

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Mycologie et Biotechnologie Fongique*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Cellulases de souches fongiques cultivées par fermentation solide

Présenté par : Boudjaada Lamia

Le 20/06/2022

Haci Sarra

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mme. LEGHLIMI Hind (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Melle. ABDELAZIZ Ouided (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : Mme. LABBANI Fatima-Zohra Kenza (MCA – ENS de Constantine)

Année universitaire
2021 - 2022

Remerciements

On remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force, la santé et la volonté d'entamer et déterminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme Leghlimi Hind Maître de Conférences classe A. Université des Frères Mentouri.

Constantine, nous la remercions pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire

Nos remerciement s'adresse à Mlle ABDELAZIZ Ouided et Mme LABBANI Fatima-Zohra Kenza pour nous avoir fait le grand honneur de juger ce travail.

Nos remerciement s'adresse également à tout nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Dédicaces

*Je dédie ce travail d'abord à moi-même,
car malgré toutes les difficultés et les obstacles, je me suis lancé un
défi et j'ai atteint ce que je suis maintenant.*

*Je le dédie également à mes parents, en particulier à ma mère que
dieu lui fasse miséricorde, qui a été la raison de mon succès, et à mon
cher frère Chouaib et ma sœur Bouchra*

À tous mes amies et mes collègues ; à mon binôme Sarra ;

À tous mes professeurs :

*Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon
profond respect et ma loyale considération*

À tous ceux qui m'aiment

Lamia

Dédicaces

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail,

À mon père, l'homme fort, confiant et au coeur pur. À lui tous mes remerciements pour m'avoir appris à me compter, pour m'avoir protégé, de ses efforts pour m'élever et surtout pour son amour et son sacrifice afin que rien n'entrave le déroulement de mes études

À ma mère, ma plus grande mentor, qui m'a appris la compassion, l'amour et le l'intrépidité, qui m'a toujours donné l'espoir de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi, mon pilier de force

À mon cher frère, mon deuxième père pour son soutien, son affection et la confiance qu'il m'a accordé

À mes chers frères et sœurs

*À tous mes amis et collègues et tous qui m'aide
En fin, je remercie mon binôme, Lamia, qui a contribué à la réalisation de ce modeste travail*

Sarra



Table des matières

Table des matières

Résumés

Les abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....1

Chapitre 01 : Revue bibliographique

1. Les cellulases

I. Définition	3
II. Mécanisme d'action	4
III. Applications	5
III.1 Industries du papier et de la pâte	6
III.2 Biocarburants et Bioraffineries	6
III.3 Agriculture	6
III.4 Industrie de l'alimentation animale	7
III.5 Industrie alimentaire	7
III.6 Détergents	7
III.7 Industrie de textile	7
III.8 Industrie pharmaceutique	8
IV. Origines	8

2. Les champignons cellulolytiques

I. Généralités	10
II. Les champignons cellulolytiques d'intérêt industriel	11
II.1 Champignons du genre <i>Trichoderma</i>	11
II.2 Champignons du genre <i>Aspergillus</i>	12
II.3 Champignons du genre <i>Penicillium</i>	12

3. La fermentation sur milieu solide

I. Définition	13
II. Substrats de la fermentation solide	14
II.1 Son de blé	15

II.2 Paille de riz	15
II.3 Bagasse	16
II.4 Résidus de vinaigre.....	17
II.5 Résidus de coco	17
III. Les étapes de la fermentation sur milieu solide	18
III.1 Préparation du substrat carboné	18
III.2 Inoculation du milieu de culture	19
III.3 Optimisation de la température, de la teneur en eau, du pH et de l'aération de la culture	19
IV. Avantages et inconvénients de la fermentation sur milieu solide	19
V. Applications de la fermentation sur milieu solide.....	20
V.1 Alimentation humaine	20
V.2 Production des acides organiques	21
V.3 Productions des métabolites secondaires	21
V.4 Energie et protection de l'environnement	21
V.5 Production des enzymes	22

Chapitre 02 : Méthodes de production des cellulases

I. Microorganismes	23
II. Substrats de fermentation	24
III. Milieux de culture	25
IV. Méthodes de fermentation et d'extraction des enzymes cellulolytiques.....	25
IV.1 Conduite de la fermentation	25
IV.2 Extraction des enzymes.....	27

Chapitre 03 : Discussion générale

Conclusion et perspectives.....	36
Références bibliographiques.....	38
Annexes	



Résumés

Résumé

Une augmentation impressionnante de l'application des cellulases dans divers domaines au cours des dernières décennies exige des recherches approfondies pour améliorer sa production à grande échelle. Par conséquent, les recherches actuelles se concentrent sur les facteurs pertinents pour une production optimale de cellulases. Leurs production selon le procédé de la fermentation sur milieu solide par des souches fongiques (*Trichoderma koningii*, *Penicillium decumbens* et *Aspergillus fumigatus*) cultivées sur des résidus agro-industriels (résidus de vinaigre, la bagasse, la paille de riz mélangé avec le son de blé), à été effectuée sous différentes conditions physiques et chimiques, afin d'examiner leur influence sur la production de cellulase (la température, le temps de fermentation, le pH initial et humidité). Les activités enzymatiques APFase et CMCase sont mesurées dans les filtrats obtenus. La production des enzymes étaient maximales à 30°C au bout de 84 heures, 6 à 8 jours, respectivement avec les souches *Trichoderma koningii* et *Penicillium decumbens*. Alors que, avec *Aspergillus fumigatus* c'était 40°C après 2 à 4 jours. Le pH optimal du milieu pour la production des cellulases était 5 pour les deux souches : *Trichoderma koningii* et *Penicillium decumbens*, et 6 pour *Aspergillus fumigatus*. Le maximum des activités enzymatiques était observé à un pourcentage d'humidité de 40 à 60% ; 75% pour *Trichoderma koningii* et *Aspergillus fumigatus*, respectivement. Un rapport d'humidité (3.1 p/v) a été préconisé pour *Penicillium decumbens*. Au vu des résultats des études précédentes, les souches fongiques mentionnées précédemment sont parmi les meilleurs champignons producteurs de cellulase, ainsi que le choix des résidus agro-industriels comme un substrat, et l'optimisation des conditions physico-chimiques semblent une alternative importante pour la production de cellulase par fermentation sur milieu solide.

Mots clés : Cellulase, fermentation sur milieu solide, *Trichoderma koningii*, *Penicillium decumbens*, *Aspergillus fumigatus*, résidus agro-industriels

Abstract

An impressive increase in the application of cellulases in various fields over the past decades demands extensive research to improve its large-scale production. Therefore, current research focuses on factors relevant to optimal cellulases production. Their production according to the process of solid fermentation by fungal strains (*Trichoderma koningii*, *Penicillium decumbens* and *Aspergillus fumigatus*) cultivated on agro-industrial residues (vinegar residues, bagasse, rice straw mixed with wheat bran), was carried out under different physical and chemical conditions to examine their influence on cellulase production (temperature, time of fermentation, initial pH and moisture). The FPAase and CMCase enzymatic activities are measured in the filtrates obtained. The production of enzymes was maximal at 30° C after 84 hours, 6 to 8 days, respectively with the strains *Trichoderma koningii* and *Penicillium decumbens*, Whereas, with *Aspergillus fumigatus* it was 40°C after 2 to 4 days. The optimum pH of the medium for the production of cellulases was 5 for the two strains : *Trichoderma koningii* and *Penicillium decumbens*, and 6 for *Aspergillus fumigatus*. The maximum of enzymatic activities was observed at a moisture percentage of 40 to 60% ; 75% for *Trichoderma koningii* and *Aspergillus fumigatus*, respectively, while (3.1 w/v) with *Penicillium decumbens*. In view of previous studies, the fungal strains mentioned above are among the best cellulase-producing fungi, as well as the choice of agro-industrial residues as a substrate, and the optimization of physico-chemical conditions seem an important alternative for the production of cellulase by fermentation on solid state fermentation.

Key words : Cellulase, solid state fermentation, *Trichoderma koningii*, *Penicillium decumbens*, *Aspergillus fumigatus*, agro-industrial residues

ملخص

تتطلب الزيادة المذهلة في استخدام السليلاز في مختلف المجالات على مدى العقود الماضية بحثًا مكثفًا لتحسين إنتاجه على نطاق واسع. لذلك، يركز البحث الحالي على العوامل ذات الصلة بإنتاج السليلاز الأمثل. إنتاجها وفقًا لعملية التخمير الصلب بواسطة السلالات الفطرية (*Trichoderma koningii*, *Penicillium* *Aspergillus fumigatus*, *decumbens*) المزروعة على بقايا الصناعة الزراعية (بقايا الخل، مصاصة القصب، قش الأرز الممزوج بنخالة القمح)، مختلف الظروف الفيزيائية والكيميائية، تم استخدامها لفحص تأثيرها على إنتاج السليوليز (درجة الحرارة، وقت التخمير، الاس الهيدروجيني الاولي الاولي، الرطوبة). يتم قياس أنشطة APFase، CMCase في الترشيح الذي تم الحصول عليه. اقصى انتاج للانزيمات كان عند 30 درجة مئوية بعد 84 ساعة، 6 إلى 8 أيام، على التوالي مع سلالات *Trichoderma koningii*, *Penicillium decumbens*. في حين كانت درجة الحرارة 40 درجة مئوية من 2 الى 4 ايام بالنسبة ل *Aspergillus fumigatus*. كان الرقم الهيدروجيني الامثل للوسط لانتاج السليلاز 5 للسلالتين: *Trichoderma koningii* و *Penicillium decumbens* و *Aspergillus fumigatus*. لوحظ الحد الاقصى من الانشطة الانزيمية عند نسبة رطوبة من 40% الى 60%؛ 75% بالنسبة للسلالتين *Trichoderma koningii* و *Aspergillus fumigatus* على التوالي. بينما نسبة الرطوبة تساوي (3.1 وزن/حجم) مع *Penicillium decumbens*. في ضوء الدراسات السابقة، تعتبر السلالات الفطرية المذكورة اعلاه من بين افضل الفطريات المنتجة للسليلاز، كما أن اختيار مخلفات الصناعات الزراعية كركيزة، وتحسين الظروف الفيزيائية والكيميائية يبدو بديلا مهما لانتاج السليلاز عن طريق التخمير الصلب.

الكلمات المفتاحية: السليلاز، التخمير الصلب، *Trichoderma koningii*، *Penicillium decumbens*، *Aspergillus fumigatus*، مخلفات التصنيع الزراعي.

Abréviations

EG : Endoglucanases

FMS : Fermentation sur milieu solide

FML : Fermentation sur milieu liquide

CMC : Carboxyméthylcellulose

APF : Activité papier filtre

PDA : Potato dextrose agar

DNS : Acide dinitrosalicylique

UI : Unité Internationale

Rpm : rotation par minute

μM : micro mole

Liste des figures

Figure 01 : Classes d'enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose (**Lakhundi et al., 2015**)

Figure 02 : Mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par la cellulase (**Béguin et Aubert, 1994**)

Figure 03 : Aspect microscopique de *Trichoderma* (**Botton et al., 1990**)

Figure 04 : Tête aspergillaire bisériée (gauche) et unisériée (droite) (**Guillaume et Alcindor, 2006**)

Figure 05 : Aspect microscopique de *Penicillium* (**Peberdy, 1987**)

Figure 06 : Structure anatomique du son de blé (**Bourdeau et al., 1992**)

Figure 07 : Paille de riz (**Gummert et al., 2020**)

Figure 08 : Bagasse (**Mohamad et al., 2019**)

Figure 09 : La moelle de coco (**Seal et al., 2015**)

Figure 10 : Un aménagement de la chambre de fermentation en acier inoxydable (**Liu et Yang, 2007**).

Liste des tableaux

Tableau 01 : Principaux microorganismes utilisés dans la production de cellulase

Tableau 02 : Avantages et inconvénients de la FMS



Introduction générale

La biotechnologie offre une alternative intéressante pour la fabrication de produits à forte valeur ajoutée, par l'emploi des microorganismes et des enzymes (**Gargouri et al., 2004**). Les enzymes commerciales destinées pour les applications industrielles sont principalement extraites de trois sources principale, à savoir les plantes, les animaux et les microorganismes (**Abdullah et al., 2018**).

Actuellement, les cellulases constituent la troisième plus grande classe d'enzymes industrielles dans le monde, en termes de volume de dollars. L'immense potentiel des enzymes cellulases pour hydrolyser les composés cellulosiques les rend extrêmement applicables aux processus industriels tels que le recyclage du papier, la transformation du coton, l'extraction de jus de fruits et légumes, la modification des tissus alimentaires, la fermentation alcoolique des céréales, les enzymes détergentes et les additifs alimentaires pour animaux etc. (**Shweta, 2015**).

Par ailleurs, l'hydrolyse de la cellulose peut être effectuée en utilisant les cellulases pour produire du glucose, qui peut être utilisé pour la production d'éthanol, d'acides organiques et d'autres produits chimiques (**Remaz et al., 2018**). La bioconversion de la cellulose nécessite l'action synergique d'un système cellulase complet composé d'endoglucanases (EC 3.2.1.4), d'exoglucanases (cellobiohydrolases ; EC 3.2.1.91) et de β -glucosidases (EC 3.2.1.21) (**Bansal et al., 2012**).

En effet, les cellulases peuvent être produites par plusieurs microorganismes, notamment des bactéries et des champignons. Parmi les genres fongiques, on trouve *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Talaromyces* (**Dashtban et al., 2009**). Ces champignons microscopiques peuvent se développer et utiliser des résidus agro-industriels mieux que d'autre microbes, car ces résidus ressemblent beaucoup à leur habitat naturel. Les champignons filamenteux sont bien connus comme une source rentable pour les cellulases industrielles en fonction de leur application ultime (**Harini et Kumaresan, 2014**).

Par ailleurs, le choix du substrat est une considération importante dans la production de cellulase. Récemment, les agro-résidus ont été utilisés comme sources de carbone dans les fermentations solide pour la production de cellulases. Pour rendre cette production économique, il convient mieux d'utiliser des substrats disponibles bon marché, et les substrats lignocellulolytiques offrent cet avantage, et ont été utilisés pour la production de cellulases. Parmi ceux, on trouve le son de blé, le son de riz,

l'épi de maïs, la paille de maïs, la tige et les cosses de maïs, la bagasse de canne à sucre et les pelures de manioc, la sciure de bois, etc. **(Ire et al., 2018)**

En plus des substrats utilisés, la technologie de fermentation appliquée peut considérablement déterminer le succès de la production de cellulase. Cependant, les technologies souvent utilisées sont des fermentations liquides et solides.

La fermentation sur milieu solide (**FMS**) est un processus attrayant pour produire de la cellulase en raison de son investissement en capital inférieur et de ses dépenses d'exploitation aussi réduites **(Sherief et al., 2010)**. Les FMS comprennent par leurs multiples avantages, entre autres : une productivité supérieure, une technique simple, un faible besoin en énergie et moins de production d'eau, une meilleure récupération du produit et l'absence d'accumulation de la mousse. Ces avantages offrent à ce type de fermentation comme le processus le plus approprié pour les pays en voie de développement **(Mrudula et Murugammal, 2011)**.

De plus, l'amélioration de la production de cellulase nécessite l'optimisation des conditions de fermentation. Les cellulases microbiennes sont de nature inductible et leur production peut être influencée par plusieurs facteurs tels que le pH, la température, l'agitation, la concentration du substrat, le type de source d'azote et de carbone, etc. **(Ire et al., 2018)**.

Dans cette optique, la présente étude vise la production de cellulases fongiques par fermentation sur milieu solide à base d'agro résidus. Dans le cadre du présent travail, un plan adopté pour explorer cet objectif est subdivisé en trois chapitres : dont le premier chapitre, est une synthèse bibliographique mettant au point l'enzyme cellulase, les champignons cellulolytiques et la fermentation solide avec ces avantages. Le deuxième chapitre mettant au point les méthodes utilisées pour la production de cellulase par différentes souches fongiques, selon la culture en milieu solide à base de résidus agro-industriels.

Le troisième chapitre est consacré à la discussion générale de quelques résultats des travaux antérieurs permettant d'évaluer notre thématique de recherche.

Une conclusion générale et des perspectives seront proposées pour donner suite à cette étude, dans le but d'améliorer la production de ces enzymes et de compléter ce travail.



Revue bibliographique

1. Les cellulases

I. Définition

Les cellulases désignent un groupe d'enzymes qui agissent ensemble pour hydrolyser la cellulose en sucres solubles. Ils sont distribués dans toute la biosphère comme les plantes, les animaux et les micro-organismes (**korish, 2003**).

L'enzyme cellulase est composée d'un domaine catalytique (CD) relié à un module de liaison aux glucides (CBM) par une courte séquence polypeptidique appelée linker (**Gomez et Saadeddin, 2013**).

La cellulase a la capacité d'hydrolyser la cellulose insoluble pour former des chaînes glucanes soluble et des sucres tels que le glucose, alors que la cellulose est connu comme une ressource renouvelable la plus abondante au monde, est présente dans une grande variété d'espèces vivantes du monde des plantes, des animaux et des bactéries ainsi que dans certaines amibes (**Samir et al., 2005**), c'est un polymère linéaire d'unités de glucose et peut être dégradée en glucose par la cellulase, qui à son tour peut être convertie en éthanol, en protéine unicellulaire et en d'autres produits chimiques précieux (**Guowei et al., 2011**).

Il existe trois principaux types d'enzymes présentes dans les systèmes de cellulase : les endo-1,4- β -D-glucanases (EG, EC 3.2.1.4), les cellobiohydrolases (CBH, EC 3.2.1.91) et la β -glucosidase. (CE 3.2.1.21) (Figure 01) (**Xu, 2002**).

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

Les endoglucanases (EC 3.2.1.4), qui catalysent l'endohydrolyse des liaisons (1,4)- β -D-glucosidiques dans la cellulose (**Gomez et Saadeddin, 2013**). Les EG clivent les liaisons au sein des chaînes situées dans les régions désordonnées amorphes de la cellulose et diminuent rapidement le degré de polymérisation du substrat. Pendant ce temps, les enzymes créent de nouvelles extrémités de chaîne sur les surfaces de cellulose pour l'attaque par le CBH (**Xu, 2002**).

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

L'exoglucanase ou la cellobiohydrolase clive progressivement la chaîne de cellulose de l'extrémité de la chaîne pour libérer du cellobiose ou du glucose. La

cellobiohydrolase est capable de dégrader la partie cristalline de la cellulose (Golan, 2011).

➤ **β (1-4)-glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21)**

Les β-glucosidases complètent l'hydrolyse des cellulo-oligosaccharides et du cellobiose en glucose (Xu, 2002), pour donner deux molécules de glucose (Leghlimi, 2013).

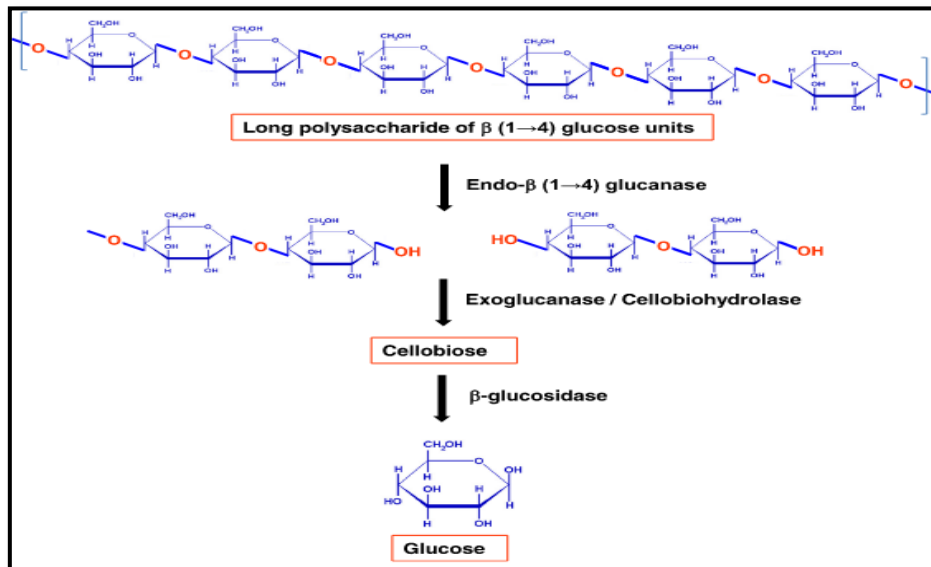


Figure 01 : Classes d'enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose (Lakhundi et al., 2015).

II. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action est de type acide/base, exigeant un donneur de proton et une base nucléophile (Figure 02). Cette hydrolyse se fait avec rétention ou inversion de la configuration anomérique. Les produits d'hydrolyse sont ainsi libérés par conservation ou inversion globale de la configuration anomérique du carbone alpha à l'extrémité réductrice. L'hydrolyse enzymatique se fait en deux étapes réactionnelles : dans la première étape, la base nucléophile attaque le centre anomérique du substrat, d'autre part, le donneur de protons (un premier acide aminé de la cellulase) protone l'oxygène de la liaison osidique, provoquant ainsi la coupure de la liaison C1 - O et la libération du premier fragment du substrat. Cependant, l'autre fragment, fixé à l'enzyme de façon instable, sera stabilisé par un second acide aminé de l'enzyme chargé négativement, qui arrache

un hydrogène à une molécule d'eau formant ainsi un groupement hydroxyle (OH-) qui agit comme un nucléophile sur un carbone d'une molécule de glucose. La liaison glycosidique se trouve ainsi rompue et libère l'autre fragment du substrat (**Leghlimi, 2013**).

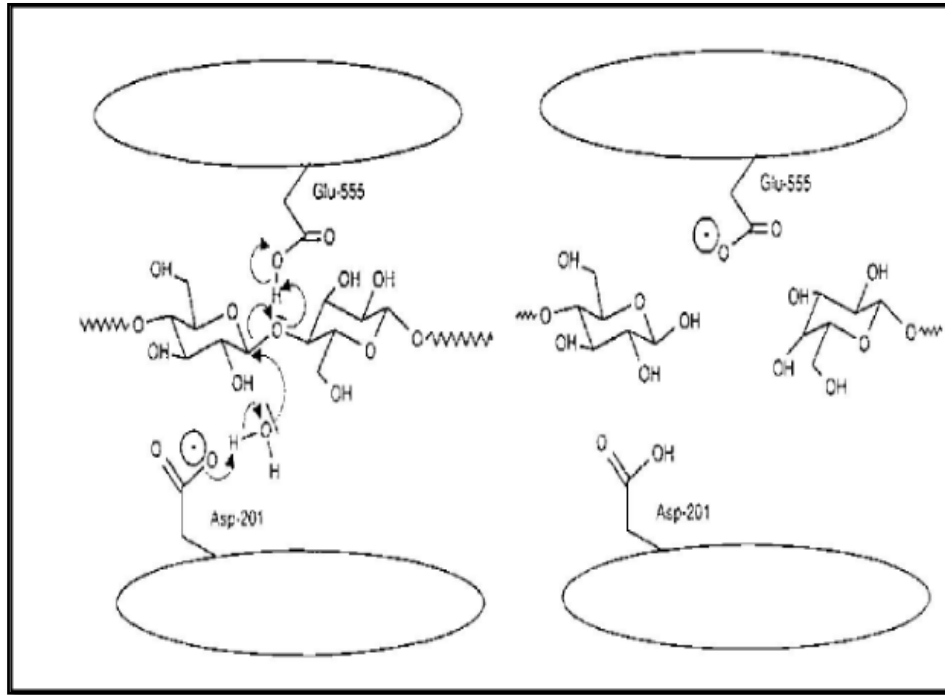


Figure 02 : Mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par la cellulase (**Béguin et Aubert, 1994**).

Asp : Acide aspartique en position 201 de la séquence de l'enzyme

Glu : Acide glutamique en position 555 de la séquence de l'enzyme

III. Applications

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

III.1 Industries du papier et de la pâte

Dans l'industrie des pâtes et papiers, les cellulases et les hémicellulases ont été utilisées pour la réduction en pâte biomécanique afin de modifier les propriétés de résistance de la pâte mécanique grossière et de la feuille à la main, le désencrage des fibres recyclées et pour améliorer le drainage et l'aptitude au fonctionnement des papeteries. Les cellulases sont employées pour éliminer les encres, les revêtements et les toners du papier, la bio-caractérisation des fibres de pâte à papier dans une autre application où les cellulases microbiennes sont employées. Les cellulases sont également utilisées dans la préparation de cartons facilement biodégradables. L'enzyme est employée dans la fabrication de papier doux, y compris les serviettes en papier et le papier hygiénique et des préparations contenant des cellulases sont utilisées pour enlever le papier collé (**Sukumaran et al., 2005**).

III.2 Biocarburants et bioraffineries

La cellulase hydrolyse la biomasse en sucres simples, soit des pentoses soit des hexoses, qui sont ensuite fermentés en carburant ou en bioéthanol. Les cellulases sont principalement impliquées dans la bioconversion de la biomasse lignocellulosique renouvelable. La dégradation de cette biomasse comprend 3 étapes : (1) prétraitement de la biomasse, (2) saccharification dans laquelle des enzymes sont impliquées et (3) fermentation. On estime que le biotraitement de la biomasse par les micro-organismes cellulolytiques peut réduire 40 % le coût du processus. Actuellement, divers pays ont adopté des politiques concernant l'éthanol cellulosique et ont fixé des objectifs pour déplacer la ressource de biomasse de féculents ou sucres de canne aux matériaux à base de cellulose (**Ejaz et al., 2009**).

III.3 Agriculture

Lutte contre les agents pathogènes et les maladies des plantes ; génération de protoplastes végétaux et fongiques ; amélioration de la germination des graines et système racinaire amélioré ; amélioration de la croissance et de la floraison des plantes ; amélioration de la qualité du sol ; une dépendance réduite aux engrais minéraux (**Kuhad et al., 2011**).

III.4 Industrie de l'alimentation animale

Une autre application de la cellulase implique son utilisation dans l'industrie de l'alimentation animale. Elle peut être utilisée pour le prétraitement des céréales fourragères et de l'ensilage agricole afin d'améliorer la valeur nutritionnelle de l'alimentation animale. De plus, les cellulases dégradent les composants anti-nutritionnels tels que oligosaccharides, β -glucane, pectines, lignine, inuline, dextrines, cellulose et arabinoxylanes, ce qui améliorent la valeur nutritionnelle des aliments pour animaux et la santé animale (**Ejaz et al., 2009**).

III.5 Industrie alimentaire

Les cellulases sont employées dans l'industrie alimentaire pour extraire et clarifier l'huile d'olive, les jus de fruits et de légumes, à des fins de production et de nectars de fruits. Les caroténoïdes, qui ont été utilisés comme colorants alimentaires, peuvent être extraits par des cellulases. Les cellulases ont été utilisées pour modifier la qualité nutritive des fourrages, une meilleure digestibilité et un meilleur taux de conversion alimentaire des aliments céréaliers pourraient être obtenus grâce à l'ajout de cellulases de *Trichoderma* (**Imran et al., 2016**).

III.6 Détergents

Les cellulases alcalines présentes dans la composition détergente peuvent traverser facilement les espaces inter fibrilles et aider à éliminer efficacement les taches de draps. De plus, les cellulases traitent les fibrilles de et donne luminosité et douceur des couleurs des chiffons même après plusieurs lavage (**Kuhad et al., 2011**).

III.7 Industrie de textile

Les cellulases ont été utilisées pour réduire l'aspect délavé et les fibres saillantes des tissus et des vêtements et pour leur donner de la douceur. Les cellulases de *Humicola insolens* sont fréquemment utilisées dans le biolapidage avec les protéases et la *Trichoderma*. Les cellulases donnent une meilleure finition et digèrent les petites fibres qui causent la rugosité des tissus. Ils ont été utilisés pour la défibrillation et l'assouplissement des tissus. Les cellulases sont de bons agents de

localisation et sont utilisées pour éliminer la variation de couleur des fibres (**Imran et al., 2016**).

III.8 Industrie pharmaceutique

Les cellulases sont apparues comme des biocatalyseurs commercialement attractifs à exploiter en industrie pharmaceutique. Ceux-ci se sont avérés jouer un rôle central dans la libération de substances médicinales composés pertinents de végétaux ou de produits végétaux. L'utilisation de cellulases comme auxiliaires digestifs (par exemple, Digestin, P-A-L Plus Enzymes, Polyzyme Plus, etc.) pour traiter les personnes souffrant de troubles métaboliques évolue comme une voie prometteuse (**Sharma et al., 2016**).

IV. Origines

Les cellulases sont produites naturellement par une grande variété d'organismes, y compris les bactéries, les champignons, les actinomycètes, les protozoaires, et certains insectes, mollusques et nématodes (**Saini et al., 2017**).

Les cellulases peuvent également être produites par des animaux et des végétaux, plusieurs animaux (omnivores et herbivores) utilisent la cellulose comme une source d'énergie, bien qu'ils ne puissent pas produire de cellulases endogènes, cela est dû à la vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif. Cependant, les animaux supérieurs ne sont généralement pas reconnus pour produire des cellulases endogènes (**Clementi, 1922**), alors que chez les plantes, les cellulases hydrolysent leurs parois cellulaires à divers stades de développement (ex. abscission du haricot, fruit maturation et abscission, et abscission du pédicelle) (**Watanabe et Tokuda, 2001**).

L'enzyme cellulase est largement distribuée dans le système vivant et en particulier chez les microorganismes (**Gupta, 2016**), les bactéries qui ont un taux de croissance élevé par rapport aux champignons, ont un bon potentiel pour être utilisées dans la production de cellulase. Cependant, l'application de bactéries dans la production de cellulase n'est pas largement utilisée (**Sethi et al., 2013**); l'un des groupes taxonomiques distincts au sein du domaine bactéries sont les actinomycètes qui

peuvent également produire de la cellulase, parmi les actinomycètes producteurs de cellulase, *Cellulomonas fimi*, *Microbispora bispora* et *Thermobifida fusca* (et une thermophile), ont été largement étudiés (Saini et al., 2015). Les levures appartiennent à un groupe de microorganismes connus pour produire des cellulases autres que les bactéries et les champignons. Des espèces de levures telles que *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Candida acidothermophilum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Trichosporon sp.* et *Pachysolen tannophilus* ont l'avantage de produire des cellulases par rapport aux autres micro-organismes (Alami et al., 2017).

Parmi les microorganismes, les champignons sont les organismes les plus étudiés et les plus utilisés en raison de leur grande capacité à sécréter de grandes quantités de cellulases (Tableau 01) (Srivastava et al., 2019).

Tableau 01 : Principaux microorganismes utilisés dans la production de cellulase (Sukumaran et al., 2005) et (Alami et al., 2017).

Principaux groupes	Microorganismes	
	Genres	Espèces
Champignons	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> <i>A. nidulans</i> <i>A. oryzae (recombinant)</i>
	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i>
	<i>Humicola</i>	<i>H. insolens</i> <i>H. grisea</i>
	<i>Melanocarpus</i>	<i>M. albomyces</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>P. brasilianum</i> <i>P. occitanis</i> <i>P. decumban</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. reesei</i> <i>T. longibrachiatum</i> <i>T. harzianum</i>

Bactéries	<i>Acidothermus</i> <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodothermus</i>	<i>A.cellulolyticus</i> <i>Bacillus sp</i> <i>Bacillus subtili</i> <i>B.acetobutylicum</i> <i>C. thremocellum</i> <i>P. cellulosa</i> <i>R. marinus</i>
Actinomycètes	<i>Cellulomonas</i> <i>Streptomyces</i> <i>Thermononospora</i>	<i>C. fimi</i> <i>C.bioazotea</i> <i>C.uda</i> <i>S. drozdowiczii</i> <i>S. sp</i> <i>S. lividans</i> <i>T. fusca</i> <i>T. curvata</i>
Levures	<i>Pichia</i> <i>Candida</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Trichosporon</i> <i>Pachysolen tannophilus</i>	<i>P.stipitis</i> <i>C.shehatae</i> <i>C. acidothermophilium</i> <i>K .marxianus</i> <i>Trichosporon.sp.</i> <i>P. tannophilus</i>

2. Champignons cellulolytiques

I. Généralités

Environ 80 000 à 120 000 espèces de champignons ont été décrites à ce jour, bien que le nombre total d'espèce est estimée à environ 1,5 million (**Webster et Weber, 2007**). Ils sont des eucaryotes qui maintiennent leur ADN à l'intérieur d'un noyau bien défini, chaque cellule fongique peut être unicellulaire ou pluricellulaire, elles se présentent sous toutes les formes et toutes les tailles (**McCoy et Noell, 2016**), elles sont des organismes hétérotrophes qui imprègnent notre environnement à quelques exceptions, ils ont un corps filamenteux entouré de parois cellulaires, sont

immobiles et se reproduisent à la fois sexuellement et asexuellement par des spores (Foster et al, 2004).

II. Champignons cellulolytiques d'intérêt industriels

Remarquablement, les champignons aérobies sont connus pour sécréter de grandes quantités de cellulase extracellulaire, ce qui les rend préférables pour l'industrie comparativement aux champignons anaérobies qui sont connus pour synthétiser des complexes multi-enzymes, le cellulosome, liés à la surface cellulaire, ce qui rend finalement sa récupération difficile. Des cellulases ont été produites et caractérisées à partir de différents champignons aérobies tels que : *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* entre autres (Ahmed et Bibi, 2018).

II.1 Champignons du genre *Trichoderma*

La première description d'un champignon nommé *Trichoderma* était en 1794 par Persoon (Figure 03) (Schuster et Schmoll, 2010), les membres du genre *Trichoderma* sont utilisés dans diverses branches de l'industrie principalement dans la production d'enzymes, d'antibiotiques et d'autres métabolites, mais aussi de biocarburant. De plus, le genre *Trichoderma* comprend des champignons comestibles et médicinaux, la capacité des champignons *Trichoderma* à produire des enzymes lytiques est utilisée dans l'alimentation animale et l'industrie du vin (brasserie) (Blaszczyk et al., 2014).

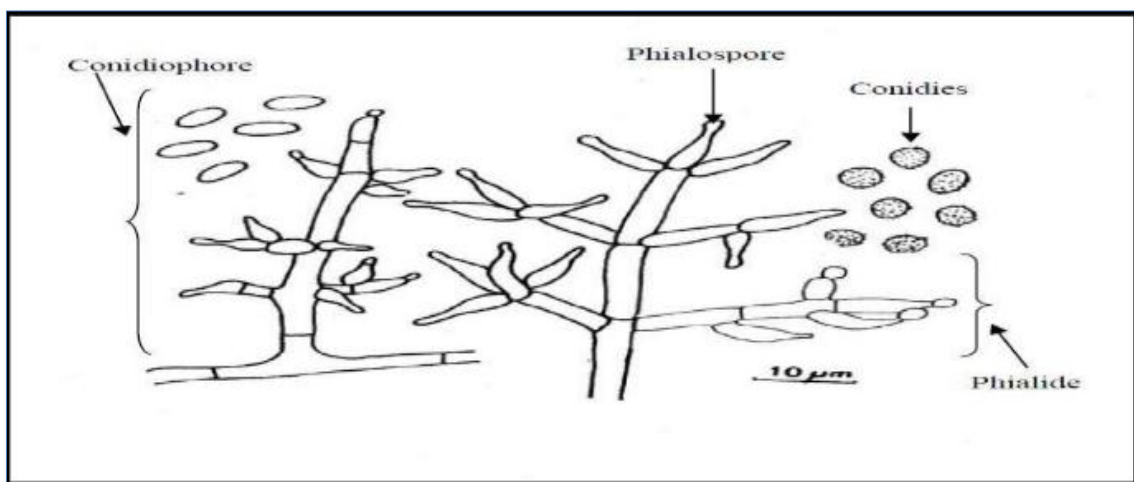


Figure 03 : Aspects microscopique de *Trichoderma* (Botton et al., 1990).

II.2 Champignons du genre *Aspergillus*

Les champignons de genre *Aspergillus* ont été décrits pour la première fois par le biologiste italien Pietro Micheli en 1729 (Figure 04) (Amaresan et al., 2020), de nombreuses espèces d'Aspergilli, principalement les souches noires d'*Aspergillus*, sont utilisées dans les industries biotechnologiques et alimentaires en raison de leur capacité à sécréter de grandes quantités d'enzymes et d'acides organiques. Les métabolites sont l'un des applications industrielles d'*Aspergillus*, dont certains sont remarquables tels que l'acide citrique, la lipase, la protéase, l'hémicellulase et la cellulase produites par *A. niger*; l'acide kojique, l' α -amylase, la protéase et la tanase d'*Aspergillus oryzae*; et l'acide itaconique et la lovastatine produits par *Aspergillus terreus* (Gupta, 2016).

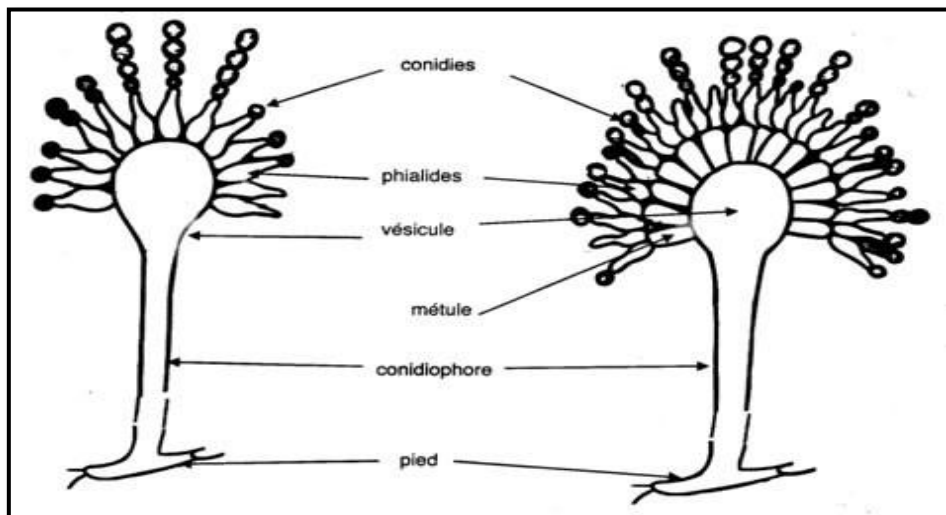


Figure 04 : Tête aspergillaire bisériée (gauche) et unisériée (droite). (Guillaume et Alcindor, 2006).

II.3 Champignons du genre *Penicillium*

Penicillium est un genre de champignons des Ascomycota, décrit pour la première fois en 1809 par Link. Le nom *Penicillium* vient du mot latin qui signifie pinceau, reflétant la forme conidiophore des champignons *Penicillium* (Figure 05) (Ropars et al., 2020), le genre *Penicillium* a été profondément étudié pour sa capacité à produire une large gamme de produits naturels (métabolites secondaires), dont beaucoup ont des applications biotechnologiques et pharmaceutiques. Il est connu comme producteur industriel d'antibiotique β -lactame en particulier de pénicilline (Guzman-Chavez et al., 2018). Plusieurs espèces de *Penicillium* sont largement

utilisées dans l'industrie, telles que *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti*, qui sont utilisés comme entrées de fromage, et *Penicillium nalgiovense*, qui est utilisé dans la fermentation des saucisses. *Penicillium waksmanii* est un important producteur de cellulase et d'hémicellulase. De plus, les acides gras et les hydrocarbures sont produits par toutes les espèces de *Penicillium* (Gupta et Rodriguez-Couto, 2018).

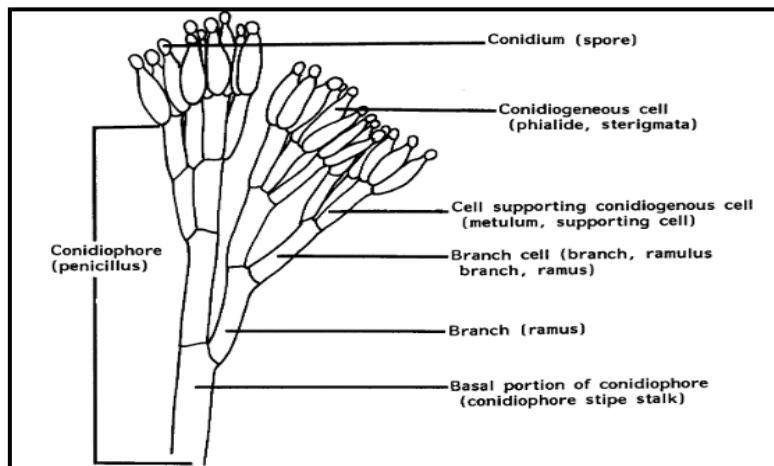


Figure 05 : Aspect microscopique de *Penicillium* (Peberdy, 1987).

3. La fermentation sur milieu solide

I. Définition

La fermentation sur milieu solide (FMS) est définie comme le processus de fermentation dans lequel les microorganismes croissent, en l'absence ou en l'absence quasi totale d'eau libre en utilisant un substrat naturel ou un substrat inerte comme support solide (Bhargav et al., 2008). Le substrat doit posséder suffisamment d'humidité pour soutenir la croissance et le métabolisme du microorganisme, la FMS ressemble à l'habitat naturel des microorganismes et est donc le choix préféré des microorganismes pour se développer et produire des produits à valeur ajoutée utiles. Les champignons et les levures ont été qualifiés de microorganismes appropriés pour la FMS selon le concept théorique de l'activité de l'eau, alors que les bactéries ont été considérées comme inappropriées (Singhania et al., 2008). L'objectif de la FMS est d'amener les champignons ou les bactéries cultivées en contact étroit avec le substrat insoluble et d'obtenir la concentration la plus élevée en nutriments du substrat pour la fermentation. L'utilisation de cette technologie à grande échelle

reste encore limitée, mais elle présente des avantages par rapport à la fermentation immergée (**Bhargav et al., 2008**).

Bien que la FMS a été largement utilisée depuis l'Antiquité, pour la production d'aliments fermentés comme la sauce soja et le miso dans l'Extrême-Orient, ce type de culture solide a été modernisé au cours des 20 dernières années et différents systèmes FMS non traditionnels ont été développés (**Barrios-González, 2012**).

Deux types de systèmes FMS ont été distingués selon la nature de la phase solide utilisée ; le système le plus couramment utilisé consiste à cultiver sur un matériau naturel, et le moins fréquemment utilisé consiste à cultiver sur un support inerte imprégné d'un milieu liquide (**Krishna, 2005**).

La fermentation sur milieu solide offre de nombreuses opportunités dans la transformation des résidus agro-industriels. Cela s'explique en partie par le fait que les procédés sur milieu solide nécessitent moins d'énergie, produisent moins d'eaux usées et sont respectueux de l'environnement car ils résolvent le problème de l'élimination des déchets solides (**Pandey, 2002**).

II. Substrats de la fermentation sur milieu solide

Dans les études actuelles, la relation entre le substrat et la production de cellulase a été étudiée pour sélectionner le meilleur substrat pour les cellulases actives, puisque la quantité et la disponibilité de cellulases bon marché et de haute activité sont des éléments essentiels dans la réussite de la conversion enzymatique des substrats cellulosiques (**Rajoka et al., 1997**).

Le son de blé, la paille de blé, la paille de riz, l'épi de maïs, la bagasse de canne à sucre, le marc de fruits et les tourteaux (par exemple, arachide, moutarde, graines de lin, soja) représentent les principaux agro-résidus. Ils sont principalement composés de cellulose (40 à 50 %), d'hémicellulose (20 à 30 %), de lignine (10 à 25 %) et de pectine (~35 %) (**Dhillon et Kaur, 2016**).

II.1 Son de blé

Le son de blé est l'un des alternatives les plus intéressantes au milieu synthétique dans les procédés de fermentation, connu comme un sous-produit de la mouture du blé, généralement pris sous forme de céréales ou de produits de son spéciaux (Figure 6). Est subdivisé en trois couches distinctes (testa, aleurone et péricarpe), il est composé d'environ 53% de fibres alimentaires (xylanes, lignine, cellulose et galactane, fructanes). Les autres composants comprennent les vitamines et les minéraux (le fer (Fe), zinc (Zn), manganèse (Mn), magnésium (Mg), phosphore (P)) et les composés bioactifs (Onipe et al., 2015).

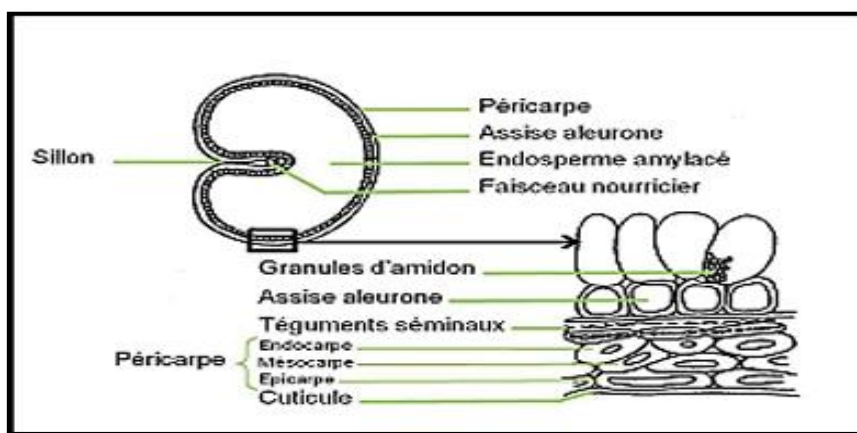


Figure 06 : Structure anatomique du son de blé (Bourdeau et al., 1992).

Le son de blé est un candidat potentiel dans l'industrie de la fermentation en raison de ses propriétés uniques : Capacité de rétention d'eau, source d'azote, production de métabolites, production de biocarburant, aspects sanitaires, en tant qu'additif pour l'alimentation humaine et animale, Bioremédiation etc, mais la propriété la plus importante que la nature complexe du son de blé réside dans sa composition nutritive unique (Javed et al., 2012).

II.2 Paille de riz

La paille de riz est le principal sous-produit de la culture du riz et l'un des résidus agricoles les plus abondants dans le monde, qui est un déchet contenant de la cellulose qui peut être utilisée comme substrat pour la production d'enzyme cellulase (Figure 07) (Maftukhah et Abdullah, 2018). Il a une teneur élevée en cellulose et en hémicelluloses qui peuvent être facilement hydrolysées en sucres fermentescibles. En termes de composition chimique, la paille contient

majoritairement de la cellulose (32–47%), de l'hémicellulose (19–27%) et de la lignine (5–24%) (Binod *et al.*, 2010).



Figure 07 : Paille de riz (Gummert *et al.*, 2020).

II.3 Bagasse

La bagasse, un résidu restant après l'extraction du jus de la canne à sucre, est ensuite utilisée dans certaines industries comme principale source d'énergie. La production en vrac estimée de bagasse après extraction du jus de canne à sucre est de 600 Mt, soit entre 40 et 50 % du poids total de la canne à sucre produite annuellement dans le monde (Figure 08) (Ashraf *et al.*, 2020). La bagasse contient principalement de la cellulose (57,76%), de l'hémicellulose (12,94%), de la lignine (21,34%), et d'autres composés (7,96%). Pour cette raison, la bagasse devient une source potentielle de production de cellulase en utilisant des champignons (Abdullah *et al.*, 2018).

Il s'agit généralement d'un type de déchet, qui peut avoir des usages particuliers. Puisqu'il contient une assez bonne quantité de cellulose, cette cellulose qui peut être extraite et peut avoir différentes applications (Nikodinovic *et al.*, 2013).



Figure 08 : Bagasse (Mohamad *et al.*, 2019).

II.4 Résidus de vinaigre

Le vinaigre est une solution diluée impure d'acide acétique obtenue à partir de denrées alimentaires et de son de blé par fermentation au-delà du stade alcoolique, est utilisée comme condiment et conservateur traditionnels. Le vinaigre a été produit à partir de nombreux matériaux, notamment la mélasse, les céréales, lactosérum, etc. **(Liu et Yang, 2007)**.

Habituellement, certains matériaux agricoles tels que les denrées alimentaires, la coque de blé et le son de riz riches en amidon et en lignocellulose sont utilisés dans la production de vinaigre. En conséquence, une grande quantité de résidus de déchets est générée dans l'industrie du vinaigre, qui n'est généralement pas utilisée, et provoque souvent une pollution de l'environnement. C'est une question importante de traiter les résidus à la fois pour l'utilisation complète des ressources lignocellulosiques et pour la prévention de la pollution de l'environnement. Étant donné que la plupart de l'amidon et des ingrédients solubles dans la matière première du vinaigre ont été dégradés par des bactéries au cours du processus de production, le résidu de vinaigre a une fraction de vide très élevée. Par conséquent, il est bien ventilé et les champignons cellulolytiques cultivés peuvent facilement obtenir suffisamment d'oxygène, le résidu sans aucun prétraitement a été utilisé comme substrat dans une fermentation à l'état solide pour produire de la cellulase **(Liu et Yang, 2007)**.

II.5 Résidus de coco

La moelle de coco est une matière organique qui provient de l'hémisphère tropical, en particulier du sud-Asie de l'Est, au départ la moelle de coco était considérée comme un déchet, mais la recherche en a maintenant établi de nombreuses applications. Au cours des dernières années, les préoccupations environnementales ont attiré l'attention sur l'utilisation de la moelle de coco comme substrat alternatif avec une orientation vers les besoins agricoles (Figure 09) **(Jabasingh et al., 2014)**.

La moelle de coco est un résidu lignocellulosique composé de lignine 20 à 40 %, de cellulose 40 à 50 %, d'hémicellulose 15 à 35 % et de protéines 2,04 %. La fibre de coco est produite à partir de la fibre de noix de coco (*Cocos nucifera* L). Plus de 1423 millions de noix de coco ont été produites au Tamilnadu avec une moyenne de

10 000 noix/ha à partir desquelles une tonne de fibre de coco et une autre tonne de moelle de coco sont devenues disponibles (**Kanmani et al., 2009**). La bonne teneur en cellulose de la moelle de coco et sa disponibilité abondante suggèrent que ce lignocellulosique peut être utilisé comme substrat pour une production plus économique d'enzyme cellulase (**Muniswaran et al., 1994**).



Figure 09 : La moelle de coco (**Seal et al., 2015**).

III. Les étapes de la fermentation sur milieu solide

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

III.1 Préparation du substrat carboné

Les substrats carbonés utilisés en fermentation sur milieu solide proviennent essentiellement des résidus agricoles et agroalimentaires. Ce sont les substrats lignocellulosiques (sous forme de paille, de son, de bagasse, de pulpe, etc.), les féculents (résidus de banane, de soja, les graines, etc.), les supports synthétiques (mousse de polyuréthane, résine polymérique, etc.), etc. La préparation du substrat carboné vise à lui faire subir divers traitements physique, chimique ou biologique (enzymes) afin de favoriser une grande accessibilité des constituants du substrat aux microorganismes (**Assamoi et al., 2009**).

III.2 Inoculation du milieu de culture

L'inoculation du milieu de culture se fait le plus souvent à partir d'une suspension de spores. Celles-ci restent viables plus longtemps que du mycélium, sont moins sensibles aux conditions externes et se conservent plus facilement. La quantité optimale de spores à inoculer diffère selon les cas. Un excès de spores peut parfois inhiber la germination. Les spores sont cependant métaboliquement dormantes, impliquant que la dégradation du substrat ne peut s'installer qu'après la germination. Pour minimiser cet inconvénient, une pré-germination des spores est parfois envisagée. Des inocula spores + mycélium + substrat de production peuvent être également utilisés (Assamoi et *al.*, 2009).

III.3 Optimisation de la température, de la teneur en eau, du pH et de l'aération de la culture

La mesure de la température se fait souvent dans la couche solide et dans la phase gazeuse entrant et sortant du réacteur grâce à des thermosenseurs, thermistances/thermistors ou des sondes métaboliques Pt, à l'échelle du laboratoire. L'activité de l'eau est contrôlée en plaçant le bioréacteur dans une chambre de culture dont l'humidité de l'atmosphère est régulée par des solutions salines saturées. À grande échelle, le bioréacteur est généralement aéré avec de l'air saturé en eau. En fermentation sur milieu solide, il n'existe pas d'électrode pouvant enregistrer le pH des milieux solides à cause de l'absence d'eau libre. Certains auteurs utilisent des électrodes potentiométriques ou une électrode à pH standard, après suspension de l'échantillon dans de l'eau distillée. L'aération des cultures solides joue quatre fonctions, à savoir le maintien des conditions d'aérobies, l'élimination du dioxyde de carbone, la régulation de la température de culture et la régulation de la teneur en eau (Assamoi et *al.*, 2009).

IV. Avantages et inconvénients de la fermentation sur milieu solide

Les différents avantages et inconvénients de la FMS sont récapitulés dans le (Tableau 02)

Tableau 02 : Avantages et inconvénients de la FMS (Hesseltine, 1987)

Avantages	Inconvénients
<p>1- Le substrat peut être très simple, n'utilisant souvent qu'un seul ingrédient plus de l'eau. Par exemple, dans la production d'aflatoxine, seul du riz poli humidifié est utilisé. Dans le shoyu koji, seuls les flocons de blé torréfié et de soja concassés sont fermentés. Dans certains cas, pour améliorer la croissance, des nutriments supplémentaires peuvent être ajoutés directement à l'eau utilisée pour humidifier le substrat.</p>	<p>1- L'inconvénient le plus important est la génération de chaleur qui se produit même dans les petites fermentations de seulement 1 kg. L'excès de chaleur doit être contrôlé, sinon la température devient si élevée et détruit le produit microbien désiré ou arrête complètement la croissance et la fermentation.</p>
<p>2- Le récipient de fermentation n'a pas besoin d'être aussi grand que celui requis pour un processus de fermentation liquide.</p>	<p>2- Parfois, le substrat doit être traité pour le rendre plus facilement infecté par l'inoculum et pour augmenter la surface d'accessibilité</p>
<p>3- La contamination bactérienne se produit rarement avec les fermentations fongiques dans des substrats solides parce que le niveau d'humidité à la surface du substrat est trop faible pour soutenir la croissance bactérienne. Pour cette raison, de nombreuses fermentations à l'état solide peuvent être effectuées dans des cuves ouvertes, même si la contamination bactérienne sera toujours présente dans l'air.</p>	<p>3- Pour les grandes fermentations nécessitant une agitation, les coûts énergétiques peuvent être élevés. Bien que l'agitation constante de la matière solide devienne très coûteuse, sachant que l'agitation n'est peut-être pas la meilleure façon de produire un produit donné</p>
<p>4- Le processus de fermentation à l'état solide peut être étendu à grande échelle ou à une fermentation continue.</p>	<p>4- Avec le milieu concentré, la quantité initiale d'inoculum requise peut être assez élevée. Il est encore plus élevé dans une fermentation continue car l'inoculum doit être ajouté en continu à la fermentation.</p>

V. Applications de la fermentation solide

V.1 Alimentation humaine

Dans les pays orientaux et en Afrique, de nombreux aliments traditionnels sont obtenus par fermentation sur milieu solide (FMS). A base de soja, riz, arachide, de manioc, ils portent les noms de shoyu (sauce de soja), sufu (fromage à base de soja), tempeh (aliment à base de soja ou d'arachide, très populaire en Indonésie); ou ontjom (issu d'une fermentation d'un gâteau d'arachide pressé, populaire en Inde

orientale). N'oublions pas le fameux saké des Japonais, boisson alcoolisée fabriquée à partir de riz préalablement fermenté par une moisissure (*Aspergillus oryzae*) en milieu solide (**Durand, 1998**).

V.2 Production des acides organiques

Les acides organiques sont utilisés depuis longtemps par l'industrie alimentaire comme additifs alimentaires et conservateurs pour prévenir la détérioration, et prolonger la durée de conservation des ingrédients alimentaires périssables (**Rodríguez-Couto et Sanroman, 2006**). La fermentation joue donc un rôle clé dans la production de ces acides organiques et leur fabrication progressé avec le développement de la FMS, parmi ces acides organiques (acide citrique ; acide lactique ; acide gallique...). Cependant, les procédés biotechnologiques pour la production à grande échelle d'acides organiques sont en cours de développement (**Bhargav et al., 2008**).

V.3 Productions des métabolites secondaires

La FMS peut être utilisée avec succès pour la production de métabolites secondaires car la morphologie mycélienne associée aux micro-organismes principalement utilisés pour la production de métabolites secondaires est bien adaptée à la croissance sur un substrat solide, un certain nombre de paramètres du processus sont importants pour la production de métabolites secondaires dans la FMS. Ceux-ci incluent la température, la teneur en humidité initiale du substrat, l'aération, le mélange, le choix du substrat et la taille des particules (**Krishna, 2005**), parmi les métabolites secondaires qui peuvent être produits par fermentation à l'état solide : l'acide gibbéréllique qui est naturellement présent dans les plantes, les alcaloïdes de l'ergot, les différents antibiotiques tels que : Pénicilline, Cyclosporine etc, et aussi les différents mycotoxines comme aflatoxine, ochratoxine, patuline ...

V.4 Energie et protection de l'environnement

La fermentation sur milieu solide est importante pour résoudre la crise énergétique et la pollution de l'environnement. Elle a été appliquée avec succès pour les biocarburants, les biopesticides, la biotransformation, la détoxification biologique et la bioremédiation. La production d'éthanol-carburant à partir de la fermentation sur

milieu solide est le point chaud de la recherche actuelle, une autre application importante de la fermentation sur milieu solide dans la protection de l'environnement est la biotransformation des cultures et des déchets pour améliorer leur valeur et participer à la dépollution de l'environnement (**Chen, 2013**).

V.5 Production des enzymes

La production d'enzymes est un domaine en croissance rapide dans le domaine de la biotechnologie, bien que la fermentation submergée (liquide) ait été la technologie préférée pour la production d'enzymes, employant généralement des souches génétiquement modifiées. Il existe un intérêt significatif à utiliser des techniques de fermentation sur milieu solide pour la production d'une large gamme d'enzymes industrielles. Parmi les avantages des procédés de fermentation sur milieu solide, il est souvent cité que les titres enzymatiques sont plus élevés que dans la fermentation immergée lorsque l'on compare la même souche et le même bouillon de fermentation (**Krishna, 2005**) ; en outre la fermentation sur milieu solide peut être particulièrement intéressant dans les procédés où le produit fermenté brut peut être utilisé directement comme source d'enzymes (**Pandey et al., 2000**).



**Méthodes de production
des cellulases**

Ce chapitre décrit 4 protocoles expérimentaux basés sur la production de la cellulase, les 3 premiers ont étudié la production de cette enzyme par fermentation en milieu solide à partir de 3 souches fongiques appartenant aux genres : *Trichoderma* ; *Penicillium* et *Aspergillus*, cultivées sur différents milieux à base de résidus agro-industriels (résidus de vinaigre, bagasse, paille de riz et son de blé), par comparaison, à une étude qui porte sur la production de cellulase d'*Aspergillus niger*, par fermentation liquide sur résidus de coco comme substrat. Les méthodes employées suivent les étapes ordinaires : isolement et culture de la souche, préparation du substrat de la fermentation, conduite de la fermentation et en fin la mesure des activités cellulases, ainsi que d'autres analyses effectuées sur les substrats fermentés.

I. Microorganismes

D'après les études analysées, les microorganismes utilisés sont : *Trichoderma koningii*, *Penicillium decumbens*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus niger*

I.1. *Trichoderma koningii*

Trichoderma koningii AS3.4262 a été cultivée sur la gélose au dextrose de pomme de terre (*PDA*) contenant 1,5% de gélose et incubé à 30°C pendant 7 jours jusqu'à sporulation complète. Les spores des pentes ont été mises en suspension dans de l'eau stérile. La suspension a été utilisée comme inoculum (10^7 spores/mL) (Liu et Yang, 2007).

I.2. *Penicillium decumbens*

La souche productrice de cellulase de *P. decumbens* L-06. A été maintenue sur des géloses inclinées au dextrose de pomme de terre (*PDA*), conservé à 4°C et repiquée toutes les deux semaines. Pour la préparation de l'inoculum, les cultures ont été incubées sur *PDA* liquide à 30°C pendant 16 ou 18 h avec une agitation de 150 tours/min sur un agitateur rotatif, puis transférées dans un milieu de fermentation à l'état solide selon une quantité d'inoculation de 10% (10^6 spores/ml) (Long et al., 2009).

I.3. *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus a été isolée localement à partir de certains échantillons de sol prélevés dans le district de Mansoura en, Mai 2007 (Sherief et al., 2010). La souche a été maintenue en routine sur des pentes PDA. Les pentes fraîchement cultivées à 28 °C sont ensuite utilisées pour un travail ultérieur ou stockées à 4 °C. Les repiquages sont effectués régulièrement toutes les 4 à 5 semaines d'intervalle (Sherief et al., 2010).

I.4. *Aspergillus niger*

Le champignon a été isolé de la zone de rouissage de coco (Mrudula et Murugammal, 2011). L'isolat a été cultivé sur un milieu Czapek-Dox-agar (CMC) et criblé. La culture a été identifiée sur la base de la morphologie de la colonie et de l'examen microscopique. La souche fongique isolée a été cultivée et maintenue sur des pentes CMC et stockée à 4 °C, jusqu'à ce que nécessaire (Mrudula et Murugammal, 2011).

II. Les substrats

Dans ces études, le résidu de vinaigre, la bagasse, la paille de riz mélangé avec le son de blé et les résidus de coco sont principalement utilisés comme substrat de fermentation.

- Le résidu de vinaigre d'une taille de (3 ± 1) mm a été obtenu auprès d'un fabricant local de vinaigre, Yangxin Hengqingtang Ya Pear Fermenting Co., Ltd, Chine (Liu et Yang, 2007).
- La bagasse non traitée et du son de blé sont utilisés. La bagasse a été lavée à l'eau pour éliminer tout sucre résiduel, séchée et broyée en poudre de 40 mesh (Long et al., 2009).
- La paille de riz et le son de blé sont séchés à l'air et broyés (Sherief et al., 2010).
- Les déchets de coco ont été broyés en poudre fine et ont été traités individuellement avec une solution de NaOH à 1 % (p/v) dans un rapport de 1:10 (substrat : solution) pendant 1 heure et a été amené à pH neutre par lavage abondant avec de l'eau distillée et séché à température ambiante.

Enfin, les déchets traités ont été autoclavés à 121°C pendant 1 heure (Mrudula et Murugammal, 2011)

III. Milieux de culture

Trichoderma koningii est ensemencée sur milieu minéral (Mandels et al., 1981) Les substrats de base utilisés étaient le son de blé (150 g) et les déchets de vinaigre (100 g). Le milieu a été ajusté à une certaine humidité et à un certain pH par addition de HCl (0.4 M). La stérilisation a été faite à 121°C pendant 15 min et la teneur en eau du substrat était de 50% dans la plupart des expériences (Liu et Yang, 2007).

Le substrat utilisé par *Penicillium decumbens* L-06 a été soigneusement mélangé avec la solution de Mandel (Annexe 01) (Long et al., 2009).

La paille de riz et le son de blé en proportions égales (1 : 1) et des contrôles ont été dispersés (Annexe 01). Le milieu a été inoculé avec 2.0 ml de spores fongiques en suspension dans une solution basale tamponnée stérile (tampon acétate 0.1 M, pH 5.5) (Sherief et al., 2010).

L'inoculum a été préparé en cultivant la souche dans un flacon Erlenmeyer de 250 ml avec 100 ml de bouillon Czapek-Dox (Annexe 01). Le milieu a été inoculé à partir des pentes de gélose Czapek-Dox et incubé à 30°C pendant 3 jours dans un agitateur (200 tours/min) avant d'être utilisé pour le processus de fermentation (Mrudula et Murugammal, 2011).

IV. Méthodes de fermentation et d'extraction des enzymes cellulolytiques

IV. 1 Conduite de la fermentation

➤ *Trichoderma koningii*

Des expériences à petite échelle ont été réalisées dans des flacons coniques (500 ml). Chaque flacon a été rempli de 100 g de substrat humide. Après ensemencement avec une suspension de spores à 10%, les flacons ont été placés dans un incubateur et maintenus à température constante, 27, 30 et 33°C. La production de cellulase à échelle pilote, a été réalisée dans une chambre de fermentation en acier inoxydable, qui avait une hauteur de 280 mm et un diamètre de 240 mm. L'épaisseur de la couche de substrat solide était de 20 cm et la température ambiante était contrôlée à

Méthodes de production des cellulases

28–30°C par bain d'eau. De l'air avec plus de 90% d'humidité a été soufflé à travers le fond de la chambre de culture par l'aération forcée.

Le flux d'air était de 10 L/min. De longs sacs de gaze (3 × 25 cm) remplis de substrat ont été intégrés dans le lit garni pour l'échantillonnage (Figure 10). Des échantillons ont été prélevés du lit à 2, 6, 10, 14 et 18 cm de hauteur. Les nouveaux trous ont été remplis de substrat de sauvegarde à temps (Liu et Yang, 2007).

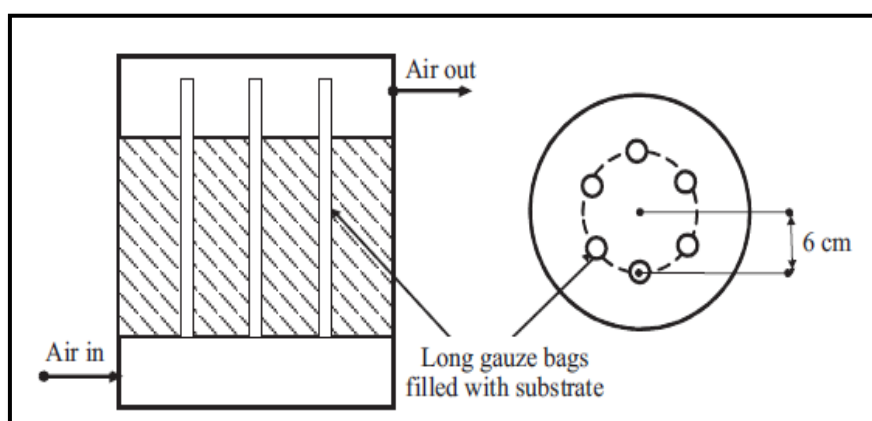


Figure 10 : Un aménagement de la chambre de fermentation en acier inoxydable. De longs sacs de gaze remplis de substrat ont été intégrés dans le lit garni pour l'échantillonnage (Liu et Yang, 2007).

➤ *Penicillium decumbens*

Les expériences ont été menées dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml, contenant chacun 5 g de bagasse de canne à sucre brute et de son de blé, les expériences ont été menées à un seul facteur pour identifier les variables ayant des effets significatifs sur la production de cellulase par *P. decumbens* L-06. Les facteurs testés comprenaient le rapport de l'eau à la matière solide, le pH initial, la température de culture et le temps de fermentation etc. La teneur en humidité a été maintenue à 70%. Pour éliminer les grandes quantités de chaleur produites dans le lit de substrat pendant la croissance des micro-organismes, une agitation a été employée (Long et al., 2009).

➤ *Aspergillus fumigatus*

Un ensemble des flacons contenant 1.0 g de paille de riz et de son de blé avec un niveau d'humidité de 3.0 ml (tampon acétate 0.1 M ; pH 5.5) ont été incubé à 30°C.

Trois flacons ont été récoltés quotidiennement à des intervalles de 8.0 jours. Le milieu a été stérilisé et les flacons ont été inoculés avec une suspension de spores. La culture statique a été réalisée à différentes valeurs de pH initiales : 4.5 ; 5.0 ; 5.5 ; 6.0 ; 7.0 et 8.0. La teneur en humidité a été modifiée par l'ajout d'une solution tampon (tampon acétate de 0.1 M ; pH 5.5) pour obtenir une plage d'humidité de 33 à 83%. Le temps d'incubation a été limité à la période de fermentation optimale après laquelle les substrats fermentés ont été extraits (**Sherief et al., 2010**).

➤ *Aspergillus niger*

La fermentation liquide a été réalisée dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu de fermentation (Annexe 01). Chaque flacon a été inoculé avec 1 ml de la suspension de spores. Les cultures ont été incubées sur un agitateur rotatif (120 rpm) à 30°C pendant 72 heures (**Mrudula et Murugammal, 2011**).

IV.2 Extraction des enzymes

IV.2.1. *Trichoderma koningii*

Des échantillons ont été prélevés toutes les 12 h pendant la fermentation pour la détermination de l'humidité, de l'activité cellulase et des sucres réducteurs totaux. La masse fermentée produite a été mélangée avec 25 volumes de tampon à pH 4.8 sous agitation à 200 tours/min à température ambiante pendant 1 heure, le mélange est ensuite filtré sur un tissu de coton de 200 mesh.

➤ Dosage enzymatique

Les activités papier filtre (APFase) et la carboxyméthylcellulase (CMCase) ont été mesurées selon la méthode recommandée par (**Ghose, 1987**) et exprimées en unités internationales (UI). Un morceau de papier filtre (6 x 1 cm) ou 5 mL de solution de carboxyméthyl cellulase (1%) a été mélangé avec une solution d'enzyme diluée, puis maintenu à 50 °C pendant 30 min. La quantité de sucre réducteurs libérés lors de l'hydrolyse des substrats cités précédemment, a été déterminée à l'acide dinitrosalicylique (DNS). Une unité internationale d'activité cellulase est la quantité d'enzyme qui libère une μ mole de glucose par minute au cours de la réaction

d'hydrolyse. Les activités enzymatiques ont été calculées pour 1 g de matière sèche de substrat (SDM). (Liu et Yang, 2007).

V.2. *Penicillium decumbens*

2 g de résidus fermentés ont été mis en suspension dans 40 ml d'eau distillée, incubés à 45°C pendant 2 heures puis centrifugés (8000 tours/min, 10 min). Le surnageant a été utilisé pour la détermination des activités enzymatiques. Le poids sec du son moisi a été déterminé par le séchage de 10 g à 105°C jusqu'à poids constant.

➤ Dosage enzymatique

Les activités APFase et endo- β -1,4-glucanase (CMCase) ont été mesurées comme décrit par (Ghose, 1987). Une unité d'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μ M de sucre réducteur par minute et l'activité de la cellulase a été exprimée en UI g⁻¹ (unités par gramme de son fermenté sec) (Long et al., 2009).

V.3. *Aspergillus fumigatus*

Les substrats fermentés fraîches dans chaque flacon de culture ont été mélangés avec 50 ml de solution tampon acétate 0.1 M, pH 5.5, les mélanges ont été laissés au repos pendant 1 heure à température ambiante (24 \pm 2°C). Les extraits ont été obtenus par filtration des mélanges sur toile de nylon ; puis centrifugé pendant 10 min à 5000 rpm pour éliminer les résidus fongiques et les particules de substrat. Les filtrats clarifiés ont été utilisés pour la mesure des activités exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase et CMCase (Sherief et al., 2010).

➤ Dosage de la cellulase

L'activité enzymatique cellulase a été déterminée selon (Mandels et al., 1976), 1% de substrat dissout dans le tampon acétate 0.1M, pH 5.5, qui peut être : cellulose amorphe (pour l'endoglucanase), CMC (pour CMCase) ou bien Avicel pH 101, cellulose microcristalline pour l'avicellase, exoglucanase, respectivement. La quantité de sucres réducteurs libérés a été déterminée contre l'enzyme bouillie comme contrôle avec le D-glucose comme standard. L'activité a été exprimée en

Méthodes de production des cellulases

UI/g de substrat sec, défini comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire une μ mole de glucose par Minute par gramme de protéine pour chaque substrat utilisé. (Sherief et *al.*, 2010).

➤ Dosage de β -Glucosidase

Selon (Christakopoulos et *al.*, 1994), l'activité de la β -glucosidase a été déterminée par mesure de l'augmentation de l'absorbance à 420 nm, après 30 min d'incubation de l'enzyme avec 0,0136 M de p-nitrophényl- β -D-glucopyranoside, comme substrat. La courbe standard du p-nitrophénol est utilisé comme référence.

La réaction est arrêtée par l'ajout d'une solution de carbonate de sodium. Une unité de β -glucosidase est définie comme la quantité d'enzyme qui libère une μ mole de p-nitrophénol par minute et par gramme de protéine dans les conditions de la réaction enzymatique. La β -glucosidase a été exprimée en UI par gramme de substrat (Sherief et *al.*, 2010).

V.4. *Aspergillus niger*

A la fin de la fermentation, le bouillon de culture issu de la fermentation liquide a été centrifugé à 6000 rpm pendant 15 min et le surnageant a été utilisé comme source d'enzyme extracellulaire (Mrudula et Murugammal, 2011).

➤ Dosage enzymatique

Les activités cellulase [papier filtre (APFase) et carboxyméthyl cellulase (CMCase)] ont été dosées selon la méthode décrite par (Ghose, 1987). Une unité d'activité enzymatique (CMCase et APFase) est définie comme la quantité d'enzyme qui libère une μ mole de sucres réducteurs par min avec le glucose comme standard, Les valeurs des activités enzymatiques ont été exprimées en U/ml (Mrudula et Murugammal, 2011).



Discussion générale

L'obtention d'enzymes de manière rentable est l'un des éléments clés de la biotechnologie industrielle, c'est ainsi que 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 globale de la production des enzymes (**Srinubadu et al., 2007**). Les cellulases sont des enzymes extrêmement importantes à la fois dans l'industrie et dans le monde naturel ; elles deviennent un sujet de recherche en premier plan car ces cellulases jouent un rôle majeur dans le cycle globale de carbone pour transformer les restes cellulolytiques en aliments afin de répondre aux besoins alimentaires croissants dans le monde entier. Les cellulase sont utilisées à de nombreuses fins dans le secteur biotechnologique grâce à ces large gamme d'applications et elles deviennent de plus en plus importantes pour hydrolyser la biomasse végétale en sucre fermentescibles qui sont ensuite convertis en biocarburant comme l'éthanol. Les champignons sont les organismes qui ont attiré le plus d'attention en terme de production de cellulases en grande quantités en raison de leur capacité de pénétration et de leur polyvalence d'utilisation de substrat, *Trichoderma koningii*, *Penicillium decumbens* et *Aspergillus fumigatus* sont considérées comme les champignons modèle pour étudier la production de la cellulase sur milieu à base de résidus agroindustriels.

Parmi les nombreuses méthodes économiquement réalisables pour la production de cellulase, la fermentation liquide et la fermentation à l'état solide. La fermentation solide est évoquée dans notre étude, elle est considérée comme la méthode la plus populaire vu son faible coût d'investissement et ses dépenses d'exploitation inférieures. Un certain nombre d'approches ont été adoptées dans le but de réduire le coût de production d'enzymes, celles-ci ont inclus l'utilisation des résidus agroindustriels qui sont nécessaires pour les processus de fermentation dans le but d'obtenir la cellulase à partir de champignons. Ces résidus peuvent servir des matières premières ou substrat idéal pour les processus microbiens de production des enzymes notamment les cellulases, pouvant ainsi valoriser ces nutriments et générer de nouvelles molécules à haute valeur ajoutée. Cela affecte l'environnement positivement, en éliminant la pollution d'une part et d'une autre part c'est économique, bien que ces matières premières soient moins chères. Un prétraitement est généralement nécessaire pour améliorer le taux d'accessibilité des matières lignocellulolitique.

Les progrès de la biotechnologie industrielle offrent des opportunités potentielles pour l'utilisation de ces résidus agro-industriels. Le son de blé ; la paille de riz ; la bagasse et les résidus de vinaigre utilisées dans ces études, sont considérés comme des matériaux à faible coût et qui ont été utilisés avec succès comme substrats pour la production de la cellulase.

En fait, les études précédentes visent l'étude de la production de niveau élevé de cellulase sous la fermentation sur milieu solide (FMS) par des souches fongiques appartenant à des espèces différentes : *Trichoderma koningii* cultivée sur les résidus de vinaigre comme substrat, la souche de *Penicillium decumbens* est utilisée sur la bagasse comme matière première, la moisissure *Aspergillus fumigatus* sur un milieu composé de deux substrats : son de blé avec la paille de riz. Dans ces conditions, l'optimisation des paramètres de culture a été effectuée (effet de la température, effet du temps de la fermentation, effet du pH initial, effet de l'humidité...). L'activité optimale du papier filtre (APFase) et de la carboxyméthylcellulase (CMCase) ainsi que l'activité β -glucosidase ont été évaluées. Enfin les résultats obtenus en fermentation solide sont comparés avec ceux de la fermentation liquide assurée par *Aspergillus niger*.

L'analyse et la comparaison des résultats précédents, concernant la production de cellulase par différents champignons, révèle les points suivants :

➤ Les facteurs affectant la production de cellulase par les souches fongiques

1. La température

La température est un facteur critique, joue un rôle prépondérant sur la croissance, la germination, la sporulation et le métabolisme des moisissures affectant ainsi la biosynthèse des enzymes (**Raimbault, 1983**). D'après (**Liu et Yang, 2007**), la température maintenue dans le système FMS par *Trichoderma koningii*, en général, est comprise entre 27 et 33°C et dépend de la cinétique de croissance du micro-organisme plutôt que de l'enzyme produite, ils montrent que le maximum des activités papier filtre (4.64 UI/g SDM) et CMCase (10.42 UI/g SDM) est enregistrée à la température de 30°C. Par conséquent, toute température inférieure ou supérieure à cette température optimale conduit à une diminution de la valeur des activités enzymatiques. Aussi (**Long et al., 2009**) trouvent que la température

optimale de production des activités APFase (3.9 UI/g), CMCCase (42.3 UI/g) produites par *Penicillium decumbens L-06* par FMS sur un milieu à base de canne à sucre est à 30°C. Alors que (Sherief et al., 2010), annoncent que le maximum des activités (CMCase 14.3 UI/g, endoglucanase 0.36 UI/g, exoglucanase 0.56 UI/g et β -glucosidase 8.2 UI/g) produites par *Aspergillus fumigatus* cultivé sur la paille de riz et le son de blé comme substrat, est enregistré à 40°C.

Par ailleurs, l'étude menée par (Mrudula et Murugammal, 2011), où ils ont incubé *Aspergillus niger* sous une fermentation à l'état liquide utilisant les déchets de coco comme substrat pour la production de cellulase, a montré que 50 % de la cellulase a été produite lorsqu'elle a été cultivée à 20, 25 et 40°C. Alors que la température optimale pour une production maximale des enzymes a été enregistrée à 30°C.

2. Le temps de fermentation

Le temps de fermentation est important pour la croissance des microorganismes et a une grande influence sur la production des enzymes. Dans la production de cellulase en milieu solide, (Liu et Yang, 2007) ont pu évaluer une activité maximale (4.64 UI/g) d'APFase et (10.42 UI/g) de CMCCase après 84 heures, suivi par une réduction du rendement, cela peut être due à une dénaturation des enzymes résultant de la variation du pH et du métabolisme cellulaire pendant la fermentation. Tandis que les résultats de (Long et al., 2009) montrent que les activités enzymatiques atteignent leurs maximum (3.9 UI/g) pour APFase et (44.7 UI/g) pour CMCCase le 6^{ème} et le 8^{ème} jour respectivement, suivi d'une diminution. (Sherief et al., 2010), annoncent que le rendement maximal des activités CMCCase et exoglucanase est obtenu après 4 jours, tandis que les activités maximales d'endoglucanase et de β -glucosidase sont affichées après 2 à 4 jours.

Dans le même contexte, et en parlant du temps de fermentation, mais avec un montage liquide, les résultats de (Mrudula et Murugammal, 2011) ont montré que l'activité de la cellulase augmente régulièrement et a atteint son maximum à 96 heures d'incubation.

De ce fait, on constate que la période d'incubation est nécessaire pour l'obtention d'un rendement optimal de cellulase. Elle varie d'un microorganisme à l'autre, selon les conditions expérimentales et même selon le type de fermentation choisi. Alors

une courte période d'incubation pour la production d'enzymes offre la possibilité d'une production peu coûteuse (**Mrudula et Murugammal, 2011**).

3. Le pH

Le pH du milieu est l'un des facteurs les plus critiques affectant la croissance fongique, la production d'enzymes et le transport de divers composants à travers la membrane cellulaire (**Raghuwanshi et al., 2014**).

Selon l'étude de (**Liu et Wang, 2007**) les valeurs de pH initiales ont été ajustées par addition de HCl ou de NaOH à (3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 et 8,0). Il a été observé que le résidu initial de pH 3 n'était pas adapté à la production de cellulase par *Trichoderma koningii* en raison d'une mauvaise croissance due à un pH acide. Par ailleurs la production de cellulase est plus proportionnelle à des valeurs d'acidité assez élevée de 3 et comprise entre (4 et 8), dont la production maximale de cellulase est observée à pH 5 avec des valeurs correspondant de (APFase 10.2 UI/g SDM, CMCCase 4.2 UI/g SDM). Tandis que dans l'étude de (**Long et al., 2010**), les pH initiaux de culture ont été établis de 3.5 à 6.5 avec un écart de 0.5. Les valeurs maximales des activités enzymatiques enregistrées par *Penicillium decumbens* : APFase 3.4 UI/g et CMCCase 41.8 UI/g ont été enregistrées à pH 5. Cependant (**Sherief et al., 2010**), ont ajusté différents niveaux de pH initiaux sur la production par *Aspergillus fumigatus* entre 4.5 et 8. Une augmentation progressive de la production de cellulase est remarquée avec une augmentation de pH, partant de 4,5 jusqu'à atteindre un pH égale à 6, là où la production était maximale, dont les valeurs mesurées pour l'activité exoglucanase 0.56 UI/g, endoglucanase 0.38 UI/g, β -glucosidase 7.33 UI/g et CMCCase 12.5 UI/g, ensuite la production commence à diminuer avec l'augmentation du pH.

Le pH a également un effet sur la production de cellulase en fermentation liquide. (**Mrudula et Murugammal, 2010**), différentes valeurs de pH de 4.5 à 8 ont été testées, la production maximal des activités APFase et CMCCase étaient 1.26 U/ml et 1.81 U/ml, respectivement, par *Aspergillus niger* a été obtenue à 7.5 et 6.5 respectivement. L'activité enzymatique a progressivement augmenté avec l'augmentation du pH jusqu'à l'optimum suivi d'une diminution à chaque augmentation de l'acidité.

4. L'humidité

Les champignons étaient bien connus pour supporter un environnement humide pour leur croissance. La teneur en humidité optimale dans la FMS dépend de la nature du substrat, des exigences du microorganisme et du type de produit final (Gao et al., 2008).

D'après (Liu et Wang, 2007) la température de culture est maintenue à (30 ± 1) °C, une large gamme de teneurs en humidité a été explorée, la teneur en humidité de 40% à 60% (en masse) a considérablement améliorée l'activité enzymatique, l'activité était la plus élevée dont APFase a été mesurée à 4.64 UI/g SDM et l'activité CMCCase a été mesurée à 10.42 UI/g SDM. Lorsque l'humidité était inférieure à 40%, la quantité de production n'était pas significative. Mais une augmentation importante de l'humidité a influencé négativement la production d'enzymes (à des taux d'humidité supérieurs à 60%). Alors que selon (Long et al., 2009), la production de cellulase a été augmentée avec l'augmentation de teneur en eau jusqu'à atteindre une teneur égale à (3 : 1 p/v) de sorte que cette dernière est considérée comme la valeur optimale pour la production, dont APFase 3.7 UI/g et CMCCase 39.5 UI/g, et avec l'augmentation de la teneur en eau de plus (3 : 1 p/v), la relation devient inverse, car la production commence à diminuer progressivement. Toujours, concernant l'effet de l'humidité sur les activités cellulolytiques d'*Aspergillus fumigatus* (Sherief et al., 2010). Le niveau d'humidité de 75% (3.0 ml) a donné le maximum des activités avec les valeurs respectives : exoglucanase (0.82 UI/g), endoglucanase (0.49 UI/g), β -glucosidase (9.7 UI/g) et CMCCase (14.81 UI/g). L'augmentation du niveau d'humidité est censé de diminuer la production d'enzymes en raison de la diminution de la porosité du substrat, de l'altération de structure des particules de substrat, le transfert d'oxygène inférieur. D'autre part, une faible humidité réduit la solubilité des nutriments et des protéines, ainsi que l'effet sur le gonflement du substrat utilisé.

En comparant les valeurs obtenues par fermentation solide à celle de la fermentation liquide, on soupçonne que, le rendement de production de cellulase par (FMS) est plus significatif que celui produit par (FML). Donc nous concluons que la fermentation à l'état solide est avantageuse pour la production de cellulase par rapport à la fermentation liquide parce qu'elle est souvent plus facile et le matériel

de fermentation est simple d'une part, et d'une autre part, les contaminations sont limitées puisque la teneur en humidité est faible, de plus les résidus agro-industriels sont utilisés comme substrat solide agissant à la fois comme sources de carbone et d'énergie, ce qui rend le processus n'est pas cher et surtout rentable. Tandis que la fermentation à l'état liquide n'est pas préférable car elle utilise de supports et d'équipements coûteux ainsi que l'élimination des déchets est difficile, avec une consommation importante d'énergie.



**Conclusion et
perspectives**

La production de cellulases par des souches fongiques (*Trichoderma Koningii*, *Penicillium decumbens* et *Aspergillus fumigatus*) cultivées sur des résidus agro-industriels à savoir, les résidus de vinaigre, la bagasse, le son de blé avec la paille de riz, respectivement est examinée dans cette étude. L'effet de la température, du temps de fermentation, du pH initial et de l'humidité sur la production des enzymes APFase et CMCCase, est aussi établi.

1. Effet de température

Le maximum de production a été observé à des températures : 30, 30, 40°C respectivement, avec les activités respectives APFase et CMCCase pour : *Trichoderma koningii* AS3.4262 (**4.64 IU/g SDM** et **10.42 IU/g SDM**), *Penicillium decumbens* L-06 (**3.9 IU/g** et **42.3 IU/g**), et *Aspergillus fumigatus* (CMCCase **14.3 UI/g**, endoglucanase **0.36 UI/g**, exoglucanase **0.56 UI/g** et β -glucosidase **8.2 UI/g**).

2. Effet du temps de fermentation

La production maximale des activités enzymatiques de ces trois souches a été évaluée après 84 heures, 6 et 8 jours et 2 à 4 jours pour (*Trichoderma koningii*, *Penicillium decumbens* et *Aspergillus fumigatus*) respectivement.

3. Effet du pH

Les souches utilisées ont pu donner une production maximale pour les deux activités papier filtre et CMCCase à un pH initiale de 5 à la fois pour *Trichoderma koningii* (APFase **10.2UI/g SDM**, CMCCase **4.2 UI/g SDM**) et *Penicillium decumbens* (APFase **3.4 UI/g**, CMCCase **41.8 UI/g**). Un pH de 6 pour *Aspergillus fumigatus* avec les valeurs suivantes : (CMCCase **12.5 UI/g**, endoglucanase **0.38 UI/g**, exoglucanase **0.56 UI/g**, β -glucosidase **7.33 UI/g**).

4. Effet d'humidité

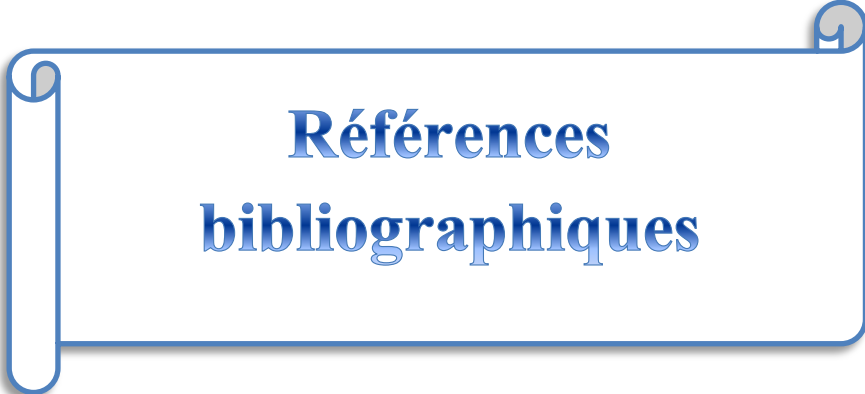
L'humidité permet d'obtenir le maximum de production de cellulase à un pourcentage de (40-60%) pour *Trichoderma koningii* (APFase **4.64 UI/g SDM**, CMCCase **10.42 UI/g SDM**), (75%) pour *Aspergillus fumigatus* (CMCCase **14.81 UI/g**, endoglucanase **0.49 UI/g**, exoglucanase **0.82 UI/g**, β -glucosidase **9.70 UI/g**),

la teneur en eau exigée par *Penicillium decumbens* est (3 : 1 p/v) avec les valeurs suivantes : (**APFase 3.7 UI/g, CMCase 39.5 UI/g**).

Conformément aux résultats, en tenant compte de tous les facteurs d'influence, on peut considérer les résidus de vinaigre, bagasse, le son de blé avec la paille de riz comme des déchets agroalimentaires d'importance industrielle, que l'on peut utiliser pour produire de la cellulase et même d'autres métabolites à intérêt industriel. En effet, ces résidus contiennent une teneur importante en cellulose, ce qui entraîne une bonne induction pour la synthèse des enzymes cellulolytiques.

Et comme perspectives nous pensons à :

- Réaliser des expériences sur la production de la cellulase par fermentation solide
- Optimiser des paramètres de production des enzymes et déterminer des valeurs optimales des facteurs sélectionnés
- Valoriser d'autres déchets industriels pour la production, afin de trouver un procédé économique d'intérêt industriel



**Références
bibliographiques**

1-Abdullah., Hamid., Christwardana, M., Hadiyanto, H. (2018). Optimization of Cellulase Production by *Aspergillus niger* ITBCC L74 with Bagasse as Substrate using Response Surface Methodology. HAYATI Journal of Biosciences [en ligne], 25 (3), (page consultée le 04/04/2022) <http://dx.doi.org/10.4308/hjb.25.3.115>

2-Ahmed, A., Bibi, A. (2018). FUNGAL CELLULASE; PRODUCTION AND APPLICATIONS: MINIREVIEW. LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences [en ligne] ,4 (1) : 19-36 (page consultée le 03/04/2022) <https://dx.doi.org/10.20319/lijhls.2018.41.1936>

3-Alami, N. H., Kuswyasari, N. D., Zulaika, E., Shovitri. M. (2017). OPTIMIZATION OF CELLULASE PRODUCTION BY CANDIDA G3.2 FROM THE RHIZOSPHERE OF GUNUNG ANYAR MANGROVE SURABAYA. Proceeding of International Conference on Green Technology [en ligne], 7 (1) : 399-406 (page consultée le 03/04/2022) <http://conferences.uin-malang.ac.id/index.php/ICGT/article/view/655>

4-Amareesan, N., Kumar, M. S., Annapurna, K., Kumar, K., Sankaranarayanan, A. (2020). Beneficial microbes in agro ecology : Bacteria and Fungi. India : Academic Press. 936 p

5-Ashraf, M., Kumar, R., Khan, K., Saqib, D., Ali, S. S., Khan, S., Amin, M. N. (2020). Role of Sugarcane Bagasse Ash in Developing Sustainable Engineered Cementitious Composites. Frontiers in Materials [en ligne], 7(65) (page consultée le 06/04/2022) <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.00065>

6-Assamoi, A. A., Destain, J., Thonart, P. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment [en ligne], 13 (2) : 281-294 (page consultée le 11/04/2022) <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=4129>

7- Bansal, N., Tewari, R., Soni, R., Soni, S. K. (2012). Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solide state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. Waste Management [en ligne], 32 (7) (page consultée le 11/05/2022) <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.03.006>

- 8- Barrios-González, J. (2012).** Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry* [en ligne], 47 (2) : 175-185 (page consultée le 10/04/2022) <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.016>
- 9-Beguin, P., Aubert, J. P. (1994).** The biological degradation cellulose. FEMS (Federation of European Microbiological Societies). *Microbiology Reviews*.13:25-58.
- 10- Bhargav, S., Panda, B. P., Ali, M., Javed, S. (2008).** Solid-state Fermentation: An Overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* [en ligne], 22 (1) (page consultée le 10/04/2022) <https://hrcak.srce.hr/21397>
- 11- Binod, P., Sindhu, R., Singhanian, R. R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R. K., Pandey, A. (2010).** Bioethanol production from rice straw : An overview. *Bioresource Technology* [en ligne], 101 (13) (page consultée le 07/04/2022) <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.079>
- 12- Blaszczyk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J., Jedryczka. (2014).** *Trichoderma spp.* – application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of plant protection research* [en ligne], 54 (4) (page consultée le 15/05/2022) <https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0047>
- 13-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.
- 14- Chen, H. (2013).** *Modern Solid State Fermentation : Theory and Practice.* China : Springer Netherlands. 324 p
- 15- Christakopoulos, P., Goodenough, P. W., Kekos, D., Macris, B. J., Claeysens, M., Bhat, M. K. (1994).** Purification and characterisation of an extracellular beta-glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*. *Eur J Biochem* [en ligne], 224 (2) : 379-385 (page consultée le 28/05/2022) <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00379.x>

- 16- Clementi, A. (1922).** La Désamidation Enzymatique De L'asparagine Chez Les Différentes Espèces Animales Et La Signification Physio Logique De Sa Presence Dans L'organisme. Archives Internationales de Physiologie [en ligne], 19 (4) : 369-398 (page consultée le 06/04/2022) <https://doi.org/10.3109/13813452209145156>
- 17- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W. (2009).** Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. International Journal of Biological Sciences [en ligne], 5 (6) : 578-595 (page consultée le 02/05/2022) <https://doi.org/10.7150/ijbs.5.578>
- 18- Dhillon, G. S., Kaur, S. (2016).** AGRO-INDUSTRIAL WASTES AS FEEDSTOCK FOR ENZYME PRODUCTION : Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass. London : Academic Press. 336p
- 19- Durand, P. A. (1998).** La fermentation en milieu solide. Biofutur [en ligne], 1998 (181) : 41-43 (page consultée le 13/04/2022) [https://doi.org/10.1016/S0294-3506\(98\)80171-3](https://doi.org/10.1016/S0294-3506(98)80171-3)
- 20- Ejaz, U., Sohail, M., Ghanimi, A. (2009).** Cellulase : From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. Biomimetics [en ligne], 6 (44) (page consultée le 25/03/2022) <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- 21- Festucci-Buselli, Reginaldo, A., Otoni, W. C., Joshi, C. P. (2007).** Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. Brazilian Journal of Plant Physiology. [en ligne], 19 (1) (page consultée le 25/03/2022) <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202007000100001>
- 22- Foster, M. S., Bills, G. F., Mueller, G. M. (2004).** Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. USA : Academic Press. 761 p
- 23- Gao, J., Weng, H., Zhu, D., Yuan, M., Guan, F., Xi, Y. (2008).** Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. Bioreource technology [en ligne], 99 (16) (page consultée le 17/05/2022) <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.005>
- 24- Gargouri, M. Smaali, I., Maugard, T. Legoy, M. D., Mrzouki, N. (2004).** Fungus – β glycosidases: immobilization and use in alkyl--glycoside synthesis. Journal of Molecular

catalysis B : Enzymatic [en ligne], 29 (1) : 98-94 (page consultée le 02/05/2022)

<https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2003.11.020>

25- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. Pure. Appl.Chem [en ligne], 59 (2) : 257-268

26- Golan, E. A. (2011). Cellulase : Types and actions, Mechanism, and uses. New York : Nova Science.319 p.- (Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine)

27- Gomez, D. P. E. M., Saadeddin, A. (2013). The cellulolytic system of *Thermobifida fusca*. Critical Reviews in Microbiology [en ligne], 40 (3) (page consultée le 23/03/2022)
<http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2013.776512>

28- Guowei, S., Man, H., Shikai, W., He, C. (2011). Effect of some factors on Production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. Procedia Environmental Sciences [en ligne], 8 : 357-361 (page consultée le 23/05/2022) <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.056>

29- Gupta, V. G. (2016). New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering : *Aspergillus* system properties and applications. India : Elsevier. 278 p

30- Gupta, V. K., Rodriguez-Couto, S. (2018). New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Penicillium* System Properties and Applications. Galway : Elsevier Science. 474 p

31- Gupta,V. K. (2016). Microbial Cellulase System Properties and Applications. Galway : Elsevier. 300 p

32- Guzman-Chavez, F., Zwahlen, R. D., Bovenberg, R. A. L., Driessen, A. J. M. (2018). Engineering of the Filamentous Fungus *Penicillium chrysogenum* as Cell Factory for Natural Products. Frontiers in Microbiology [en ligne], 9 (page consultée le 21/05/2022)
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02768>

33- Harini, S., Kumaresan, R. (2014). Production of cellulase from corn cobs by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. International Journal of ChemTech Research [en ligne], 6 (5) (page consultée le 11/05/2022) [https://sphinxsai.com/2014/vol6pt5/5/\(2900-2904\)S-2014.pdf](https://sphinxsai.com/2014/vol6pt5/5/(2900-2904)S-2014.pdf)

- 34- Hesseltine, C. W. (1987).** Solid state fermentation- An Overview. International Biodeterioration [en ligne], 23 (2) : 79-89 (page consultée le 11/04/2022)
[https://doi.org/10.1016/0265-3036\(87\)90030-3](https://doi.org/10.1016/0265-3036(87)90030-3)
- 35- Imran, M., Anwar, Z., Irchad, M., Asad, J. M., Ashfaq, H. (2016).** Cellulase Production from species of Fungi and Bacteria from Agricultures wastes and it's Utilization in Industry : A Review. Advances in Enzyme Research [en ligne], 4 (2) : 44-55 (page consultée le 28/03/2022) <http://dx.doi.org/10.4236/aer.2016.42005>
- 36- Ire, F. S., Okoli, A. O., Ezebuoro, V. (2018).** Production and Optimization of Cellulase from *Penicillium sp.* Using Corn-cob and Pawpaw Fibre as Substrates. Journal of Advances in Microbiology [en ligne], 8 (2) : 1-10 (page consultée le 04/05/2022)
<https://doi.org/10.9734/JAMB/2018/39227>
- 37- Jabasingh, S. A., Varma, S., Garre, P. (2014).** Production and Purification of Cellulase from *Aspergillus nidulans* AJSU04 under Solid-state Fermentation using Coir Pith. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly [en ligne], 24 (1) : 143-151 (page consultée le 21/05/2022) <http://silverstripe.fkit.hr/cabeq/assets/Uploads/Cabeq-2014-01-14.pdf>
- 38- Javed, M. M., Zahoor, S., Shafaat, S., Mehmooda, I., Gul, A., Rasheed, H., Bukhari, S. A. I., Aftab, M. N., Ikram-ul-Haq. (2012).** Whean bran as a brown gold : Nutritions value and its biotechnological applications. African Journal of Microbilology Research [en ligne], 6 (4) (page consultée le 07/04/2022) <https://doi.org/10.5897/AJMRX11.035>
- 39- Kanmani, P., Karuppasamy, P., Pothiraj, C., Arul, V. (2009).** Studies on lignocellulose biodegradation of coir waste in solid state fermentation using *Phanerocheate chrysosporium* and *Rhizopus stolonifer*. African Journal of Biotechnology [en ligne], 8 (24) (page consultée le 21/05/2022) <http://www.academicjournals.org/AJB>
- 40- Korish, M. (2003).** Production, Purification, Properties and Application of the Cellulase from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Faculty of Biology, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany

- 41- Krishna, C. (2005).** Solid-State Fermentation Systems—An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology* [en ligne], 25 (1) (page consultée le 10/04/2022)
<https://doi.org/10.1080/07388550590925383>
- 42- Kuhad, R. C., Gupta, R., Singh, A. (2011).** Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research* [en ligne] (page consultée le 27/03/2022)
<http://dx.doi.org/10.4061/2011/280696>
- 43- 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 des enzymes. Thèse de Doctorat en Sciences : Biotechnologie Génie microbiologique, 134 p
- 44- Liu, J., Yang, J. (2007).** Cellulase Production by *Trichoderma koningii* AS3.4262 in Solid-State Fermentation Using Lignocellulosic Waste from the Vinegar Industry. *Food Technology and Biotechnology* [en ligne], 45 (4) (page consultée le 12/04/2022)
<https://hrcak.srce.hr/23993>
- 45- Long, C., Ou, Y., Guo, P., Liu, Y., Cui, J., Long, M., Hu, Z. (2009).** Cellulase production by solid state fermentation using bagasse with *Penicillium decumbens* L-06. *Annals of Microbiology* [en ligne], 59 (3) : 517-523 (page consultée le 16/04/2022)
<https://doi.org/10.1007/BF03175140>
- 46- Maftukhah, S., Abdullah, A. (2018).** Cellulase Enzyme Production From Rice Straw Using Solid State Fermentation and Fungi *Aspergillus niger* ITBCC L74. *MATEC Web of Conferences* [en ligne], 156 (page consultée le 08/04/2022)
<http://dx.doi.org/10.1051/matecconf/201815601010>
- 47- Mandels, M., Andreotti, R.E., Roche, C. (1976).** Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng.Symp*, 6 : 21-33
- 48- Mandels, M., Medeiros, J. E., Andreotti, R. E., Bissett, F. H. (1981).** Enzymatic hydrolysis of cellulose: Evaluation of cellulase culture filtrates under use conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 23 (9)
- 49- McCoy, P., Noell, N. (2016).** *Radical Mycology : A Treatise On Seeing And Working With Fungi.* United States of America : Chthaeus Press. 672 p

- 50- Mrudula, S., Murugammal, R. (2011).** PRODUCTION OF CELLULASE BY *ASPERGILLUS NIGER* UNDER SUBMERGED AND SOLID STATE FERMENTATION USING COIR WASTE AS A SUBSTRATE. Brazilian Journal of Microbiology [en ligne], 42 (3) (page consultée le 06/05/2022) <https://doi.org/10.1590/s1517-838220110003000033>
- 51- Muniswaran, P. K. A., Selvakumar, P., Charyulu, N. C. L. N. (1994).** Production of Cellulases from Coconut Coir Pith in Solid State Fermentation. Journal of Chemical Technology and Biotechnology [en ligne], 60 (2) : 147-151 (page consultée le 21/05/2022) <https://doi.org/10.1002/jctb.280600206>
- 52- Nikodinovic, R. J., Guzik, M., Kenny, S. T., Babu, R., Werker, A. G., Connor, K. E. O. (2013).** Carbon-Rich Wastes as Feedstocks for Biodegradable Polymer (Polyhydroxyalkanoate) Production Using Bacteria. Advances in Applied Microbiology [en ligne], 84 (page consultée le 05/04/2022) <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407673-0.00004-7>
- 53- Onipe, O. O., Jideani, A. I. O., Beswa, D. (2015).** Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. International Journal of Food Science & Technology [en ligne], 50 (12) (page consultée le 08/04/2022) <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.12935>
- 54- Pandey, A. (2002).** Solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal [en ligne], 13 (2) : 81-84 (page consultée le 10/04/2022) [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- 55- Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D. (2000).** New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. Process Biochemistry [en ligne], 35 (10) : 1153-1169 (page consultée le 13/04/2022) [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)
- 56- Raghuwanshi, S., Deswal, D., Karp, M., Khad, R. C. (2014).** Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. Fuel [en ligne], 124 : 193-198 (page consultée le 17/05/2022) <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.01.107>
- 57- Raimbault, M. (1983).** Fermentation en milieu solide, croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. p:1-42. O.R.S.T.O.M.-Paris

- 58- Rajoka, M.I., Malik, K.A. (1997).** Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. *Bioresource Technology* [en ligne], 59 (1) (page consultée le 04/04/2022) [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00136-8)
- 59- Receveur, V., Czjek, M., Schulein, M., Panine, P., Henrissat, B. (2002).** Dimension, shape, and conformational flexibility of two domain fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *The Journal of Biological Chemistry* [en ligne], 277 (43) (page consultée le 24/03/2022) <https://doi.org/10.1074/jbc.M205404200>
- 60- Remaz, M. M., Elrsoul, A. A., Bakhiet, S. E. A. (2018).** Optimization of Factors Influencing Cellulase Production by Some Indigenous Isolated Fungal Species. *Jordan Journal of Biological Sciences* [en ligne], 11 (1) (page consultée le 01/05/2022) <https://jjbs.hu.edu.jo/files/v11n1/Paper%20Number%20205m.pdf>
- 61- Rodriguez-Couto, S., Sanroman, M. A. (2006).** Application of solid state fermentation in food industry - A Review. *Journal of Food Engineering* [en ligne], 76 (3) : 291-302 (page consultée le 13/04/2022) <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022>
- 62- Ropars, J., Caron, T., Lo, Y.C., Bennetot, B., Giraud, T. (2020).** La domestication des champignons *Penicillium* du fromage. *Vie de l'académie* [en ligne], 343 (2) : 155-176 (page consultée le 09/04/2022) <https://doi.org/10.5802/crbio1.15>
- 63- Saini, A., Aggarwal, N. K., Sharma, A., Yadav, A. (2015).** Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes. *Enzyme research* [en ligne] (page consultée le 03/04/2022) <https://doi.org/10.1155/2015/279381>
- 64- Saini, A., Aggarwal, N. K., Yadav, A. (2017).** Cost-effective cellulase production using *Parthenium hysterophorus* biomass as an unconventional lignocellulosic substrate. *3 Biotech* [en ligne], 7(12) (page consultée le 02/04/2022) <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0604-1>
- 65- Samir, M. A. S. A., Alloin, F., Dufresne, A. (2005).** Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field *Biomacromolecules* [en ligne], 6 (2), (page consultée le 22/03/2022) <https://doi.org/10.1021/bm0493685>

- 66- Schuster, A., Schmoll, M. (2010).** Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. Appl Microbiol Biotechnol [en ligne], 87 (3) :787-799 (page consultée le 05/04/2022) <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>
- 67- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., Gupta, S. (2013).** Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. ISRN biotechnology [en ligne] (page consultée le 02/04/2022) <https://doi.org/10.5402/2013/98568>
- 68- Sharma, A., Tewari, R., Singh, R. S., Soni, R., Kumar, S. S. (2016).** Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. Appl Biochem Biotechnol [en ligne], 179 (8) (page consultée le 27/03/2022) <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2070-3>
- 69- Sherief, A. A., El-Tanash, A. B., Atia, H. (2010).** Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. Research Journal of Microbiology [en ligne], 5 (3) : 199-211 (page consultée le 15/04/2022) <https://dx.doi.org/10.3923/jm.2010.199.211>
- 70- Shweta, A. (2015).** Solid state fermentation for cellulase production. Biotechnological research [en ligne], 1 (1) : 108-112 (page consultée le 04/05/2022) <http://br.biomedpress.org/index.php/br/article/download/691/1405>
- 71- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., Pandey, A. (2008).** Recent advances in solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal [en ligne], 44 (1) : 13-18 (page consultée le 10/04/2022) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>
- 72- Srinubabu, G., Lokeswari, N., Jayaraju, K. (2007).** Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. E-Journal of chemistry [en ligne], 4 (2) : 208-215 (page consultée le 27/05/2022) <https://doi.org/10.1155/2007/915432>
- 73- Srivastava, M., Srivastava, N., Ramteke, P. W., Michra, P. K. (2019).** Approaches to Enhance Industrial Production of Fungal Cellulases. India : Springer International Publishing. 218 p.- (Fungal Biology)
- 74- Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., Pandey, A. (2005).** Microbial cellulases- Production, applications and challenges. Journal of Scientific and Industrial Research [en

ligne], 64 (11) : 832-844 (page consultée le 25/03/2022)

<http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/5375>

75- Watanabe, H., Tokuda, G. (2001). Animal cellulases. Cellular and Molecular Life Sciences [en ligne], 58 (9) (page consultée le 04/03/2022) <https://doi.org/10.1007/pl00000931>

76- Watson, R. R., Preedy, V., Zibadi, S. (2014). Wheat and rice in disease prevention and health Benifits , risks and mechanims of whole grains in health promotion. USA : Academic Press. 536 p

77- Webster, J., Weber, R. (2007). Introduction to Fungi .New York : Cambridge University Press. 875 p

78- Xu, B. (2002). Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, Mytilus edulis : Purification, Characterization, Gene and Three Dimensional Structure. Thèse de doctorat : Faculty of Science and Technology, Uppsala University, 57 p



Annexes

Annexe 1 : Milieux de cultures

1- Milieu Mandels

+	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
+	KH ₂ PO ₄	3.0 g
+	MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	1.0 g
+	CaCl ₂	0.5 g
+	FeSO ₄ ·7H ₂ O.....	7.5 mg
+	MnSO ₄ ·H ₂ O.....	2.5 mg
+	ZnSO ₄ ·7H ₂ O.....	2.0 mg
+	CoCl ₂ ·6H ₂ O.....	5.5 mg
+	Eau distillée.....	1000 ml

pH= 5

❖ Stérilisation à 110 °C pendant 30 min

2- Milieu minérale

+	NANO ₃	3.0 g
+	KH ₂ PO ₄	0.1 g
+	Mg SO ₄ 7H ₂ O.....	0.5 g
+	KCl.2H ₂ O.....	0.5 g

3- Milieu Czapek-Dox-Agar

+	Saccharose.....	30 g/L
+	Nitrate de sodium.....	3.0g/L
+	K ₂ HPO ₄	1.0g/L
+	MgSO ₄	0.5 g/L
+	KCl.....	0.5g/L
+	FeSO ₄	traces
+	Gélose.....	15 g/L

4- Milieu de fermentation liquide

+ Acide L-glutamique.....	0.3 g/L
+ NH ₄ NO ₂	1.4 g/L
+ K ₂ HPO ₄	2.0 g/L
+ CaCl ₂	2.0 g/L
+ MgSO ₄	0.3 g/L
+ Peptone de protéase.....	7.5 g/L
+ FeSO ₄	5.0 g/L
+ MnSO ₄	16 g/L
+ ZnSO ₄	1.4 g/L
+ Déchets de coco.....	30 g/L
+ Tween.....	80, 20 % (v/v)

❖ Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 15 min

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : Boudjaada Lamia
Haci Sarra

Cellulases de souches fongiques cultivées par fermentation solide

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

Résumé

Une augmentation impressionnante de l'application des cellulases dans divers domaines au cours des dernières décennies exige des recherches approfondies pour améliorer sa production à grande échelle. Par conséquent, les recherches actuelles se concentrent sur les facteurs pertinents pour une production optimale de cellulases. Leur production selon le procédé de la fermentation sur milieu solide par des souches fongiques (*Trichoderma koningii*, *Penicillium decumbens* et *Aspergillus fumigatus*) cultivées sur des résidus agro-industriels (résidus de vinaigre, la bagasse, la paille de riz mélangé avec le son de blé), a été effectuée sous différentes conditions physiques et chimiques, afin d'examiner leur influence sur la production de cellulase (la température, le temps de fermentation, le pH initial et l'humidité). Les activités enzymatiques APCase et CMCase sont mesurées dans les filtrats obtenus. La production des enzymes était maximale à 30°C au bout de 84 heures, 6 à 8 jours, respectivement avec les souches *Trichoderma koningii* et *Penicillium decumbens*. Alors que, avec *Aspergillus fumigatus* c'était 40°C après 2 à 4 jours. Le pH optimal du milieu pour la production des cellulases était 5 pour les deux souches : *Trichoderma koningii* et *Penicillium decumbens*, et 6 pour *Aspergillus fumigatus*. Le maximum des activités enzymatiques était observé à un pourcentage d'humidité de 40 à 60% ; 75% pour *Trichoderma koningii* et *Aspergillus fumigatus*, respectivement. Un rapport d'humidité (3.1 p/v) a été préconisé pour *Penicillium decumbens*. Au vu des résultats des études précédentes, les souches fongiques mentionnées précédemment sont parmi les meilleurs champignons producteurs de cellulase, ainsi que le choix des résidus agro-industriels comme un substrat, et l'optimisation des conditions physico-chimiques semblent une alternative importante pour la production de cellulase par fermentation à l'état solide.

Mots-clefs : Cellulase, fermentation sur milieu solide, *Trichoderma koningii*, *Penicillium decumbens*, *Aspergillus fumigatus*, résidus-agro-industriels.

Encadreur : Mme. LEGHLIMI Hind (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Melle. ABDELAZIZ Oueded (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : Mme. LABBANI Fatima-Zohra Kenza (MCA – ENS de Constantine).