirment les caractères cultureux et morphologiques de cette souche. La mise en évidence de l'activité xylanolytique de la souche (S3) sur milieu synthétique solide à base de xylane de maïs a été effectuée. Les résultats obtenus ont montré un bon développement de cette souche sur ce substrat et aussi une zone de lyse claire de 2 mm de diamètre autour des colonies. La cinétique de production de la biomasse et de l'activité enzymatique de la souche (S3), sur milieu liquide à base de xylane de maïs, a révélé que le taux de croissance cellulaire optimale est de 11.815 mg/ml après 96 heures de fermentation pour l'incubateur IC30 et 11.146 mg/ml à 120 h pour l'incubateur IC37. Par ailleurs, la production enzymatique maximale atteint 4.92 U/ml après 72 heures de fermentation, enregistrant une productivité maximale de 0,5292 UI/mg dans l'incubateur IC30 et 4.36 U/ml après 72 heures avec un rendement de 0,3260 UI/mg dans l'incubateur IC37.

L'utilisation de l'Alfa comme seule source de carbone et d'azote, pour la production de xylanase par *Aspergillus sp*. (S3) a abouti à l'obtention d'une quantité considérable de cette enzyme (14.12 UI/ml) atteignant une productivité totale de 0.0392 UI/ml/h à la fin de la période de fermentation. Ceci ouvre, désormais, la voie sur l'exploitation industrielle de ce déchet naturel.

Mots clés : *Aspergillus*, Fermentation, Xylane, *Stipa tenascissima*, xylanases.

Abstract

In this study, the *Aspergillus sp.* strain (S3) (Supplied by the Laboratory of Mycology, Biotechnology and Microbial Activity (LaMyBAM)), was characterized for its xylanase production performance on two different media, namely a synthetic medium based on xylan and a second natural medium based on Algerian Alfa (*Stipa tenascissima*), in order to enhance ligno-cellulose biomass.

The purity of the strain (S3) was verified by macroscopic and microscopic study. The results obtained confirm the cultural and morphological characteristics of this strain. The detection of the xylanolytic activity of the strain (S3) on solid synthetic medium based on corn xylane was carried out. The results obtained showed a good development of this strain on this substrate and also a clear lysis zone of 2 mm in diameter around the colonies. The kinetics of production of the biomass and maximum enzymatic activity of the strain (S3), on a liquid medium based on corn xylane, revealed that the optimal cellular growth rate is 11.815 mg/ml after 96 hours of fermentation for the IC30 incubator and 11.146 mg/ml at 120 h for the IC37 incubator. In addition, enzymatic production reaches 4.92 IU/ml after 72 hours of fermentation, with a maximum productivity of 0.5292 IU/mg in the IC30 incubator and 4.36 IU/ml after 72 hours with a yield of 0.3260 IU/mg in the IC37 incubator.

The use of Alfa as the only source of carbon and nitrogen for the production of xylanase by *Aspergillus sp.* (S3) resulted in a considerable amount of this enzyme (14.12 IU/ml) reaching a total productivity of 0.0392 IU/ml/h at the end of the fermentation period. This now paves the way for the industrial exploitation of this natural waste.

Key words: *Aspergillus*, Fermentation, Xylane, *Stipa tenascissima*, xylanases.

ملخص

أثبتت الدراسة ان *Aspergillus sp (S3)* التي تم توفيرها من قبل مختبر الفطريات والتكنولوجيا الحيوية والنشاط الميكروبي (LaMyBAM)، تتميز بإنتاج xylanase في بيئتين زراعتين مختلفتين ، وهما: وسط اصطناعي يعتمد على xylane والآخر وسط طبيعي يحتوي أساسا على الحلفاء (*Stipa tenascissima*) وهذا ، من أجل استغلال الكتلة الحيوية اللينوسيلوليزية.

تم التحقق من نقاء سلالة (S3) عن طريق الدراسة الماكروسكوبية والميكروسكوبية للخصائص المورفولوجية. من تم قمنا بتنفيذ عرض توضيحي لنشاط إنزيم xylanase للسلالة (S3) على وسط اصطناعي صلب يحتوي على xylane. حيث أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها النمو الجيد للسلالة على هذه الركيزة حيث أوضحت منطقة التحلل xylane بقطر 2 ملليمتر حول (S3). كشفت إنتاج الكتلة الحيوية والنشاط الأنزيمي للسلالة (S3) ، على الوسط السائل xylane، أن معدل نمو *Aspergillus sp* هو 11.815 ملغ / مل بعد 96 ساعة من التخمير. للحاضنة IC30 و 11.146 ملغ / مل عند الساعة 120 للحاضنة IC37. بالإضافة إلى ذلك، يصل إنتاج الإنزيم إلى 4.92 وحدة / مل كحد أقصى بعد 72 ساعة من التخمير ، مما يسفر عن إنتاجية قصوى تبلغ 0.5292 وحدة / ملغ في الحاضنة IC30 و 4.36 وحدة / مل بعد 72 ساعة بمعدل إنتاج قدره 0,3260 وحدة / ملغ في الحاضنة IC37.

استخدام الحلفاء كمصدر وحيد للكربون والنيتروجين ، لإنتاج xylanase بواسطة *Aspergillus sp (S3)* أسفرت على إنتاج كمية كبيرة من هذا الإنزيم (14.12 وحدة دولية / مل) بلاضافة إلى إنتاجية إجمالية قدرها 0.0392 وحدة دولية / مل / ساعة في نهاية فترة التخمير. هذا يفتح الطريق أمام الاستغلال الصناعي لهذه النفايات الطبيعية.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus sp* ، التخمير ، xylane ، *Stipa tenascissima*، xylanase.

*Références
Bibliographiques*

Reference

Agbor, V.B., Sparling, R., Berlin, A., Cicek, N., 2011. Biomass Pretreatment: Fundamentals Toward Application.

Ahirwar S, Soni H, Prajapati BP, Kango N 2017 Isolation and screening of thermophilic and thermotolerant fungi for production of hemicellulases from heated environments. *Mycology* 8(3):125–134.

Annamalai, N., Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., 2009. Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated from marine environment. *INDIAN J BIOTECHNOL* 7.

Assamoi, A.A., Destain, J., Thonart, P., 2009. Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures: le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14.

Babu, K.R., Satyanarayana, T., 1996. Production of bacterial enzymes by solid-state fermentation, *Journal of Scientific and Industrial Research* 55,464–467.

Badillet, G., de Briève, C., Guého, E., 1987. Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique*, vol II, Ed VARIA, Paris.

Bakri, Y., Jacques, P., Thonart, P., 2003. Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105–108, 737–748.

Balakrishnan, K., Pandey, A., 1996. Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* 55, 365–372.

Balan, V., Jin, M., Culbertson, A., Uppugundla, N., 2013. The Saccharification Step: *Trichoderma Reesei* Cellulase Hyper Producer Strains, in: *Lignocellulose Conversion*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 65–91.

Battan, B., Dhiman, S.S., Ahlawat, S., Mahajan, R., Sharma, J., 2012. Application of Thermostable Xylanase of *Bacillus pumilus* in Textile Processing. *Indian J Microbiol* 52, 222–229.

Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 326–338.

Béguin, P., Aubert, J.-P., 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews* 13, 25–58.

Betini, J.H.A., Michelin, M., Peixoto-Nogueira, S.C., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli, M.L.T.M., 2009. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst Eng* 32, 819–824. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0308-y>

Botella, C., Diaz, A., de Ory, I., Webb, C., Blandino, A., 2007. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochem.* 42, 98–101. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.025>.

Botton, B., Brenton, A., Fever, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J., Vayssier, Y., Veau, P., 1990. Moisissure utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2e édition. Masson. Paris.

Bouiri, B., Amrani, M., 2010. Production of dissolving grade pulp from alfa : *BioResources*, *BioRes.* 5(1), 291-302.

Braaksma, M., Berg, R.A. van den, Werf, M.J. van der, Punt, P.J., 2010. A Top-Down Systems Biology Approach for the Identification of Targets for Fungal Strain and Process Development. In; Borkovich. k.a., Ebbole. d.j. *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fung.* Ed; ASM Press. Washington. U.S.A. 25-35.

Breton, A., 1990. Principes et méthodes d'étude des moisissures, In: Botton B. et al., *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle.* 2ème édition Masson. Collection Biotechnologies. Paris. 11-32.

Carvalho, F., Duarte, L.C., Medeiros, R., Gírio, F.M., 2007. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: effect of supplementation. *Biotechnol. Lett.* 29, 1887–1891.

Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A., 2002. Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc.

Catalogue of life, 2019. Annual Checklist : Arbre taxonomique.

Catalogue of Life, 2017. *Stipa tenacissima* L. <http://www.catalogueoflife.org>

Chauve, M., 2011. Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des substrats celluloses. Influence de la structure et morphologie du substrat.

Clark, J.H., Deswarte, F.E.I., Farmer, T.J., 2009. The integration of green chemistry into future biorefineries. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 3, 72–90. <https://doi.org/10.1002/bbb.119>

Cole, S. C. J. et Sheehan, N. 2000. The analysis of xylanase and β -glucanase in feedenzymes. *Enzyme Services & Consultancy*, Blackwood, Wales.

- Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005a. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- Colombatto, D., Beauchemin, K., 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Can. J. Anim. Sci.* 83, 559–568.
- Cunha, L., Martarello, R.D., Souza, P.M. de, Freitas, M.M. de, Barros, K.V.G., Filho, E.X.F., Homem-de-Mello, M., Magalhães, P. de O., 2018. Optimization of Xylanase Production from *Aspergillus foetidus* in Soybean Residue, in: *Enzyme Research*. <https://doi.org/10.1155/2018/6597017>
- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W., 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences* 578–595. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5.578>
- Deb, A., Vimala, R., 2018. Camptothecin loaded graphene oxide nanoparticle functionalized with polyethylene glycol and folic acid for anticancer drug delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 43, 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.10.025>
- De Hoog, G.S., Gene, H., Figueras, M.J., 2000. Atlas of Clinical Fungi 2nd Edition. *Mycopathologia* 152, 159–160. <https://doi.org/10.1023/A:1013183715057>
- Didderen, I., Destain, J., Thonart, P., 2008. Le bioéthanol de seconde génération: la production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. Presses Agronomiques de Gembloux.
- Dodd, D., Cann, I.K.O., 2009. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy* 1, 2–17. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x>
- Eloutassi, N., Louaste, B., Boudine, L., 2014. Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération 10.
- Fernández-Espinar, M., Piñaga, F., de Graaff, L., Visser, J., Ramón, D., Vallés, S., 1994. Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. *Appl Microbiol Biotechnol* 42, 555–562. <https://doi.org/10.1007/BF00173920>
- Florencio C, Couri S, Farinas CS 2012 Correlation between agar plates screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Res.* <https://doi.org/10.1155/2012/79370> 8
- Fujimoto, H., Ooi, T., Wang, S.-L., Takizawa, T., Hidaka, H., Murao, S., Arai, M., 1995. Purification and Properties of Three Xylanases from *Aspergillus aculeatus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry - BIOSCI BIOTECHNOL BIOCHEM* 59, 538–540. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.538>
- Garg, N., Garg, K.L., Mukerji, K.G., 2010. Microscopic examination of yeast and moulds, In: *Laboratory Manual of Food Microbiology*. I. K. International Pvt Ltd, New Delhi. India. 104-106.

- Georis, J., Giannotta, F., Buyl, E.D., Granier, B., Frere, J.-M., 2000. Purification and properties of three endo- β -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology* 9.
- Ghosh, M., Nanda, G., 1994. Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4620–4623.
- Gibbons, W.R., Hughes, S.R., 2009. Integrated biorefineries with engineered microbes and high-value co-products for profitable biofuels production. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 45(3):218-228.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carneiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Gusakov, A.V., Kondratyeva, E.G., Sinitsyn, A.P., 2011. Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. *Int. J. Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1155/2011/283658>
- Haberre, S., 2014. Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 937–953. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0827-2>
- Harris, A.D., Ramalingam, C., 2010. Xylanases and its Application in Food Industry: A Review 1, 11.
- Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280 (Pt 2), 309–316. <https://doi.org/10.1042/bj2800309>
- Henrissat, B., Bairoch, A., 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316 (Pt 2), 695–696. <https://doi.org/10.1042/bj3160695>
- Henrissat, B., Bairoch, A., 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293 (Pt 3), 781–788. <https://doi.org/10.1042/bj2930781>
- Hnain, A., M. Cockburn, L., D. Lefebvre, D., 2011. Microbiological processes for waste conversion to bioenergy products: Approaches and directions. *Environmental Reviews* 19, 214–237. <https://doi.org/10.1139/a11-007>
- Holker, U., Hofer, M., Lenz, J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3>

Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen, van R.E.L., Howard, S., 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* 2, 602–619. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1115>

Ito, K., Iwashita, K., Iwano, K., 1992. Cloning and Sequencing of the *xynC* Gene Encoding Acid Xylanase of *Aspergillus kawachii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56, 1338–1340. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.1338>

Jahn, B., Koch A., Schmidt A., Wanner G., Gehringer H., Bhakdi S., et Brakhage A. A. 1997. Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect Immun* 65:5110-7

Jamar, C., du Jardin, P., Fauconnier, M.-L., 2011. Cell wall polysaccharides hydrolysis of malting barley (*Hordeum vulgare* L.): A review. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment* 15, 301–313.

Joseleau, J.P., 1980. Les hémicelluloses Les Polymères Végétaux, Polymères Pariétaux et Alimentaires Non Azotés, in: *Les Polymères Végétaux*. Gauthier-Villars, pp. 87–121.

Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L., 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry* 40, 3519–3525. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.057>

Kim, S., Dale, B.E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy* 26, 361–375. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.002>

Knob, A., Terrasan, C.R.F., Carmona, E.C., 2010. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 389–407. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0190-4>

Kormelink, F.J.M., Searle-Van Leeuwen, M.J.F., Wood, T.M., Voragen, A.G.J., 1993. Purification and characterization of three endo-(1,4)- β -xylanases and one β -xylosidase from *Aspergillus awamori*. *Journal of Biotechnology* 27, 249–265. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90089-6](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90089-6)

Koutinas, A., Du, C., Wang, R.H., Webb, C., 2008. Production of chemicals from biomass. In: Clark J, Deswarte F, editors. *Introduction to chemicals from biomass*. London: John Wiley & Sons.

Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M., 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 411–456. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x>

Kumar, D., Kumar, S.S., Kumar, J., Kumar, O., Mishra, S.V., Kumar, R., Malyan, S.K., 2017. XYLANASES AND THEIR INDUSTRIAL APPLICATIONS : A REVIEW 9.

- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P., 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 3713–3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Lachapelle, J., 2004. Microscopie, méthodes d'examen, colorations. *Revue du Cercle de Mycologie de Bruxelles* .4.35–71.
- Lau, M.W., Gunawan, C., Balan, V., Dale, B.E., 2010. Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. *Biotechnology for Biofuels* 3, 11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-11>
- Lee, H.V., Hamid, S.B.A., Zain, S.K., 2014. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. *Sci. World J.* 2014, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2014/631013>
- Li, F., Xie, J., Zhang, X., Zhao, L., 2015. Improvement of the optimum pH of *Aspergillus niger* xylanase towards an alkaline pH by site-directed mutagenesis. *Journal of microbiology and biotechnology* 25, 11–17. <https://doi.org/10.4014/jmb.1402.02055>
- Liu, Y.-S., Baker, J.O., Zeng, Y., Himmel, M.E., Haas, T., Ding, S.-Y., 2011. Cellobiohydrolase Hydrolyzes Crystalline Cellulose on Hydrophobic Faces. *Journal of Biological Chemistry* 286, 11195–11201. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216556>
- Machado, C.M.M., Oishi, B.O., Pandey, A., Soccol, C.R., 2004. Kinetics of *Gibberella fujikuroi* growth and gibberellic acid production by solid-state fermentation in a packed-bed column bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 20, 1449–1453. <https://doi.org/10.1021/bp049819x>
- Mathew, G.M., Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R., Pandey, A., 2008. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation 11.
- Mazza, M., 2009. Modification chimique de la cellulose en milieu liquide ionique et CO supercritique.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mirande, C., 2009. Dégradation des fibres pariétales et système xylanolytique de *Bacteroides xylanisolvens* XB1AT et *Roseburia intestinalis* XB6B4, espèces bactériennes du microbiote intestinal humain.
- Mitchell, D.A., Berovic, M., Krieger, N., 2002. Overview of solid state bioprocessing, in: *Biotechnology Annual Review*. Elsevier, pp. 183–225. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(02\)08009-2](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(02)08009-2)
- Moine, C., 2005. Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois : Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes 284.

- Moore, D., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., 2011. 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press. New York. 706.
- Morales, P., Madarro, A., Flors, A., Sendra, José M., Pérez-González, José A., 1995. Purification and characterization of a xylanase and an arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa*. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 424–429. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00062-V](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00062-V)
- Morin, O., 1994. *Aspergillus et aspergilloses: biologie*, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10. EM-Consulte.
- Morosoli, R., Roy, C., Yaguchi, M., 1986. Isolation and partial primary sequence of a xylanase from the yeast *Cryptococcus albidus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 870, 473–478. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(86\)90255-4](https://doi.org/10.1016/0167-4838(86)90255-4)
- Mudgett, R. E. (1986). Solid-state fermentations. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, ed. A. L. Demain & N. A. Solomon. American Society for Microbiology, Washington, pp. 66-83.
- Musoni, M., Destain, J., Thonart, P., Bahama, J.-B., Delvigne, F., 2015. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems 14.
- Mussatto, S.I., Ballesteros, L.F., Martins, S., Teixeira, J.A., 2012. Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. *Industrial Waste*. <https://doi.org/10.5772/36310>
- Nakajima T. and Ballou. C. E, “Characterization of the carbohydrate fragments obtained from *Saccharomyces cerevisiae* mannan by alkaline degradation,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 249, no. 23, pp. 7679–7684, 1974.
- Nelson, N., 1944. A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375–380.
- Ochs, M., 2012. Synthèse de xylosides et d’oligoxylosides par voie enzymatique. O’Donohue, M.J., 2008. La production de carburants à partir de biomasse lignocellulosique par voie biologique : état de l’art et perspectives. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 15, 172–177. <https://doi.org/10.1051/ocl.2008.0190>
- Paës, G., 2005. Etude structure / fonction d’hémicellulases thermostables : la xylanase GH-11 et l’arabinofuranosidase GH-51 de *Thermobacillus xylanilyticus*. Reims.
- Paiva, M.C., Ammar, I., Campos, A.R., Cheikh, R.B., Cunha, A.M., 2007. Alfa fibres: Mechanical, morphological and interfacial characterization. *Composites Science and Technology* 6, 1132–1138. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2006.05.019>
- Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* 35, 1153–1169. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)

- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 577–591. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
- Portail de l'agriculture marocaine, 2002. «L'alfa: Importance écologique et socio-économique», Portail de l'agriculture marocaine, Terre et Vie.
- Prevot, V., 2013. Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide 159.
- Raimbault, M., Alazard, D., 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9, 199–209. <https://doi.org/10.1007/BF00504486>
- Raj, K.C., Chandra, T.S., 1996. Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. *FEMS Microbiology Letters* 145, 457–461. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08616.x>
- Ramos, J., Rojas, T., Navarro, F., Dávalos, F., Sanjuán, R., Rutiaga, J., Young, R.A., 2004. Enzymatic and fungal treatments on sugarcane bagasse for the production of mechanical pulps. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5057–5062. <https://doi.org/10.1021/jf030728+>
- Raulo, R., 2016. Expression of Glycoside Hydrolases in 257.
- Rhanem, M., 2009. «L'alfa (*Stipatenacissima*L.) dans la plaine de Midelt (haut bassin versant de la Moulouya, Maroc) –Éléments de climatologie», *Physio-Géo* [En ligne], 3.
- Robinson, T., Singh, D., Nigam, P., 2001. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 284–289. <https://doi.org/10.1007/s002530000565>
- Ryu, K.G., Kim, Y.G., 1997. Effects of surfactants on the enzymatic bleaching of kraft pulp by xylanase. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2, 94–96. <https://doi.org/10.1007/BF02932332>
- Saidi, A., 2011. La biomasse lignocellulosique et la bioénergie 4–5.
- Saroj, P., P, M., Narasimhulu, K., 2018. Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. *Bioresour. Bioprocess.* 5. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0216-6>
- Seiboth, B., Metz, B., 2011. Fungal arabinan and l-arabinose metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 1665–1673. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3071-8>
- Semhaoui, I., Zarguili, I., Rezzoug, S.A., Maugard, T., Zhao, J.M.Q., Toyir, J., Nawdali, M., Maache-Rezzoug, Z., 2017. Bioconversion of Moroccan Alfa (*Stipa Tenacissima*) by Thermomechanical Pretreatment Combined to Acid or Alkali Spraying for Ethanol Production 13.
- Shallom, D., Shoham, Y., 2003. Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 219–228.

Shleser, R., Hawaii, Department of Business, E.D.& T., 1994. Ethanol production in Hawaii: processes, feedstocks, and current economic feasibility of fuel grade ethanol production in Hawaii: final report. Hawaii State Dept. of Business, Economic Development & Tourism, Energy Division, Honolulu, Hawaii.

Silva, C.H.C. e, Puls, J., Sousa, M.V. de, Ferreira Filho, E.X., 1999. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Revista de Microbiologia* 30, 114–119. <https://doi.org/10.1590/S0001-37141999000200005>

Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H., 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306, 2206–2211. <https://doi.org/10.1126/science.1102765>

Smogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19–23.

Steinbach, W.J., Cramer, R.A., Perfect, B.Z., Asfaw, Y.G., Sauer, T.C., Najvar, L.K., Kirkpatrick, W.R., Patterson, T.F., Benjamin, D.K., Heitman, J., Perfect, J.R., 2006. Calcineurin Controls Growth, Morphology, and Pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 5, 1091–1103. <https://doi.org/10.1128/EC.00139-06>

Subramaniam, R., Vimala, R., 2012. SOLID STATE AND SUBMERGED FERMENTATION FOR THE PRODUCTION OF BIOACTIVE SUBSTANCES: A COMPARATIVE STUDY 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.10.025>

Tao, Y.-M., Zhu, X.-Z., Huang, J.-Z., Ma, S.-J., Wu, X.-B., Long, M.-N., Chen, Q.-X., 2010. Purification and Properties of Endoglucanase from a Sugar Cane Bagasse Hydrolyzing Strain, *Aspergillus glaucus* XC9. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6126–6130. <https://doi.org/10.1021/jf1003896>

UI-Haq, I., Roheena, A., Ashraf, H. et Shah, A.H. 2002. Isolation and screening of fungus for the biosynthesis of α -amylase. *Biotechnol.* 2 (4): 61- 66.

Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A. V., et Renard, M. G. C., “Pectins,” in *Food Polysaccharides and Their Applications*, A. M. Stephen, Ed., pp. 287–339, Marcel Dekker, New York, NY, USA, 1995.

Walia, Abhishek., Mehta, Preeti., Chauhan, Anjali., Shirkot, C. Karan., 2013. Optimization of cellulase-free xylanase production by alkalophilic *Cellulosimicrobium* sp. CKMX1 in solid-state fermentation of apple pomace using central composite design and response surface methodology. *Ann Microbiol.* 2013;63:187–198. doi: 10.1007/s13213-012-0460-5

Wen, Z., 2004. Hydrolysis of animal manure lignocellulose for reducing sugar production. *Bioresour. Technol.* 91, 31–39. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00166-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00166-4)

Wertz, J.-L., 2011. Les hémicelluloses 16.

Xun Liu;Rémy Bayard Valorisation énergétique de la biomasselignocellulosique par digestion anaérobie :prétraitement fongique aérobie 2015 l'institut national des sciences appliquees de lyon pp 21-22.

You, J., Lian, Z., Wang, Y., Ouyang, J., 2010. Effect of laccase and xylanase pretreatment on delignification and bleachability of wheat straw pulp. Sun RCFSY, editor. 628- 632p.

Yuan, J.S., Tiller, K.H., Al-Ahmad, H., Stewart, N.R., Stewart, C.N., 2008. Plants to power: bioenergy to fuel the future. Trends Plant Sci. 13, 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.06.001>

Zaafouri, K., Ziadi, M., Ben Farah, R., Farid, M., Hamdi, M., Regaya, I., 2016. Potential of Tunisian Alfa (*Stipa tenassicima*) fibers for energy recovery to 2G bioethanol: Study of pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation. Biomass and Bioenergy 94, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.08.008>

Annexe

Annexe 1

1- Milieux de cultures

1.1- Milieu xylane gélosé

Xylane de maïs.....	10 g
NaNO ₃	1,2 g
KH ₂ PO ₄	3 g
K ₂ HPO ₄	6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂	0,05 g
MnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,001 g
Agar	18g
Eau distillée quantité suffisante pour (q.s.p)	1l

Avec un pH=7

1.2- Le milieu liquide à base de xylane

Xylane	10 g
Peptone	10 g
Extrait de levure.....	10 g
Eau distillée q.s.p.....	1l

pH= 6.5

1.3- Milieu YPGA

Agar.....	18g
Extrait de levure.....	10g
Peptone	10g
Glucose	10g
Eau distillée q.s.p.....	1l

pH=7,0

1.4- Eau peptone

Peptone	2 g
NaCl.....	5g
tween 80.....	1 ml
H ₂ O q.s.p.....	1l

1.5- Milieu solide à base de l'Alfa

Prétraitement des échantillons d'Alfa

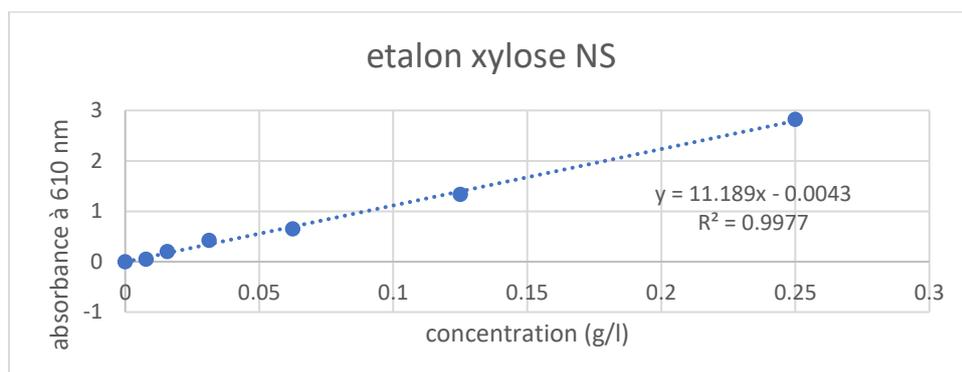
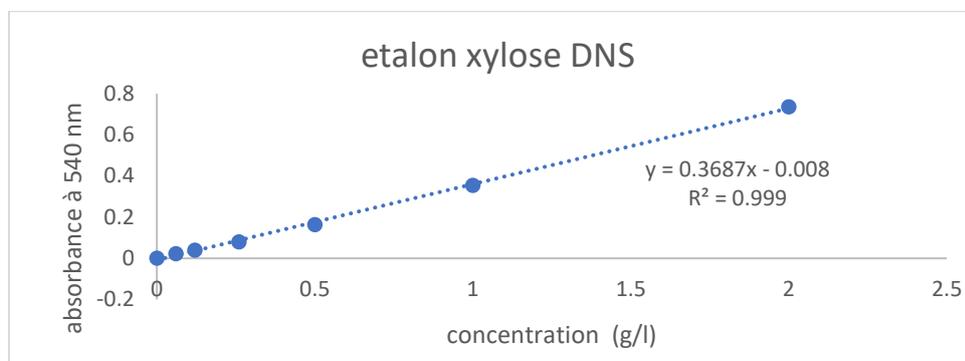
Les échantillons (1Kg) ont été séchés pendant 24h à 40° C, puis coupés en morceaux d'environ 5-7 cm de long, et broyés deux fois et tamisés (pour la récupération de la poudre avec un tamis de 500µm.

Composition de milieu

Alfa.....	6.25 g
Eaudistillé.....	25 ml

Annexe 2

1- Courbe d'étalonnage



Annexe 3

1- Réactif

1.1- Rouge Congo à 0.1%

Rouge Congo0.1g

Eau distillé100ml

1.2- NaCl (1M)

NaCl..... 38g

H₂O.....1l

1.3- Préparation des réactifs de Nelson-Somogyi

Réactif de Somogyi : Le réactif de Somogyi est préparé partir de deux solution (A) et (B) :

Solution A :

Dans une fiole jaugée de 1 litre, on dissout :

Carbonate de Na anhydre (NaCO₃).....25g

Tartrate double de sodium et potassium25g

Carbonate acide de Na anhydre (NaHCO₃).....20g

Sulfate de Na anhydre (Na₂SO₄)200g

H₂O q.s.p1000ml

Solution B :

On dissout 15g de CuSO₄ dans 100ml d'eau distillée, puis on ajoute 1a 2 gouttes d'acide sulfurique concentré.

Le réactif Somogyi est obtenue en additionnant extemporanément 25 parties de la solution (A) et une partie de la solution (B). La solution finale de coloration bleue est gardée pendant 48h a 37°C puis filtrée et conservée l'abri de la lumière.

Réactif de Nelson :

25g de molybdate d'ammonium H₂O sont dissouts à chaud dans 400ml d'eau distillée. Après refroidissement, on ajoute 25ml d'H₂SO₄ concentré et 3g d'arséniate de Na- 7H₂O dissouts

dans 25ml d'eau distillée. L'ensemble est décanté pendant un temps de 48h à 37°C. La solution finale est filtrée et conservera l'abri de la lumière.

Le réactif de Nelson doit avoir une coloration jaune dorée. Si avec le temps la coloration devient verdâtre. On peut ajouter quelques gouttes d'une solution de permanganate de potassium (KMnO_4) à 0.05N jusqu'à l'obtention de la couleur initiale.

Réactif DNS :

Composition de la solution de DNS :

- 10 g d'acide 3,4-dinitrosalicyclique
- 300 g de tartrate de potassium et de sodium
- 16 g de NaOH

Préparation:

- Dans un bécher de 1000 ml, dissolvez 10 g d'acide 3,4-dinitrosalicyclique dans 200 ml d' H_2O . Puis, sous agitation continue, ajouter lentement une solution de NaOH dissoute dans 150 ml d'eau distillée.
- Incuber le mélange à 50 ° C sous agitation pour obtenir une solution limpide.
- Ajoutez 300 g de tartrate tétrahydraté de sodium et de potassium en petites portions.
- Filtrer le mélange à l'aide d'un filtre en papier et compléter le volume à 1000 ml avec de l'eau.
- Conserver dans une bouteille en verre sombre à une température inférieure à 20 ° C

Tampon citrate-phosphate

Solutions de stocks

A: solution 0,1 M d'acide citrique (19,21 g dans 1 L)

B: solution 0,2 M de phosphate de sodium dibasique (53,65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou 71,7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dans 1 L).

xmL de A + y mL de B, dilué à un total de 100 mL

x	y	pH
44.6	5.4	2.6
42.2	7.8	2.8
39.8	10.2	3.0
37.7	12.3	3.2
35.9	14.1	3.4
33.9	16.1	3.6
32.3	17.7	3.8
30.7	19.3	4.0
29.4	20.6	4.2
27.8	22.2	4.4
26.7	23.3	4.6
25.2	24.8	4.8
24.3	25.7	5.0
23.3	26.7	5.2
22.2	27.8	5.4
21.0	29.0	5.6
19.7	30.3	5.8
17.9	32.1	6.0
16.9	33.1	6.2
15.4	34.6	6.4
13.6	36.4	6.6
9.1	40.9	6.8
6.5	43.6	7.0

Noms et Prénoms : DEBBACHE KENZA

Date de soutenance : 24/07/2019

Noms et Prénoms : DERDOUR SARA

Thème : Etude de production de Xylanase par une souche d'*Aspergillus sp*(S3).

Résumé :

Dans cette étude, la souche *Aspergillus sp* (S3) (Fournie par le laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'activité Microbienne (LaMyBAM)), a été caractérisée pour ses performances de production de xylanase sur deux milieux différents, en l'occurrence : un milieu synthétique à base de xylane et un deuxième milieu naturel à base de l'Alfa Algérienne (*Stipa tenascissima*) et ce, dans le but de valoriser la biomasse ligno-cellulosique.

La pureté de la souche (S3) a été vérifiée par l'étude macroscopique et microscopique. Les résultats obtenus confirment les caractères cultureux et morphologiques de cette souche. La mise en évidence de l'activité xylanolytique de la souche (S3) sur milieu synthétique solide à base de xylane de maïs a été effectuée. Les résultats obtenus ont montré un bon développement de cette souche sur ce substrat et aussi une zone de lyse claire de 2 mm de diamètre autour des colonies. La cinétique de production de la biomasse et de l'activité enzymatique de la souche (S3), sur milieu liquide à base de xylane de maïs, a révélé que le taux de croissance cellulaire optimale est de 11.815 mg/ml après 96 heures de fermentation pour l'incubateur IC30 et 11.146 mg/ml à 120 h pour l'incubateur IC37. Par ailleurs, la production enzymatique maximale atteint 4.92 U/ml après 72 heures de fermentation, enregistrant une productivité maximale de 0,5292 UI/mg dans l'incubateur IC30 et 4.36 U/ml après 72 heures avec un rendement de 0,3260 UI/mg dans l'incubateur IC37.

L'utilisation de l'Alfa comme seule source de carbone et d'azote, pour la production de xylanase par *Aspergillus sp*. (S3) a abouti à l'obtention d'une quantité considérable de cette enzyme (14.12 UI/ml) atteignant une productivité totale de 0.0392 UI/ml/h à la fin de la période de fermentation. Ceci ouvre, désormais, la voie sur l'exploitation industrielle de ce déchet naturel.

Mot clés : *Aspergillus*, Fermentation, Xylane, *Stipa tenascissima*, xylanases.

Laboratoire :

Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'activité microbienne (LaMyBAM)

Président de jury: Mr. KACEM CHAOUICHE N.

Rapporteur : Mme.KARA ALI M.

Examinatrice : Mme. MOSBAH A.

Tutrice : Mme GARES M.

Pr. UFM. Constantine 1.

Dr. UFM. Constantine 1.

Dr. UFM. Constantine 1.

Doctorante UFM. Constantine 1.