



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم الميكروبيولوجيا

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

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologique**

**Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique**

Intitulé :

---

**Production de cellulase par *Trichoderma longibrachiatum*  
cultivée sur grignon d'olive**

---

Présenté et soutenu par : SEBTI CHAIMA

Le : 27/06/2018

DEGHDAK MOUSSAAB

**Jury d'évaluation :**

**Présidente :** Melle ALMI Hiba. (Maître de conférences B- UFM Constantine).

**Rapporteur :** Mme LEGHLIMI Hind. (Maître de conférences B - UFM Constantine).

**Examinatrice :** Melle ABDLAZIZ Wided. (Maître Assistante A- UFM Constantine).

*Année universitaire*  
*2017 - 2018*

# ***Remerciements***

*Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude avant tous au bon Dieu qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail. Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Zoologie, faculté des sciences de la nature et de la vie.*

*Il nous est agréable de remercier notre encadreur Mme LEGHLIMI Hind Maître de conférences B à UFM Constantine pour nous avoir assuré l'encadrement et le temps qu'elle nous a consacré à la réalisation de ce mémoire.*

*Je me fais un immense plaisir d'adresser également mes remerciements à Mme ALMI Hiba Maître de Conférences B à UFM Constantine pour le grand honneur de présider le jury*

*Je me fais un immense plaisir d'adresser également mes remerciements à Melle ABDLAZIZ Wided Maître Assistante A à UFM Constantine*

*Pour avoir accepté d'examiner notre travail*

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

# *Dédicaces*

Je dédie ce mémoire à celle qui m'a donné la vie ; qui s'est sacrifiée pour ma réussite et mon bonheur, à ma mère Puisse Dieu de m'aider à la rendre plus fière de moi ; merci maman **FATIMA**

A Mon père **AHMED** symbole de tendresse, qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager ; m'aider et me protéger Je t'aime papa

Merci ma grand-mère **ZABIDA** de m'avoir comblé de tant de tendresse, d'amour et de générosité ; que dieu te prête longue vie

A Mes adorable sœurs **Racha Lamis, Meriem et Malak** à qui je souhaite tout le bonheur du monde

A Mon seul frère **Ayoub** à qui je souhaite beaucoup de succès

A Toute la famille **SEBTI** ainsi que la famille **REHAIL** pour lesquelles j'éprouve beaucoup d'affection et de respect

A Tous ceux que j'aime

**SEBTI CHAIMA**

# ***Dédicaces***

**Je remercie, tout d'abord, Dieu le tout puissant**

**Je dédié ce mémoire à ;**

**Ma chère mère qui s'est tant battue pour mon bien être,**

**Pour sa bienveillance et sa force qu'elle me transmet pour traverser les plus  
difficiles**

**Épreuves. À mon père pour sa tendresse et sa patience.**

**Que dieu les garde pour moi.**

**À mes sœurs**

**&**

**A mon frère**

**A tous mes chères amies**

**DEGHDAK MOUSSAAB**

# Table des matières

## Résumés

## Les abréviations

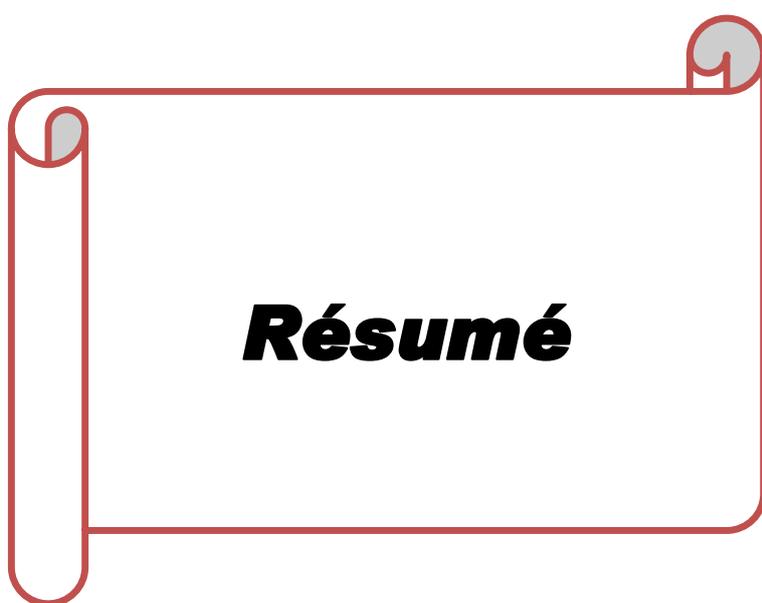
## Liste des figures

## Liste des tableaux

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Revue Bibliographique.....</b>	<b>3</b>
Partie 1 : Cellulases et Champignons du genre <i>Trichoderma</i> .....	<b>3</b>
I. Définition de la cellulose .....	3
II. Etude de la cellulase .....	4
II.1 Nomenclature.....	4
II.2 Définition de la cellulase .....	5
II.3 Enzymes cellulolytiques .....	5
II.3.1 Les endoglucanases (EGs) ou 1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4).....	5
II.3.2 Les exoglucanases ou 1,4- $\beta$ -D-glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) ou cellobiohydrolases (CBHs) .....	5
II.3.3 Les $\beta$ -glucosidases (BGs) ou cellobiases ou $\beta$ -D-glucoside glucohydrolases (EC3.2.1.21).....	5
II.4 Mécanisme de dégradation de la cellulose .....	6
II.5 Origines de la cellulase .....	7
II.5.1. Origine animale .....	7
II.5.2. Origine végétale.....	8
II.5.3. Origine microbienne .....	8
II.5.4 Applications des cellulase.....	10
III Champignons du genre <i>Trichoderma</i> .....	11
III.1. Morphologie .....	11
III.2 Taxonomie.....	12
III.3. Ecologie.....	12

Partie 2 : Fermentation en milieu solide.....	<b>13</b>
I. Définition .....	13
II. Inconvénients et avantages .....	13
III. Facteurs influençant la fermentation en milieu solide .....	14
III.1 Le type d'inoculum .....	14
III.2 L'humidité.....	14
III.4 Le pH.....	15
III.5 L'aération et le brassage.....	15
III.6 L'oxygène et le dioxyde de carbone.....	16
IV. Les facteurs nutritionnels .....	16
IV.1 Les substrats.....	16
IV.2 La taille des particules.....	17
V. Applications de la fermentation en milieu solide .....	17
V.1 La production d'enzymes .....	17
V.2 La production de métabolites secondaires.....	17
V.3 La biorémédiation.....	18
Partie 3 : Les grignons d'olives.....	<b>18</b>
I. Généralités sur les sous-produits de l'oléiculture .....	18
I.1. Production oléicole en Algérie.....	18
I.2. Procédés d'extraction d'huile d'olive .....	18
I.2.1. Procédé en discontinu (système à presse ou traditionnel) .....	19
I.2.2. Procédé en continu (système à centrifugation) .....	19
I.2.2.1. Procédé d'extraction par centrifugation à trois phases .....	19
I.2.2.2. Procédé d'extraction par centrifugation à deux phases.....	19
I.3. Principaux sous-produits.....	20
I.3.1. Déchets liquides (margines).....	20
I.3.2. Déchets solides (grignons d'olive).....	20
II. Intérêt du grignon d'olive .....	21
II.1. Caractéristiques de grignon d'olive .....	21
II. 1.1. Caractéristiques physiques du grignon d'olive.....	21
II.1.2. Caractéristiques chimiques .....	21
III. Utilisation du grignon d'olive .....	22
III.1 Extraction d'huile de grignon.....	22

III.2. Alimentation du bétail .....	22
III.3. Charbon actif .....	23
III.4. Biocombustible.....	23
III.5. Compostage .....	23
III.6. Ingrédient des matériaux de construction.....	23
IV. Traitement biologique .....	24
IV.1. Ensilage de grignons tamisés avec des fientes de volaille .....	24
III.3.2. Traitement enzymatique .....	24
<b>Matériel et Méthodes.....</b>	<b>25</b>
1-Microorganisme .....	25
1-1 Préparation de l'inoculum et conservation de la souche.....	25
1-2- Conservation de la souche .....	25
2-Etude de la production des enzymes cellulolytiques par fermentation sur milieu solide.....	26
2-1- Matière première.....	26
2-2- Conduite de la fermentation solide .....	26
2-2-1-Effet du taux (pourcentage) d'humidité sur la production des enzymes.....	26
2-2-2- Cinétique de production des enzymes par <i>Trichoderma longibrachiatum</i> .....	26
2-2-3-Effet de la température d'incubation et du taux d'inoculum sur la production des enzymes.....	27
3- Mesures et dosages effectués après fermentation .....	27
3-1- Dosage des activités cellulolytiques .....	27
3-2- Mesure de l'humidité.....	29
<b>Résultat et discussion.....</b>	<b>30</b>
1-Détermination du taux d'humidité optimal .....	30
2-Suivi cinétique de la production des enzymes .....	31
3-Effet de la température d'incubation sur la production des enzymes .....	33
4- Effet du taux d'inoculation .....	34
<b>Conclusion.....</b>	<b>37</b>
<b>Références</b>	
<b>Annexes</b>	



# ***Résumé***

## Résumé

La production des enzymes cellulolytiques par *Trichoderma longibrachiatum* est effectuée sur milieu à base de grignons d'olive par fermentation solide. L'effet du pourcentage d'humidité (40%, 50%, 60%, 70% et 80%) est étudié. Le suivi des profils cinétiques de la production des enzymes, ainsi que l'influence de la température (28°C, 30°C, 37°C et 44°C) et du taux d'inoculum ( $1.5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  et  $2.5 \times 10^7$  spores par grammes de substrat) sur la production des enzymes APF et endoglucanase, est établi. Un maximum de production est observé, pour les activités APF et endoglucanase (**16.38U/gds** et **45.41U/gds**, respectivement), à un pourcentage d'humidité de 50%. Le profil cinétique de la production de ces enzymes révèle un maximum (**5.68U/g** et **13.32U/g**, respectivement) au bout de trois jours de fermentation. La température optimale de production des enzymes (**4.78U/g** et **15.41U/g**, respectivement) par *Trichoderma longibrachiatum* est de 30°C. Le taux d'inoculation **2 x 10<sup>7</sup> spores/gds** correspond au maximum de production des activités papier filtre et endoglucanase (**4.78U/g** et **15.41U/g**, respectivement). D'après ces résultats on peut valoriser ce déchet agroalimentaire abandonné pour la production de cellulase à intérêt industrielle.

**Mots clés :** Cellulase, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation en milieu solide, grignons d'olive.

## Abstract

Production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma longibrachiatum* is performed on medium based on its solid olive pomace by fermentation. The effect of moisture content (40%, 50%, 60%, 70% and 80%) is studied. Monitoring kinetic profiles of enzyme production as well as the influence of temperature (28 ° C, 30 ° C, 37 ° C and 44 ° C) and the rate of inoculum ( $1.5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  and  $2.5 \times 10^7$  spores per gram of substrate) on the production of enzymes APF and endoglucanase, is established. Maximum production was observed for the APF and endoglucanase activities (**16.38U / gds** and **45.41U / gds**, respectively) to a moisture content of 50%. The fermentation yield production Maximum APF activities and endoglucanase (**5.68U / g** and **13.32U / g**, respectively) at 72 hours of fermentation. The *Trichoderma longibrachiatum* strain used was able to give a maximum output for both activities and filter paper cellulase (**4.78U / g** and **15.41U / g**, respectively) at a temperature of 30 ° C. The inoculation rate  $2 \times 10^7$  spores / gds gave a maximum production of filter paper and endoglucanase activities (**4.78U / g** and **15.41U / g**, respectively). From these results we can develop this food waste dropped for cellulase production in industrial interest.

**Keywords :** Cellulase, *Trichoderma longibrachiatum*, solid state fermentation, pomace.

## ملخص:

انتاج الانزيم السيلولوزي المنتج من طرف الفطر الخيطي *Trichoderma longibrachiatum* المنمى على ثفل الزيتون عن طريق التخمير في وسط صلب حيث تمت دراسة تأثير الرطوبة بنسب مختلفة (40٪، 50٪، 60٪، 70٪ و 80٪) ملامح الحركية لإنتاج الانزيم فضلا عن تأثير درجة الحرارة (28 37 44 حرارة مئوية) و معدل اللقاح ( $1.5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  et  $2.5 \times 10^7$ ) وقد لوحظ إنتاج الحد الأقصى للأنشطة APF و  $16.38 \text{U/gds}$  و  $45.41 \text{U/gds}$  endoglucanase، على التوالي لمحتوى الرطوبة من 50٪. إنتاج محصول تخمير أنشطة APF و endoglucanase القصوى و  $5.68 \text{U/gds}$  و  $13.32 \text{U/gds}$ ، على التوالي في 72 ساعة من التخمير. وكانت السلالة المستخدمة *Trichoderma longibrachiatum* قادرة على إعطاء الطاقة الانتاجية القصوى لكل الأنشطة و APF و endoglucanase :  $4.78 \text{U/gds}$  و  $15.41 \text{U/gds}$ ، على التوالي عند درجة حرارة 30 درجة مئوية . معدل التلقيح أعطى  $2 \times 10^7 \text{spores/gds}$  الحد الأقصى لإنتاج الأنشطة APF و endoglucanase من هذه النتائج يمكننا استعمال هذه النفايات الغذائية لإنتاج السيلولاز في مصلحة الصناعية.

**كلمات البحث:** السيلولاز، *Trichoderma longibrachiatum*، التخمير الصلب ، ثفل الزيتون

# *Abréviations*

APF : Activité papier filtre

CMC : Carboxyméthylcellulose

DNS : Acide dinitrosalicylique

EG : Endoglucanases

PDA : *Potato dextrose agar*

FMS : Fermentation sur milieu solide

Gds : Gramme de substrat

U : Unité

# Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Structure de la cellulose. a/Représentation de la chaîne de cellulose ; b/Liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires au sein de la fibre de cellulose.....	3
<b>Figure 2:</b> La cellulolyse. (EG : endoglucanase, CBHI : cellobiohydrolase de type I, CBHII : cellobiohydrolase de type II, BG : $\beta$ -glucosidase).....	7
<b>Figure 3 :</b> Aspect microscopique de <i>Trichoderma</i> .....	11
<b>Figure 4:</b> procédé d'extraction en continue .....	20
<b>Figure 5:</b> <i>Trichoderma longibrachiatum</i> cultivée sur milieu PDA, après 3 jours (a : mycélium a' : revers) et 6 jours (b : mycélium b' : revers) d'incubation à 30°C.....	25
<b>Figure 6:</b> Courbe étalon de glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase.....	28
<b>Figure 7:</b> Effet du pourcentage de l'humidité du substrat sur la production des enzymes papier filtre (APF) et endoglucanase, après 6 jours de culture à 30°C. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts- types. N=3.....	30
<b>Figure 8:</b> Profils cinétiques de production des activités papier filtre(APF) (a) et endoglucanase (b) par <i>Trichoderma longibrachiatum</i> .....	32
<b>Figure 9:</b> Effet de la température d'incubation sur la production des activités papier filtre (a) et endoglucanase (b) par <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , après 3 jours de culture. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts- types. N=3.....	34
<b>Figure 9:</b> Effet du taux d'inoculum sur la production des activités Papier filtre (a) et endoglucanase (b) par <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , après 3 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3.....	36

# *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1 :</b> Les microorganismes producteur de cellulase.....	9
<b>Tableau 2:</b> Application industrielle de cellulase.....	10
<b>Tableau 3:</b> Les différents composants du grignon d'olive .....	21
<b>Tableau 4:</b> caractéristique chimique de différents types de grignons d'olives.....	22



**Introduction générale**

## Introduction

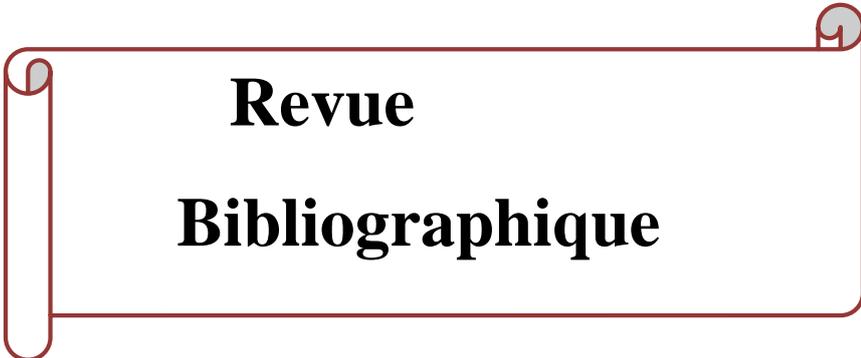
Les champignons filamenteux microscopiques, sont des organismes eucaryotes dépourvus de chlorophylle les qualifiant d'organismes hétérotrophes. Ils jouent un rôle essentiel dans le recyclage des matières organiques en puisant leur énergie à partir des sources carbonées externes (Chabasse *et al.*, 2002). En effet, ces organismes représentent une importante source à exploiter pour développer des procédés biotechnologiques nouveaux par la production de métabolites, en particulier les enzymes. Parmi les enzymes d'intérêt industriel, il existe les cellulases pour lesquelles l'industrie porte une attention toute particulière grâce à leur grand potentiel biotechnologique, industriel (industries du textile, des détergents, du papier, les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et de l'alimentation animale) et le recyclage de la biomasse cellulosique (Korish, 2003; Moussa et Tharwat, 2007). Actuellement, elles représentent environ 20 % du marché mondial des enzymes (Lekhchir, 2006) et la plupart sont produites par les moisissures du genre *Trichoderma* (Miettinen-Oinonen, 2004; Wang *et al.*, 2004 ; Lekhchir, 2006) et *Aspergillus* (Miettinen-Oinonen, 2004 ; Lekhchir, 2006). Par ailleurs, la bioindustrie exige également un milieu de production riche en matière organique et en éléments minéraux (Proot, 2001), peu onéreux et donnant le métabolite recherché avec des rendements satisfaisants (Gana et Touzi, 2001). En effet, l'exploitation des coproduits agricoles en vue d'une valorisation a bénéficié au cours de ces dernières années d'un regain d'intérêt pour des raisons économiques aussi bien qu'environnementales. L'importance de ces coproduits agricoles réside dans leur abondance, leur faible coût ainsi que dans le fait qu'ils représentent une source organique naturelle disponible partout sur la planète. Cependant, aujourd'hui, l'industrie mondiale utilise moins de 10% de la biomasse végétale produite et des quantités énormes des résidus d'agriculture sont brûlées chaque année, ce qui cause un problème environnemental sérieux.

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens producteurs d'huile d'olives, avec un taux de production de 45 mille tonnes/an, elle compte environ 1532 huileries. Ce secteur agricole engendre sans cesse de quantités appréciables de déchets solides, connus sous l'appellation de grignons d'olives. Ces derniers comptent parmi les matières les plus abondantes dans notre pays qui sont déversées dans la nature. Cette situation conduit à des pollutions qui peuvent avoir des impacts négatifs sur la santé humaine et l'environnement (Djadouf *et al.*, 2011).

Notre travail de recherche s'insère dans cette préoccupation et consiste à l'utilisation des grignons d'olive comme substrat de fermentation pour la production de la cellulase par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum*. La production est effectuée par fermentation en milieu solide. Celle-ci présente un certain nombre d'avantages économiques et technologiques dont la faiblesse des coûts et la simplicité des équipements (Durand, 2003).

Dans ce cadre, les objectifs de notre étude sont :

- Effet du pourcentage de l'humidité du substrat de fermentation sur la production des enzymes ;
- Etude des profils cinétiques de production des activités enzymatiques par la souche utilisée, dont le but est de déterminer le temps de culture pour une production maximale.
- Effet de la température d'incubation et du taux d'inoculum (concentration en spores) sur la production des enzymes recherchées, qui s'avère aussi intéressant dans ce cadre.



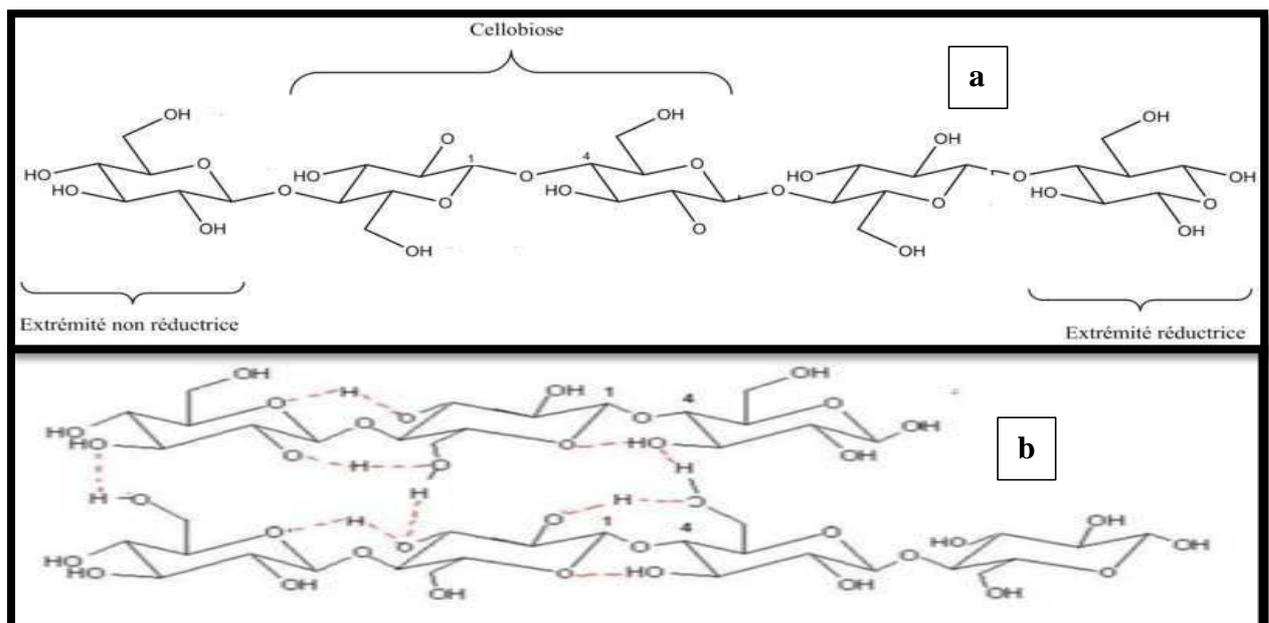
**Revue**  
**Bibliographique**

## Revue Bibliographique

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

#### I. Définition de la cellulose

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



**Figure 1 :** Structure de la cellulose. a/Représentation de la chaîne de cellulose ; b/Liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires au sein de la fibre de cellulose (Stryer *et al.*, 2003).

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

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

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

- La cellulose type I : représente la forme native et la plus répandue avec des chaînes de glucanes exclusivement parallèles. Elle se compose de deux formes : la forme I $\alpha$  composant majoritairement les algues et les bactéries, et la forme I $\beta$  composant majoritairement les plantes (Brown et Malcom, 1999).
- La cellulose type II : qui est une forme modifiée obtenue après traitement chimique (à la soude par exemple).

Par ailleurs, la cellulose est le produit de l'utilisation de l'énergie solaire et du dioxyde de carbone par les végétaux via la photosynthèse. C'est le bio polymère le plus abondant, et la seule source de carbone renouvelable sur terre (Romero *et al.*, 1999). Sa décomposition en sucres simples, permettrait de résoudre de nombreux problèmes, comme la pollution de l'environnement (par la bioconversion des déchets urbains, industriels et agroindustriels) ainsi que des problèmes énergétiques (par la production d'énergie : alcool, méthane) (Roussos et Hannibal, 1984). Sa biodégradation est un des paramètres majeurs contrôlant le cycle du carbone sur terre, assurée par des microorganismes cellulolytiques sécrétant des cellulases (Lekchiri *et al.* 2006).

## **II. Etude de la cellulase**

### **II.1 Nomenclature**

**Nom codifié :** EC. 3.2.1.4

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

**Nom recommandé :** Cellulase

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

## II.2 Définition de la cellulase

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

## II.3 Enzymes cellulolytiques

Le système cellulolytique de référence est celui de *Trichoderma reesei* et repose principalement sur l'action complémentaire de trois types d'enzymes :

**II.3.1 Les endoglucanases (EGs) ou 1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4)** : qui hydrolysent de manière aléatoire les parties amorphes de la cellulose, principalement les chaînes de surface des microfibrilles, générant des oligosaccharides de différentes tailles, ainsi que de nouvelles extrémités de chaînes. Ces enzymes n'agissent pas sur la cellulose cristalline et sont mises en évidence sur la carboxyméthylcellulose (CMC : forme soluble de la cellulose), on les appelle également CMCases (Bayer *et al.* 1998).

**II.3.2 Les exoglucanases ou 1,4- $\beta$ -D-glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) ou cellobiohydrolases (CBHs)** : qui agissent de manière processive et s'adsorbent sur la cellulose en hydrolysant à partir des extrémités réductrices (type I ou CBHI) ou à partir des extrémités non réductrices (type II ou CBHII) pour libérer du cellobiose. Ce sont les seules enzymes agissant sur la cellulose cristalline.

**II.3.3 Les  $\beta$ -glucosidases (BGs) ou cellobiases ou  $\beta$ -D-glucoside glucohydrolases (EC3.2.1.21)** : qui hydrolysent le cellobiose ou les cello-oligosaccharides (DP inférieur à 6) en glucose. Elles n'ont pas d'action sur la cellulose insoluble (Saddler *et al.* 2010 ; Ballerini, 2011). Le complexe cellulolytique de *Trichoderma reesei* se compose de 80% de CBH (50- 60% de CBHI et 12-20% de CBHII par rapport aux cellulases totales), de 20% d'EG (5-10% de EGI et 1-10% de EGII) et de moins de 1% de  $\beta$ -glucosidase (puisque la plupart de ces enzymes sont intracellulaires) (Lopes, 2008).

## II.4 Mécanisme de dégradation de la cellulose

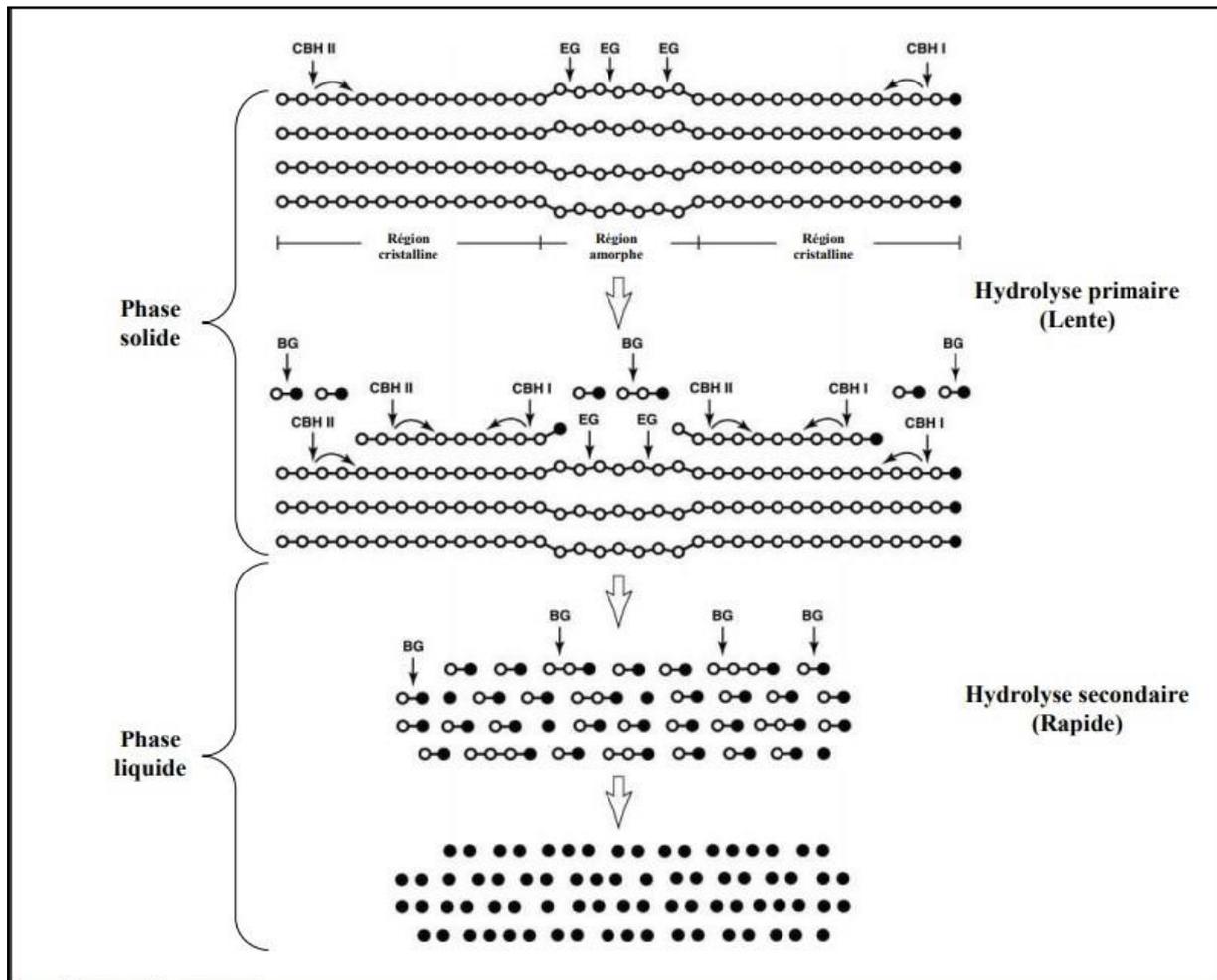
Le mécanisme de dégradation de la cellulose ou cellulolyse (Figure 2), tout comme celui d'un polysaccharide pariétal, est un phénomène de catalyse enzymatique hétérogène et suit les étapes suivantes :

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

L'attaque initiale de la cellulose est la plus lente et la réaction d'hydrolyse des différents produits s'accélère. Au cours de cette hydrolyse, les produits d'inhibition (cellobiose, glucose) et les changements de propriété du substrat affectent les différentes étapes.

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

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



**Figure 2 :** La cellulolyse (Gusakov, 2011). (EG : endoglucanase, CBHI : cellobiohydrolase de type I, CBHII : cellobiohydrolase de type II, BG :  $\beta$ -glucosidase).

## II.5 Origines de la cellulase

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

### II.5.1. Origine animale

Plusieurs espèces animales (omnivores et herbivores) utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif (Smant *et al.*, 1998). Ainsi, peu de cellulases endogènes ont été décrites chez des organismes supérieurs (Xu *et al.*

2000). Des cellulases ont été isolées à partir du suc digestif d'escargot comestible *Helix pomatia* (Rebeyrotte *et al.* 1976 ; Kubicek *et al.* 2003), de la glande digestive d'une moule verte

*Perna viridis* (Marchall, 1973), de la moule bleue *Mytilus edulis* (Xu *et al.*, 2000) et du mollusque marin *Littorina brevicula* (Purchon, 1977 ; Kiesov, 1982). De plus, l'amibe *Dictyostelium discoideum* produit une cellulase extracellulaire pendant la germination de ses spores (Blume et Ennis, 1991). Des cellulases ont également été identifiées dans les glandes de l'oesophage de kyste des nématodes *Globodera restochiensis* et *Heterdora glycines*, parasites obligatoires des plantes (Smant *et al.*, 1998).

### **II.5.2. Origine végétale**

Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes (Cordonnier *et al.*, 1986). Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces (Riccio *et al.*, 1999), de l'avocat *Persea americana* (Blume et Ennis, 1991), des céréales tels que l'orge (Dan *et al.*, 2000) et le riz de la variété *Oryza sativa* (Xu *et al.*, 2000). Les préparations cellulasiques d'origine végétale sont dépourvues d'exo- $\beta$ -glucanases (Mandels *et al.*, 1976). Néanmoins, la fabrication d'enzyme végétale est soumise aux contraintes d'approvisionnement de la matière première (caractère saisonnier des récoltes, spéculations dues aux incertitudes économiques et politiques des pays producteurs) (Joyeau, 1982).

### **II.5.3. Origine microbienne**

Les micro-organismes cellulolytiques, qui interviennent au niveau de la première étape du processus (qui s'avère être l'étape limitante), constituent un large groupe très disparate comprenant des champignons et des bactéries peuvent être aérobie ou anaérobies, thermophiles ou mésophiles (Beguin *et al.*, 199). Certains de ces micro-organismes sont récapitulés dans le tableau 1 :

**Tableau 1** : Les microorganismes producteur de cellulase (Muhammad *et al.*, 2016).

<b>Groupes</b>	<b>Genres</b>	<b>Espèces</b>
<b>Bactérie</b>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp</i>
	<i>Acidothermus</i>	<i>A. Cellulyticus</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. Cellulosa</i>
	<i>Clostridium</i>	<i>C. thermocellum</i>
	<i>Clostridium</i>	<i>C. acetobutylium</i>
<b>Champignons</b>	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. Niger</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. acculeatus</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. nidulans</i>
	<i>Humicola</i>	<i>H. grisea</i>
	<i>Humicola</i>	<i>H. insolens</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. reesai</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. koningii</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. viride</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. harjianum</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. branchiatum</i>
	<i>Sclerotium</i>	<i>S. rolfsii</i>
	<i>Acremonium</i>	<i>A. cellulyticus</i>
	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>
	<i>Sporotrichum</i>	<i>S. cellulophilum</i>
<i>Penicillium</i>	<i>P.fumiculosum</i>	
<b>Actinomycètes</b>	<i>Streptomyces</i>	<i>S. lividans</i>
	<i>Streptomyces</i>	<i>S. drozdowiejii</i>
	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. uda</i>
	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. fimi</i>
	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. bioajotea</i>
	<i>Thermonospora</i>	<i>T. curvata</i>
	<i>Thermonospora</i>	<i>T. fusca</i>

## II.5.4 Applications des cellulase

Les principales utilisations industrielles des cellulases sont récapitulées dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Application industrielle de cellulase (Ramesh, 2011).

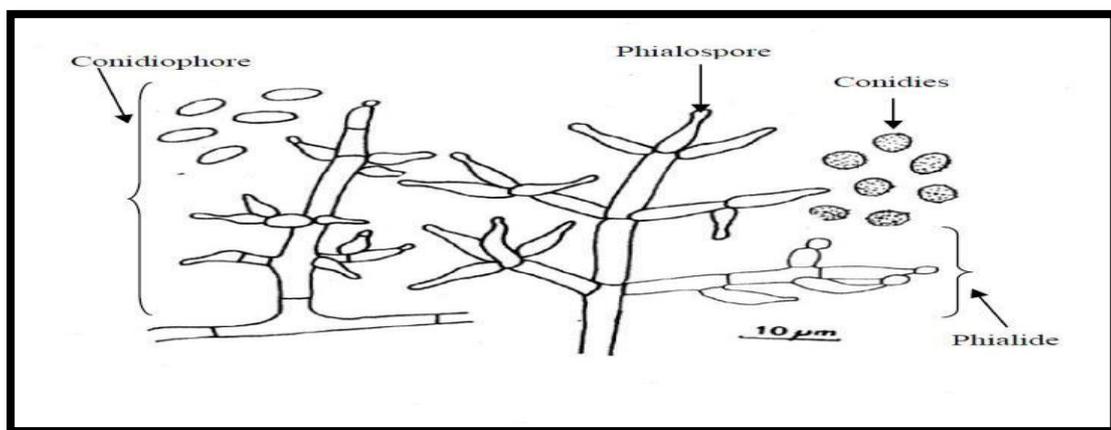
<b>Industrie</b>	<b>Application</b>
<b>Agriculture</b>	Contrôle des maladies pathogènes des plantes ; génération de protoplaste de plantes et de champignons ; germination des semences améliorées et système racinaire améliorée ; amélioration de la croissance des plantes et floraison ; amélioration de la qualité des sols ; dépendance réduite sur les engrais minéraux
<b>Bioconversion</b>	La conversion des matières cellulosiques à l'éthanol, d'autres solvants, des acides organiques et des protéines unicellulaires et des lipides ; la production d'aliments pour animaux riches en énergie ; amélioration de la qualité nutritionnelle des aliments pour animaux ; amélioration de la performance des ruminants ; l'amélioration de la digestion et l'absorption d'alimentation ; la conservation du fourrage de haute qualité
<b>Détergents</b>	détergents à base de cellulases ; action de nettoyage supérieur sans fibres préjudiciables ; l'amélioration de la luminosité et la couleur d'élimination des impuretés ; enlever des protubérances rugueuses dans les tissus de coton ; déposition de particules d'encre
<b>Fermentation</b>	Amélioration de maltage et de brassage ; l'amélioration de l'extraction de pressage et la couleur de raisin ; l'amélioration de l'arôme des vins ; l'amélioration de la fermentation primaire et la qualité de la bière ; l'amélioration de la viscosité et la filtration du moût ; l'amélioration doit clarification dans la production de vin ; amélioration du taux de filtration et de la stabilité du vin
<b>Aliments</b>	Sortie des antioxydants à base de fruits et de légumes grignons; amélioration des rendements de l'amidon et de l'extraction des protéines; l'amélioration de la macération, pressage, et l'extraction de la couleur des fruits et légumes; clarification des jus de fruits; l'amélioration de la texture et la qualité des produits de boulangerie; l'amélioration des purées de fruits de viscosité; l'amélioration de la texture, arôme, l'arôme et les propriétés volatiles des fruits et légumes; amertume contrôlée d'agrumes
<b>Pâtes et papier</b>	Co additif dans le blanchiment de la pâte ; pulpage biomécanique ; l'amélioration de la vidange ; désencrage enzymatique ; réduction des besoins en énergie ; réduit exigence de chlore ; l'amélioration de la luminosité de fibre, les propriétés de résistance, et de la pâte égouttage et de propreté ; amélioration du drainage dans les usines de papier ; production de carton biodégradable, serviettes en papier, et le papier hygiénique
<b>Textile</b>	Amélioration de la qualité des jeans ; bio polissage des fibres textiles ; amélioration de la qualité des tissus ; l'amélioration de la propriété d'absorption des fibres ; ramollissement des vêtements ; l'amélioration de la stabilité des tissus cellulosiques ; élimination de l'excès de colorant de tissus ; restauration de la luminosité de la couleur
<b>Autres</b>	Amélioration de l'extraction des caroténoïdes ; l'amélioration de l'oxydation et la stabilité de la couleur des caroténoïdes ; l'amélioration de l'extraction de l'huile d'olive ; l'amélioration de la pâte d'olive malaxage ; amélioration de la qualité de l'huile d'olive ; diminution du risque des déchets de la biomasse ; la production de molécules hybrides.

### III Champignons du genre *Trichoderma*

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

#### III.1. Morphologie

La majorité des espèces de *Trichoderma* sont morphologiquement très semblables et difficiles à distinguer. L'aspect macroscopique des *Trichoderma* sp est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogenèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> jour un feutrage épais se superpose à la culture. Au microscope optique (Figure 3) on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Kubicek *et al.*, 2003).



**Figure 3 :** Aspect microscopique de *Trichoderma* (Botton *et al.*, 1990).

### III.2 Taxonomie

La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études et de beaucoup de polémiques. Dans le règne vivant les limites de « l'espèce » reposent sur la possibilité de croisement entre individus. Or, les champignons anamorphes du genre *Trichoderma*, en tant que tels, n'ont pas de reproduction sexuées connue, et ce caractère ne peut donc être utilisé pour la systématique. On se base alors sur les aspects culturels et la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert, 1996). La taxonomie moderne des champignons a aboli l'embranchement des Deuteromycotina, auquel appartenait le genre *Trichoderma*. La position taxonomique actuelle des *Trichoderma* sp se présente comme suit, selon (Bissett, 2004) :

**Embranchement :** Amastigomycota et/ou Eumycètes

**Sous embranchement :** Ascomycotina

**Classe :** Sordariomycètes

**Ordre :** Hypocréales

**Famille :** Hypocracea

**Genre :** *Hypocrea mitosporique (Trichoderma)*.

### III.3. Ecologie

Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998). Les *Trichoderma* sp sont des champignons cosmopolites, caractérisés par leur croissance rapide, leur capacité d'utiliser divers substrats et leur résistance à des agents chimiques nocifs (Klein et Eveleigh, 1998). Ils constituent les éléments prédominants de la mycoflore des sols de divers écosystèmes (forêts, champs agricoles, prairies, marécages, déserts, lacs salés ...) (Klein et Eveleigh, 1998). En effet, l'abondance des *Trichoderma* sp dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (Kubicek et al., 2003). Le genre *Trichoderma* renferme les espèces les plus utilisées en tant qu'agents de lutte biologique contre les phytopathogènes et comme source d'enzymes et de métabolites secondaires d'intérêts biotechnologique.

## **Partie 2 : Fermentation en milieu solide**

### **I. Définition**

La fermentation en milieu ou en phase solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux et des champignons supérieurs, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique (Holker et Lenz, 2005). D'un point de vue fondamental, la fermentation en milieu solide est définie comme une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou presque d'eau libre et diffère de la fermentation en milieu liquide, où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau, et de la fermentation en milieu submergé où le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide ( Duchiron et Copinet, 2011). La FMS est donc constituée de trois phases : une matrice (phase) solide, une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. Les champignons filamenteux sont particulièrement bien adaptés à ces cultures du fait de leur résistance à une faible activité en eau et à une pression osmotique élevée. Le développement des champignons filamenteux en FMS se fait par extension et ramification des filaments formant le mycélium. Après l'inoculation d'un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Pour finir, les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (Holker et Lenz, 2005 ; Rahardjo *et al.*, 2006).

### **II. Inconvénients et avantages**

Divers problèmes peuvent être rencontrés au cours d'une fermentation en milieu solide. Les principaux obstacles rencontrés sont : la faible capacité à réguler les paramètres influençant la FMS, la forte hétérogénéité du milieu, le passage à grande échelle, l'estimation de la biomasse (Hölker et Lenz, 2005). La fermentation en milieu liquide (FML) semble alors être plus facile à contrôler et donc à utiliser (Mitchell *et al.*, 2006).

Cependant, la FMS possède de nombreux avantages par rapport à la FML. Tout d'abord, elle se prête bien à la croissance de champignons filamenteux puisqu'elle mime les conditions naturelles de développement de ces micro-organismes.

Le procédé se déroulant à de faibles taux d'humidité, le risque de contamination par les bactéries et les levures est moins important. De plus, un ensemencement important permet de contourner une éventuelle contamination par d'autres champignons. Les conditions de stérilité ne sont donc pas aussi strictes qu'en FML. La FMS permet d'utiliser beaucoup moins de liquide par rapport à la FML ce qui permet de réduire le volume d'eau à traiter entraînant ainsi une diminution du coût de production global. Il est également décrit que la FMS permet d'obtenir de meilleurs rendements pour la production d'enzymes. Un des avantages majeurs de la FMS est la valorisation des coproduits solides agro-industriels. Ceci est très important au niveau environnemental et économique (Durand, 1998).

### **III. Facteurs influençant la fermentation en milieu solide**

#### **III.1 Le type d'inoculum**

Il existe deux types d'inoculum. L'inoculum sous forme de cellules végétatives (mycélium) est obtenu après culture du champignon en milieu liquide. L'inoculum sous forme de spores ou conidies est obtenu après « grattage » d'une culture fongique sporulée. Cependant, l'inoculum sous forme de spores ou conidies est décrit, dans les procédés industriels, comme plus avantageux que l'utilisation de cellules végétatives ou mycélium. En effet, l'utilisation de spores ou conidies permet d'une part, une répartition plus homogène du micro-organisme au sein du milieu de fermentation et d'autre part, une meilleure répétabilité de la production obtenue. Cependant, l'utilisation de spores comme inoculum engendre un temps de latence plus long (Wolken *et al.*, 2003). En effet, les spores sont métaboliquement en dormance, la croissance fongique et l'utilisation du substrat ne démarrera que lorsque l'équipement enzymatique nécessaire aura été induit et synthétisé (Krishna, 2005).

#### **III.2 L'humidité**

Le besoin en eau dépend du type de micro-organisme utilisé et de la capacité de rétention d'eau du substrat solide. Ainsi, le taux d'humidité d'une fermentation solide se situe dans une fourchette comprise entre 30 et 85% (Krishna, 2005). Il est nécessaire d'avoir une humidité suffisante pour la croissance du micro-organisme mais elle ne doit pas être trop faible (inférieure à 30%) afin d'éviter tout problème de diffusion des nutriments dû à un milieu trop sec. Au contraire, une humidité trop importante (supérieure à 85%) entraîne une agglomération des particules (milieu pâteux) ainsi qu'une limitation du transfert gazeux. Les bactéries ont besoin d'un pourcentage d'humidité supérieur à 70% alors que les champignons se développent à des humidités comprises entre 40 et 70% (Singhania *et al.*, 2009).

### **III.3 La température**

La température est probablement l'un des paramètres les plus importants parmi les facteurs physiques affectant la FMS. Cependant, le suivi de température est difficile à mettre en place pour les cultures en erlenmeyer car la croissance du micro-organisme se fait en milieu clos et il n'existe pas de sonde permettant de mesurer directement la température du milieu contrairement aux fermenteurs solides (Krishna, 2005). La température peut avoir une influence sur la croissance du micro-organisme mais également sur la production d'enzyme et de métabolites qui peuvent être très sensibles aux variations de température. Les champignons se développent, généralement, de 20 à 55°C, mais la température optimale de croissance peut être différente de celle de la production.

### **III.4 Le pH**

Chaque micro-organisme a une gamme de pH propre à sa croissance et à son activité métabolique. Les champignons sont capables de se développer à des pH compris entre 2 et 9, avec un optimum entre 3 et 6, ce qui permet donc de débiter une FMS à un pH acide. Ceci peut être un atout afin d'éviter la contamination bactérienne. La production de métabolites peut faire varier le pH au cours d'une FMS. Le pH est également un paramètre difficile à maîtriser en FMS. Le contrôle est pratiquement impossible en raison de l'hétérogénéité du milieu en absence d'homogénéisation et d'agitation au cours de la FMS. La variation du pH peut aussi être liée à la source d'azote utilisée. Le choix de cette dernière est donc une voie possible pour le contrôle du pH (Krishna, 2005).

### **III.5 L'aération et le brassage**

L'aération a une influence significative en fermentation en milieu solide à cause de la demande continue en oxygène nécessaire à la croissance fongique. Cependant, il est nécessaire d'humidifier le milieu car l'aération entraîne un assèchement du substrat. Cet apport d'eau doit être réalisé de façon la plus homogène possible. Ceci peut être assuré par une agitation du milieu qui facilite également le transfert de masse et de chaleur (Krishna, 2005). Le brassage du milieu est un facteur très important en fermentation aérobie. Il faut qu'il soit bien approprié pour éviter de fractionner le mycélium en morceaux trop petits et entraîner une perte du contenu cytoplasmique provoquant la mort du champignon.

### III.6 L'oxygène et le dioxyde de carbone

La quantité en oxygène doit être suffisante pour ne pas limiter le développement des champignons. La technique de fermentation en milieu solide facilite l'accès du micro-organisme à l'oxygène (Krishna, 2005) contrairement à la fermentation en milieu liquide où le transfert d'oxygène est très souvent un facteur limitant.

La mesure de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone fournit une réponse rapide sur le métabolisme du micro-organisme. Elle permet de calculer le quotient respiratoire défini comme le ratio entre le dioxyde de carbone produit et l'oxygène consommé (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Le quotient respiratoire théorique des micro-organismes aérobies est de 1, en dessous de cette valeur le transfert d'oxygène est insuffisant et reflète un faible développement du micro-organisme (Krishna, 2005).

## IV. Les facteurs nutritionnels

Le carbone sert à la fois de source d'énergie et de nutriments pour la croissance du micro-organisme. La source de carbone peut être un glucide simple, comme le glucose, ou des glucides complexes tels que la cellulose ou l'amidon. D'autres sources de carbone telles que le saccharose, le lactose, le glycérol mais encore l'extrait de malt ou le cellobiose peuvent également être utilisées (Couto et Sanroman, 2005). Les sources d'azote telles que le tartrate d'ammonium, le sulfate et le nitrate de sodium, les peptones ainsi que les éléments incluant le sodium, le calcium, le cuivre, le fer, le zinc stimulent la sporulation des champignons.

### IV.1 Les substrats

Les substrats utilisés en fermentation en milieu solide peuvent être des supports inertes imprégnés par un milieu de culture mais sont, le plus généralement, des matrices naturelles hétérogènes issues de produits ou co-produits agro-industriels (Mitchell *et al.*, 2006). Les supports inertes sont soit des matériaux minéraux comme, par exemple, la perlite ou la pouzzolane, soit des matériaux synthétiques de type mousse de polyuréthane (Durand, 1998). De tels supports permettent principalement l'étude de la croissance fongique. Leur utilisation facilite la récupération du produit d'intérêt. Les substrats naturels employés sont très variés, pulpe de betterave et son de blé sont les principaux. Bagasse (résidus de tige de canne à sucre), tourteaux (résidus de fruits ou de graines), pulpes de café, peau d'agrumes sont utilisés dans les pays du Sud (Durand, 1998). Les résidus agro-industriels sont considérés comme de très bons substrats puisqu'ils fournissent les nutriments nécessaires pour la croissance. Le choix du substrat est influencé par sa disponibilité et son coût. Les résidus agro-industriels sont des

ressources renouvelables naturelles et abondantes donc largement disponibles pour la fermentation en milieu solide et dont le coût est peu élevé.

#### **IV.2 La taille des particules**

La taille et la forme des particules déterminent l'espace vide qui est occupé par l'air permettant l'oxygénation du micro-organisme. Il est donc nécessaire d'avoir une taille de particules convenable, ni trop petite ni trop grosse. En effet, des particules trop petites entraînent une agglomération du substrat diminuant la respiration microbienne et donc le développement. Au contraire, le substrat n'est pas suffisamment accessible si les particules sont trop grosses (Krishna, 2005).

### **V. Applications de la fermentation en milieu solide**

La fermentation en milieu solide permet de produire des acides organiques, des enzymes mais aussi des métabolites secondaires de type antibiotiques. Elle est également utilisée pour la production de biocarburant.

#### **V.1 La production d'enzymes**

En 2007, le marché industriel des enzymes représentait 4 milliards \$ par an (Fernandes, 2010). De plus, ce marché est sous-estimé car il existe une production pour un usage interne par certains industriels. La fermentation en milieu liquide est la technique préférée pour la production d'enzymes. Les micro-organismes employés sont généralement des souches génétiquement modifiées. Cependant, il y a un intérêt grandissant pour la production d'une large gamme d'enzymes par fermentation en milieu solide (FMS) car la concentration est plus importante. La stabilité des enzymes est aussi un autre avantage de la production par FMS. De plus, les co-produits agro-industriels sont considérés comme les meilleurs substrats (Krishna, 2005).

#### **V.2 La production de métabolites secondaires**

La production de métabolites secondaires est principalement réalisée par fermentation en milieu liquide, cependant, les recherches s'orientent vers la production de ces métabolites par la technique de fermentation en milieu solide. Il est décrit que cette dernière permet de diminuer le temps de culture, d'augmenter le rendement ou encore de réduire le coût de production (Krishna, 2005). Parmi ces métabolites, nous trouvons l'acide gibbérélique qui est un facteur de croissance chez les plantes mais aussi les alcaloïdes de l'ergot dont la demande

est en constante augmentation car ils sont largement utilisés dans le traitement des maladies comme l'angine de poitrine, la migraine, l'hypertension ou encore le glaucome.

Les antibiotiques, les mycotoxines, telles que l'aflatoxine et l'ochratoxine, peuvent être produits par fermentation en milieu solide. Cette méthode est également employée pour la production de spores utilisées pour la protection des plantes afin de diminuer l'utilisation de pesticides.

### **V.3 La biorémédiation**

Ce domaine est actuellement en plein essor. L'élimination des métaux lourds est un défi majeur pour la dépollution des eaux usées. La présence de cuivre et de plomb est dangereuse pour la santé humaine. L'utilisation de co-produit industriel est un filtre naturel pour la décontamination. La fermentation en milieu solide peut être une alternative moins coûteuse que la dépollution classique par des résines synthétiques (Javed *et al.*, 2012).

## **Partie 3 : Les grignons d'olives**

### **I. Généralités sur les sous-produits de l'oléiculture**

#### **I.1. Production oléicole en Algérie**

L'Algérie, pays du bassin méditerranéen, malgré un climat très favorable à la culture de l'olivier, se positionne largement après l'Espagne, l'Italie et la Tunisie qui sont gros producteurs d'huile d'olive dans le monde. Elle possède, cependant, d'importantes ressources oléicoles dont les superficies actuelles sont de l'ordre de 180000 ha (Benrachou, 2010). Durant la campagne 2012/2013, la production oléicole algérienne était de 66 000 tonnes d'huile soit 2.72% de la production mondiale (Barjol, 2014). Alors que la production d'huile d'olive durant la campagne 2014-2015, atteignait 200 000 tonnes (COI, 2015).

#### **I.2. Procédés d'extraction d'huile d'olive**

La production d'huile d'olive a toujours été le principal objectif de la culture de l'olivier. Le processus d'extraction d'huile d'olive est resté toujours le même. Il inclut quatre opérations principales : les opérations préliminaires, le broyage, le malaxage et la séparation des phases liquides (huile et eau) de la phase solide (grignons) (Chaouadi et Elias, 2015). L'extraction, selon Roussos, (2009), est réalisée en fonction du système employé : la pression (système discontinu ou traditionnel) ou la force centrifuge (système continu).

### **I.2.1. Procédé en discontinu (système à presse ou traditionnel)**

Il s'agit d'un système classique par pression avec broyeurs. Le broyage des olives, suivi du malaxage, se fait par des meules. Après obtention d'une pâte composée de grignons et d'un moût (l'huile et les margines), la séparation des deux phases solide-liquide se fait par simple pression, alors que l'huile est séparée des margines par décantation naturelle (Chaouadi et Elias, 2015).

### **I.2.2. Procédé en continu (système à centrifugation)**

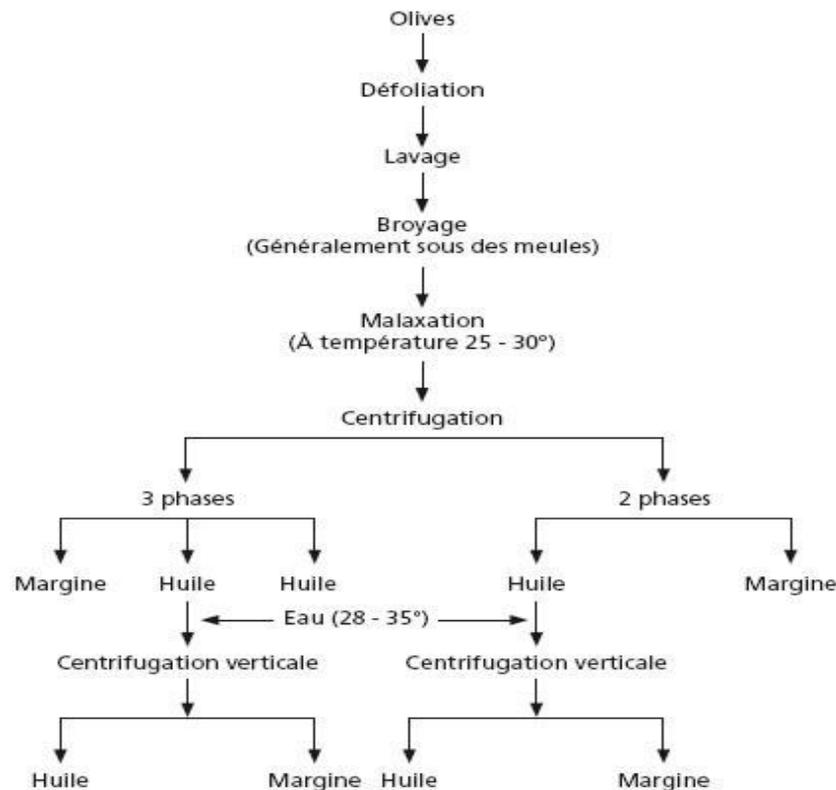
L'extraction d'huile d'olive se fait à travers des phases successives contrairement au procédé discontinu. Les olives sont lavées, broyées, mélangées avec l'eau chaude puis malaxées. Les phases liquide et solide sont séparées par centrifugation. Le moût subit à son tour une centrifugation pour séparer l'huile des margines (Chaouadi et Elias, 2015). Il existe deux types de procédé d'extraction continu :

#### **I.2.2.1. Procédé d'extraction par centrifugation à trois phases**

Cette méthode permet de séparer en une seule opération les deux phases liquides (huile et margines) de la phase solide (grignon), mais elle nécessite l'ajout d'eau dans la pâte ce qui conduit à environ 120 L de margines/100 kg d'olive (Figure 4) (Roussos *et al.* 2009).

#### **I.2.2.2. Procédé d'extraction par centrifugation à deux phases**

Le mode à deux phases sépare l'huile et le mélange (margines + grignons) et qui généralement ne nécessite pas d'ajout d'eau. Ainsi, il est produit un grignon humide (contenant 60-70% d'eau) mais plus de margines (Figure 4) (Roussos *et al.*, 2009).



**Figure 4** : procédé d'extraction en continu (Roussos *et al.*, 2009).

### I.3. Principaux sous-produits

#### I.3.1. Déchets liquides (margines)

Le procédé d'extraction de l'huile d'olive engendre la production d'effluents liquides, nommés margines ou parfois eaux de végétation. Le pressage de 1 tonne d'olives produit en moyenne 1,5 tonnes de margines avec les modes de production modernes. Les variations constatées dépendent des processus d'extraction à savoir le lavage préalable ou non des olives et l'humidification des pâtes durant le pressage (Benyahia et Zein, 2003).

#### I.3.2. Déchets solides (grignons d'olive)

Les grignons sont des résidus solides issus de la première pression ou centrifugation et sont formés des pulpes et noyaux d'olives. Ils peuvent être transformés en un produit destiné à l'alimentation animale ou en huile dite de grignons d'olive après extraction chimique (Benyahia et Zein, 2003). Les grignons sont disponibles en quantités importantes dans de nombreux pays méditerranéens. Selon le procédé d'extraction et l'équipement des huileries, il est possible de distinguer trois types de grignons (Chaabane *et al.*, 1997) : le grignon brut c'est le résidu de la première extraction de l'huile par pression de l'olive entière, ses teneurs relativement élevées en eau (24%) et en huile (9%) favorisent son altération rapide lorsqu'il est laissé à l'air libre. Le

grignon épuisé c'est le résidu obtenu après déshuilage du grignon brut par un solvant, généralement l'hexane. Il diffère, essentiellement, par une plus faible teneur en huile et une teneur en eau réduite du fait qu'il ait été déshydraté au cours du processus de l'extraction (FAO, 1984). Le grignon partiellement dénoyauté résulte de la séparation partielle du noyau de la pulpe par tamisage ou ventilation, il est dit "gras" si son huile n'est pas extraite par solvant il est dit "dégraissé ou épuisé" si son huile est extraite par solvant.

## II. Intérêt du grignon d'olive

### II.1. Caractéristiques de grignon d'olive

#### II.1.1. Caractéristiques physiques du grignon d'olive

La composition physique des grignons dépend étroitement de la variété des olives, de leur degré de maturation et du système employé lors de l'extraction de l'huile. Les grignons bruts renferment la coque du noyau réduite en morceaux, la peau et la pulpe broyée. Ils renferment aussi une certaine humidité et une quantité d'huile résiduelle (Tableau3). Tandis que les grignons épuisés diffèrent essentiellement par une plus faible teneur en huile et une teneur en eau réduite du fait qu'ils ont été déshydratés au cours du processus d'extraction.

**Tableau 3 :** Les différents composants du grignon d'olive (Sansoucy, 1981).

Composants	Olive (%)	Grignon brut (%)	Grignon épuisé (%)
<b>Eau</b>	49	27	17
<b>Huile</b>	27	9	2
<b>Coque</b>	14	43	55
<b>Pulpe</b>	9	21	26

#### II.1.2. Caractéristiques chimiques

Contrairement aux autres tourteaux oléagineux les grignons bruts sont pauvres en matières azotées et riches en cellulose brute. Ils restent relativement riches en matières grasses. L'épuisement par les solvants diminue la teneur en matières grasses et augmente relativement les autres teneurs. Le dénoyautage partiel par tamisage ou ventilation réduit les teneurs en cellulose brute. (Tableau 4). Les pulpes, du fait de la séparation totale du noyau avant pression, ont la valeur la plus faible en cellulose brute.

**Tableau 4 :** Caractéristiques chimiques de différents types de grignons d'olives.

Type	Matière sèche	% Matière sèche			
		Matière minérale (Nefzaoui, 1988)	Matière Azotée Totales (Nefzaoui, 1988)	Cellulose brute (Negro, 1991)	Matière Grasse (FOA, 1984)
<b>Grignons brut</b>	75-80	3-5	5-10	35-50	8-10
<b>Gr. gras part. dénoyauté</b>	80-95	6-7	9-12	20-30	15-30
<b>Grignon épuisé</b>	85-90	7-10	8-10	35-40	4-6
<b>Gr. épuisé part. dénoyauté</b>	85-90	6-8	9-14	15-35	4-6
<b>Pulpe grasse</b>	35-40	5-8	9-13	16-25	26-33

### III. Utilisation du grignon d'olive

#### III.1 Extraction d'huile de grignon

L'huile du grignon est obtenue par traitement aux solvants ou d'autres procédés physiques des grignons d'olive. Elle est destinée au raffinage en vue de son utilisation dans l'alimentation humaine ou destinée à des usages techniques (Hammadi, 2006).

#### III.2. Alimentation du bétail

D'une manière générale, la digestibilité de la matière sèche et de la matière organique reste faible (20 à 50%) quel que soit le type des grignons, les matières grasses ont toujours une digestibilité élevée (60 à 90%), les matières azotées ont en moyenne une faible digestibilité de l'ordre de (20 à 25%) mais très variable et la cellulose brute a une estimée variant de (0 à 40 %). Les grignons d'olive, vu leur nature hautement lignocellulosique ont, selon Nefzaoui *et al.*, (1984), une dégradabilité très lente et les valeurs maximales atteintes sont très modestes (32% de la MS est dégradée après une durée de séjour de 72 h dans le rumen pour le grignon tamisé épuisé). La dégradabilité des protéines est aussi très faible, et cela peut s'expliquer par le fait que 75 à 90% de l'azote est lié à la fraction ligno-cellulosique entraînant ainsi une très faible solubilité de l'azote qui n'est que de 2.3% (N soluble / % N total) pour le grignon brut, et de l'ordre de 0.2 à 0.4% pour les grignons tamisés. De nombreuses expériences ont rapporté une mauvaise utilisation digestive des grignons d'olive. Celle-ci pourrait avoir pour cause une réduction de l'activité de la flore du rumen qui (mesurée par le dégagement gazeux) peut être

réduite de 40% suite à l'ingestion de grignon brut (Theriez et Boule, 1970) citée par (Kernou, 2015). L'ingestion des grignons épuisés tamisés se traduit par un comportement alimentaire très comparable à celui obtenu avec du foin haché. Ce résultat est important en soi, car malgré la faible taille des particules alimentaires du grignon, il assure une rumination normale (Nefzaoui, 1991). La mauvaise digestibilité à savoir ; influence des matières grasses, certains facteurs inhibiteurs (phénols) et la lignine.

### **III.3. Charbon actif**

Selon Ouederni et (Gharib, 2005), les grignons d'olive peuvent être valorisés en les transformant, par voie thermo-chimique, en charbon actif et cela en utilisant de l'acide phosphorique comme agent d'activation. Plus récemment, la préparation des charbons actifs de bonne qualité et développant une structure poreuse importante avec des grandes surfaces spécifiques à partir des matériaux lignocellulosiques a été rapportée par Ounas *et al.*, (2009).

### **III.4. Biocombustible**

La bio-combustion représente l'application la plus courante, le grignon d'olive est un combustible de valeur calorique moyenne (2950 kcal/kg). Selon Nefzaoui (1991), Cette quantité de chaleur est apporté par la coque qui représente 60% du total et qui a une valeur calorique élevée (4000 kcal/kg).

### **III.5. Compostage**

Le compostage est la méthode la plus utilisée pour la préparation des amendements organiques et pour la fertilisation des sols. Il permet de détoxifier ces résidus solides contenant des substances phytotoxiques et antimicrobiennes à cause de la présence des phénols, des acides gras et des acides organiques. Le produit généré par ce processus étant des dioxydes de carbone, l'eau, les minéraux et la matière organique décomposée. Il convient souvent pour le compostage efficace des grignons d'ajouter d'autres déchets végétaux à savoir les feuilles, la biomasse de taille d'olivier, les margines et les pailles de céréales (Roussos *et al.*, 2009).

### **III.6. Ingrédient des matériaux de construction**

L'usage de grignon d'olive dans la fabrication de la brique constitue une percée intéressante, comme la diminution de la masse volumique des briques, ce qu'il les rend plus légères. Il crée des pores, une caractéristique recherchée dans le but d'économiser l'énergie car leur présence dans les matériaux contribue à diminuer la conductivité thermique et augmente ainsi son pouvoir d'isolation (Djadouf, 2011).

## **IV. Traitement biologique**

### **IV.1. Ensilage de grignons tamisés avec des fientes de volaille**

Les essais montrent que des ensilages comportant 70% de fientes ayant été accumulés pendant moins de 21 jours et 30% de grignons tamisés épuisés se conservaient de façon excellente (FAO, 1984).

### **III.3.2. Traitement enzymatique**

Dans le but de modifier la structure des fibres et améliorer la qualité sensorielle du grignon d'olive pour son incorporation dans un produit de boulangerie, des préparations commerciales d'enzymes ont été utilisées : Viscozyme L, un complexe multi enzyme hémicellulase/ cellulase et Olivex qui contient, principalement des activités pectinolytiques aussi bien que plusieurs activités secondaires, hémicellulase et cellulases. Ces traitements ont causés des changements dans le contenu des fibres. Des expériences de cuite de pain ont montré que la substitution de 10% de la farine de blé par grignon d'olive modifié par voie enzymatique, a conduit à une texture améliorée, comparée aux produits contenant un grignon non traité (Valiente *et al.*,1995) cité par (Moumene et Saidi, 2006).



## **Matériel et méthodes**

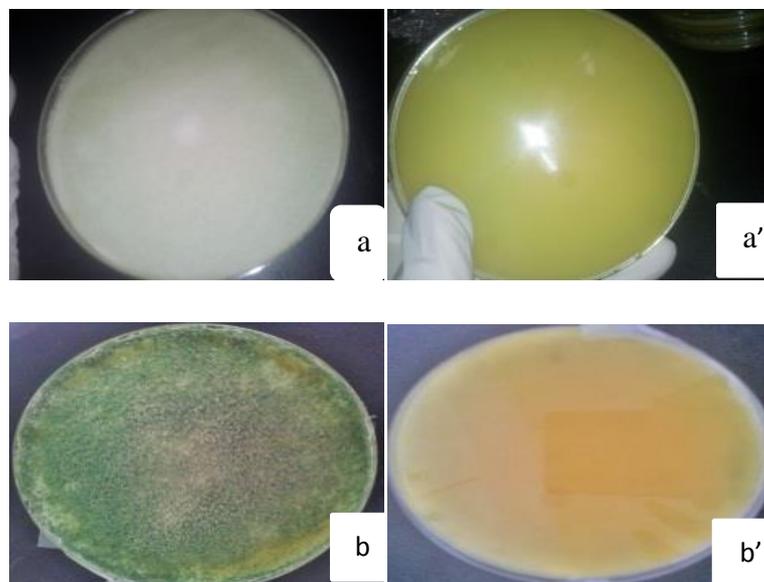
## Matériel et Méthodes

### 1-Microorganisme

La moisissure utilisée dans cette étude est *Trichoderma longibrachiatum* isolée au laboratoire de Génie Enzymatique (Université Constantine 1), à partir d'échantillons de sol collectés proche de la source thermale (Hammam Debbagh, Guelma), localisée dans le nord-est de l'Algérie (Février, 2007). Cette souche est identifiée au niveau du laboratoire DSMZ (Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) en Allemagne.

#### 1-1 Préparation de l'inoculum

La souche est maintenue sur milieu PDA (Annexe 1), incubées à 30°C jusqu'à ce que la surface de la boîte soit recouverte de spores (Figure 5). Après sporulation de la moisissure, les spores sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée stérile. La suspension de spores va servir à l'inoculation des milieux de cultures et de production des enzymes cellulolytiques. La concentration en spores est déterminée par le dénombrement de la dilution appropriée à l'aide d'une cellule de Thoma (Guiraud, 1998).



**Figure 5** : *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur milieu PDA, après 3 jours (a : mycélium a' : revers) et 6 jours (b : mycélium b' : revers) d'incubation à 30°C.

#### 1-2- Conservation de la souche

Les suspensions de spores sont ensuite stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990). Pour une conservation à -20°C, les spores sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée avec le glycérol à 20% (agent cryoprotecteur). Ces suspensions de spores sont ensuite stockées au congélateur, afin de garder leur viabilité et de limiter les possibilités de variation, jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990).

## **2-Etude de la production des enzymes cellulolytiques par fermentation sur milieu solide**

### **2-1- Matière première**

Le grignon d'olive est la matière première principalement utilisée, comme substrat de fermentation, dans cette étude. Il nous a été gracieusement fourni par une huilerie moderne à ELkennar (Jijel). Il est issu d'une extraction à système continu. Après séchage du grignon d'olive brut pendant un mois à l'air libre, celui-ci a été tamisé pour séparer les débris de coque de la pulpe et obtenir un grignon d'olive tamisé.

### **2-2- Conduite de la fermentation solide**

La production des enzymes recherchées est réalisée dans des erlens-meyers de 250 ml à raison de 10 grammes de substrats par erlens, imbibés par une solution *starter* (agent humidifiant) (Annexe 2). Les milieux sont homogénéisés à l'aide d'une tige en verre puis les erlens-meyers sont bouchés avec du coton cardé, recouverts avec du papier aluminium et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, les erlens-meyers vont servir pour l'étude de l'effet des paramètres suivants sur la production des enzymes cellulolytiques (papier filtre et endoglucanase) :

- \*Le taux (pourcentage) d'humidité ;
- \*Le temps (durée) d'incubation ;
- \*La température d'incubation et le taux d'inoculum.

#### **2-2-1-Effet du taux (pourcentage) d'humidité sur la production des enzymes**

L'étude de l'influence du taux d'humidité sur la production des enzymes, dont le but est de déterminer le pourcentage d'humidité qui permet de mesurer le maximum des activités enzymatiques. Pour cela, les erlens meyers contenant le milieu de production (grignon d'olive), sont imbibés (humidifiés) par la solution de l'agent humidifiant à différents pourcentages. La gamme des taux d'humidité étudiée est : 40%, 50%, 60%, 70% et 80%. Le contenu de chaque erlen doit être bien mélangé à l'aide d'une tige. Après stérilisation et refroidissement, les erlens sont inoculés avec une suspension de spores à raison de  $2.10^7$  spores par gramme de substrat, puis incubés à 30°C pendant 6 jours.

#### **2-2-2- Cinétique de production des enzymes par *Trichoderma longibrachiatum***

Le suivi cinétique de la production des enzymes est effectué en erlens meyers préparés avec un milieu de production humidifié à 50% par l'agent humidifiant (le meilleur pourcentage obtenu). Après stérilisation, refroidissement et inoculation avec une suspension de spores à raison de

$2.10^7$  spores par gramme de substrat, les erlens sont ensuite incubés à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 5 jours. Des prélèvements sont effectués chaque jour afin de mesurer les activités enzymatiques, ce qui permet d'établir leurs cinétiques en fonction du temps et de déterminer le meilleur temps de production.

### **2-2-3-Effet de la température d'incubation et du taux d'inoculum sur la production des enzymes**

L'étude de l'effet de la température sur la production des enzymes, dont le but est de comparer les activités enzymatiques produites par la souche à différentes températures, ainsi de déterminer la température optimale de production, est effectuée par inoculation des erlens meyers contenant du grignon d'olive humidifié à 50%, avec une suspension de spores à raison de  $2.10^7$  spores par gramme de substrat. Le contenu de chaque erlen meyer doit être bien mélangé à l'aide d'une tige stérile. Les erlens meyers ensemencés sont ensuite incubés à différentes températures ( $28^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  et  $45^{\circ}\text{C}$ ) pendant 3 jours (meilleur temps de production). L'étude de l'influence du taux d'inoculum sur la production des enzymes par la souche est réalisée par incubation des erlens contenant le milieu de production à  $30^{\circ}\text{C}$  (température optimale de production des enzymes), pendant 3 jours. Les taux d'inoculum étudiés sont  $1,5.10^7$  et  $2,5.10^7$  spores par gramme de substrat.

Toutes les expériences effectuées pour l'étude de ces paramètres, sont réalisées en duplicate.

## **3- Mesures et dosages effectués après fermentation**

A la fin de la fermentation, une quantité connue (2.5g) de substrat fermenté est mélangée avec 50 ml de solution tampon citrate 0.1M, pH 4.8 (Annexe 3). Après broyage à l'aide d'un blinder ménager pendant 1 à 2 minutes, le mélange est centrifugé à 12000 rpm pendant 5 minutes, à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant obtenu (représente l'extrait enzymatique) est utilisé pour le dosage des activités enzymatiques (papier filtre et endoglucanase). Les expérimentations sont réalisées en triplicate. Le surnageant est conservé à  $4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

### **3-1- Dosage des activités cellulolytiques**

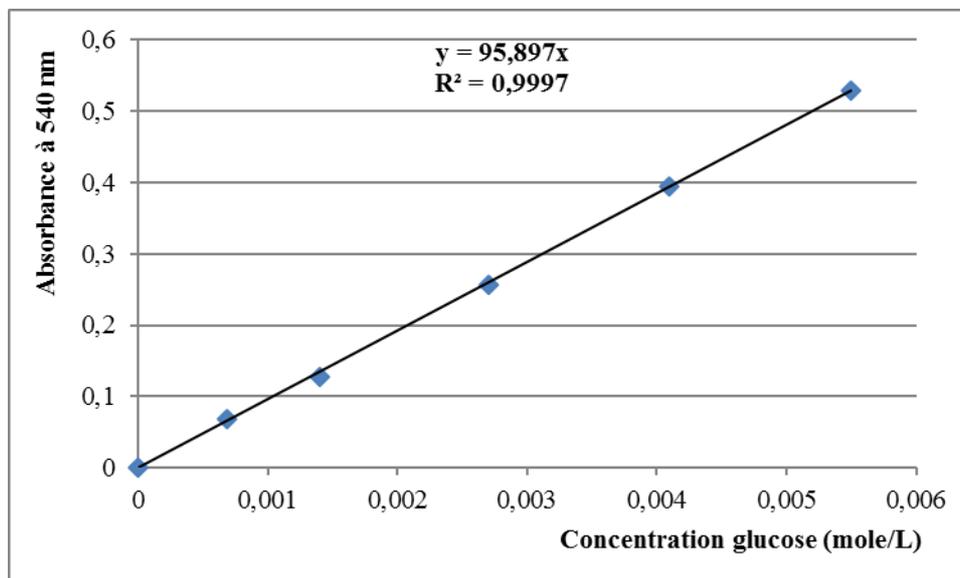
➤ **Activité papier filtre (APF) :** est utilisée pour déterminer l'activité totale dans un complexe cellulosique selon la méthode de Ghose (Ghose, 1987) dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés (lors de l'hydrolyse d'un substrat cellulosique). Le mélange réactionnel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

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

La quantité des sucres réducteurs libérés de l'hydrolyse du papier filtre et du carboxymethylcellulose est mesurés selon la méthode de Miller (Miller, 1959) par une réaction colorimétrique due à la présence du réactif : acide dinitrosalicylique (DNS) (Annexe 4).

\* L'absorbance de la coloration développée est lue à 540 nm, l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant le glucose comme standard avec une concentration de la solution mère de 0.0167 mol/L (Figure 6). L'activité enzymatique est calculée en **Unité par gramme de matière sèche (U/g)**.

Une unité de l'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent glucose (lorsque le glucose est utilisé comme étalon sucre réducteur) par minute et par millilitre, à 50°C, pH 4,8. Le blanc est préparé de la même façon, sans l'addition de substrat. Chaque dosage est effectué en triplicate.



**Figure 6** : Courbe étalon de glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase.

### 3-2- Mesure de l'humidité

L'humidité est un paramètre qui renseigne sur le développement du champignon au cours de la culture. En effet, au cours de sa croissance, le champignon produit six molécules d'eau pour une molécule de glucose consommée. De plus, la mesure du taux d'humidité permet de déterminer la matière sèche, nécessaire pour le calcul de la production de l'enzyme.

L'humidité est déterminée par la méthode de la mesure du poids sec. 2,5g de substrat fermenté de chaque prélèvement est séché par incubation dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant (Audigie *et al.*, 1984). L'humidité correspond au pourcentage que représente la masse d'eau obtenue par calcul après dessiccation par rapport à la masse initiale.

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



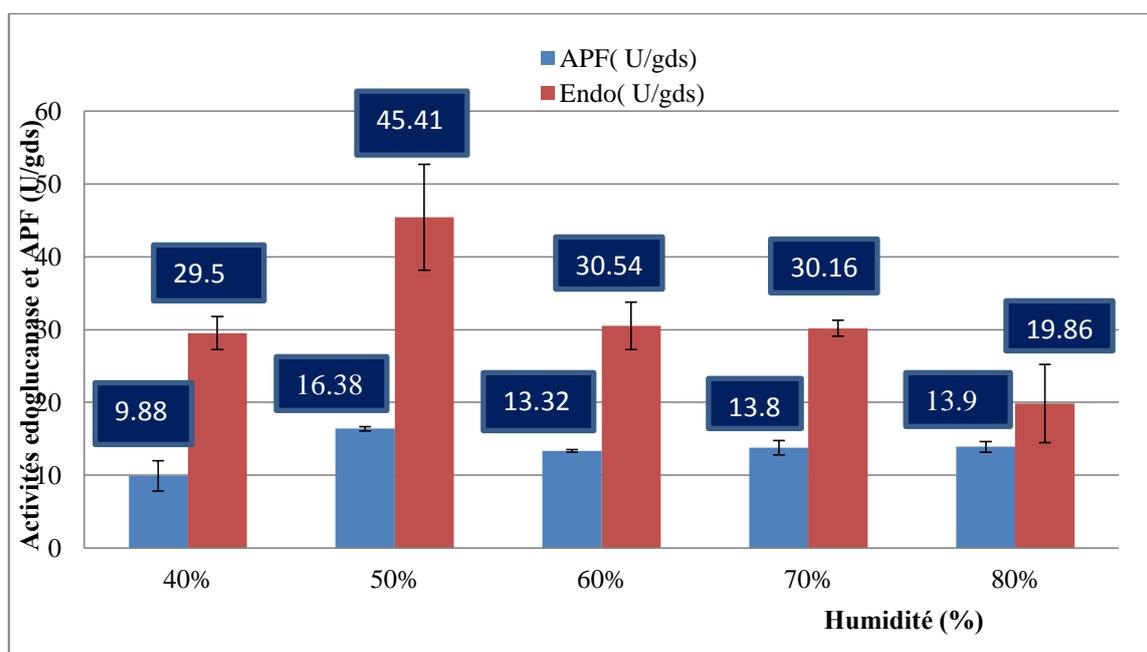
# **Résultats et Discussion**

## Résultat et discussion

Dans cette partie, on présente l'influence du pourcentage de l'humidité du substrat de fermentation et le suivie cinétique de production des enzymes, ainsi que, l'effet de la température d'incubation et du taux d'inoculum sur la production des enzymes recherchées.

### 1-Détermination du taux d'humidité optimal

Les résultats de la production des enzymes en fonction du taux d'humidité sont présentés dans la figure 7. Ils montrent que le pourcentage optimal d'humidité correspond à 50%. A ce taux, les activités enzymatiques papier filtre (APF) et endoglucanase sont mesurées à leurs valeurs maximales de 16.38 U/gds et 45.41 U/gds, respectivement. Au-delà de ce taux, on note une diminution progressive des deux activités jusqu'à atteindre leurs valeurs faibles à 80% d'humidité (13.90 U/gds et 19.86 U/gds, respectivement).



**Figure 7** : Effet du pourcentage de l'humidité du substrat sur la production des enzymes papier filtre (APF) et endoglucanase, après 6 jours de culture à 30°C. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes  $\pm$ écarts- types. N=3.

Notre résultat est en parfait accords avec celui obtenu par Vu *et al.*, (2011) qui ont rapporté une teneur en humidité de 50% pour une production importante en cellulase (76,6 U / g) par le mutant *Aspergillus* sp. SU 14 cultivé sur son de blé.

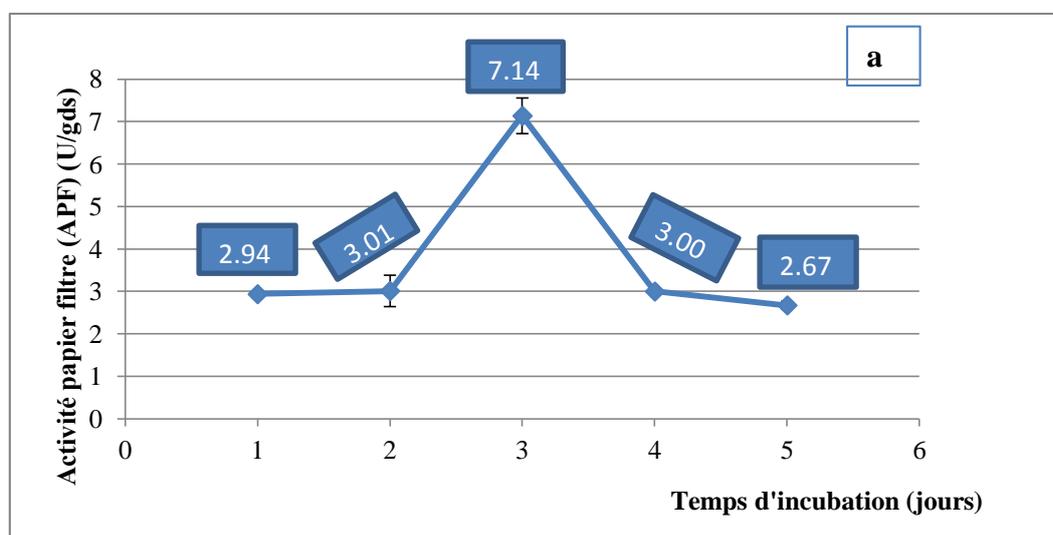
Pour d'autres auteurs par contre, les teneurs en humidité maximales sont supérieures à 50%. Raimbault et Alazard, (1980) ont rapportés un rapport substrat / humidité de 1: 3 sous FMS en utilisant le son de blé comme substrat. De même, Latifian *et al.*, (2007) ont obtenu une

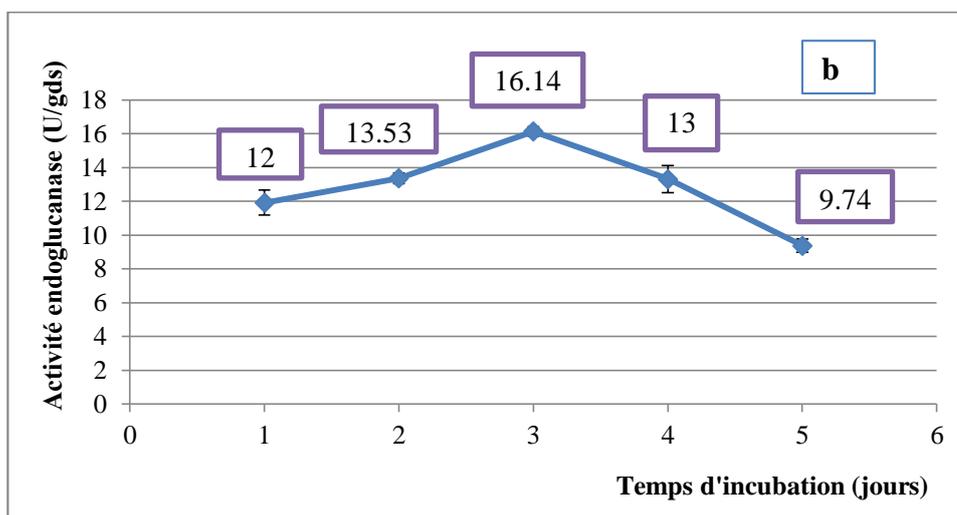
activité maximale de la cellulase par *T. reesei* à une teneur en eau de 70% sous SSF en utilisant le son de riz comme substrat. Aussi le taux de 70% est décrit par Leghlimi *et al.*, (2017) pour la production de cellulases par *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur son de blé. Singhania *et al.*, (2006) ont rapportés un rendement maximum de l'activité du papier filtre produite par *Trichoderma reesei* NRRL 11460 à 66,4% en humidité initiale de la bagasse de canne à sucre.

Par ailleurs, l'humidité initiale du milieu est un facteur critique en FMS car c'est elle qui détermine la croissance microbienne et le rendement en produit (Gervais et Molin, 2003). Des taux d'humidité faibles ou élevés affectent largement les activités métaboliques des cultures et par conséquent, la synthèse des produits. Dans les cultures solides fongiques et bactériennes, des niveaux d'humidité inférieurs peuvent conduire à une réduction de la solubilité des éléments nutritifs, un faible degré de gonflement des substrats et une tension d'eau plus élevée dans les substrats solides (Gervais et Molin, 2003; Lazim *et al.*, 2009). Les teneurs en humidité élevées peuvent provoquer une diminution de la porosité, ce qui interfère avec le transfert de l'oxygène ainsi que la perte de la structure des particules et la réduction du volume de gaz. De plus, elles diminuent les échanges gazeux et augmentent la formation du mycélium aérien (Sandhya *et al.*, 2005 b; Murthy et Naidy, 2010).

## 2-Suivi cinétique de la production des enzymes

La production des enzymes APF et endoglucanase par *Trichoderma longibrachiatum* est représentée dans la figure 8. Les activités enzymatiques sont détectées dans l'extrait de la culture dès le premier jour. Durant les premières 24 h, les activités mesurées sont faible, cela indique que les spores sont métaboliquement dormantes et que la dégradation du substrat ne peut avoir lieu qu'après la germination (Assamoi *et al.*, 2009).





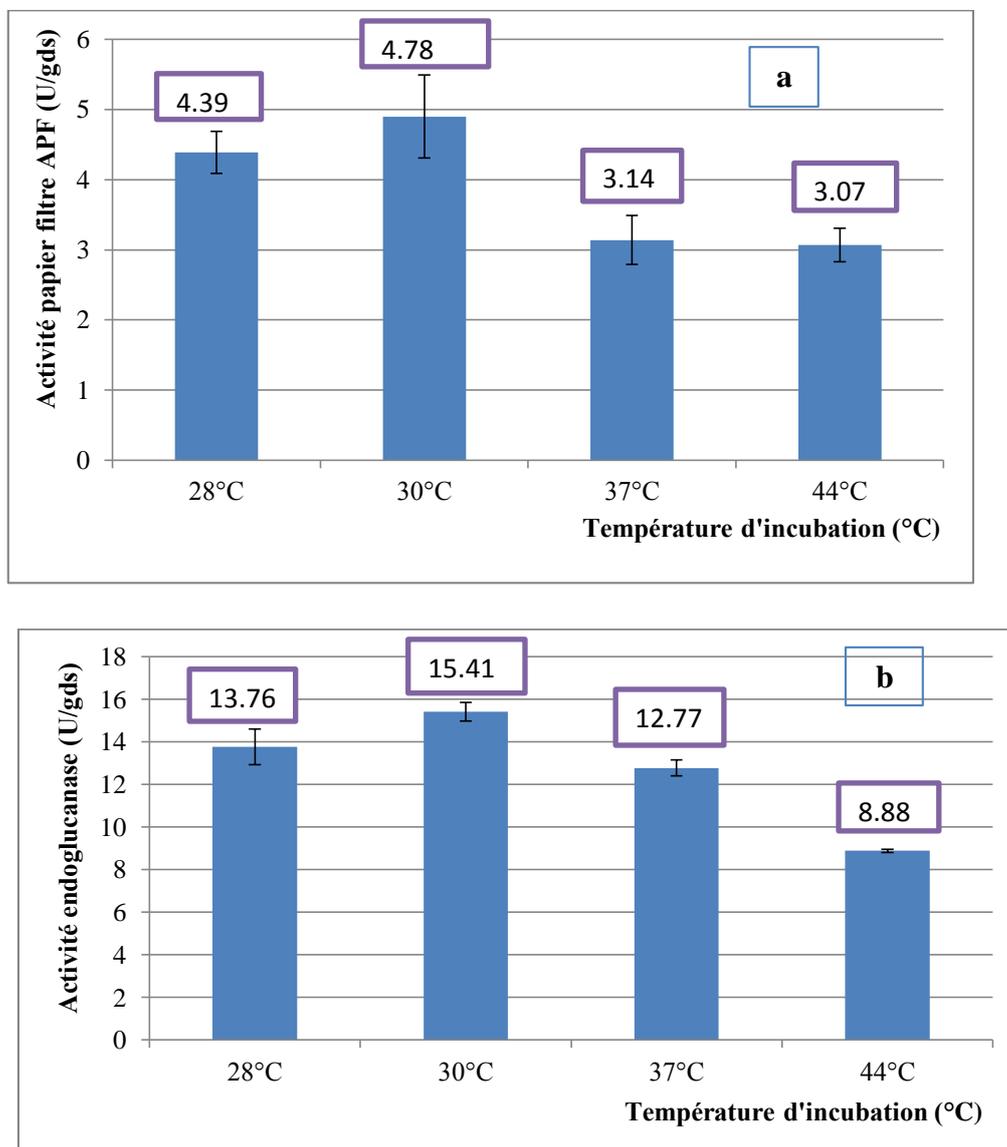
**Figure 8** : Profils cinétiques de production des activités papier filtre (APF) (a) et endoglucanase (b) par *Trichoderma longibrachiatum*.

Le profil cinétique montre que la production maximale des enzymes est obtenue après 3 jours de fermentation, aussi bien pour l'activité papier filtre (**7.14 U/gds**) que pour l'activité endoglucanase (**16.14 U/gds**). Au-delà de 3<sup>ème</sup> jours, la production subite une diminution importante pour les deux activités, soit 2.67 U/gds d'APF et 9.38 U/gds d'endoglucanase au bout du 5<sup>ème</sup> jour. Résultat similaire à celui obtenu par Leghlimi *et al.*, (2017), où le maximum des activités APF et endoglucanase produites par *Trichoderma longibrachiatum* est obtenu après 3 jours de fermentation sur son de blé. Par contre, une durée d'incubation de 4 jours est décrite pour la production de cellulase d'*Aspergillus niger* KK2 (Kang *et al.*, 2004) et d'*Aspergillus Phoenix* (Dedavid *et al.*, 2008). Les résultats obtenus par notre souche sont comparable aux travaux de Prasanna *et al.*, (2016), où un maximum d'endoglucanase est obtenu au bout de 3 jours de fermentation sur un milieu solide à base de déchet de datte, par la moisissure *Penicillium sp*, qui a montré que la quantité d'endoglucanase produite par cette souche (4.3U/g) est largement inférieure à celle obtenue par notre souche. Cependant, l'activité papier filtre (9.52U/g) obtenue dans ce travail dépasse légèrement celle produite par notre souche.

En effet, les durées de fermentation assez longues n'ont pas été explorées car elles ont été jugées insignifiantes sur le plan commercial. De ce fait, la durée de la période d'incubation est une préoccupation majeure pour le développement d'un processus de production de cellulase commerciale (Abdullah *et al.*, 2016), elle est affectée par plusieurs facteurs y compris la présence de différents ratio de cellulose amorphe et cristalline dans les substrats utilisés (Ogel *et al.*, 2001).

### 3-Effet de la température d'incubation sur la production des enzymes

Différentes températures (28°C, 30°C, 37°C et 44°C) sont testées pour comparer les activités enzymatiques mesurées : papier filtre et endoglucanase, ainsi de déterminer la température optimale pour la production des enzymes. Les résultats sont présentés dans la figure 9.



**Figure 9 :** Effet de la température d'incubation sur la production des activités papier filtre (a) et endoglucanase (b) par *Trichoderma longibrachiatum*, après 3 jours de culture. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes  $\pm$ écarts- types. N=3.

Les résultats présentés dans la figure 9, montrent que la production de la cellulase est nettement influencée par la température d'incubation. La température optimale de production des deux activités APF et endoglucanase est de 30°C, où les activités sont mesurées à **4.9 U/gds pour l'APF et 15.41 U/gds pour l'endoglucanase**. Cette température sera retenue pour la suite

de notre étude. La production des enzymes est aussi appréciable à 28°C et à 37°C. Pour l'activité globale papier filtre, les valeurs de 4.39 U/gds, 3.14 U/gds sont mesurées respectivement à 28°C et à 37°C. De même, l'activité endoglucanase est évaluée à 28°C et à 37°C dont les valeurs respectives sont : 13.76 U/gds, 12.77 U/gds. Quant à 44°C, la production des enzymes s'avère très faible, les valeurs respectives de 3.07 U/gds et 8.88 U/gds sont mesurées pour les activités papier filtre et endoglucanase.

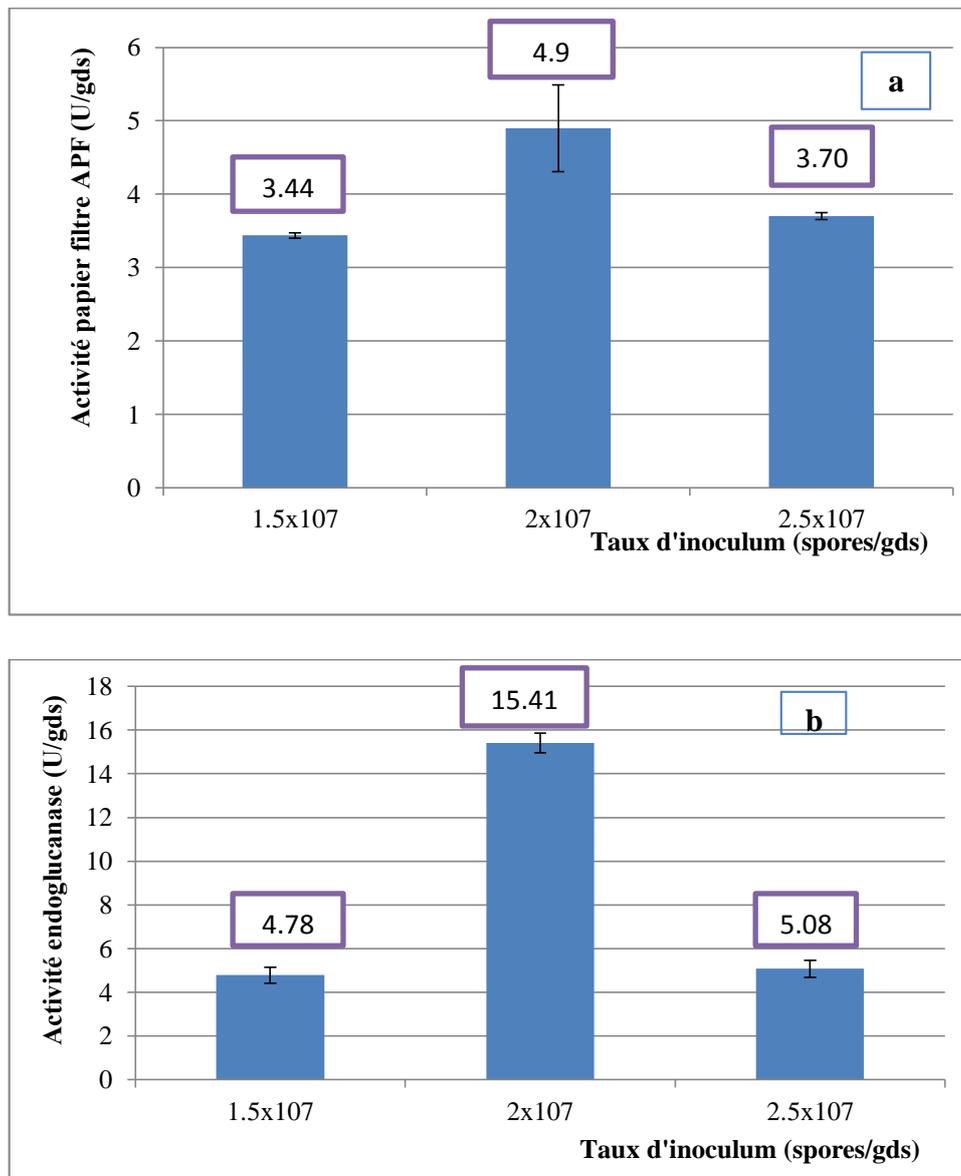
La température est l'un des facteurs les plus difficiles à réguler en fermentation en milieu solide. La faible conductivité thermique de l'air (en comparaison de celle de l'eau), des supports et l'absence d'eau libre limite le transfert de chaleur et son élimination favorisant ainsi une élévation de la température au-dessus de la température d'incubation. 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).

Nos résultats corrobore ceux de Sindhu *et al.*, (2009) qui indiquent qu'une meilleure production d'enzymes cellulolytiques et amylolytiques par les micromycètes est obtenue sur une gamme de température de 30°C à 45°C, avec une production optimale à 35°C.

Par contre, Moeses *et al.*, (2012) annoncent une température optimale de 28°C pour la production d'activité papier filtre par *Trichoderma reesei* cultivé par FMS sur milieu à base de son de riz.

#### **4- Effet du taux d'inoculation**

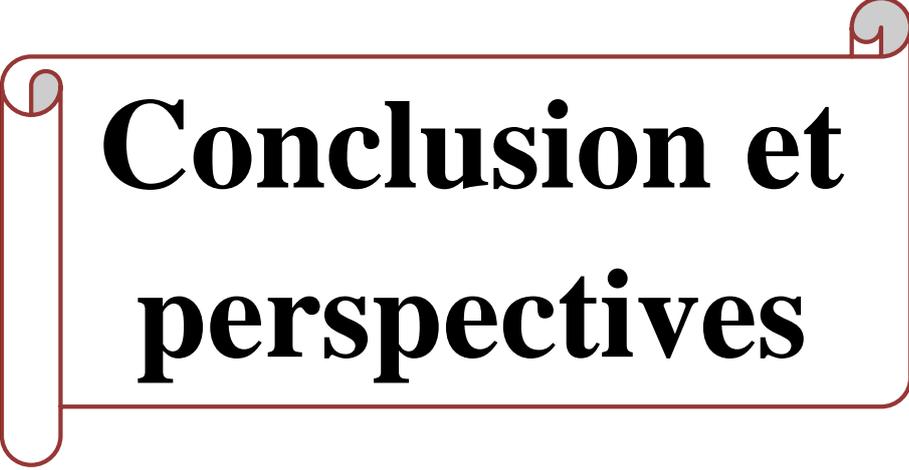
Une gamme des taux d'inoculum (spores/gramme de substrat) :  $1.5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  et  $2.5 \times 10^7$ , est testé à 30°C pour comparer la production des enzymes à différentes concentrations en inoculum, aussi pour déterminer le taux d'ensemencement optimal adéquat pour la production maximale des enzymes. Les résultats sont présentés dans la figure 10.



**Figure10** : Effet du taux d'inoculum sur la production des activités Papier filtre (a) et endoglucanase (b) par *Trichoderma longibrachiatum*, après 3 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes  $\pm$ écarts- types. N=3.

L'examen de la figure 10, montre que le taux d'ensemencement influence différemment l'expression des enzymes secrétées par cette souche. Il ressort que la concentration d'inoculum de  $2 \times 10^7$  spores par gramme de substrat, semble être suffisante pour obtenir une bonne activité cellulolytique mesurée à **4.9 U/gds pour l'APF et 15.41 U/gds pour l'endoglucanase**. Par ailleurs, on note une légère diminution pour l'activité papier filtre avec les autres concentrations en spores. A savoir, le taux  $1.5 \times 10^7$  spores/gds donne 3.44 U/gds et 3.7 U/gds avec le taux  $2.5 \times 10^7$  spores par gramme de substrat. Par contre, on enregistre une forte diminution de l'activité endoglucanase, dont les valeurs respectives 4.78 U/gds et 5.08 U/gds sont mesurées.

Cependant, une concentration de  $3 \times 10^7$  spores/gds correspond à une dose optimale pour initier une bonne croissance (Roussos et Raimbault, 1982). Aussi, un taux de  $2 \times 10^8$  spores/gds est préconisé pour la production de cellulase de *Trichoderma*. Sp cultivé sur grignons de pomme (Haiyan *et al.*, 2010). En effet, les taux d'inoculum faibles exigent plus de temps pour la multiplication des cellules à un nombre suffisant pour utiliser le substrat et produire les enzymes. Tandis que, un inoculum concentré en spores assure une prolifération rapide de la biomasse, ainsi que, la synthèse de métabolites. Au-delà d'une certaine limite, la production d'enzymes pourrait diminuer en raison de l'épuisement des nutriments due à une biomasse accrue, ce qui entrainerait une diminution de l'activité métabolique (Haiyan *et al.*, 2010)



# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion

Dans le cadre du travail effectué concernant la production de cellulases par le champignon filamenteux *Trichoderma longibrachiatum* provenant de sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales) cultivée sur grignons d'olive. L'effet du pourcentage d'humidité (40%, 50%, 60%, 70% et 80%) est étudié. Le suivi des profils cinétiques de la production des enzymes, ainsi que l'influence de la température (28°C, 30°C, 37°C et 44°C) et du taux d'inoculum ( $1.5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  et  $2.5 \times 10^7$  spores par grammes de substrat) sur la production des enzymes APF et endoglucanase, est établi.

Le maximum de production est observé pour les activités APF et endoglucanase (**16.38U/gds** et **45.41U/gds**, respectivement) à un pourcentage d'humidité de 50%. La fermentation a donné une production maximale des activités APF et endoglucanase (**5.68U/gds** et **13.32U/gds**, respectivement) après trois jours de fermentation. La souche utilisée *Trichoderma longibrachiatum* a pu donner une production maximale pour les deux activités papier filtre et endoglucanase (**4.78U/g** et **15.41U/g** respectivement) à une température de 30°C. Le taux d'inoculation **2 x 10<sup>7</sup> spores/gds** permet d'obtenir le maximum de production des activités papier filtre et endoglucanase (**4.78U/g** et **15.41U/g**, respectivement).

D'après ces résultats on peut considérer les grignons d'olive comme un déchet agroalimentaire d'importance industrielle, que l'on peut utiliser pour produire de la cellulase et même d'autres métabolites à intérêt industrielle.

Enfin ces résultats sont encourageants et ouvrent de nouvelles perspectives :

- Optimisation des paramètres de la production de la cellulase : concentration de différents éléments nutritifs (sources carbonées et azotées) ;
- Caractérisation des enzymes produites : pH, température et stabilité thermique ;
- Purification de la cellulase produite si elle est destinée à des usages pharmaceutiques.

## Références bibliographique

- Accardi. F., Leto. G., Giacconne. P., Alicata. Maria Luigia, (1980).** Sansa vergine di oliva. Indagine sulla composizione chimica, digeribilità ed effetto nutritivo su agnelli. *Zoot. Nutri. Anim*; 2 : p 238.
- Assamoi A.A., Destain J., Thonart P., (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13**(2); 281–294
- Assamoi Allah Antoine, Jacqueline Destain, Philippe Thonart, (2008).** Aspects microbiologiques de la production des protéases par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*.
- Bansal PK, (2009)** Sgt1 dimerization is negatively regulated by protein kinase CK2-mediated phosphorylation at Ser361. *J Biol Chem* 284(28):18692-8
- Beaugrand, J.(2004).** Probing the cell wall heterogeneity of micro-dissected wheat caryopsis using both active and inactive forms of a GH11 xylanase. *Planta* 222 (2),246-257.
- BALLERINI, Daniel, (2011).** *Les biocarburants. Répondre aux défis énergétiques et environnementaux des transports*. Paris (France) : Technip. 381 p. ISBN : 978-2710809692.
- Barjol L.-J. (2014).** L'économie mondiale de l'huile d'olive. OCL : 21(5) D502
- Beguïn P, Aubert J P. (1994).** The biological degradation cellulose. FEMS (Federation of European Microbiological Societies). *Microbiology Reviews*.13:25-58.
- Bellon-Maurel V., Orliac O., & Christen P., (2003).** Sensors and Measurements In Solid-State Fermentation: A Review. *Process Biochem.*, 38, 881-896.
- Benrachou N., Henchiri C. et Djeghaba Z. (2010).** Caractérisation de trois huiles d'olive issues de trois cultivars de l'est Algérien. *Revue synthèse* N°22 :12-22.
- Benyahia N. et Zein K. (2003).** Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. *2ème Conférence Internationale Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries (SESEC II)* du 28-29 janvier à Lausanne, Suisse 8 p.
- Bissett J. (2004).** Commentaires de l'adresse internet suivante : [http://www.Medicalglossary.org/fungi\\_mitosporic\\_fungi\\_definitions.html](http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html).

- Bissett J. (1991).** A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Pachybasium. (a) Can. J. Bot. 69: 2373-2417.
- Blume J.E., Ennis H.L. (1991).** A dictistelium dicoideum cellulose is a member of a sporegermination-specefic gene family. J. Biol. Chem. 266 (23). p:15432-15437.
- BROWN, R. Malcolm, (1999).** Jr.. Cellulose structure and biosynthesis. *Pure and Applied Chemistry* [en ligne, vol. 71, n°5, p. 767-775.
- Bayer E A., Kenig R., Lamed R. (1983).** Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. J Bacteriol. 156: 818-827.
- Chaabane K., Berdjaoui R. et Benhemouda M. (1997)** .Utilisation de différents types de grignons d'olive dans l'alimentation des lapereaux. *World Rabbit Science* 5(1) :17-21.
- Campos-García J., 2008.** Substrate specificity of the 3-methylcrotonyl coenzyme A (CoA) and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190, 4888–4893.
- Chaouadi H. et Elias A. (2015).** Production et extraction de l'huile d'olive en Algérie. *JEHOM, Université M'Hamed Bougara Boumerdès / CRAPC, 41-43.*
- CHUNDAWAT, Shishir P.S., BECKHAM, Gregg T., HIMMEL, Michael E., - DALE, Bruce E, (2011).** .Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, vol. 2, p. 121-145.
- Cordonnier R.E., Bayonone C.L., Baumes R.L. (1986).** Données récentes sur les précurseurs d'arômes du raisin, perspectives de leurs exploitations en vinification. Rev. Fr. Oenol. 102.p :29-41.
- Dan S., Marton I., Dekel M., Bravdo B A., He S., Withers S G., Shoseyov O. (2000).** Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase. J. Biol. Chem. 275(7): 4973-4980.
- Dedavid, E. S. L. A., Lopes, F. C., Silveira, S. T., Brandelli, A. (2008).** Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology. *Appl Biochem Biotechnol*, <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8190-7>.
- Dedavid, E. S. L. A., Lopes, F. C., Silveira, S. T., Brandelli, A. (2008).** Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology. *Appl Biochem Biotechnol*, <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8190-7>.
- Djadouf S., Tahakourt A., Chelouah N. et Merabet D. (2011).** Utilisation du grignon d'olive et foin comme ajouts dans la fabrication des briques de terre cuite. Séminaire

International, Innovation et Valorisation en Génie Civil et matériaux de Construction, Univ de Bejaïa N° 10-051.p1-5.

**-DUCHIRON, Francis, COPINET, Estelle. (2011).** Fermentation en milieu solide (FMS). *Techniques de l'ingénieur*. Référence BIO620.

**-Durand A., (2003).** Bioreactor Designs for Solid-State Fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 13, 113-125.

**-Esposito E. and Silva, M. (1998).** Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 24 (2): 89-98

**-F.A.O : (1982)** Monographie de produits 47, fruits et légumes transformés.

**-Gervais P., Molin P, (2003).** The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 13 ; 85-101.

**-GIDENNE, T, (2003).** Fibres in rabbitfeeding for digestive troubles prevention: respective role of flow-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science* [en ligne], vol.81, n°2-3, p. 105-117.

**-Gommers F.J., Henrissat B., Davis E.L., Helder J., Schots A., Bakker J. (1998).** Endogenous cellulases in animals: Isolation of  $\beta$ -1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Biochemistry*. 95(9). P: 4906-4911.

**-GUSAKOV, Alexander V.** Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*, septembre 2011, vol. 29, n°9, p. 419-425.

**-Hamdi M. et Ellouz R. (1993).** Treatment of detoxified olive mill wastewater by anaerobic filter and aerobic fluidized bed process. *Environmental Technology* 19 :183-188.

**-Hammadi C. (2006).** Technologie d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité. Bulletin mensuel d'information et de liaison de PNTTA, Rabat. N° 141.

**-Haiyan Sun., Xiangyang Ge., Zhikui Hao., Ming Peng. (2010).** Cellulase production by *Trichoderma* sp. On apple pomace under solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (2), pp. 163-166.

**-HOLKER, U., HOFER, M., LENZ, J, (2004),** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 64, n°2, p. 175-186.

- Joyeaux A. (1982).** Les préparations industrielles d'enzymes. p : 22-46. In : Durant G., Monsan. (ed.), Les enzymes production et utilisations industrielles. Edition Gautier-Villars. Paris.
- Kang, S.W., Park, Y. S., Lee, J. S., Hong, S. I., Kim, S. W. (2004).** Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, 91, 153-156.
- Kernou O. (2015).** Bioamélioration du grignon d'olive par culture submergée d'une souche locale de streptomycetes. Mémoire de Magister de microbiologie. Université de Bejaïa 79 p.
- Kiesov A.A. (1982).** Enzymatic hydrolysis of cellulose, 5. Cellulase complexes in marine organisms from the sea of Japan. *Bioorgan. Khim.* 8. P: 1490-1496.
- Klein D.; Eveleigh D.E. (1998).** Ecology of *Trichoderma* in *Trichoderma* and *Glicoladium*; Basic biology, taxonomy and genetics, pp.57- 74. Taylor and Francis Ltd, London, UK.
- Klopfenstein. (), (1980):** Chemical treatment of crap residues. *J of anim*; 46 (3):841-848.
- KRISHNA, Chundakkadu.** Solid-State Fermentation System-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2005, vol. 25, n°1-2, p. 1-30.
- Kubicek C P., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C., Szakacs G. (2003).** Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma sp.*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet Biology*. 38 (3): 310-319.
- Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I., Limam F., (2009).** Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **36** ; 531–537.
- Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I., Limam F., (2009).** Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **36** ; 531–537.
- LARROCHE, Christian, PANDEY, Ashok, (2010).** Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 46, n°7, p. 541-549.
- Leghlimi. H, Djeddar-Mihoubi. I, Boukhalfa-Lezzar. H., Dakhmouche. S., Bennamoun. L., Meraihi. Z. (2017).** Improvement of Fungal Cellulase Production by Solid State Fermentation. *International Journal of Sciences*, 6 (10), 46-51.

- LOPES FERREIRA, Nicolas, (2008).** Valorisation des ressources renouvelables : de la production d'éthanol au développement de nouveaux bioproduits. *Journal de la Société de Biologie*, vol. 202, n°3, p. 191-199.
- Mandels M., Andreotti R., Roche C. (1976).** Measurement of saccharifying cellulose. *Biotrechnol. Bioeng. Sump.* 6. P: 21-33.
- Marchall J.J. (1973).** Preliminary report on the digestive enzymes present in the digestive gland of *Perna viridis*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 44. p: 981-988.
- Mathot P. (1996).** Modélisation d'un réacteur simplifié pour la fermentation solide de produits et sous-produits agricoles. Valorisation de l'aliment fermenté par le Porc. Thèse De Doctorat : Faculté Universitaire Des Sciences Agronomiques De Gembloux (Belgique). D'Ingénieur en génie biologique. Université de Bejaia. 46p.
- Moses Jeyakumar Rajesha., Leelavathy Rajesha., Lakew Wondimu Abachire. (2012).** Optimization of Solid State Fermentation Conditions for the Production of Cellulase by Using *Trichoderma Reesei*. *European Journal of Applied Engineering and Scientific Research*, 2012, 1 (4) :196-200.
- Moumene M. et Saidi M. (2006).** Essai de la bioamélioration du grignon d'olive. Mémoire
- Muhammad Imran1, 2\*, Zahid Anwar2, Muhammad Irshad2, Muhammad Javaid Asad3, Hassan Ashfaq. (2016).** Cellulase Production from Species of Fungi and Bacteria from Agricultural Wastes and Its Utilization in Industry : A Review, n°4, p.44-55.
- Murthy P.S., Naidu M.M. (2010).** Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Appl. Sci. J.*, 8(2) ; 199-205. **Nefzaoui A.,**
- Marchan, S. ET Vanbelle M, (1982).** Tropical Animal Production For The Benefit of Man. International Colloquium, Antwerp, Belgium: 309-314.
- Nefzaoui A, (1985) :**"Valorisation des lignocelluloses dans l'alimentation des ruminants par les traitements aux alcalis. Application aux grignons d'olive". *Thèse de doctorat d'Etat, Université Catholique de Louvain.*
- Nefzaoui A, (1987).** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. *Olivae*; 19: 17-21.
- Nefzaoui A., Hellings PH., Vanbelle, M, (1983).** Ensiling olive pulp with ammonia. Effects on voluntary intake and digestibility measured among sheep. 34th Annual Meeting of the EAAP Study Commission. Madrid: 118.
- Odier E., Rouau X. (1985).** Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine. *In: Mouranche A., Costes C. (ed.), Hydrolases et dépolymérasés. Enzymes d'intérêt industriel.*

- Ogel, Z. B., Yarangumeli, K., Du, H., Ifrij, J. (2001).** Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass. *Enzyme Microbiol Technol*, 28, 689-695.
- PERCIVAL ZHANG, Y.-H.(2008).** Reviving the carbohydrate economy via multi-product Lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 35, n°5, p. 367-375 .
- Purchon R.D. (1977).**The biology of the mollusca, 2 nd ed. Pergamon Press, Oxford.
- Rahardjo Y.S.P., Tramper J. & Rinzema A,(2006).**Modeling Conversion and Transport Phenomena In Solid-State Fermentation: A Review And Perspectives. *Biotechnol. Adv.*, 24 (2), 161-179.
- Ramesh Chander Kuhad, 1 Rishi Gupta, 1 and Ajay Singh2, (2011).** Microbial Cellulases and Their Industrial Applications, p3.
- Rebeyrotte P., Dupin F., Jayle M.F. (1976).** Contribution à l'étude d'une cellulose extraite du suc digestif d'*Helix pomatia*. Bull. Soc. Chim. Biol. Paris. 49. P: 1247-1256.
- Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002).** Dimension, shape, and conformational flexibility of two domaine fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *The journal of Biological Chemistry*. 277 (43). p : 40887-40892.
- Riccio P., Rossano R., Vinella M., Domizio P., Zito F., Sansevrino F., D'elis A., Rosi I. (1999).** Extraction and immobilization in one step of two  $\beta$ -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii* .*Enzyme and Microbiol Technology*.24: 123-129.
- RODRIGUEZ COUTO, S., SANROMAN, M.A. (2005).** Application of solid-state fermentation to lignolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 22, n°3, p. 211-219.
- Scriban R., (1988).** Biotechnologie. 5e Edition. *Tech Et Doc*. Lavoisier. Paris.
- Roussos S., Praud G., Lakhtar H., Aouid F. Labrousse Y., Belkacem N., Macarie H. et Artaud J. (2009).** Valorisation biotechnologique des sous-produits de l'olivier par Fermentation en Milieu Solide, P 293-300.
- Roussos, S. (1985).** Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse de doctorat. ORSTOM, Paris, France.
- Roquebert, M.-F. (1996)** Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. Dans les systèmes telluriques : Systématiques, biologie et écologie des organismes. Comptes rendus des 4èmes Rencontres en Toxinologie, Paris, 13-15.

- SADDLER, Jack N. (2010).** ARANTES, Valdeir, Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis : the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, vol. 3, n°4.
- Sanglier J J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P : 34-428.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, **40** ; 2689–2694.
- Sansoucy R. (1981).** L'utilisation des sous-produits de l'olivier pour l'alimentation des animaux. Séminaire sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. Monastir, Tunisie, PNUD/FAO/COI, pp73–78.
- Schulein M. (1988).** *Methods Enzymol*, 160, p : 234-242.
- Scriban R. (1993).** *Biotechnologie*. 4ème édition. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. P: 40.
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Pillai, A., Prema, P., Szakas, G., Pandey, A. (2006).** Solide state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulase production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460. *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 332-336.
- Simon P., Meunier R. (1970).** *Microbiologie industrielle et génie biochimique*. Ed Masson Et Cie. Paris. PP 567.
- Stryer L., Berg J M., Tymoczko J L. (2003).** *Biochimie*. 5ème édition. Médecine-Sciences. Flammarion. Paris. P: 303.
- Schamburg D., Salzman M G B F. (1991).** Cellulase. *In: Enzyme Handbook*, Vol IV. Springer-Verlag Berlin, p: 1-11.
- Schulein M. (1985).** *Methods Enzymol*, 160, p: 234
- Vu, V. H., Pham, T. A., Kim K. (2011).** Improvement of Fungal Cellulase roduction by Mutation and Optimization of Solid State Fermentation. *Mycobiology*, 39(1), 20-25.
- Xu B., Hellman U., Ersson B., Janson J C. (2000).** Purification, characterization and aminoacid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- $\beta$ -1, 4-glucanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*. *Euro J Biochem*. 267: 4970-49.



# **Annexes**

## Annexe 1 : Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

+ Extrait de pomme de terre	
+ Glucose.....	20g
+ Agar.....	20g
+ Eau distillée.....	1000ml

pH = 5

- Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes
  - Préparation de l'extrait pomme de terre

200g de pomme de terre non pelées vieilles sont lavés et coupés en petites dés ensuite mis dans un litre d'eau distillée et portés à ébullition pendant 1heure, ils sont enfin écrasés puis filtrés. Le filtrat obtenu représente l'extrait de pomme de terre.

- Préparation du milieu de culture

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

## Annexe 2 : Agent humidifiant

+ Glucose.....	1g
+ Sulfate d'ammonium.....	0.92g
+ Tartrate double Na, K .....	0.92g
+ Eau distillée.....	100ml

Dissoudre 1 g de glucose, 0.92 g de sulfate d'ammonium et 0.92 g de tartrate double Na, K dans un petit volume d'eau distillée et bien mélanger, puis compléter à 100 ml avec l'eau distillée et agiter jusqu'à l'homogénéisation complète.

## Annexe 3 : Tampon citrate 0.1M, pH 4.8

+ Acide citrique (0.1M).....	23g
+ Citrate de sodium (0.1M).....	58.8g
+ Eau distillée	

### Protocole :

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

#### **Annexe 4 : Réactif DNS (acide dinitrosalicylique)**

Dissoudre 1g de DNS dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée (NaOH (2N) : 8g NaOH dans 100 ml eau distillé).

Ajouter 30g tartrate double Na, K. Compléter à 100ml avec l'eau distillée, agité. Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière. Il se conserve environ un mois (Miller, 1959).

Production de cellulase par *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur grignons d'olive

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en :  
Mycologie et biotechnologie fongique

La production des enzymes cellulolytiques par *Trichoderma longibrachiatum* est effectuée sur milieu à base de grignons d'olive par fermentation solide. L'effet du pourcentage d'humidité (40%, 50%, 60%, 70% et 80%) est étudié. Le suivi des profils cinétiques de la production des enzymes, ainsi que l'influence de la température (28°C, 30°C, 37°C et 44°C) et du taux d'inoculum ( $1.5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  et  $2.5 \times 10^7$  spores par grammes de substrat) sur la production des enzymes APF et endoglucanase, est établi.

Un maximum de production est observé, pour les activités APF et endoglucanase (16.38U/gds et 45.41U/gds, respectivement), à un pourcentage d'humidité de 50%. Le profil cinétique de la production de ces enzymes révèle un maximum (5.68U/g U/g et 13.32U/g, respectivement) au bout de trois jours de fermentation. La température optimale de production des enzymes (4.78U/g et 15.41U/g, respectivement) par *Trichoderma longibrachiatum* est de 30°C. Le taux d'inoculation  $2 \times 10^7$  spores/gds correspond au maximum de production des activités papier filtre et endoglucanase (4.78U/g et 15.41U/g, respectivement). D'après ces résultats on peut valoriser ce déchet agroalimentaire abandonné pour la production de cellulase à intérêt industrielle.

**Mots clés :** Cellulase, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation en milieu solide, grignons d'olive.

**Laboratoire de recherche :** laboratoire de ZOOLOGIE. Université Constantine 1. Algérie.

**Membres du jury :**

**Présidente :** Melle. H. ALMI. Maître de conférences B. UFM Constantine.

**Rapporteur :** Mme. H. LEGHLIMI. Maître de conférences B. UFM Constantine.

**Examinatrice :** Melle. W. ABDELAZIZ. Maître Assistante A. UFM Constantine.

**Date de soutenance :** 27/06/2018



