



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : biotechnologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé

**Utilisation de la planification expérimentale pour
l'optimisation de la production de cellulase sur son de blé.**

Présenté et soutenue par : AROUAK LINDA
ZENAD AMINA

Le : 07 /07 /2019

Jury d'évaluation :

Présidente : Melle. ABDEIAZIZ. W (Maître de conférences B- UFM Constantine).

Promotrice : Mme . LEGHLIMI. H (Maître de conférences A - UFM Constantine).

Examinatrice : Mlle BELMESSIKH. A (Maître Assistante A- UFM Constantine).

**Année universitaire
2018/2019**



Notre premier remerciement va au bon Dieu le tout puissant qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.

Le travail a été réalisé au laboratoire de Zoologie, faculté des sciences de la nature et de la vie. Nous tenons à remercier les responsables de ce laboratoire. Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer toute nos reconnaissances et notre profond respect à notre encadreur, Mme. LEGHLIMI. H. Maître de Conférences à UFM Constantine, pour sa patience, ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont on a pu bénéficier. Nous souhaiterons également remercier notre présidente de jury, Melle. Abedleziz .W. Maître de Conférences à UFM Constantine, qui nous a fait l'honneur de présider ce jury. Nous remercions par la même occasion Melle BELMESSIKH. A. Maître Assistante à UFM Constantine d'avoir acceptée d'évaluer notre travail. Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace



Je dédie ce travail à mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encourage et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU les bénisse. à ma chère tante Djamilia.

A mes chers frères Mehdi et Islem ,je vous souhaite un avenir plein de joie ,de santé, de réussite et de bonheur .

A tous mes cousins et cousines

A tous mes collègues de promotion

A tous ceux que j'aime.

Arouak Linda

Dédicace



Grace à Allah et avec sa faveur, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie

À MES CHERS PARENTS : Abdelhakim et Nadia

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie

A mes adorables Sœurs : Khadîdja, Rahma, Nanou et ma petite Nesrine

A mes frères: Abderrahmane, Djalil, Sisou et Mohammed

A mon binôme et ma meilleur amie LYNDA

A toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont apporté leur aide ...merci

Table des matières

Résumés

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Revue bibliographique

Chapitre1 : la cellulase

1-Définition de la cellulose	2
2-Généralités	2
3- Source de la cellulose	3
4-La cellulase	3
5-Nomenclature.....	4
6- Structure des cellulases.....	4
7 -Enzymes cellulolytiques	5
7-1 Endo β (1-4) glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4)	5
7-2 Exo β (1-4) glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)	5
7-3 β (1-4) glucosidase ou cellobiase (EC3.2.1.21).....	5
8- Origines des cellulases.....	6
8-1 Origine animale	6
8-2 Origine végétale	6
8-3 Origine microbienne	6
8.3.1 Bactéries	7
8.3.2 Levures	7
8.3.3 Moisissures	7
* Champignon de genre <i>Trichoderma</i>	8
1- Généralité.....	8
2- Morphologie	9
3-Taxonomie	10
4-Ecologie	10
* <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	11
8- Mécanisme d'action des cellulases.....	11
9- Domaines d'application des cellulases.....	12

9-1 Industries alimentaires:.....	12
9-2 Nutrition animale.....	12
9-3 Industries des textiles et des détergents.....	12
9-4 Fabrication de pâte à papier	13
9-5 Domaine thérapeutique	13

Chapitre 2 : Fermentation solide et matière première

1-Définition	14
2-Avantages de la fermentation solide.....	14
3-Inconvénients de la fermentation solide	14
4-Matière première de la fermentation solide.....	15
4-1 Le son de blé	15
4-2-La structure macroscopique de son de blé.....	16
4-3-Rôle du son de blé	17
4-4-Utilisation du son de blé.....	18

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel et méthodes

1-Origine de la souche fongique.....	19
2-Réactivation et repiquage de la souche.....	19
3-Dénombrement des spores.....	20
4-Conservation des souches.....	20
5-Préparation des fermentations en milieu solide.....	20
6-Méthodes analytiques.....	22
6-1-Dosage des activités cellulolytiques.....	22
6-1-1-Activité papier filtre(APF).....	22
6-1-2-Activité endoglucanase.....	22
6-2- Mesure de l'humidité.....	23
7-Méthode d'optimisation.....	24
7-2-Plan composite centré de Box et Wilson (CCD : central composite design).....	25

Résultats et discussion

1-Activité papier filtre.....	28
*Calcul des optima.....	31
2-Activité endoglucanase (CMCase).....	32
Conclusion partiel.....	35

Conclusion générale	36
Références bibliographiques.....	37
Annexes.....	43

résumés

Résumé

L'objectif principal de cette étude est de déterminer les valeurs optimales des deux facteurs : carboxyméthyl cellulose (CMC) et le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pour augmenter la production des activités cellulases. Pour cela, le plan statistique composite centré de Box et Wilson à deux facteurs est utilisé. La production des enzymes cellulolytiques par *Trichoderma longibrachiatum* est effectuée sur milieu à base de son de blé à 70% d'humidité par fermentation solide (FMS). Les milieux de production sont préparés par l'emploi de ce plan à deux facteurs et 11 essais. L'analyse des résultats, a permis la détermination des optima de ces deux facteurs pour la production de l'activité cellulase globale (APF), à savoir 10.4 g/l de CMC et 4.48 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Pour l'activité endoglucanase, ce plan n'a pas donné de résultat significatif et reste à confirmer ultérieurement.

Mots clés : Cellulase, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation en milieu solide, son de blé, optimisation, plan Box et Wilson.

Abstract

The main objective of this study is to determine the optimal values of the two factors: carboxymethyl cellulose (CMC) and ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to increase the production of cellulase activities. For this. The production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma longibrachiatum* is carried out on wheat bran medium at 70% moisture by solid fermentation (FMS) The production media are prepared by using this two-factor plan and 11 trials.. The analysis of the results made it possible to determine the optimum of these two factors for the production of the overall cellulase activity (APF), namely 10.4 g / l of CMC and 4.48 g / l of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. For the endoglucanase activity, this plan did not give a significant result and remains to be confirmed later.

Keywords: Cellulase, *Trichoderma longibrachiatum*, solid state fermentation, wheat bran, optimization, Box-Wilson plan.

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تحديد القيم المثلى للعاملين: كربوكسي ميثيل السليلوز (CMC) وكبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$ لزيادة إنتاج أنشطة السليلاز. ولهذا الغرض يتم إنتاج إنزيمات سيلوليتيك بواسطة ترايكودرما *longibrachiatum* على وسط نخالة القمح بنسبة رطوبة 70 % عن طريق التخمير الصلب (FMS)، ويتم إعداد وسائط الإنتاج باستخدام هذه الخطة ثنائية العوامل و 11 تجربة. أتاح تحليل النتائج تحديد أفضل هذين العاملين لإنتاج نشاط السليلاز الكلي (APF)، أي 10.4 جم / لتر من CMC و 4.48 جم / لتر من $(NH_4)_2SO_4$ بالنسبة لنشاط *endoglucanase*، لم تقدم هذه الخطة نتيجة مهمة ولا يزال يتعين تأكيدها لاحقاً.

كلمات مفتاحية: السليلوز, ترايكودرما *longibrachiatum*, التخمر في الحالة الصلبة، نخالة القمح،

التحسين، خطة Box و Wilson.

Abréviations

APF : Activité papier filtre

CMC: Carboxyméthylcellulose

DNS: Acide dinitrosalicylique

EC : *Enzyme Commission numbers*

EG: Endoglucanases

PDA: *Potato dextrose agar*

FMS : Fermentation sur milieu solide

Gds : Gramme de substrat

T : *Trichoderma*

U : Unité

DSMZ : *Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zellkulturen*

liste des figures

Figure 01 : la cellulose.....	02
Figure 02 : Liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires au sein de la fibre de cellulose... ..	03
Figure 03 : Structure de la cellulose. Représentation de la chaîne de cellulose.....	04
Figure 4 : <i>Trichoderma longibrachiatum</i> sporulé sur milieu PDA après 7 jours d'incubation à 30°	09.
Figure 5 : Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (Botton et al., 1990).....	10
Figure 06 : Illustration générale du fractionnement du blé (Du et al., 2009).....	16
Figure 07 : Structure anatomique du son de blé (Bourdeau et al., 1992).....	17
Figure 08 : <i>Trichoderma longibrachiatum</i> sur milieux PDA, après 7 jours d'incubation à 30°C.....	19
Figure 09 : Préparation de l'inoculum et fermentation sur un milieu solide.....	21
Figure 10 : Préparation des extraits enzymatiques par extraction du substrat fermenté.....	22
Figure 11 : Courbe étalon de glucose pour la mesure des activités papier filtre et endoglucanase.....	23
Figure 12 : Mesure de la matière sèche après dessiccation à 10.....	24

Liste des tableaux

Tableau 01 : Exemples des microorganismes producteur de la cellulase.....	08
Tableau 02 : Position taxonomique des <i>Trichoderma</i>	10
Tableau 03 : Générateur de base des matrices pour $N= 8, 12, 16,$ et 20 essais de Plackett et Burman.....	25
Tableau 04 : Structure du plan composite centré à deux facteurs.....	26
Tableau 05 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels utilisés dans le plan composite centré à 2 facteurs.....	27
Tableau 06 : Valeurs expérimentales (observées) de l'activité APF de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> par le CCD.....	29
Tableau 07 : Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité APF	30
Tableau 08 : Analyse de variance (ANOVA) pour les paramètres de la méthode de surface de réponse Adaptée au modèle polynomial quadratique pour l'optimisation de l'activité APF	30
Tableau 09 : Coordonnées codées des extremums des facteurs en SFM et leurs valeurs réelles.....	31
Tableau. 10 : Valeurs expérimentales (observées) de l'activité endoglucanase (CMC ase) de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> par le CCD.....	33
Tableau 11 : Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité endoglucanase (CMCase).....	33
Tableau 12 : Analyse de variance (ANOVA) pour les paramètres de la méthode de surface de réponse adaptée au modèle polynomial quadratique pour l'optimisation de l'activité endoglucanase (CMC ase).....	34

Introduction générale

Les cellulases sont parmi les enzymes les plus importantes, qui occupent une place de choix en biotechnologie. Dans cette optique, la cellulase est utilisée dans de nombreuses applications industrielles principalement dans le domaine de la bioénergie, le traitement du textile, le recyclage du papier, l'agriculture et dans le domaine de la recherche et du développement. Ce qui constitue une grande classe d'enzymes industrielles au marché des enzymes (Rajagopalan et Krishnan ; 2008).

Par ailleurs, la production des enzymes industrielles exige la préparation de milieux de culture à moindre coût, sachant que l'estimation du coût du milieu de croissance représente 30 à 40% du coût global de la production des enzymes industrielles (Srinubabu et *al.*, 2007). Ceci peut être atteint par l'utilisation de résidus agroindustriels disponibles et bon marché, d'une part et par l'optimisation des conditions nutritionnelles et physicochimiques du milieu de culture, d'autre part. C'est ainsi que plusieurs déchets et sous-produits agro-industriels sont appliqués pour la production d'enzymes.

Le processus fermentation en milieu solide (FMS) est l'un des procédés les plus impliqués en industrie vu les faibles coûts d'investissement et d'exploitation. Cela a fait une alternative intéressante pour la production de cellulases (Srinubabu et *al.*, 2007).

L'objectif principal du présent travail est la production de cellulases par la moisissure *Trichoderma logibrachiatum* dans un milieu de culture solide à base de son de blé, ce dernier est un des substrats qui permet une bonne croissance de la moisissure. L'optimisation de leur production sur un milieu à base de son de blé, est réalisée par un plan statistique de Box et Wilson (1951).

Ce manuscrit comprend une première partie théorique sur l'étude des enzymes cellulolytiques et la fermentation sur milieu solide. La deuxième partie expérimentale renferme les techniques et les méthodes ainsi que les résultats et leur discussion.

1-Définition de la cellulose

La cellulose est le polysaccharide structurale de base des parois des cellules végétales, qui peut représenter jusqu'à 50 % de la masse totale. C'est la molécule organique la plus abondante sur terre, avec une production annuelle estimée à 1.5×10^{12} tonnes.

la cellulose est un polymère linéaire constituée d'unités β -D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons β -1,4 glycosidiques, sa formule chimique est $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Alarcón-Gutiérrez, 2007; Balat, 2011).

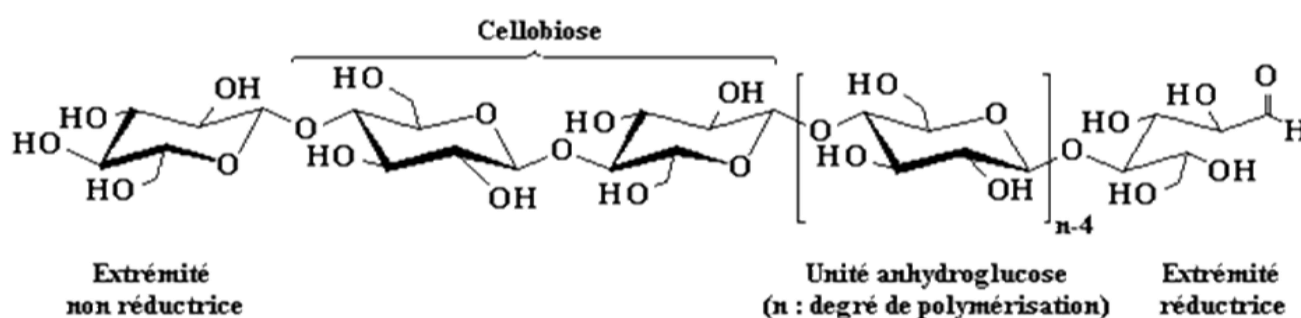


Figure01 : la cellulose (Brown, 2004).

2-Généralités :

Les unités de base constituant ce polysaccharide sont alternativement inversées de 180° par rapport au plan de la molécule, faisant du cellobiose le plus petit motif de répétition de cette structure (figure 1). Les chaînes de glucanes ou fibrilles élémentaires, composées de ce motif, sont regroupées pour former des microfibrilles de 3 à 5 nm de diamètre, dont le nombre peut varier de 36 chaînes de glucanes à plus de 200 chaînes chez les algues. Ces chaînes sont reliées entre elles par des liaisons répétitives de type Van der Waals et de type hydrogènes, à la fois intermoléculaires, entre l'O3 et l'O5, et intramoléculaires (Cosgrove, 2005 ; Chundawat, 2011).

Les nombreux groupements hydroxyles sont responsables du comportement physicochimique de la cellulose. Selon leur position dans l'unité glucose, ils sont capables de former des liaisons hydrogènes intramoléculaires à l'intérieur d'une même chaîne de cellulose ou intermoléculaires entre deux chaînes différentes constituant ainsi des microdomaines hautement organisés (figure 2). Ces liaisons hydrogènes sont responsables de la formation des microfibrilles dans lesquelles certaines régions sont hautement ordonnées, cristallines et d'autres moins, dites amorphes. La structure hautement cristalline n'est généralement pas accessible aux activités enzymatiques, tandis que les régions amorphes sont plus accessibles à la dégradation (Pérez et al., 2002).

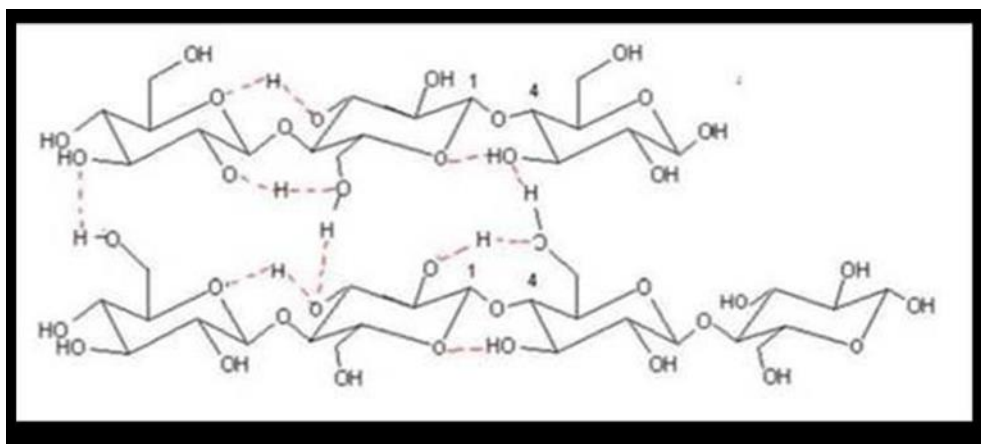


Figure 2 :Liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires au sein de la fibre de cellulose(Stryer et al., 2003).

3- Source de la cellulose

Selon Marouf et Tremblin, (2009), la cellulose se trouve surtout dans la paroi secondaire, accompagnée par les lignines, mais aussi dans la paroi primaire de la fibre. A l'exception du coton, la cellulose n'est disponible que sous forme de résidus lignocellulosique. Les fibres de cellulose sont habituellement à l'état combiné avec d'autres polymères : l'hémicellulose et la lignine qui réduisent ainsi son accessibilité aux cellulases (Cullen et Kersten, 1992). Ainsi, Les déchets issus de l'agriculture et des industries peuvent constituer une source importante de lignocellulose. Ainsi les diverses céréales cultivées dans le monde fournissent près de 1,7 milliards de tonnes de paille par an dont la majeure partie est inutilisée (Sasson, 1986).

4-La cellulase

La cellulase se rapporte à un groupe d'enzymes qui, agissant ensemble pour hydrolyser la cellulose en sucres simples. En effet, sa biodégradation est un des paramètres majeurs contrôlant le cycle de carbone sur terre, assurée par des microorganismes cellulolytiques, principalement moisissures et bactéries, sécrétant des cellulases (Kader ,1999; Lekchiri *et al.*, 2006).

L'hydrolyse complète de la cellulose nécessite l'action synergique de trois types de cellulases (Lynd *et al.*, 2002). Elles sont classées en fonction de l'endroit où elles agissent au niveau de la fibre cellulosique. Les endoglucanases commencent l'hydrolyse, les exoglucanases agissent au niveau

des extrémités générées par les endoglucanases, suivie par les β -glucosidases qui agissent sur le produit de catalyse des exoglucanases, pour libérer enfin des monomères de glucose (Pimentel *et al.*, 2014).

5-Nomenclature

- Nom codifié : E.C.3.2.1.4
- Nom systématique : 1,4-(1,3 ; 1,4)- β -D-Glucan 4-glucanohydrolase.
- Nom recommandé : Cellulase.
- Synonymes : Endoglucanase, Endo-1,4- β -Glucanase, Cellulase carboxyméthylque, ect. (Schamburg etSalzmann, 1991).

6- Structure des cellulases

Les Cellulases sont composées d'unités structurellement et fonctionnellement distinctes, appelées domaines ou modules (Henrissat *et al.*, 1998).Le plus souvent, les cellulases sont constituées d'un domaine catalytique (CD) et d'un module de fixation au substrat (CBM), qui est généralement reliée au CD par un peptide de liaison relativement long souvent glycosylé (de 30 à 44 AA).

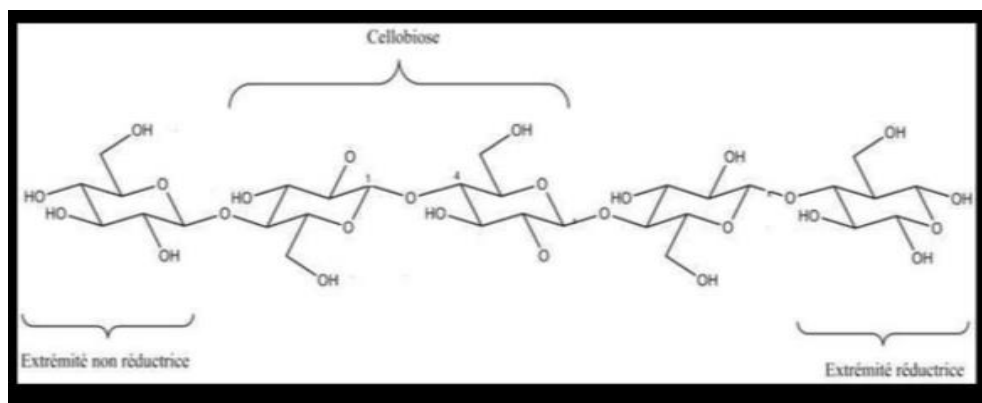


Figure 3 : Structure de la cellulose. Représentation de la chaîne de cellulose (Stryer *et al.*, 2003).

Les enzymes qui n'ont pas de CBM, c'est à dire avec un seul domaine catalytique, conservent leur capacité d'absorber la cellulose, mais souvent avec une affinité plus faible par rapport à l'enzyme complète (Karlsson *et al.*, 2002).Les cellulases sont maintenant classées selon leur structure, comme toutes les enzymes agissant sur les sucres. Il existe trois types d'activités enzymatiques cellulolytiques complémentaires pour l'hydrolyse totale de la cellulose (Scriban, 1993).

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

Les cellulases ont d'abord été classées selon leur mode d'action catalytique. Elles sont maintenant aussi classées selon leur structure, comme toutes les enzymes agissant sur les sucres (Ballerini et Alazard-Toux, 2006). Toutes ces enzymes travaillent synergiquement pour hydrolyser la cellulose en créant de nouveaux sites accessibles pour chacune d'entre elles en enlevant les obstacles et réduire les produits d'inhibition (Zhou et *al.*, 2009).

7-1 •Endo β (1-4) glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4) : L'endocellulase est capable de rompre les liaisons internes de la chaîne cellulosique. L'attaque se fait au hasard et entraîne la libération de cellodextrines, de cellobiose et de glucose. (Arnaud et Guiraud, 1999 ; Xu et *al.*, 2007). Ce sont donc les premières enzymes qui attaquent la matière cellulosique, en coupant les longues chaînes de cellulose en chaînes plus courtes en produisant du cellobiose, des cellodextrines et du glucose. Elles sont très actives sur la cellulose soluble dont l'activité est d'autant plus importante que le degré de polymérisation est élevé. Par contre, son activité est très faible sur la cellulose cristalline (Hasper et *al.*, 2002).

7-2 •Exo β (1-4) glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) : sont des enzymes processives qui attaquent les deux extrémités de chaque chaîne courte de polysaccharide de la région cristalline de la cellulose en provoquant une réduction lente du DP, Le produit final serait encore hydrolysé en cellobiose, un dimère de glucose. (Arja, 2004 ; Lee et *al.*, 2010). L'enzyme seule n'est active, ni sur la cellulose cristalline, ni sur les celluloses solubles (carboxyméthyl cellulose). Par contre, elle attaque les celluloses partiellement dégradées. Le rôle essentiel de cette enzyme est de permettre l'action de l'endocellulase sur la cellulose cristalline. Seuls les champignons filamenteux semblent disposer d'une cellobiohydrolase : *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani*, *Chaetomium thermophile*, *Sporotrichum pulverulentum*. Dans tous les cas, une seule cellobiohydrolase par micro-organisme a été isolée (Arnaud et Guiraud, 1999).

7-3 • β (1-4) glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) : La cellobiase hydrolyse la liaison β -glucosidique du cellobiose et libère deux molécules de glucose. Selon sa spécificité, la cellobiase peut être active sur les β (1-4) oligoglucosidiques, mais l'activité diminue rapidement quand la longueur de la chaîne augmente. De nombreux auteurs ont montré que la cellobiase est fortement inhibée par son produit d'hydrolyse : le glucose.

L'importance du rôle de la cellobiase lors d'une saccharification a été soulignée par divers auteurs. En effet, en hydrolysant le cellobiose, la cellobiase permet d'éviter l'inhibition de la cellobiohydrolase. Ainsi la vitesse globale de la cellulolyse est étroitement dépendante de l'activité cellobiasique (Arnaud et Guiraud, 1999; Xu et al., 2007). Comme les enzymes de β -glucosidases sont les seules enzymes du système de cellulases qui peuvent hydrolyser le cellobiose, ils ont un rôle vital dans la dégradation de la cellulose. La plupart des β -glucosidases purifiées ont été identifiées comme étant des glycoprotéines avec des poids moléculaires allant de 40 à 400 kDa (Candace et Weimer, 1991).

8- Origines des cellulases

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

8-1 Origine animale : Plusieurs espèces animales (omnivores et herbivores) utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif. Des cellulases ont été isolées à partir du tube digestif d'escargot comestible (Smant et al., 1998).

8-2 Origine végétale : Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes. Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces, des céréales tels que l'orge et le riz de la variété *Oryzasativa*. Les préparations cellulasiques d'origine végétale sont dépourvues d'exo- β -glucanases (Xu et al., 2000).

8-3 Origine microbienne : Les bactéries et les moisissures utilisent la cellulose pour la production de quantités substantielle d'enzymes extracellulaires qui sont alors facilement récupérées du milieu de culture après fermentation, ces enzymes peuvent être présentes sur la surface des cellules, les cellulases bactériennes et fongiques sont les plus étudiées en raison de leurs utilisations potentielles en biotechnologie (Odier et Rouau, 1985). Les microorganismes lignocellulolytiques sont retrouvés dans tous les biotopes où les déchets celluloseux s'accumulent : les composts, les fumiers pailleux, les litières, le rumen. Parmi les microorganismes cellulolytiques, on distingue : les bactéries, les levures et les moisissures (Coleman, 1978).

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

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

8.3.3 Moisissures : Les champignons sont les principaux acteurs de la dégradation de la matière organique, principalement les polymères structuraux tels que la lignine, la cellulose et les hémicelluloses. En dépit de la concurrence sérieuse des bactéries et des levures, les moisissures occupent une place importante dans le marché des enzymes, il s'agit presque exclusivement d'hydrolases dont les producteurs principaux appartiennent aux Zygomycètes (genres *Mucor* et *Rhizopus*) et aux Deutéromycètes (genres *Aspergillus* et *Trichoderma*) (tableau 01) (Bouix et Leveau, 1993 ; Lekounougou, 2008).

chapitre 01 : la cellulase

Tableau 1: Exemples des microorganismes producteur de la cellulase (Béguin et Aubert, 1992).

Microorganismes	Espèces
Moisissures	<i>Neocallimastixfrontalis</i> , <i>Sphaeromonascommunis</i> , <i>Piromonascommmuniis</i> , <i>Chytridomycètes</i> , <i>Trichodermaviridae</i> , <i>T. reesei</i> , <i>T. koningii</i> , <i>Aspergillus aculeatus</i> <i>A.nidulans</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Fusariumsolani</i> , <i>Sporotrichumpulver</i> <i>lentum</i> , <i>Chaetomiumcellulolyticum</i> , <i>Humicolain</i> <i>solens</i>
Levures	<i>Candida molischiana</i> , <i>C. pulcherrima</i> , <i>C. stellata</i> , <i>C.</i> <i>wickerhamii</i> , <i>Cryptococcus</i> <i>flavus</i> , <i>Kloeckeraapiculata</i> , <i>Kluyveromyceslactis</i> , <i>Rhodotorulaglu</i> , <i>Saccharomyces</i> <i>fibuligeratinis</i> , <i>Trichosporoncutanum</i>
Bactéries	Aérobies : <i>Sporocytophaga</i> , <i>Myxococcoides</i> , <i>Baccillussubtilis</i> , <i>Cellulomonas</i> et <i>Pseudomonas</i> Anaérobiesstrictes : <i>Clostridium thermocellum</i> , <i>C.</i> <i>stercorarium</i> , <i>Ruminococcus</i> <i>albus</i> , <i>R. flavefasciens</i> , <i>Bactéroï des succinogenes</i> Anaérobiesfacultatifs : <i>Erwiniachrysantharum</i> Anaérobiesstrictes: <i>Clostridium thermocellum</i> , <i>C.</i> <i>stercorarium</i> , <i>Ruminococcus</i> <i>albus</i> , <i>R. flavefasciens</i> et <i>Bactéroï des succinogenes</i>
Actinomycètes	<i>Thermomonosporafusca</i> , <i>Cellulomonasfimi</i> , <i>C.bioazotea</i> , <i>C.uda</i> , <i>Streptomyces</i> <i>drozdowiczii</i> , <i>S.lividans</i>

*Champignon de genre *Trichoderma*

1- Généralité :Le terme « *Trichoderma* » a été introduit dans la mycologie en 1794 par Peterson (Bissett, 1991). Il désigne des champignons microscopiques considérés durant 200 ans comme étant des «Gastéromycètes».

Ces organismes cosmopolites appartiennent à un grand ensemble de champignons sans reproduction sexuée connue (Vining, 1990 ; Genilloud et *al.*, 1994 ; Roquebert,1996).

En milieu terrestre, leur production d'enzymes, de substances bioactives et leur développement rapide font des *Trichoderma sp* des agents potentiels en agroalimentaire et une matière de choix pour l'exploitation industrielle (Prieto et *al.*, 1997). Quelques-unes des quelques 35 espèces établies à ce jour sont d'intérêt économique, pour leur production d'enzymes cellulolytiques et utilisés comme agents de lutte biologique en raison de leur antagonisme vis-à-vis d'autres espèces fongiques (antibiose, mycoparasitisme, compétition, lyse, promotion de la plante hôte) (Roquebert, 1996 ; Cooney et *al.*, 1997 ; Prieto et *al.*, 1997 ; Grondona et *al.*, 1997 ; Verbist, 2000 ; Kubicek et *al.*,2003).

2- Morphologie :L'aspect macroscopique des *Trichoderma sp* est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse (figure 4). D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16ème et le 20ème jour un feutrage épais se superpose à la culture.

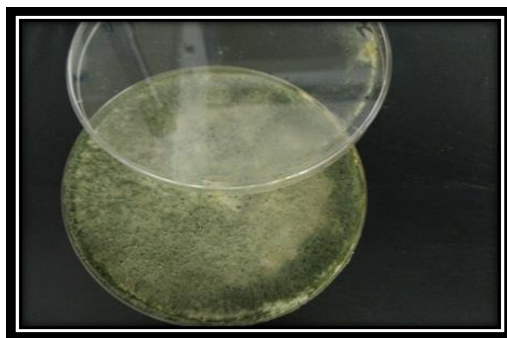


Figure 4 : *Trichoderma laugibrachiatum* sporulé sur milieu PDA après 7 jours d'incubation à 30°C.

Au microscope optique, on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores (figure 5) ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores.

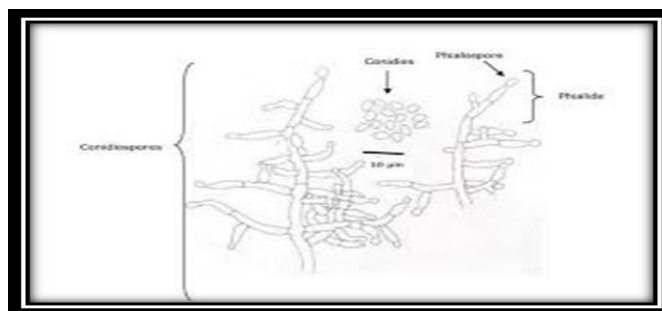


Figure 5 : Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma longibrachiatum* (Botton et al., 1990).

3-Taxonomie : La position taxonomique actuelle des *Trichoderma sp* se présente comme suit (Bissett, 2004) (Tableau 2) :

Tableau 2 : Position taxonomique des *Trichoderma* (Bissett, 2004).

Sous-embranchement	Ascomycotina
Classe	Sordariomycetes
Ordre	Hypocrèales
Famille	Hypocrèaceae
Genre	<i>Trichoderma</i>

4-Écologie : Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998). En effet, les *Trichoderma sp* sont remarquables pour leur croissance rapide et leur capacité à utiliser différents substrats et sont, par conséquent, l'élément majeur dans la mycoflore terrestre et marine (Widden et Abitrol, 1980 ; Kubicek et al., 2003). Les *Trichoderma sp* terrestres se développent quasiment dans tous les sols (forestiers ou cultivés) et sur les végétaux en décomposition. Ils contaminent fréquemment le compost de la culture industrielle des champignons comestibles, mais sont rarement parasites de plantes vivantes (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998).

La présence des *Trichoderma sp* en milieu terrestre (6% du nombre total des espèces fongiques) semble comparable à celle en milieu marin (6,4% à 10,4%) (Landreau, 2001).

chapitre 01 : la cellulase

L'abondance des *Trichoderma sp* dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (Widden et Abitrol, 1980 ; Vining, 1990 ; Kubicek et *al.*, 2003).

****Trichoderma longibrachiatum*** : *Trichoderma longibrachiatum* est un champignon filamenteux saprophyte (Leuchtmann, 1996). Dans les années 1980 et le début des années 1990 (Bissett, 1991), Bissett a proposé une classification infra générique de *Trichoderma* par laquelle le genre a été divisé en sections : section *Trichoderma pachybasium*, section *Trichoderma saturnisporum*, section *Trichoderma longibrachiatum* et section *Trichoderma hypocreanum*. Les principales caractéristiques de la section *Trichoderma longibrachiatum* inclus ce qui suit :

/Développent rapidement des colonies (6 à 9 cm après 4 jours à 20 °C) ;

/Revers des boites des isolats frais est invisiblement jaune- vert ;

/Présence ou absence des chlamydoespores ;

/Les conidiophores sont ramifiés, rameaux primaires est longue et les branches secondaires sont généralement courtes ;

/Phialides ovoïdes à ellipsoïdales, atténuées au sommet ;

/Les conidies sont unicellulaire, verte, lisse fortifiée et ellipsoïde à ovoïde.

8- Mécanisme d'action des cellulases

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

9- Domaines d'application des cellulases :

Si le coût de production de cellulases reste important dans l'économie d'un procédé d'hydrolyse enzymatique, les performances élevées atteintes ouvrent à ces enzymes des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (Pourquié et Vandecasteele, 1993). L'intérêt que porte la biotechnologie à la cellulase s'explique par ces vastes applications. En effet, son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui une fois fermenté permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques d'où l'importance écologique et industrielle, considérable des cellulases (Receveur et *al.*, 2002).

9-1 Industries alimentaires : Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993). Les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes, le plus souvent en association avec les pectinases pour la digestion qui précède les extractions pour améliorer la qualité des produits (protéines de soja, amidon de pomme de terre ou de maïs, jus de fruits, huiles végétales etc.) (Odier et Rouau, 1985). Les cellulases améliorent également l'arôme des jus de fruits et du vin (Riccio et *al.*, 1999).

9-2 Nutrition animale : D'après Raimbault, (1981) ainsi que Odier et Rouau, (1985), les cellulases sont utilisées comme supplément dans des rations alimentaires de bétail et dans l'amélioration de la valeur nutritionnelle des fourrages pour ruminants. Selon Pourquié et Vandecasteele, (1993), l'addition de cellulases aux aliments pour volailles ou porcins améliore la digestibilité de leurs fractioncellulosique, et permettre donc de réduire à la fois les consommations de sources d'énergie (amidon) et l'excrétion de cellulose non digérée (et donc la charge polluante des excréta).

9-3 Industries des textiles et des détergents : les textiles et les détergents constituent les plus grands marchés mondiaux pour l'utilisation des cellulases. Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements de type Jean après lavage et améliore l'apparence des tissus par élimination des tâches. Elles sont utilisées aussi dans les lessives afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (Maurer, 1997) des fibres et dans la préparation de « stone washed jeans » (Scriban, 1993; Ando et *al.*, 2002). Elles sont actuellement additionnées aux détergents pour enlever les fibres endommagées (poils, peluche) des tissus de coton ainsi que la graisse attachée fortement aux poils (Wilson, 2009).

9-4 Fabrication de pâte à papier : L'addition de cellulases aux suspensions de pâte au cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Pourquié et Vandecasteele, 1993). Elle contribue également à l'amélioration de la qualité de papier. Les cellulases sont aussi utilisées pour le désencrage, améliorant le drainage. Dans le cadre de la récupération (recyclage) du papier, on les utilise pour éliminer les encres (Rolf, 2005).

9-5 Domaine thérapeutique : Certaines cellulases sont utilisées dans des formules médicamenteuses comme aides digestives. Ainsi, des cellulases de *Trichoderma viridae* sont utilisées en association avec des amylases fongiques, pour éviter les dyspepsies et fermentations intestinales (Rivière, 1975 ; Odier et Scriban, 1993).

Chapitre02 : Fermentation solide et matière première

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

Les bactéries, les levures et les champignons peuvent se développer sur des substrats solides, et trouvent une application dans les processus de la fermentation solide. Les champignons filamenteux sont les mieux adaptés pour ce type de culture (Doalle et *al.*,1992).

2-Avantages de la fermentation solide: Les avantages de la fermentation solide sont nombreux. Ceux-ci incluent :

*La simplicité de cette technologie qui ne nécessite pas d'équipement sophistiqué pour les contrôles permanents des paramètres environnementaux (facultatifs).Le coût des équipements et des opérations est donc faible.

*L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes. Le peu d'eau disponible favorise la production de certains métabolites qui n'apparaissent pas ou peu en culture liquide(Mathot, 1996).

*De plus, les opérations de mélange étant facilement modulables, il n'y a pas de production de mousses lors des fermentations solides contrairement aux fermentations liquides.

*L'aération peut être assurée passivement et/ou sans agitation ou par agitation discontinue. En cas d'aération active ou forcée, une porosité bien étudiée facilite le passage de l'air qui entre facilement en contact avec les moisissures installées en surface des particules.

*En revanche, les moisissures filamenteuses rendent souvent les milieux liquides fortement visqueux. Ce qui entraîne des problèmes à l'agitation et au transfert d'oxygène.

*En cas de production d'aliments pour animaux, tout le produit est utilisé, sans rejet d'eau usée. Les frais de séchage éventuels sont réduits (Mathot, 1996).

Chapitre02 : Fermentation solide et matière première

3-Inconvénients de la fermentation solide : Les microorganismes utilisés sont limités. En effet, seuls les microorganismes se développant bien aux basses humidités peuvent être employés. Le problème de transfert d'oxygène et de chaleur rendent difficile l'augmentation d'échelle des procédés. En effet, la faible quantité d'eau ralentit les échanges de chaleur, pouvant créer des problèmes de surchauffe lorsque des masses importantes sont mises en fermentation. L'évaporation compense partiellement cet échauffement, mais en réduisant l'eau disponible. De plus, l'évacuation des calories métaboliques peut donc poser un problème qu'il s'agit de résoudre lors du passage de petits essais de laboratoire aux applications en vraie grandeur (Singhania et *al.*, 2009).

La nature solide et hétérogène des substrats utilisés complique le suivi direct des paramètres de fermentation. Par ailleurs, il est pratiquement difficile d'assurer une distribution parfaitement homogène de substances ajoutées au substrat et donc du milieu de culture. Ce qui rend le contrôle des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration des nutriments, assez aléatoire (Bellon-Maurel et *al.*, 2003).

Les microorganismes étant inséparables du substrat, l'estimation de la biomasse est délicate. Étant donné la forte concentration des métabolites obtenus, des produits inhibiteurs générés par les microorganismes peuvent s'accumuler en concentration élevée dans le milieu de culture (Bellon-Maurel et *al.*, 2003).

4-Matière première de la fermentation solide : La valorisation des sous produits agricoles et agro-alimentaires par voie fermentaire constitue une approche biotechnologique très intéressante pour la production de cellulases vue leur richesse en cellulose. Parmi les substrats solides utilisés ; le son et la paille de blé, la coque d'arachide, la sciure de bois...etc. En effet ces sous-produits constituent une source de choix de cellulose par excellence (Singhania et *al.*, 2009).

4-1 Le son de blé : Le son de blé est l'un des sous-produits de la mouture sèche du blé tendre. Il représente entre 11 et 15% de la masse totale du grain de blé et son rôle est de protéger la graine (Javed et *al.*, 2012). La composition biochimique du son de blé industriel comprend de 22 à 25% de glucuronoarabinoxylanes, de 14 à 17% de protéines, de 7 à 11% de cellulose, de 3 à 10% de lignine, des β -glucanes à liaisons mixtes et de 11 à 30% d'amidon résiduel selon le mode de fractionnement. (annexe 03).

Chapitre02 : Fermentation solide et matière première

Au total, les polysaccharides hors amidon représentent environ 46% du son de blé industriel, dont près de 70% sont des glucuronoarabinoxylanes (Kabel *et al.*, 2001). Sa composition varie en fonction de ses variabilités génétiques, éco-physiologiques ainsi que le mode de fractionnement et de mouture, laissant des quantités d'amidons résiduels plus ou moins grandes (annexe) (Maes *et al.*, 2001).

Lors de la récolte de la plante, celle-ci subit un fractionnement mécanique primaire qui conduit à la séparation des grains d'une part et des pailles d'autre part. Un fractionnement mécanique secondaire est réalisé sur le grain lors des activités de meunerie qui engendre deux fractions : la farine et les issues (sons, remoulages, etc.) (figure 06).

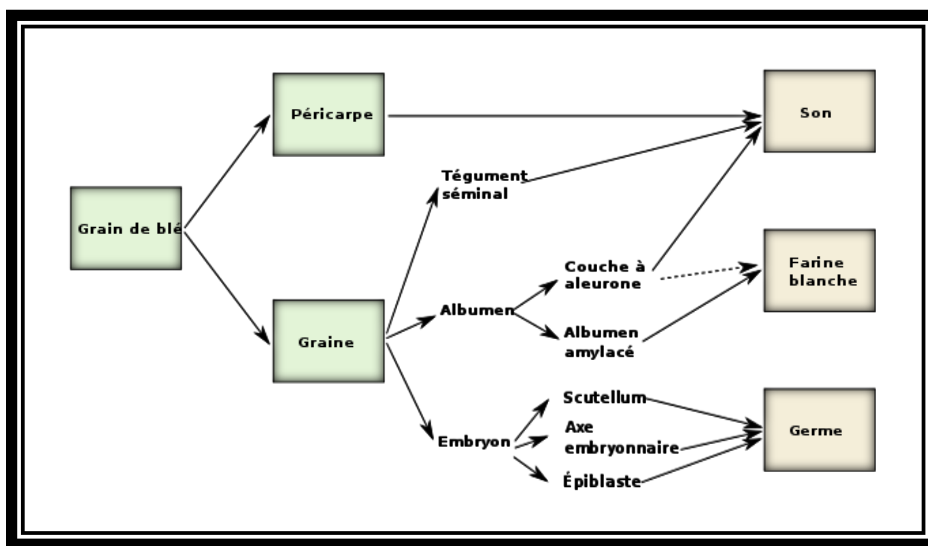


Figure 06 : Illustration générale du fractionnement du blé (Du *et al.*, 2009).

4-2-La structure macroscopique de son de blé : Pour comprendre la structure du son de blé, il faut tout d'abord aborder plus en détail la structure des tissus maternels qui constituent le tégument, enveloppe du grain de blé. Ces tissus maternels sont constitués, de l'intérieur vers l'extérieur d'une assise aleurone, du tégument séminal, du péricarpe et d'une coque externe (cuticule). La couche nucellaire (assise aleurone) recouvre directement le grain et constitue le plan de clivage lors du broyage du grain de blé. Lorsque le grain est à maturité, cette couche d'une épaisseur de 7µm environ, est composée de cellules à parois fines et non lignifiées qui adhèrent fortement aux couches voisines.

Chapitre02 : Fermentation solide et matière première

Le tégument séminal est épais, d'environ 5 à 8 um et est lui même formé de plusieurs couches, lui conférant une bonne perméabilité à l'eau (une cuticule interne, une couche contenant les pigments et une cuticule externe épaisse), le péricarpe est lui aussi organisé en plusieurs couches :

/Le péricarpe interne qui comporte une couche de cellules tubulaires à parois lignifiées et une couche de cellules transversales étroitement liées présentant des parois lignifiées alvéolées ;

/Le péricarpe externe est formé d'une agglomération de cellules du parenchyme aplatis, recouvertes par l'hypoderme et l'épiderme. L'épiderme présente une cuticule relativement épaisse et subit une modification au niveau de l'apex du grain où les cellules deviennent excessivement épaisses pour former des cheveux qui constituent la brosse.

/Enfin, la coque se compose de couches cellulaires provenant des tissus de la feuille, généralement éliminée lors du battage des céréales (figure 07) (Maes *et al.*, 2001).

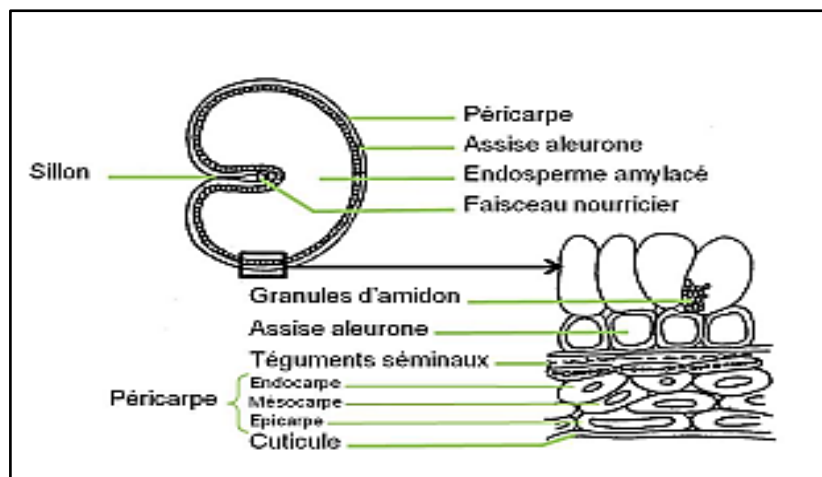


Figure 07 : Structure anatomique du son de blé (Bourdeau *et al.*, 1992).

4-3-Rôle du son de blé : Le son de blé est un des substrats les plus attractifs. Il a pour avantage de permettre une bonne circulation de l'air, de ne pas présenter d'agglomération des particules entre elles, de faciliter la pénétration du mycélium dans le substrat et d'être bon marché. Aujourd'hui, le son de blé est utilisé en fermentation sur milieu solide pour la production d'enzymes, de métabolites secondaires et autres produits d'intérêt biotechnologiques.

Chapitre02 : Fermentation solide et matière première

Le son de blé a une bonne capacité de rétention de l'eau pouvant aller jusqu'à 80% (Abdullah,1985). Ainsi, il est possible de travailler avec une humidité importante permettant une bonne croissance des champignons.

En effet, Le son de blé est un substrat potentiellement intéressant pour la production de biocarburant. Des études actuelles portent sur la saccharification et la fermentation simultanée du son de blé, qui permet de convertir les complexes polysaccharidiques en réserve de sucre facilement transformable en éthanol. Le son de blé a également un rôle dans le domaine médical, les antioxydants contenus dans ce coproduit peuvent réduire les risques de maladies telles que : le cancer du côlon, la maladie de Parkinson, les maladies cardio-vasculaires. Les fibres du son de blé sont connues pour diminuer le taux de cholestérol (Javed et *al.*, 2012).

4-4-Utilisation du son de blé : Dans l'industrie alimentaire, le son de blé est utilisé comme alternative des substrats synthétiques utilisés dans le processus de fermentation (Pandey, 1992) ainsi que dans la production d'enzymes et de métabolites secondaires (Javed et *al.*, 2012).

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

Matériel et Méthodes

Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Zoologie. Université des frères Mentouri. Constantine. Il consiste à la production et à l'extraction des enzymes cellulolytiques produites par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* cultivée par fermentation sur milieu solide (FMS).

1-Origine de la souche fongique

La souche utilisée dans ce travail a été isolée au laboratoire de Génie Enzymatique (Université Constantine 1), à partir d'échantillons de sol collectés proche de la source thermale (Hammam Debbagh, Guelma), localisée dans le nord est de l'Algérie. Cette souche a été identifiée au niveau du laboratoire DSMZ en Allemagne (Leghlimi, 2013).

2-Réactivation et repiquage de la souche

A partir de cryotubes de la souche conservée dans du glycérol à -20°C , la réactivation de cette dernière est effectuée sur deux milieux de culture gélosés : le milieu PDA (annexe 01) et le milieu Sabouraud (annexe 2), par étalement d'une suspension de spores à l'aide d'un râteau d'une pipette pasteur stérile. La croissance est poursuivie par incubation à 30°C pendant 7 jours.

Le repiquage est réalisé à partir de culture mycélienne pure, un fragment de la souche *Trichoderma longibrachiatum* est prélevé de la boîte précédente bien sporulée, est ensuite repiqué au centre de boîtes de Pétri, coulées préalablement par le milieu PDA. Les géloses ensemencées sont ensuite incubées à 30°C jusqu'à une bonne sporulation (figure 08).

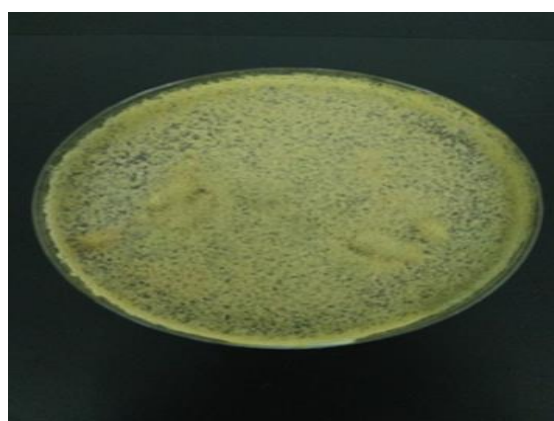


Figure 08 : *Trichoderma longibrachiatum* sur milieux PDA, après 7 jours d'incubation à 30°C

3-Dénombrement des spores

Après une bonne sporulation de la moisissure, la poudre sporale est récupérée par addition de 10 ml d'eau distillée stérile. La suspension sporale obtenue est utilisée pour l'inoculation des milieux de culture, qui vont servir pour la production des enzymes cellulolytiques recherchées.

Le nombre de spores est déterminé par le dénombrement au microscope optique (objectif $\times 40$) à l'aide d'une cellule de comptage (cellule de Thoma) (Guiraud, 1998). Ce nombre nous permettra de calculer, par la suite, le volume de la suspension sporale à inoculer tout en respectant le taux d'inoculum préconisé (2.10^7 spores/gramme de substrat).

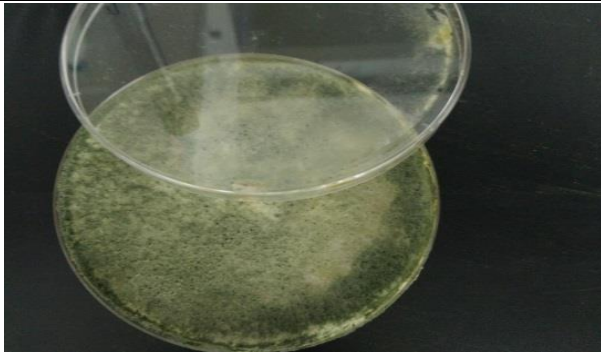
4-Conservation des souches

Les souches sont maintenues sur milieu PDA (Incubation à 30°C jusqu'à une bonne sporulation). Les spores sont récupérées par addition de 10ml d'eau tweenée additionné du glycérol à 20%. Ces suspensions de spores sont ensuite stockées au congélateur (-20°C), afin de garder leur viabilité et de limiter les possibilités de variation, jusqu'à leur utilisation (Botton et *al.*, 1990).

5-Préparation des fermentations en milieu solide

Les fermentations en milieu solide sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml à col large. Dans chaque erlenmeyer, 5g de son de blé dont le taux d'humidité initiale est de 13.5 %, sont introduits et pré-humidifiés avec une solution aqueuse à 70% (agent humidifiant). Sa composition varie selon les 11 essais du plan statistique adopté (annexe 4). Les milieux sont bien homogénéisés à l'aide d'une baguette en verre, puis les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé, recouverts avec du papier aluminium et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, les erlenmeyers sont inoculés par une suspension de spores à raison de 2.10^7 spores par grammes de substrat. Les erlenmeyersensemencés sont ensuite incubés à 30°C dans une étuve, pendant 7 jours (figure09).

Matériel et méthodes



Les spores sont
récupérer dans 10
ml
d'eau distillée

ensemencement par une suspension de spore dans 5g de milieu de culture.

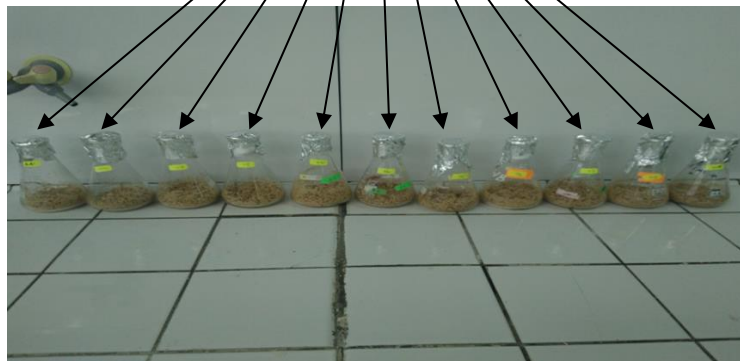
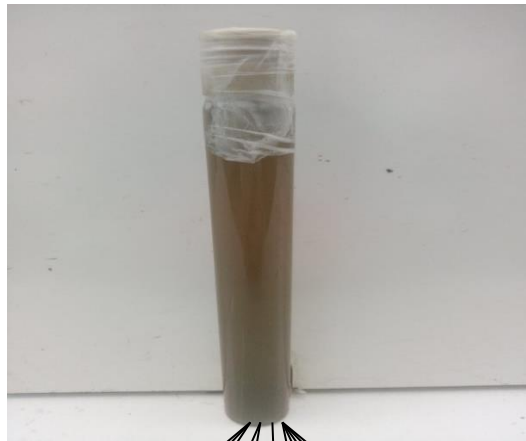


Figure 09 : Préparation de l'inoculum et fermentation sur un milieu solide

Matériel et méthodes

A la fin de la fermentation, une quantité connue (2.5 g) de substrat fermenté est mélangée avec 25 ml de tampon citrate 0.2M, pH 4.8. Après broyage à l'aide d'un mixeur ménager pendant 1 à 2 minutes, le mélange est centrifugé à 10000 rpm (4°C) pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu (représente l'extrait enzymatique) (figure 10) est utilisé pour le dosage des activités enzymatiques (papier filtre et endoglucanase). Les expérimentations sont réalisées en triplicate. Le surnageant est conservé au congélateur, jusqu'à utilisation.



Figure10 : Préparation des extraits enzymatiques par extraction du substrat fermenté.

6-Méthodes analytiques

6-1-Dosage des activités cellulolytiques

6-1-1-Activité papier filtre (APF) : est utilisée pour déterminer l'activité totale dans un complexe cellulosique selon la méthode de Ghose (Ghose, 1987) dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés (lors de l'hydrolyse d'un substrat cellulosique). Le mélange réactionnel est constitué d'une solution d'enzyme (0.25 ml), de 0.5 ml de tampon citrate (0.1M, pH 4.8) (annexe 5) et de papier filtre Wattman N° 1 (des morceaux de 1 x 3 cm), incubés à 50°C pendant 60 minutes.

6-1-2-Activité endoglucanase : (CMCase, endo 1.4- β -D-glucanase ; EC 3. 2. 1. 4) est mesurée dans un volume totale de 1 ml d'un mélange réactionnel contenant 0.5 ml d'extrait enzymatique dilué dans du tampon citrate (0.1 M, pH 4.8) et 0.5 ml d'une solution de CMC (carboxyméthylcellulose) à 1 % (W/V) préparé dans le même tampon. Ce mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 30 minutes.

Matériel et méthodes

La quantité des sucres réducteurs libérés de l'hydrolyse du papier filtre et du carboxyméthyl cellulose est mesurés selon la méthode de Miller (Miller, 1959) par une réaction colorimétrique due à la présence du réactif : acide dinitrosalicylique (DNS) (annexe6). L'absorbance de la coloration développée est lue à 540 nm, l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant le glucose comme standard avec une concentration de la solution mère de 0.0167 Mole /litre (figure 11.). L'activité enzymatique est calculée en Unité par gramme de matière sèche (U/g).

Une unité de l'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent glucose (lorsque le glucose est utilisé comme étalon sucre réducteur).

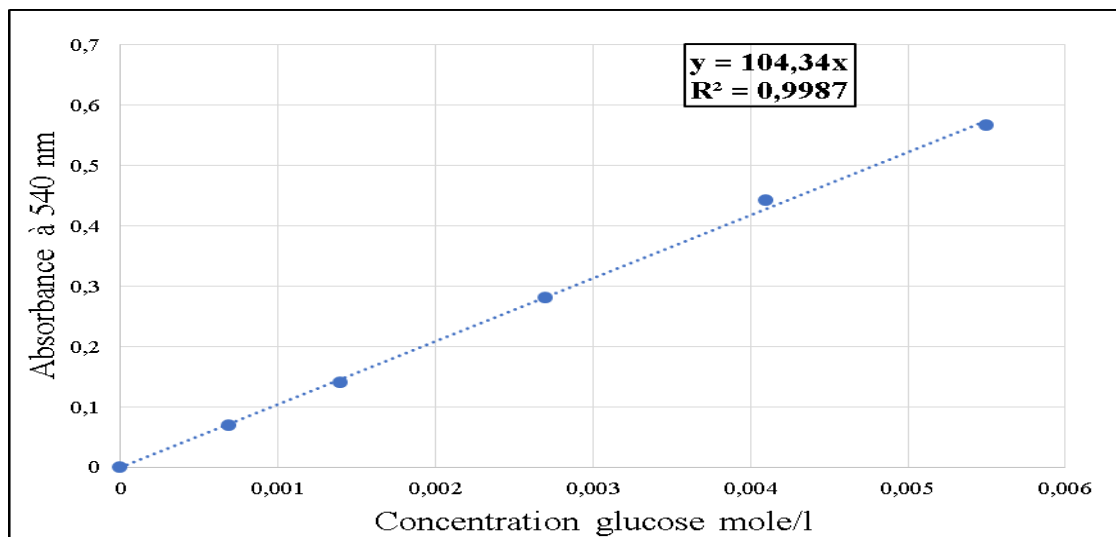


Figure11 : Courbe étalon de glucose pour la mesure des activités papier filtre et endoglucanase.

6-2- Mesure de l'humidité

L'humidité est un paramètre qui nous renseigne sur le développement du champignon au cours de la culture. En effet, au cours de sa croissance, le champignon produit six molécules d'eau pour une molécule de glucose consommée (Clémence ,2012). De plus, la mesure du taux d'humidité permet de déterminer la matière sèche, nécessaire pour le calcul de la production de l'enzyme. L'humidité est déterminée par la méthode de la mesure du poids sec. 2,5g de substrat fermenté de chaque prélèvement est séché par incubation dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant (figure 12) (Audigie et *al.*, 1984). L'humidité correspond au pourcentage que représente la masse d'eau obtenue par calcul après dessiccation par rapport à la masse initiale. D'une part, la matière totale et la matière sèche sont déterminées afin de calculer la production des enzymes.

Matériel et méthodes

La matière sèche permet également d'avoir des indications concernant la consommation du substrat. D'autre part, l'humidité est un paramètre permettant l'amélioration de la croissance du champignon et/ou de la production de la molécule recherchée.



Figure 12 : Mesure de la matière sèche après dessiccation à 105°C.

7-Méthode d'optimisation

Le processus d'optimisation des milieux de culture est un sujet d'importance centrale pour la production de métabolites à échelle industrielle. Dans le cas de la surproduction d'enzymes, les manipulations des milieux représentent la meilleure alternative aux manipulations génétiques (Reddy *et al.*, 2008).

7-2-Plan composite centré de Box et Wilson (CCD : central composite design)

Chaque microorganisme possède ses propres conditions pour une production maximale du métabolite désiré. Donc, l'optimisation des composants du milieu doit être réalisée pour maintenir un équilibre entre les divers composants, ce qui minimise la quantité des substances non utilisées à la fin de la fermentation (Murthy et Naidu, 2010).

Le plan composite centré est un outil expérimental efficace permettant l'identification des facteurs effectifs, l'étude de leurs interactions et la sélection des conditions optimales d'un système multi variable. Ce plan est originalement introduit par Box et Wilson en 1951.

Notre plan est formé de trois parties distinctes générant 11 traitements de combinaisons (tableau 4).

Ce plan est formé de trois parties distinctes pour générer un nombre de traitements de combinaisons égal à $2^k + 2.k + N$

/Un plan factoriel à deux niveaux factoriels (-1, +1), habituellement fractionné à partir de k facteurs, ce qui forme un plan factoriel complet 2^k .

Matériel et méthodes

Ce plan comprend 2^k expériences (k est le nombre de facteurs). Avec $k = 2$ facteurs, ce plan comporte 4 essais (tableau 04).

/2.k points en étoiles, avec des niveaux $(-\alpha)$ et $(+\alpha)$. La valeur du α est fonction du nombre de facteurs k ($\alpha = 1.414$).

/ N = 3 répétitions du point central (niveau 0) : afin de calculer l'erreur expérimentale ce qui permet d'analyser ce plan (3 répétitions sont effectuées).

Tableau 04 : Structure du plan composite centré à deux facteurs.

N° d'essais	Niveau codés	
	X1	X2
01	-1	-1
02	1	-1
03	-1	1
04	1	1
05	0	0
06	0	0
07	0	0
08	$(-\alpha)-1.414$	0
09	0	-1.414
10	$(+ \alpha) +1.414$	0
11	0	1.414

L'analyse du plan CCD permet d'obtenir une équation polynomiale du deuxième degré :

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

\hat{Y} : La réponse (activité cellulolytique APF ou endoglucanase, selon le cas) ;

X_1, X_2 : Les formes codées des variables explicatives ;

β_0 : La constante du modèle ;

β_1, β_2 : Les coefficients linéaires ;

β_{11}, β_{22} : Les coefficients quadratiques ;

β_{12} : Le coefficient d'interaction.

La relation entre les valeurs codées des variables entrées et ses valeurs réelles (tableaux 05) est décrite par l'équation suivante :

$$X_i = \frac{(A_i - A_0)}{\Delta A}$$

où : X_i : valeur codée du facteur ;

ΔA : valeur réelle de ce facteur ;

A_0 : valeur réelle du même facteur au niveau central ;

ΔA : pas entre le niveau central et les niveaux ± 1 .

Le plan composite centré permet d'exprimer les résultats sous forme d'un modèle quadratique nécessitant une analyse de la variance (ANOVA) qui donne la statistique de Fisher F. En général, pour que les prédictions soient significatives, la valeur de F observée doit être plus élevée que la valeur tabulée p .

.La validité du modèle est vérifiée en déterminant les coefficients de corrélation multiple (R^2) et R^2 . Lorsque R^2 est large, la régression a été alors expliquée pour une large proportion de variabilité totale des valeurs observées de \hat{Y} , ce qui favorise le modèle.

Matériel et méthodes

Tableau 05 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels utilisés dans le plan composite centré à 2 facteurs.

Facteurs	$-\alpha$ (-1.414)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1.414)
X1 :CMC (g/l)	2	6	10	14	18
X2 : (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	2	3.5	5	6.5	8

Résultats et discussion

Le plan statistique (Central Composite Design CCD) est un moyen intéressant pour la détermination des valeurs optimales exactes des facteurs ayant un effet significatif sur la production des enzymes cellulolytiques de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum*. Ces facteurs ont été déjà sélectionnés selon le plan statistique de Plackett et Burman (Yaiche et Aidouni, 2018).

Le CCD est utilisé pour étudier l'interaction entre les facteurs sélectionnés précédemment, il s'agit du carboxyméthyl cellulose (CMC) et le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, et aussi pour déterminer leur niveau optimal. Ce plan est basé sur la méthode des surfaces de réponse (RSM) qui est la plus couramment utilisée dans ce type d'expériences (Jun Li *et al.*, 2015). Elle consiste à modéliser les résultats sous la forme de fonctions polynomiales du second degré soit un modèle quadratique.

Les résultats des expériences de l'optimisation sont analysés en utilisant le logiciel Minitab 18. La signification de chaque coefficient est déterminée par les valeurs de t et les valeurs de p correspondantes. Les valeurs de p, inférieures à 0,05, indiquent que les coefficients sont significatifs. La valeur élevée de t et la valeur faible de p indiquent la signification élevée du coefficient correspondant et les variables ayant des coefficients négligeables ont été omises.

1-Activité papier filtre

Le tableau 6 renseigne sur les valeurs expérimentales données par le CCD pour l'optimisation des facteurs sélectionnés pour la réponse Y (activité APF). Les résultats de l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle de surface de réponse sont regroupés dans le tableau 06.

Le tableau 7 récapitule les coefficients significatifs du polynôme de second degré de l'activité APF déterminés par le test de Student (t) et (p) valeur.

La relation entre la réponse Y (activité APF) et les variables expérimentales obtenues par l'application du RSM est représentée mathématiquement par l'équation de régression suivante:

$$Y_{APF} = 5,828 - 1,004 X_1 + 1,163 X_2 + 3,848 X_1^2 + 1,604 X_2^2 - 0,587 X_1 \cdot X_2.$$

Où Y est l'activité APF et X₁, X₂ représentent les facteurs CMC et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ respectivement. Une corrélation est établie entre les données expérimentales et les valeurs prédites par le modèle. Plus les valeurs expérimentales seront proches de la droite de régression linéaire, plus le modèle sera pertinent.

Résultats et discussion

L'analyse statistique indique la valeur du coefficient de détermination R^2 de ce modèle est égale à 0,89. Cela signifie que 89 % de la production de l'APF sont expliqués par ce modèle et aussi par les deux variables étudiés, et que 11% restent par conséquent inexpliqués. Cette valeur élevée de R^2 témoigne de la bonne qualité et de la robustesse du modèle. Selon Vimal *et al.*, 2015, le coefficient de détermination est une mesure globale pour la qualité du modèle.

Le modèle du deuxième degré est un indicateur adéquat des résultats expérimentaux puisque la valeur de R^2 prédit de 0,6832 (68.32%) indique un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites. La valeur du coefficient de détermination ajusté R^2 Adj = 78% représente une correction de la valeur de R^2 qui permet de prendre en compte la taille de l'échantillon et le nombre de variables utilisées dans le modèle (Sampaio *et al.*, 2010). Le coefficient de détermination relativement élevé ajusté (R^2 Adj= 0,78) dans la présente étude explique la bonne qualité descriptive du modèle.

Tableau 06 : Valeurs expérimentales (observées) de l'activité APF de *Trichoderma longibrachiatum* par le CCD.

N° d'essai	Niveaux codés		Activée papier filtre (U/gds)
	CMC	(NH ₄) ₂ SO ₄	
1	-1	-1	10,833
2	1	-1	9,947
3	-1	1	14,684
4	1	1	11,448
5	0	0	8,575
6	0	0	4,394
7	0	0	4,516
8	-1.414	0	14,456
9	0	-1.414	7,190
10	1.414	0	11,693
11	0	1.414	9,982

$R^2=89\%$ R (ajust)=78% R (prévu)=68.32%

Résultats et discussion

Tableau 07 : Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité APF.

Variable	Coefficient de régression	Coefficient estimé	Valeur t	Valeur p
Constante	5,828	0,938	6,22	0,002
X1	-1,004	0,574	-1,75	0,141
X2	1,163	0,574	2,02	0,099
X1²	3,848	0,683	5,63	0,002
X2²	1,604	0,683	2,35	0,066
X1*X2	-0,587	0,812	-0,72	0,502

Tableau 08 : Analyse de variance (ANOVA) pour les paramètres de la méthode de surface de réponse adaptée au modèle polynomial quadratique pour l'optimisation de l'activité APF.

Source	DL	Som Car ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Modèle	5	105,225	21,0451	7,98	0,020
Linéaires	2	18,872	9,4362	3,58	0,108
X1	1	8,061	8,0612	3,06	0,141
X2	1	10,811	10,8111	4,10	0,099
Carré	2	84,973	42,4864	16,11	0,007
X1²	1	83,595	83,5949	31,70	0,002
X2²	1	14,515	14,5150	5,50	0,066
Interaction à 2 facteurs	1	1,380	1,3802	0,52	0,502
X1*X2	1	1,380	1,3802	0,52	0,502
Erreur	5	13,185	2,6369		
Inadéquation de l'ajustement	3	1,858	0,6192	0,11	0,947
Erreur pure	2	11,327	5,6635		
Total	10	118,410			

Résultats et discussion

L'ANOVA, à travers le modèle de régression quadratique, a révélé que le modèle de surface de réponse du second ordre obtenu est hautement significatif.

Cette analyse est également confirmée par la valeur élevée du test de Fisher. Le tableau 8 montre que la valeur de $F = 7.98$ est supérieure à celle tabulée $t = 6.22$. Ceci est approuvé aussi par une faible valeur de la probabilité ($p = 0.02$), ce que signifie que la régression est donc significative à un niveau de confiance d'environ 99 % et que le modèle choisi est adéquat pour la production de l'APF.

Par ailleurs, la signification des coefficients du modèle est réalisée par un test d'hypothèse (test-t) à un niveau de signification à 5%. Selon le tableau 8, les résultats montrent que les termes linéaires du CMC (X_1), du $(NH_4)_2SO_4$ (X_2) et l'interaction X_1X_2 ont un impact important sur l'activité APF.

L'effet négatif de la concentration CMC (X_1) montre un coefficient négatif indiquant qu'il contribue à diminuer l'activité enzymatique. Par contre, l'effet positif de la concentration en $(NH_4)_2SO_4$ (X_2) indique un effet linéaire pour augmenter l'activité APF.

Les termes quadratique (X_1)² et (X_2)² ont un impact important sur l'activité APF. Cependant, l'interaction ($X_1X_2 = -0.587$) contribue négativement à la réponse. (tableau 7)

*Calcul des optima :

Les optima des facteurs utilisés sont obtenus par le calcul des dérivées partielles de l'équation (1), ce qui permet de déterminer les coordonnées codées des extremums qui sont ensuite convertis en valeurs réelles traduisant les valeurs optimales des facteurs retenus (CMC et sulfate d'ammonium) (tableau 09).

Tableau 09 : Coordonnées codées des extremums des facteurs en SFM et leurs valeurs réelles.

Facteurs	Coordonnées codées	Valeurs réels
CMC	0.10	10.4 g/l
Sulfate d'ammonium	-0.344	4.484 g/l

2-Activité endoglucanase (CMCase)

Le tableau 10 renseigne sur les valeurs expérimentales données par le CCD pour l'optimisation des facteurs sélectionnés pour la réponse Y* (activité endoglucanase ou CMC ase).

Les résultats de l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle de surface de réponse sont regroupés dans le tableau 10.

Le tableau 11 récapitule les coefficients significatifs du polynôme de second degré de l'activité endoglucanase déterminés par le test de Student (t) et (p) valeur.

La relation entre la réponse Y* (activité CMCase) et les variables expérimentales obtenues par l'application du RSM est représentée mathématiquement par l'équation de régression suivante:

$$CMC\ ase = 12.97 + 2.90 A + 5.67 B + 4.41 A^2 + 10.00 B^2 - 2.79 A*B$$

Où : Y* est l'activité CMCase

A et B représentent les facteurs CMC et sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ respectivement.

La valeur du coefficient de détermination R² de ce modèle est égale à **0,8861**. Cela signifie que **88.61 %** de la production de CMC ase sont expliqués par ce modèle et que **11.39%** restent par conséquent inexpliqués.

Cette valeur élevée de R² indique l'efficacité du modèle. Le modèle du deuxième degré est un indicateur adéquat des résultats expérimentaux. Par contre, la valeur de R² prédit de 0,2532 (25.32%) n'indique pas un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites.

La valeur du coefficient de détermination ajusté R² (ajusté) représente une correction de la valeur de R² qui permet de prendre en compte la taille de l'échantillon et le nombre de variables utilisées dans le modèle (Sampaio *et al.*, 2010). Le coefficient de détermination relativement élevé ajusté (R²= **77.22 %**) indique une signification importante du modèle.

Résultats et discussion

Tableau. 10: Valeurs expérimentales (observées) de l'activité endoglucanase (CMC ase) de *Trichoderma longibrachiatum* par le CCD.

N° d'essai	Niveaux codés		Activée CMC ase (U/gds)
	CMC	(NH ₄) ₂ SO ₄	
1	-1	-1	11,41
2	1	-1	24,84
3	-1	1	28,505
4	1	1	30,76
5	0	0	9,949
6	0	0	14,509
7	0	0	14,439
8	-1.414	0	22,62
9	0	-1.414	28,568
10	1.414	0	27,948
11	0	1.414	44,34

Tableau 11 : Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité endoglucanase (CMC ase).

Variable	Coefficient de régression	Coefficient estimé	Valeur T	Valeur p
Constante	12,97	2,83	4,59	0,006
A	2,90	1,73	1,68	0,154
B	5,67	1,73	3,27	0,022
A ²	4,41	2,06	2,14	0,085
B ²	10,00	2,06	4,85	0,005
A*B	-2,79	2,45	-1,14	0,306

R ²	R ² (ajust)	R ² (prév)
88,61%	77,22%	25,32%

Résultats et discussion

Tableau 12 : Analyse de variance (ANOVA) pour les paramètres de la méthode de surface de réponse adaptée au modèle polynomial quadratique pour l'optimisation de l'activité endoglucanase (CMC ase).

Source	Valeur de F	Valeur de P
Modèle	7.78	0.021
Linéaires	6.76	0.038
A	2.81	0.154
B	10.71	0.022
Carré	12.04	0.012
A²	4.58	0.085
B²	23.53	0.005
Interaction à 2 facteurs	1.30	0.306
A*B	1.30	0.306
Inadéquation de l'ajustement	5.19	0.166

L'ANOVA, à travers le modèle de régression quadratique, a révélé que le modèle de surface de réponse du second ordre obtenu est hautement significatif. Cette analyse est également confirmée par la valeur élevée du test de Fisher. Le tableau 12 montre que la valeur de $F = 7.78$ est supérieure à celle tabulée $t = 4.59$. Ceci est approuvé aussi par une faible valeur de la probabilité ($p = 0.021$). Par ailleurs, la validité de modèle est confirmée par le R (prédit) qui doit être supérieur à 50%, ce qui n'est pas le cas dans notre étude, avec un R^2 prédit évalué à 25.23% (inférieur à 50%). Le R^2 prédit pour cette enzyme ne concorde pas avec le R^2 ajusté indiquant un faible accord entre les valeurs expérimentales et prédites pour la production de l'endoglucanase. Alors, on peut dire que les valeurs expérimentales de l'activité endoglucanase, obtenue par ce plan semblent en accord étroit avec la prédiction du modèle statistique.

Résultats et discussion

Par ailleurs, ce modèle statistique a été utilisé dans plusieurs travaux de recherche pour l'optimisation de la production d'autres activités enzymatiques, même d'autres métabolites.

-La protéase neutre par la moisissure *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates (Belmessikh, 2011) ;

-Le bioéthanol par la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Moussli, 2017) ;

-La xylanase par l'actinobactérie *Jonesia denitrificans* BN 13 (Hamma et Saoudi, 2016) ;

-La polygalacturonase de la levure *Aureobasidium pullulans* (Bennamoun, 2017) ;

-La pullulanase et l'alpha amylase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 (Dakhmouche, 2016).

CONCLUSION PARTIEL

La méthode statistique adoptée dans cette étude représentée par le plan composite centré de Box et Wilson, (1951) a permis de définir la composition du milieu de culture pour une production maximale de l'activité papier filtre par culture solide sur son de blé avec un taux d'humidité de 70%

l'agent humidifiant contenant :

10.4 g/l de CMC et 4.484 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Conclusion générale

La production de la cellulase par le champignon microscopique filamenteux, *Trichoderma longibrachiatum* par fermentation sur milieu solide (FMS) est effectuée sur son de blé. Ce dernier est parmi les substrats naturels, convenables pour la croissance de la moisissure à cause de sa richesse en matières azotées et en cellulose. Ces sources carbonées et azotées conviennent donc aussi bien à la croissance microbienne qu'à la production de métabolites. Ce qui permet une valorisation de ce sous produit de la moutinerie du blé, et servira pour la préparation des milieux de culture à moindre cout telle que l'exige la production industrielles de molécules à forte valeur ajoutée.

Le but de cette étude est l'optimisation de deux facteurs nutritionnels, carboxyméthyl cellulose et sulfate d'ammonium, ayant déjà été sélectionnés par une étude précédente. L'emploi du plan statistique de Box et Wilson, (1951) pour la détermination des valeurs optimales de ces deux facteurs, dans la mesure d'augmenter la production des enzymes cellulolytiques sur son de blé par cette moisissure.

L'analyse statistique des résultats des expériences de l'optimisation, nous a permis de déterminer les concentrations optimales des deux facteurs étudiés sur la production de l'activité cellulase globale représentée par l'activité papier filtre, de ce fait, l'agent humidifiant le son de blé à 70% doit contenir le CMC à 10.4 g/l et le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 4.48 g/l.

Alors que, les valeurs expérimentales de l'activité endoglucanase, obtenue par ce plan semblent en accord étroit avec la prédiction du modèle statistique (R^2 prédit inférieur à 50%). Par conséquent, on ne peut pas valider le modèle utilisé pour cette activité, et on ne peut pas calculer les optima de ces facteurs.

Au terme de cette étude, nous envisageons les perspectives suivantes :

- ✚ Faire d'autres essais avec ce plan pour s'assurer des résultats obtenus avec l'activité endoglucanase ;
- ✚ le choix d'un autre plan statistique pour optimiser la production de l'endoglucanase.
- ✚ Essai de validation du modèle en erlen meyer pour s'assurer de l'augmentation des activités recherchées ;
- ✚ Elargir l'application du modèle Box et Wilson afin d'optimiser d'autres paramètres physico chimiques influençant sur la production de cellulase ;
- ✚ Tester les milieux optimisés à grande échelle.

Références bibliographiques

- 1-Abdullah A. (1985).** "Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw." *biotechnology and bioengineering* 27(1), P: 20-27.
- 2-Alarcón G.E. (2007).** Influence de facteurs abiotiques sur la régulation des paramètres microbiens impliqués dans la dégradation de la matière organique d'une litière forestière méditerranéenne. Thèse de Doctorat .université Paul Cézanne. Aix-marseille III. France. 241.
- 3-Arja E.M.O. (2004).** *Trichoderma reesei* strains for production of cellulase for textile industry .VTT Publications. 550: 35- 96.
- 4-Arnaud A., Guiraud J.P. (1999).** le métabolisme microbien. In : *Biotechnologie*. Scriban R. 5ème Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp. 43-192.
- 5-Audigie C.L., Fagerella J., Zonszain F. (1984).** Manipulation d'analyse biochimique. P:270. Edition Tec et Doc, Lavoisier. Paris. 13, P: 25-58.
- 6-Ballerini D., Alazard-Toux N. (2006).** Les biocarburants : état des lieux, perspectives et enjeux du développement. Edts . Technip, Paris, 264p.
- 7-Bataillon M., Mathaly P., Nunes Cardinali A.P., Duchiron F. (1998).** "Extraction and purification of arabinoxylan from destarched wheat bran in a pilot scale." *Industrial Crops and Products*, 8(1):37-43.
- 8-Bèguin P., Aubert J.P. (1994).** The biological degradation of cellulose, *fems, microbiol. Rev.* Bennamoun L., Meraihi Z., Dakhmouche S., 2004. Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. *J. Food Eng.*, 64; 257–264.
- 9-Bissett J. (1991).** A revision of the genus *Trichoderma*. La section *Pachybasium*. (a) *can.J.Bot.*, , 69: 2373-2417. 2 -**Vining, I.c. (1990).** fonctions of secondary metabolites, *Annu.Rev.Microbiol.*, 44: 395-427.
- 10-Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P : 34-428.
- 11-Bouix M., Leveau J.Y. (1993).** Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Edition : technique et documentation Lavoisier. Paris. 612p.
- 12-Bourdeau A., G Ménard. (1992).** Le blé, éléments fondamentaux et transformation. Laval, Les Presses de l'Université de Laval.
- 13-Brown R., Malcolm J.r. (2004).** Cellulose structure and biosynthesis. *Pure and Applied Chemistry [en ligne]*, vol. 71, n°5, p. 767-775.
- 14-Bennamoun L. (2017).** Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens Purification et caractérisation enzymatique, ; 13–22.

Références bibliographiques

- 15-Belmessikh A. (2011)** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide.
- 16-Candace H.H., Weimer P. J. (1991).** Biosynthesis and biodegradation of cellulose. Marcel Dekker (Ed), INC, New York, pp. 164- 522.
- 17-Chundawat., Shishir P.S., Beckham., Gregg T., Himmel., Michael E., Dale., Bruce E. (2011).** Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering [en ligne], vol. 2, p. 121-145.
- 18-Clémence R. (2012).** Production d'acide itaconique par des souches d'*Aspergilli* par fermentation en milieu solide.p :64.
- 19-Coleman G.S. (1978).** The metabolism of cellulose, glucose, and starch by rumen ciliate protozoa *Eudiphodinium maggii*. J. Gen. Microbiol. 107, 359-366.
- 20-Cooney J.M., Lauren D.R., Perry-meyer L.J. (1997).** A novel tubular bioassay for measuring the production of antagonistic chemicals produced at the fungal/pathogen interface. Letters in Applied Microbiology., 24 (6) : 460-462.
- 21-Cosgrove., Daniel J. (2005).** Growth of the plant cell wall. Nature Reviews Molecular Cell Biology [en ligne], vol. 6, n°11, p. 850-861.
- 22-Cullen D., Kersten P. (1992).** 4 Fungal enzymes for lignocellulose degradation. In: Kinghorn, JR et Turner G. Applied molecular genetics of filamentous fungi. Chapman et Hall. New York, pp. 100-131.
- 23-Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z., Bennamoun L., (2006).** Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. J. Food Eng. 73; 190–197.
- 24-Doelle H.W., Mitchell D.A., Rolz, C.E. (1992).** Solid substrate cultivation. Edition: Elsevier Applied Science. New York. 466 p.
- 25-Dakhmouche D. (2016).** Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de doctorat en sciences. Spécialité : Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université des Frères Mentouri Constantine. European Food Research Technology. 231: 339–346. for new recombinant cyprosin B production in bioreactor for cheese production.
- 26-Du C., Campbell G.M., Misailidis N., Mateos-Salvador F., Sadhukhan J., Mustafa M., Weightman R.M. (2009).** "Evaluating the feasibility of commercial arabinoxylan production in the context of a wheat biorefinery principally producing ethanol. Part 1. Experimental studies of arabinoxylan extraction from wheat bran." Chemical Engineering Research and Design, 87(9):1232-1238.

Références bibliographiques

- 27-Durand A. (2003).** Bioreactor designs for solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, No13, pp 113-125.
- 28-Esposito E., silva M. (1998).** Systematics and environmental application of genus *Trichoderma*. 1998. *Crit. Rev. Microbiol.*, 24(2) : 89-98.
- 29-Genilloud O., Pelaez F., genzalez I., Diez M.T. (1994).** Diversity on actinomycètes and seaweeds from the iberian coasts. *Microbiologia*, 1994, 10 : 413-422 Grondona, I. ; Hermosa, R. ; Tejada, M. ; Gomis, M.D.
- 30-Ghose T.K. (1987).** Mesure des activités de la cellulase. *Pure Appl Chem*, 59 , 257-268.
- 31-Grondona I., Hermosa R., Tejada M., Gomis M.D., Mateos P.S., Bridge P.D., Monte E., Garcia-Acha I. (1997).** Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma Harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *App. Environ. Microb.*, 63 (8): 3189-3198.
- 32-Guiraud J. P. (1998).** *Microbiologie alimentaire*. Donod. Paris. P: 7-330.
- 33-Hasper A., Dekkers E., Mil M.V., Van de Vondervoort P. j. I., De Graaff L. H. (2002).** Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4): 1556-1560.
- 34-Henrissat B., Teeri T.T., Warren R.A.J. (1998).** A scheme for designating enzymes that hydrolyze the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett.* 425. 352-354.
- 35-Hamma S., Saoudi S.** Optimisation de la production des xylanases chez *Jonesia denitrificans*.
- 36-Javed M. (2012).** "wheat bran as a brown gold: nutritious value and its biotechnological applications." *african journal of microbiology research* 6(4), P: 724-733.
- 37-Jun Li P., Lan Xia J., Shan Y., Yuan Nie Z., Lin Su D., Rui Gao Q., Zhang C. (2016).** Long Ma oxalicum PJ02 using response surface methodology. *Waste Biomass Valorization.* 6(1) : par la méthode des plans d'expériences.
- 38-Moussli M. (2017)** Optimisation par le model Box-Behnken de la production du bioéthanol à partir d'une variété de datte algérienne à faible valeur marchande.
- 39-Kabel., Mirjam A., Van Der Maarel, Marc J.E.C., Klip, Gert, Voragen, Alphons G.J., Schols, Henk A. (2006).** Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials. *Biotechnology and Bioengineering* [en ligne], janvier, vol. 93, n°1, P : 56-63.
- 40-Kader A.J., Omar O., Feng L.S. (1999).** Isolation of cellulolytic fungi from the bario Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. *Review of Biodiversity and Environmental Conservation*.

Références bibliographiques

- 41-Karlsson J., Siika-aho M., Tenkanen M., Tjerneld F. (2002).** Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.*99.63-78.
- 42-Kubicek C.P; Bissett J.; Druzhinina I., Kullinig-Gradinger C., Szakacs G. (2003).** Genetic and métabolic diversity of *Trichoderma* sp.; a case study on south-east asian isolates. *Fungal Genet. Biol.*, 38 (3) : 310-319.
- 43-Landreau A. (2001).** Métabolites d'une souche de *Trichoderma Koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, Biologie et risques pour les coquillages en culture. Th. :Pharmacie : Nantes :, 201p.
- 44-Lee K., Jeya M., Joo A. R., Singh R., Kim I.W., Lee J.K. (2010).** Purification and characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme and Microbial Technology.* 46 : 206–211.
- 45-Leghlimi H. (2013).** Cellulases de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques desenzymes. Thèse de Doctorat en Sciences.
- 46-Lekchiri S., Moueqqit M., Lekchiri A. (2006).** Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.
- 47-Lekounougou S.T. (2008).** Evaluation et Compréhension des Mécanismes fongiques impliqués dans la dégradation du bois. Thèse doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy-I, 147p.
- 48-Leuchtman A., Petrini O., Samuels G. (1996).** Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycologia.* 88 (3): 384-394.
- 49-Lynd L.R., Weimer P.J., Van-Zyl W.H., Pretorius I.S. (2002).** Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3), 506-739 MAES, C., DELCOUR, J.A. (2001). Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction of Wheat Bran.
- 50-Marouf A., Tremblin G. (2009).** Abrégé de biochimie appliquée. Edition: EDP science. France. 483p.
- 51-Mathot P. (1996).** Modélisation d'un réacteur simplifié pour la fermentation solide de produits et sous-produits agricoles. Valorisation de l'aliment fermenté par le porc. Thèse de Doctorat, Université des Sciences agronomiques de Gembloux, (Belgique).192p.
- 52-Maurel V., Orliac O., Christen P. (2003).** Sensors and measurements in solidstate fermentation: a review. *Process Biochem.*, No 38, pp: 881-896.

Références bibliographiques

- 53-Maurer K. (1997).** Developpement of new cellulases. In: EeJE, Misset O., Baas E.J., editors. Enzymes in tetergency. Surfactant science series. 69 :175-202.
- 54- Azzouz Z,** Production de cellulases et de xylanases fongiques par fermentation solide et liquide à base de paille et de son de blé, 122 pages, Université A. MIRA- BEJAIA Faculté des sciences de la nature et de la vie Département microbiologie).
- 55-Murthy P.S., Naidu M.M., (2010).** Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Appl. Sci. J.*, 8(2); 199-205.
- 56-Non-starch Polysaccharides.** *Journal of Cereal Science* [en ligne], vol. 34, n°1, P: 29-35.
- 57-Odier E., Rouau X. (1985).** Les cellulases et les enzymes de polymérisation de la lignine. Edition Gauthier- Villard. Paris. pp. 199-214.
- 58-Pandey A., Soccol C.R. et Mitchell D. (2000).** New developments in solid state fermentation: I. Bioprocesses and products. *Process Biochemistry.* 35: 1153-1169.
- 59-Pérez J., Muñoz-Dorado J., De-La-Rubia T., Martíne. J. (2002).** Biodegradation and biological treatments of cellulose. hemicellulose and lignin. *Inter. Microbiol.*5.53 – 63.
- 60-Pimentel P.S.S., Lima de Souza A., Rosas Nascimento A.T., Vaz de Andrade E., AstolfiFilho S., Silva-Nune. C.G. (2014).** Endo And exoglucanases produced by *Penicillium Citrinum* isolated from Amazon. *BMC Proceedings* .8.179.
- 61-Pourquié J., Vandecasteele J.P. (1993).** Conversion de la biomasse lignocellulosique par hydrolyse enzymatique et fermentation. In biotechnologie, coord : Scriban R. 4ieme. Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris. pp. 677-700.
- 62-Prieto A., leal J.A., Poeda A., jiménez-Barbero,J., Gomez-Miranda B., DomenechJ.,Ahrazem, O., Berabé, M. (1997).** Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *hypocrea* species. *Carbohydrate Research* 1997, 304 (3-4): 281-291.
- 63-Rahardjo Y.S.P., Tramper J., Rinzema A. (2006).** Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol. Adv.*, Vol 24 No 2, pp 161-179.
- 64- Rajagopalan G., Krishnan C. (2008).** Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour Technol.* ;99:3044–3050.
- 65-Raynal-Ioualalen R. (1996).** Procédé de fractionnement des sons de blé. Extraction et étude des propriétés fonctionnelles des arabinoxylanes. PhD thesis, Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle - UMR 1010 INRA / INP ENSIACET, Université de Toulouse.

Références bibliographiques

- 66-Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002).** Dimension, shape, and conformational flexibility of two domaine fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *J. Biological. Chemistry.* 277 (43): 40887-40892.
- 67-Reddy L.V.A., Wee Y.J., Yun J.S., Ryu H.W. (2008).** Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour. Technol.*, 99; 2242–2249.
- 68-Riccio P., Rossano R., Vinella M., Domizio P., Zito F., Sansevrino F., D’elis A., Rosi I. (1999).** Extraction and immobilisation in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hanseni*. *Enzyme and Microbiol Technology.* 24:123-129
- 69-Rivière J. (1975).** Les applications industrielles de la microbiologie. Collection sciences agronomiques. Edition, Masson et Cie, pp.31-195.
- 70-Rolf D.S. (2005).** Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique. Edition : Flammarion Médecine – Science. Paris. 335p.
- 71-Roquebert M.F. (1996).** Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. Dans les systèmes telluriques : systématique biologie et écologie des organismes. Compte-rendu des 4 emes rencontres en toxicologie,paris, 13-15.
- 72-Roussos S. (1987).** Croissance de *Trichoderma Harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de la cellulase. Edition ORSTOM. Paris. 193p.
- 73-Roussos., Raimbault. (1982).** M.Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. - I. (Screening 1) des souches cellulolytiques. *Ann. MicrobioZ. (Insf. Pas-teur)*, 133 B, 455-464.
- 74-Sampaio P.N., Calado C.R.C., Sousa L., Bressler D.C., Pais M.S., Fonseca L.P. (2010).** Optimization of the culture medium composition using response surface methodology. (2015). Optimizing production of pectinase from orange peel by *Penicillium*.
- 75-Sasson N. (1986).** Quelles biotechnologies pour les pays en développement. Edition biofutur/ Unesco. Diffusion TEC & Doc Lavoisier. Paris. 200p.
- 76-Schamburg D., Salzman M.G.B.F. (1991).** Cellulase. In: *Enzyme Handbook, Vol IV.* Springer-Verlag Berlin, p: 1-11.
- 77-Scriban R. (1993).** Biotechnologie. 4^{ème} édition. Technique de documentation. Edition, Lavoisier. pp. 32690.
- 78-Singhania R.R. (2009).** Cellulolytic enzymes. In : *Biotechnology for agro-industrial Residues utilisation: utilization of agroresidues* Singh née nigam P et Pandey A. Edition: Springer, pp. 372-381.
- 79-Singhania R.R., Patel K., Soccol C.L., Pandey A. (2009).** Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* 44:13-18

Références bibliographiques

- 80-Smant G., Stokkermans J.P.W.G., Yan Y., De Boer J.M., Baum T.J., Wang X., Hussey R.S., Gommers F.J., Henrissat B., Davis E.L., Helder J., Schots A., Bakker J. (1998).** Endogenous celluloses in animals: isolation of β -1,4 endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Biochemistry*. 95 (9), 4906-4911.
- 81-Srinubabu G., Lokeswari N., Jayaraju K., (2007).** Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. *E-J. Chem.*, 4(2); 208-215.
- 82-Stryer L., Berg J.M., Tymoczko J.L. (2003).** *Biochimie*. 5^{ème} édition. Médecine-Sciences.Flammarion. Paris. P: 303.
- 83-Verbist J.F. (2000).** Marine fungal substances in: studies in natural products chemistry.Londres : Elsevier Sciences B.V., 24: 979-1092. 9-**Kubicek C.P., Bissett J., Druzhinina I., Kullinig-Gradinger C., Szakacs G. (2003).** Genetic and métabolic diversity of *Trichoderma* sp.; a case study on south-east asian isolates. *Fungal Genet. Biol.*, 38 (3): 310-319.
- 84- Vining I.C. (1990).** fonctions of secondary metabolites, *Annu.Rev.Microbiol.*, 44: 395-427. 14 Vimal S. Prajapati, Ujjval B. Trivedi and Kamlesh C. Patel. A statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 under solid-state fermentation. *3 Biotech.*, 2015, 5 (2): 211-220.
- 85-Widden P., Abitbol J.J. (1980).** Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. *Mycologia*, 72: 775-784.
- 86-Wilson D.B. (2009).** Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* 20 ,1-5. Voet D et G. Voet G. J. 1998. *Biochimie*, 2me Ed. De Boek. Université S. A. Paris, pp.74 - 95.
- 86-Xu B., Hellman U., Hellman U., Janson J.C. (2000).** Purification, characterisation and amino-acid sequence analysis of thermostable, low molecular mass endo- β -1,4 glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Euro. J. Biochem.* 267, 4970-4977.
- 87-Xu Q., Adney W.S., Ding S.Y., Himmel M.E. (2007).** Cellulases for biomass conversion. In *Industrielle enzyme: Structure, function, and application*. Cood. Polaina J and Maccabe A-P. Edition: Springer. Spain. 641p.
- 88-Yaiche S., Aidouni B. (2018)** Optimisation de la production de cellulase par *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur son de blé.
- 89-Zhou J., Wang Y.H., Chu J., Luo L. Z., Zhuang Y. P., Zhang S. L. (2009).** Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam- exploded corn stover by statistically designed experiments. *Bioresource. Technology*. 100: 819-825.



Annexes

Annexe 1 : Milieu PDA

- Extrait de pomme de terre
- Glucose.....20g
- Agar.....20g
- Eau distillé stérile.....1000ml
- pH= 5

***Préparation de l'extrait pomme de terre**

200g de pomme de terre non pelées vieilles sont lavés et coupés en petites dés ensuite mis dans un litre d'eau distillée et portés à ébullition pendant 20 min, ils sont enfin écrasés puis filtrés. Le filtrat obtenu représente l'extrait de pomme de terre.

***Préparation de milieu de culture**

L'agar et le glucose dissous à chaud dans l'extrait, compléter à 1Ld'eau distillée.

Annexe 02 : milieu sabouraud :

peptone10g
Glucose20g
Agar-agar.....15g
Eau distillée.....1000 ml

PH=6.0

Annexe 3 : Composition chimique du son de blé (Bataillon *et al.*, 1998)

Paramètre	Pourcentage %
Cellulose	11
Amidon	29
Protéine	14
Matière grasse	7.7
Matière minérale	4

Annexe 4: Agent humidifiant

Composition des solutions utilisées pour l'humidification de milieu .

N° d'essais	CMC(g)	(NH₄)SO₃ (g)
01	0.3	0.175
02	0.7	0.175
03	0.3	0.325
04	0.7	0.325
05	0.5	0.25
06	0.5	0.25
07	0.5	0.25
08	0.1	0.25
09	0.5	0.1
10	0.9	0.25
11	0.5	0.4

Protocole :

*Dans chaque bécher :une quantité de CMC (g) + (NH₄)SO₃ (g) dans un petit volume d'eau distillé(30ml),après dissolution complète , complétez a (50ml) avec l'eau distillé.

Annexe 5 : solution tampon citrate 0.1M, pH =4.8

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

Protocole :

- 1000 ml acide citrique (0.1M) : 23g acide citrique dans 1000 ml d'eau distillée.
- 2000 ml citrate de sodium (0.1M) : 58g citrate de sodium dans 2000ml d'eau distillée.
- Titration à l'aide d'un pH mètre (préalablement étalonné) jusqu'à pH 4.8. La solution tampon est conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

Annexe 6 : acide dinitrosalicylique (DNS) (Miller, 1959)

- Dissoudre 1g de DNS dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée (NaOH (2N) : 8g NaOH dans 100 ml eau distillé).
- Ajouter 30 g tartrate double Na, K. Compléter à 100ml avec l'eau distillée, agité.
- Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière. Il se conserve environ un mois

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en mycologie et biotechnologie fongique.

Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de cellulase sur son de blé.

Résumé

L'objectif principal de cette étude est de déterminer les valeurs optimales des deux facteurs : carboxyméthyl cellulose (CMC) et le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pour augmenter la production des activités cellulases . Pour cela, La production des enzymes cellulolytiques par *Trichoderma longibrachiatum* est effectuée sur milieu à base de son de blé à 70% d'humidité par fermentation solide (FMS), Les milieux de production sont préparés par l'emploi de ce plan à deux facteurs et 11 essais. L'analyse des résultats, a permis la détermination des optima de ces deux facteurs pour la production de l'activité cellulase globale (APF), à savoir 10.4 g/l de CMC et 4.48 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Pour l'activité endoglucanase, ce plan n'a pas donné de résultat significatif et reste à confirmer ultérieurement.

Mots clés : : Cellulase, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation en milieu solide, son de blé, optimisation, plan box et wilson .

Laboratoire de recherche : laboratoire de zoologie , faculté des sciences de la nature et de la vie .

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme . ABDEIAZIZ.W (Maître de conférences B- UFM Constantine).
Rapporteur : Mme LEGHLIMI. H (Maître de conférences A - UFM Constantine).
Examineur : Mme BELMESSIKH. A (Maître Assistante A- UFM Constantine).

Date de soutenance : 07/07/2019