



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arreridj
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre
et de l'Univers
Département des Sciences Biologiques
Laboratoire de Caractérisation et Valorisation des Ressources Naturelles



Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat LMD (3ème Cycle)
Domaine S.N.V.
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité: Biochimie

INTITULEE

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS PRODUCTEURS D'ENZYMES.

Présentée par : GAHFIF Ouahiba

Soutenu le _11/_12 / 2021 Devant le Jury :

BOUBELLOUTA Tahar	MCA	UNIV-BBA	Président
BETTACHE Azzeddine	Pr	UNIV Bejaia	Encadrant
SOUAGUI Yasmina	MCB	UNIV- BBA	Co-encadrant
DJOUDI Ferhat	MCA	UNIV- Bejaia	Examineur
TOUATI Nouredine	MCA	UNIV-BBA	Examineur
BENDIF Hamdi	MCA	UNIV-M'sila	Examineur

Année Universitaire 2020/2021

REMERCIEMENTS

*Avant toute chose, je remercie **Dieu**, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.*

*J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à mon encadreur **Pr BETTACHE Azzeddine**, Maitre de conférences classe A, à l'université de Bejaia pour l'intéressant sujet qu'il m'a proposé et qui n'a cessé de m'orienter et m'appuyer à chaque étape, c'est par ses conseils précieux, son aide et ses encouragements que ce travail s'est concrétisé.*

*J'exprime mes respectueuses reconnaissances à **Dr SOUAGUI Yasmina** (Coencadreur), Maitre de conférences classe B à l'Université de Bordj Bou Arrerridj et **M^{elle} AZZOUZ Zahra**, doctorante à l'université de Bejaia, pour leur aide technique et leurs précieuses orientations.*

*J'exprime également mes sincères remerciements à **Dr SADRATI Nouari**, maitre de conférences classe B au département de Biologie, Université de Bordj Bou Arrerridj, pour son aide et ses conseils au cours de la réalisation de ce travail.*

*J'adressé aussi mes sincères remerciements à **Mr HARRAR Abdenassar**, Maitre, assistant au département de biochimie et microbiologie, Université de M'sila, qui m'a aidé abondamment dans le volet rédaction de la thèse.*

*Un grand merci à **Mr BOUBELLOUTTA Tahar**, Doyen de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury.*

*Mes sincères remerciements vont aux membres de jury : **Dr TOUATI Nouredine**, **Dr BENDIF Hamdi** et **Dr DJOUDI Ferhat** pour l'honneur qu'ils ont fait en acceptant d'examiner ce travail.*

*Mes vifs remerciements vont à **Mme BOUMERFEG Sabah** professeur à l'Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A pour le soutien moral qu'elle m'a donné, et à **M^{me} DEHAMNA Wassima**, ma très chère collègue et **Mr REBAI Khalil** pour l'aide qu'ils m'on prodigués et pour leur conseil au cours de la réalisation de ce travail ainsi que mes collègues du laboratoire pour leur aide, leur soutient et leur présence.*

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude à tous les doctorants, le personel et les enseignants de Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers de Université de Bordj Bou Arrerridj particulièrement Dahou Moutassem, Merzougui Youcef, Benthabet Abdelouahab, Laazazga Abdelali, Bouguerra Asma, Abed Hanen, Zerroug Amina, Iratni Nadjat, Maafi Oula, Laoufi hadjer pour leur aide et leur soutient.

Au risque de me répéter, j'exprime mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de cette thèse.

DEDICACE

A DIEU, pour m'avoir donné la force dans les moments difficiles d'éditer ce travail.

A mes chers parents qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour ; leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études ; que DIEU les bénisse.

A l'homme qui me redonne confiance en moi et me soutient dans toutes les épreuves, Mon cher mari Mourad.

La plus chère partie de moi, mes très cher enfants Malak, Maria, Zohir et la petite Mayar, source de ma volonté et de mon courage, que Dieu les gardes' pour moi.

À mes chères sœurs, leurs époux et leurs enfants et mes très chers frères ainsi que leurs épouses et leurs enfants de m'avoir compris et soutenus dans mes moments difficiles, À toute ma famille A ma belle-famille,

A toutes mes amies.

A tous mes collègues de travail.

A tous ceux qui m'ont enseigné...

A tous ceux que j'aime.

Résumé

L'objectif visé lors de cette étude, cible l'isolement, l'identification, l'optimisation, et la caractérisation des champignons producteurs d'enzymes hydrolytiques. Les quarante champignons isolés d'un sol riche en matière organique ont été criblés pour la production d'enzymes extracellulaires. Ils ont été sélectionnés sur la base de leur potentiel hydrolytique de la cellulose, du xylane, de l'amidon, de la caséine et des plumes de poulet. L'ordre des activités enzymatiques avec pourcentage pour les microorganismes isolés est : cellulolytique > xylanolytique > amylolytique > protéolytique > kératinolytique. Les souches dont leurs résultats étaient positifs lors du premier criblage ont été testées sur milieu liquide et ont été évaluées quantitativement. Les activités les plus élevées de CMCCase (5,10 UI/ml) et de xylanase (98,25 UI/ml) ont été obtenues à partir de *Trichoderma sp.* Mtr6. Pour l'amylase, l'activité maximale (44,67 UI/ml) a été enregistrée par *Aspergillus sp.* BAS2. *Penicillium sp.* Bpn3 a montré une activité protéasique de 3,80 UI/ml. *Penicillium sp.* BAS3 est la plus productrice de kératinase avec (2,18 UI/ml). Après le criblage, La CMCCase a été privilégiée pour compléter ce travail, et cela par les isolats les plus performants à savoir : Mtr6, BAS1 et BbV1. Ils ont été identifiés comme *T. afroharzianum*, *A. foetidus*. et *S. kiliense* respectivement. Les résultats de l'étude OFAT ont révélé que le temps d'incubation, l'humidité, la température et la taille de l'inoculum ont significativement influencé la production d'endoglucanase, l'optimum de ces paramètres sont respectivement : (6 jours, 90%, 24°C, 10⁷ spores/g), (7 jours, 90%, 28°C et 10⁷ spores/g), (8 jours, 90%, 26°C et 10⁵ spores/g). Le plan de Box Benckhen a été utilisé pour améliorer la production d'endoglucanase de *S kiliense*. BbV1 en étudiant l'effet d'interaction entre les paramètres sélectionnés (temps d'incubation, humidité, température, et taille de l'inoculum). La validation du modèle RSM par la souche *S. kiliense* a permis d'obtenir une activité maximale de 15,03U/gds avec :10 jours,60%,24°C et 1,9 10⁵sp/g respectivement L'activité optimale de CMCCase semi purifiée en utilisant l'ultrafiltration pour les trois souches est observé à 60°C et pH 4,8 pour les deux souches : *T afroharzianum*. Mtr6 et *A foetidus*. BAS1 et un optimum d'activité de *S kiliense* BbV1 à 40°C et pH 5. Pour *T afroharzianum*, les ions FeSO₄ et Ag₂SO₄ augmentent l'activité 114,32% et 100, 39% respectivement. La présence de l'ion FeSO₄ stimule l'activité avec 111,57% par *A foetidus*.BAS1 et l'addition d'AgSO₄ augmente l'activité avec (107,11%) par *S kiliense* BbV1, tandis que l'effet de l'EDTA pour ces deux souches (65,09%) et (33,61%) respectivement inhibe la CMCCase. La thermostabilité révélée stable pendant (165,90,270 min) pour les souches Mtr6, BAS1et BbV1 respectivement. L'endoglucanase possède plus d'affinité pour le CMC (carboxymethyl cellulose) avec une activité de 100% pour les trois souches.

Mots clés : Box Benckhen, caractérisation, criblage, enzymes hydrolytiques, fermentation solide, *Sarocladium kiliense*.

Abstract

The objective of this study is to isolate, identify, optimize and characterize hydrolytic enzyme producing fungi. The forty fungi isolated from a soil rich in organic matter were screened for the production of extracellular enzymes. They were selected on the basis of their hydrolytic potential of cellulose, xylan, starch, casein and chicken feathers. The order of enzyme activities with percentage for the isolated microorganisms is: cellulolytic > xylanolytic > amylolytic > proteolytic > keratinolytic. Strains that were positive in the first screening were tested on liquid medium and quantitatively evaluated. The highest activities of CMCCase (5.10 IU/ml) and xylanase (98.25 IU/ml) were obtained from *Trichoderma sp.* Mtr6. For amylase, the maximum activity (44.67 IU/ml) was recorded by *Aspergillus sp.* BAS2. *Penicillium sp.* Bpn3 showed a protease activity of 3.80 IU/ml. *Penicillium sp.* BAS3 is the most keratinase producer with (2.18 IU/ml). After screening, CMCCase was preferred to complete this work, and this by the best performing isolates namely: Mtr6, BAS1 and BbV1. They were identified as *T. afroharzianum*, *A. foetidus*. and *S. kiliense* respectively. The results of the OFAT study revealed that incubation time, humidity, temperature and inoculum size significantly influenced the production of endoglucanase, the optimum of these parameters are respectively: (6 days, 90%, 24°C, 107 spores/g), (7 days, 90%, 28°C and 107 spores/g), (8 days, 90%, 26°C and 105 spores/g). The Box Benckhen design was used to improve the endoglucanase production of *S. kiliense*. BbV1 by studying the interaction effect between the selected parameters (incubation time, humidity, temperature, and inoculum size). Validation of the RSM model with the *S. kiliense* strain resulted in a maximum activity of 15.03U/gds with: 10 days, 60%, 24°C and 1.9 105sp/g respectively. The optimal activity of semi-purified CMCCase using ultrafiltration for the three strains is observed at 60°C and pH 4.8 for both strains: *T. afroharzianum*. Mtr6 and *A. foetidus*. For *T. afroharzianum*, FeSO₄ and Ag₂SO₄ ions increase the activity 114.32% and 100.39% respectively. The presence of FeSO₄ ion stimulates the activity with 111.57% by *A. foetidus*. BAS1 and the addition of Ag₂SO₄ increases the activity with (107.11%) by *S. kiliense* BbV1, while the effect of EDTA for these two strains (65.09%) and (33.61%) respectively inhibits the CMCCase. Thermostability was found to be stable for (165,90,270 min) for Mtr6, BAS1 and BbV1 strains respectively. Endoglucanase has more affinity for CMC (carboxymethyl cellulose) with 100% activity for all three strains.

Key words: Box Benckhen, characterization, hydrolytic enzymes, *Sarocladium kiliense*, screening, solid fermentation.

ملخص

تلعب الفطريات الخيطية دوراً مهماً في إنتاج مجموعة متنوعة من إنزيمات التحلل المائي خارج الخلية المفيدة للتطبيقات الصناعية الواسعة.

الهدف من هذه الدراسة هو عزل الفطريات المنتجة للإنزيم المائي وتحديدها وتحسينها وتوصيفها. تم فحص أربعين فطراً معزولة من تربة غنية بالمواد العضوية لإنتاج إنزيمات خارج الخلية. تم اختيارهم على أساس إمكانات التحلل المائي لديهم من السليلوز، الكزيلوز، النشاء، الكازين وريش الدجاج. أظهرت السلالات المعزولة فعالية إنزيمية مصنفة كالتالي: السليولاز (35٪)، الكزيلاناز (28٪)، الاميلاز (16٪)، البروتياز (12٪) الكيراتيناز بنسبة (9٪). نمت سلالات تنتج مستويات عالية من هذه الإنزيمات في التخمر

المغمور وبتقييمها كمياً، تم الحصول على أعلى نشاط إندوجلوكاناز بقيمة (5.10 وحدة دولية / مل) والكزيلاناز ب (98.25 وحدة دولية / مل) من سلالة *Trichoderma sp. Mtr6*، بالنسبة للأميلاز تم تسجيل أقصى نشاط إنزيم (44.67 وحدة دولية / مل) بواسطة *Aspergillus sp. BAS2* و *Penicillium sp. Bpn3* أظهر نشاط بروتياز (3.80 وحدة دولية / مل) أما *Penicillium sp. BAS3* فهو أكثر السلالات إنتاجاً للكيراتيناز ب (2.18 وحدة دولية / مل). بعد الفحص، تم اختيار نشاط إندوجلوكاناز (CMCase) لمزيد من العمل بواسطة العزلات *Mtr6* و *BAS1* و *BbV1* والتي أظهرت إنتاج CMCCase عالي. على أساس التعريف المورفولوجي والجزئي، تم تحديد هذه العزلات على أنها *Trichoderma afroharzianum. Mtr6*، *Aspergillus foetidus. BAS1* و *Sarocladium kiliense. BbV1*. أظهرت نتائج دراسة OFAT أن مدة الحضارة والرطوبة ودرجة الحرارة وحجم اللقاح أثرت بشكل كبير على إنتاج إندوجلوكاناز، وأفضل هذه المعلمات هي على التوالي: (6 أيام، 90٪، 24 درجة مئوية، 10⁷ جراثيم / غ)، (7 أيام، 90٪، 28 درجة مئوية و 10⁷ جراثيم / غ)، (8 أيام، 90٪، 26 درجة مئوية و 10⁵ جراثيم / غ). تم استخدام تصميم Box Benckhen لتحسين إنتاج إندوجلوكاناز للسلالة *Sarocladium kiliense. BbV1* من خلال دراسة تأثير التفاعل بين المعلمات المحددة (وقت الحضارة، والرطوبة، ودرجة الحرارة، وحجم اللقاح). تم الحصول على الفعالية المثلى للاندوغلوكانيز البالغة 15.03 وحدة / جرام تحت الظروف التالية: 10 أيام من التخمر، 60٪ رطوبة، 24 درجة مئوية، و 1.9 × 10⁵ جراثيم / غ. تمت تنقية الإندوجلوكانيز من *Trichoderma afroharzianum. Mtr6* و *Aspergillus BAS1 foetidus. BbV1* جزئياً باستخدام الترشيح الفائق، النشاط الأنزيمي الأمثل للاندوغلوكاناز شبه المنقى عند 60 درجة مئوية ودرجة الحموضة 4.8 لكلا السلالتين: *Trichoderma afroharzianum. Mtr6* و *Aspergillus foetidus. BAS1* والنشاط الأمثل لسلالة *Sarocladium kiliense. BbV1* عند 40 درجة مئوية ودرجة الحموضة 5. بالنسبة للسلالة *Trichoderma afroharzianum*، تزيد أيونات FeSO₄ و Ag₂SO₄ من نشاط اندوغلوكاناز، حيث تبلغ الأنشطة النسبية 114.32٪ و 100.39٪ على التوالي. يحفز وجود أيون FeSO₄ نشاط إندوجلوكاناز مع نشاط نسبي يبلغ 111.57٪ بواسطة *Aspergillus foetidus. BAS1* وإضافة AgSO₄ يزيد من نشاط اندوغلوكاناز النسبي (107.11٪) بواسطة سلالة *Sarocladium kiliense. BbV1*، بينما يثبط EDTA نشاط CMCCase أو إندوجلوكاناز لهاتين السلالتين (65.09٪) و (33.61٪) على التوالي. وجد أن الثبات الحراري ثابت لمدة 165 دقيقة و 90 دقيقة على التوالي عند 60 درجة مئوية ودرجة الحموضة المثلى 4.8 *Trichoderma afroharzianum. Mtr6* و *Aspergillus foetidus. BAS1* و 270 دقيقة عند 40 درجة مئوية ودرجة الحموضة 5 لـ *Sarocladium kiliense. BbV1*. يمتلك إندوغلوكاناز تقارباً أكبر مع CMC مع نشاط نسبي بنسبة 100٪ للسلالات الثلاثة.

الكلمات المفتاحية: الإنزيمات المتحللة، انتقاء، *Sarocladium kiliense*، التخمر الصلب، Box Benckhen، التوصيف بالماء

Publications

Gahfif Ouahiba, Souagui Yasmina, Bettache Azzeddine, Azzouz Zahra, Sadrati Nouari. Optimization of endoglucanase production from *Sarocladium kiliense* strain BbV1 under solid state fermentation, using response surface methodology. (PONTE, 77 (4), **2021**).

Ouahiba Gahfif, Yasmina Souagui, Zahra Azzouz, Sadrati Nouari, Zahir Amghar, Nawel Boucherba, Mouloud Kecha, Said Benallaoua, Azzeddine Bettache. Isolation and Screening of Fungal Culture Isolated from Algerian Soil for the Production of Cellulase and Xylanase. (Journal of Drug Delivery & Therapeutics. 10(5-s):108-113, **2020**).

Bettache Azzeddine, Azzouz Zahra, Boucherba Nawel, Bouiche Celia, Hamma Samir, Maibeche Rima, **Gahfif Ouahiba** and Benallaoua Said. Lignocellulosic Biomass and Cellulolytic Enzymes of Actinobacteria. SAJ Biotechnology, 5(105), **2018**).

Communications Internationales

Ouahiba Gahfif, Bettache Azzeddine, Souagui Yasmina, Azzouz Zahra, Sadrati Nouari. Isolement et criblage des champignons filamenteux producteurs d'enzymes xylanolytiques. International Seminar on Biodiversity, Valorization and Conservation of Urban and Forest Ecosystems:(In support of sustainable development) Univ. M. B. M'Sila,28.29- Avril.**2021**.

Ouahiba Gahfif, Bettache Azzeddine, Souagui Yasmina, Sadrati Nouari, Azzouz Zahra, Meribai Abdelmalek. Criblage des souches fongiques isolées du sol Algérien pour la production des enzymes hydrolytiques. 1 st International Seminar visions in the sustainable valorization of the biodiversity of uncertain areas Naama, Algerai,7 et 8 Avril **2021**.

Meribai Abdelmalek, **Gahfif Wahiba**, Madoui Yousra, Iadda Sarra. Les espèces *Xylella fastidiosa* et phytopathologie : Menace agroécologique mondiale et /ou régionale ? 1 st International Seminar visions in the sustainable valorization of the biodiversity of uncertain areas Naama, Algerai,7 et 8 Avril **2021**.

Gahfif Ouahiba, Bettache Azzeddine, Azzouz Zahra, Nouari Sadrati. Isolement et identification des champignons filamenteux producteurs d'enzymes cellulolytiques. 30 th International congress of the Tunisian Society of Biological Sciences (ATSB) Sousse, Tunisie, 25-28 mars **2019**.

Bettache Azzeddine, Azzouz Zahra, **Gahfif Ouahiba**, Benallaoua Said. Production de xylanases de *Trichoderma* sp. Par fermentation solide et optimisation statistique par RSM. 30 th

International congress of the Tunisian Society of Biological Sciences (ATSB) Sousse, Tunisia, 25-28 mars **2019**.

Communications nationale

Azzouz Zahra, Bettache Azzeddine, Bouiche celia, Maibeche Rima, Hama Samir, Amghar Zahir, Benhoula Mohammed, **Gahfif Ouahiba**, Boucherba Nawel, Benallaoua Said. Bioconversion of the lignocellulosic residues and biotechnological production of fungal xylanase in solid-state fermentation. Journées Scientifiques Nationales sur les Enzymes à Application Biotechnologiques en Algérie –JSNEABA- Ecole Nationale supérieure de Biotechnologie, Constantine, Algérie, 21,21 et 22 décembre **2020**.

Bettache Azzeddine, Azzouz Zahra, **Gahfif Ouahiba**, Amghar Zahir, Allaoua Narimane, Boucherba Nawel, Benallaoua Said. Production économiques d'enzymes lignocellulolytiques par fermentation solide des coproduits par RSM. 1^{ère} Conférence Nationale Virtuelle (Webinaire) Les Objectifs de Développement Durable après la Pandémie du COVID-19, Université de Boumerdes, 13 et 14 Mai **2020**.

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AE : Activité enzymatique
ANOVA : Analyse de la variance
APF : Activité papier filtre
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique
ARN : Acide ribonucléique
aw: Activity of water
BGLs : β -glucosidase
BBD: Box-Behnken Design
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
CMC : Carboxymethyl cellulose
CBHs : Cellobiohydrolase
CBM : Carbohydrate binding module
CMCase : Carboxymethylcellulase (endoglucanase)
DNS : 3,5- acide dinitrosalicylique.
dNTP : Désoxynucléotide triphosphate
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acetate
E.C : Enzyme Commission.
EG: Endoglucanases
FML : Fermentation en milieu liquide
FMS : Fermentation en milieu solide
GH: Glycoside hydrolase
gds : Gramme de substrat
ITS : Internal Transcribed Spacer
I₂: L'iode
kDa : Kilo daltons
KI : Iodure de potassium
LNS2: Lipin Ned1 Smp2
LSU: Large Subunit of the rRNA
nLSU: nuclear Large Subunit of the rRNA
MW: Mendel et Weber
NCBI : National Center for Biotechnology Information
OFAT: One Factor At Time.
pb: paire de bases
PCR : Polymerase chain reaction
PDA : Pomme de terre dextrose agar
PDB : Potato dextrose brothp value : probability value.
PGK : 3-phosphoglycerate kinase
PM: Poids moléculaire
pI : Point isoélectrique
PNPG :4-Nitrophenyl- β -D- glucopyranoside

RSM : Response surface methodology
SSF : Solid State Fermentation
Spr/g : Spores/gramme
TCA : Acide trichloracétique
TEF1- α : Translation Elongation Factor 1-alpha
TOP1: Topoisomerase I
TEF : Facteur d'élongation
Tween 80: Polyoxyethylene sorbitane monooléate.
U/gds: Unit per gram of dry substrate
UV-VIS : Ultraviolet visible
UI: Unité internationale

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de l'hydrolyse de cellulose amorphe et microcristalline par action de diverses enzymes cellulases. La couleur rouge représente la région cristalline et la couleur noire et la région amorphe.....	6
Figure 2. Structure cellulaire et moléculaire de la biomasse lignocellulosique	16
Figure 3. Structure moléculaire de la cellulose	16
Figure 4. Les régions cristallines et amorphes dans les microfibrilles de cellulose.....	17
Figure 5. Schéma structural de l'hémicellulose	18
Figure 6. Les trois monomères de la lignine. De gauche à droite : l'alcool coumarylique (type H), l'alcool coniférylique (type G) et l'alcool synapylique (type S).	19
Figure 7. La lignine et ses principaux groupements fonctionnels.....	19
Figure 8. Transformations potentielles des différentes fractions issues de la bioraffinerie des biomasses lignocellulosiques	20
Figure 9. Aspect microscopique de <i>Trichoderma</i>	27
Figure 10. Aspect microscopique (a) et représentation schématique (b) de la conidiophore du genre <i>Aspergillus</i>	29
Figure 11. Aspect microscopique de <i>Sarocladium kiliense</i>	31
Figure 12. Localisation géographique	41
Figure 13. Le pourcentage d'isolats fongiques par genre	57
Figure 14. Détection des activités enzymatiques à l'aide de boîtes de Petri contenant des milieux spécifiques. (A) Activité cellulolytique, (B) Activité amylolytique, (C) Activité protéolytique, (D) Activité xylanolytique, (E) Activité kératinolytique.	57
Figure 15. Pourcentage d'isolats fongiques en fonction des activités hydrolytiques.	59
Figure 16. Activités des enzymes extracellulaires des isolats fongiques. A (Activités CMCCase, papier filtre et exoglucanase), B (Activité xylanase), C (Activité protéase), D (Activité kératinase), E (Activité amylase).	62
Figure 17. Morphologie de l'isolat Mtr6. (A) : Colonie sur PDA, (B et C) : Aspect microscopique au microscope optique avec le bleu coton (Grossissement x100).	66
Figure 18. Arbre phylogénétique de l'isolat Mtr6 généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données des séquences ITS-TEF1. L'arbre est enraciné avec <i>Trichoderma estonicum</i> GJS 96-129 et <i>Trichoderma parestonicum</i> CBS 120636. Les valeurs maximales du bootstrap $ML \geq 50\%$ sont représentées au niveau des nœuds.	67

Figure 19. Morphologie de l'isolat BAS1. (A et B) : Colonie sur PDA, (C) : Aspect microscopique au microscope optique par le bleu coton (Grossissement x100).	68
Figure 20. Arbre phylogénétique de l'isolat BbV1 généré par une analyse de Maximum de Vraisemblance (ML) basée sur le modèle à 2 paramètres de Kimura utilisant MEGA7 pour l'alignement des données de séquences LSU.L'arbre est enraciné avec <i>Parasarocladium breve</i> CBS 150.6 et <i>Parasarocladium debruyinii</i> CBS 144942. Les valeurs de bootstrap de vraisemblance maximale MLBS \geq 70 % sont données aux nœuds.....	69
Figure 21. Morphologie de l'isolat BAS1. (A) : Colonie sur PDA, (B et C) : Aspect microscopique au microscope optique par le bleu coton et lugol respectivement (Grossissement x100).....	70
Figure 22. Arbre phylogénétique de l'isolat BAS1 généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données de la séquence ITS. L'arbre est enraciné avec <i>Aspergillus flavus</i> CBS 100927.Les valeurs maximales du bootstrap ML \geq 50% sont représentées au niveau des nœuds.....	71
Figure 23 . Résultats de l'analyse de l'OFAT sur la production d'endoglucanase par les souches : <i>Trichoderma afroharzianum</i> . Mtr6, <i>Aspergillus sp.</i> BAS1, <i>Sarocladium kiliense</i> . BbV1. (A) Effet du temps d'incubation ; (B) Effet de la température ; (C) Effet de l'humidité ; (D) Effet de la charge de l'inoculum.....	79
Figure 24. Corrélation entre les valeurs observées et prévues de l'activité des endonucléases par le modèle de surface de réponse.....	84
Figure 25 . Surface de réponse de l'interaction du paramètre sur l'activité de l'endoglucanase (U/g ds) : (a) température /humidité ; (b) température / temps d'incubation ; (c) température / taille de l'inoculum ; (d) humidité / temps d'incubation ; (e) humidité / taille de l'inoculum ; (f) temps d'incubation /taille de l'inoculum.....	86
Figure 26 . Représentation du profil de prédiction et de désirabilité maximale.	87
Figure 27. Effet de la température (A) et du pH (B) sur l'activité de l'endoglucanase.....	89
Figure 28.Thremostabilité de l'endoglucanase des trois souches <i>Trichoderma afroharzianum</i> . Mtr6, <i>Aspergillus foetidus</i> . BAS1, <i>Sarocladium kiliense</i> . BbV1	94
Figure 29. Spécificité des celulases du surnageant semi purifié vis-à-vis de différents substrats.	95

Liste des tableaux

Tableau I : Valorisation de la biomasse lignocellulosique dans la production d'enzymes.....	22
Tableau II : Propriétés principales des champignons.....	24
Tableau III : Les principaux champignons filamenteux utilisés dans la production de cellulases	26
Tableau IV: Principaux domaines d'applications de la fermentation en milieu solide	35
Tableau V: Comparaison entre FMS et FML.....	36
Tableau VI : Composition biochimique de son de blé.....	37
Tableau VII : Composition biochimique de la paille de blé	37
Tableau VIII : Classification des techniques de séparation membranaire.	39
Tableau IX : Les valeurs codées et naturelles des facteurs à différents niveaux de BBD	52
Tableau X: Principaux caractères macroscopiques et microscopiques des isolats.	55
Tableau XI : Activité enzymatique d'isolats fongiques sur des milieux solides	58
Tableau XII : Plan d'expérience et résultats de RSM pour la production d'endoglucanase à partir de la souche <i>Sarocladium kiliense</i> (BbV1) en utilisant la paille de blé comme substrat de fermentation	82
Tableau XIII: ANOVA pour le modèle quadratique de surface de réponse	83
Tableau XIV: Comparaison du pH et des températures optimaux de la CMCase de diverses espèces fongiques.....	90
Tableau XV : Effet des ions métalliques et de réactif chimique EDTA sur l'activité enzymatique	91

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	4
I.1. Enzymes potentiellement importantes en industrie	4
I.1.1. Les hydrolases	4
I.1.1.5. Les amylases	13
I.2. Biomasses lignocellulosiques et coproduits de l'agro-industrie.....	15
I.2.1. Les sources de la biomasse lignocellulosique	15
I.2.2. Structure et composition de la biomasse lignocellulosique	15
I.2.3. Valorisation de la biomasse.....	20
I.2.4. Le procédé de conversion par voie biochimique de la biomasse lignocellulosique en bioproduits	21
I.3. Les enzymes lignocellulolytiques.....	22
I.3.1. Les Champignons source d'enzymes lignocellulolytiques	23
I.4. Fermentation sur milieu solide (FMS).....	31
I.4.1. Définition	31
I.4.2. Avantages de la fermentation à l'état solide	31
I.4.3. Inconvénients des fermentations solides	32
I.4.4. Les diverses étapes suivies en fermentations solides	32
I.5. Méthodes d'optimisation de la production d'endoglucanase	38
I.5.1. La méthode expérimentale classique (<i>one-factor -at-a-time</i>)	38
I.5.2. La méthode statistique des 'Plans d'expérience'	38

I.6.	Purification d'une enzyme.....	39
I.6.1.	L'ultrafiltration.....	39
Chapitre II.	Matériel et méthodes	41
II.1.	Zones de prélèvement et échantillonnage.....	41
II.1.1.	Isolement des champignons telluriques productrices d'enzymes hydrolytiques	41
II.1.2.	Purification des souches isolées	42
II.1.3.	Conservation des souches.....	42
II.2.	Criblage des isolats pour la production d'enzymes hydrolytiques	42
II.2.1.	Mise en évidence des activités enzymatiques (criblage qualitatif)	43
II.2.2.	Recherche des carbohydrases.....	43
II.2.3.	Recherche des protéases	43
II.3.	Production des enzymes hydrolytiques par fermentation sur milieu liquide (criblage quantitatif)	44
II.3.1.	Détermination des activités enzymatiques	44
II.3.2.	Utilisation des souches les plus performantes pour la production des cellulases ...	46
II.3.3.	Identification des souches fongiques sélectionnées	46
II.3.4.	Mise en œuvre de la FMS et obtention des extraits enzymatiques bruts	48
II.3.5.	Optimisation de la production d'endoglucanases.....	50
II.3.6.	Optimisation de la production d'endoglucanases par méthode des surfaces de réponse (RSM) pour la souche BbV1	51
II.4.	Caractérisation de l'endoglucanase (CMCase) partiellement purifiée	52
II.4.1.	Préparation de l'extrait enzymatique	52
II.4.2.	Purification partielle d'endoglucanase par ultrafiltration.....	52
II.4.3.	Analyses statistiques	53
Chapitre III.	Résultats et discussion	54
III.1.	Isolement et identification des champignons telluriques.....	54
III.1.1.	Etude macroscopique et microscopique des isolats	54
III.2.	Production des enzymes hydrolytiques extracellulaires	57

III.2.1. Criblage qualitatif des isolats	57
III.2.2. Production des enzymes hydrolytiques sur milieu liquide (Fermentation submergée)..	61
III.3. L'enzyme choisie parmi les cinq enzymes hydrolytiques testées.....	65
III.3.1. Identification des isolats présentant de meilleures activités hydrolytiques.....	65
III.3.2. Identification moléculaire des champignons par un ensemble commun de marqueurs.....	75
III.4. Effet des paramètres de fermentation solide sur la production d'endoglucanase en utilisant l'approche OFAT	75
III.4.1. Effet de temps d'incubation sur la production d'enzymes	76
III.4.2. Effet de la température sur la production d'enzymes.....	76
III.4.3. Effet de l'humidité sur la production d'enzymes	77
III.4.4. Effet de la charge de l'inoculum sur la production d'enzymes.....	78
III.5. Détermination des optima des facteurs sélectionnés par l'utilisation de la méthodologie des surfaces de réponses (RSM) pour <i>Sarocladium kiliense</i> (BbV1)	81
III.5.1. Effet d'interaction	85
III.5.2. Validation des conditions optimisées	87
III.6. Caractérisation de la CMC _{Case} partiellement purifiée	89
III.6.1. Température et pH optimum	89
III.6.2. Effet des ions métalliques et de réactif chimique EDTA	91
III.6.3. Thermostabilité en présence du substrat	93
III.6.4. Spécificité vis-à-vis du substrat.....	94
Conclusion et perspectives	96
Références	99

Annexes

INTRODUCTION

Au cours de la dernière décennie, le prix du marché du pétrole brut a chuté de manière drastique ce qui a gravement affecté l'économie algérienne qui est très dépendante du marché des combustibles fossiles où 93,6% de ses exportations sont principalement constituées de pétrole et de gaz naturel (**Bouraiou et al., 2020**). La croissance de la population mondiale et les activités économiques conduisent à une augmentation de la demande en énergie dans les prochaines décennies. Le réchauffement de la planète et la pollution de l'environnement sont exclusivement le résultat de l'utilisation des ressources énergétiques conventionnelles, comme le pétrole, le gaz naturel et le charbon, qui sont les sources principales d'émissions de gaz à effet de serre (**Akbi et al., 2017 ; Bouraiou et al., 2020**). D'autre part l'accumulation des déchets solides municipaux devient un problème grave dans tous les pays en développement (**Al-Khatib et al., 2015**), et l'inadéquation de traitement de ces déchets provoque une grave menace pour l'environnement (**He, 2012**). Sur cette base, la transition vers l'exploitation des énergies renouvelables est devenue un objectif indispensable pour le gouvernement Algérien. En raison de cette problématique, l'Algérie doit envisager de passer à l'économie verte qui est la solution pour répondre aux besoins énergétiques futurs et réduire en même temps les risques liés à l'environnement (**Bouraiou et al., 2020**). Il existe d'énormes possibilités à explorer et de nouveaux systèmes à découvrir pour convertir les bioressources les plus abondantes en produits verts à valeur ajoutée utiles pour divers aspects et industries (**Thapa et al., 2020**).

Cependant les champignons en général sont des microorganismes bien caractérisés en raison de leur capacité à produire une large gamme d'enzymes pour digérer des matériaux complexes dans l'environnement en produits de dégradation solubilisés qui peuvent être absorbés par les hyphes et utilisés comme nutriments pour survivre (**Webster et Weber, 2007**). Les champignons filamenteux particulièrement jouent un rôle important dans la production de toute une gamme d'enzymes hydrolytiques extracellulaires utiles pour de vastes applications industrielles (**Shruthi et al, 2020**). En outre la panoplie enzymatique de ces champignons est extrêmement riche et leur permet d'utiliser les substrats les plus complexes plus efficacement que les bactéries ; tel que la cellulose, la lignine, la kératine, les acides humiques etc... (**Davet et Rouxel, 1997**) pour produire un grand nombre d'enzymes tel que cellulases, xylanases, chitinases, amylases, protéases, et autres (**Braaksma et al., 2010**). Parmi ces enzymes d'intérêt industriel, il existe des cellulases qui ont fait l'objet de recherches intensives en tant que stratégie compétitive pour la déconstruction rentable de matériaux cellulosiques largement disponibles. L'amélioration du traitement de la cellulose est un objectif important, qui implique l'exploitation

de biocatalyseurs nouveaux ou améliorés, avec des modes opératoires adaptés et une méthodologie de biotraitement optimisée (**Bala et Singh 2019 ; Bugg et al. 2020**).

Le marché mondial de l'enzyme cellulase est d'environ 1500 millions de dollars US en 2019, qui devrait atteindre 2320 millions de dollars US en 2024 (**Thapa et al., 2020**). Il s'agit du troisième plus grand produit enzymatique industriel au monde, en volume de dollars (**Singhania et al., 2010**), et représente environ 20% du marché total des enzymes dans le monde mais deviendra certainement l'enzyme industrielle la plus importante en volume lors de son utilisation pour la conversion de la biomasse en biocarburants (**Wilson,2009**). La forte demande de cellulase contribue à ses principales applications dans les industries alimentaire, du carburant, du textile, de la pâte à papier et du papier (**Singhania et al., 2010 ; Bhat 2000 ; Bano et al. 2019**). En outre, la cellulase est un complexe multi enzyme à trois composants : Exoglucanase, endoglucanase (CMCase) et b-glucosidase (BGL) qui agissent en synergie lors de l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique (**Saini et al. 2015 ; Bajaj et Mahajan 2019**). Le sol est un puits majeur de cellulose, où il se présente sous la forme de biomasse végétale morte en surface et sous terre (**Lo'pez-Monde'jar et al. 2016 ; Sethi et al. 2013**). De plus, la diversité et les fonctions des microbes cellulolytiques sont plus ou moins régies par la structure et la composition du sol. Par exemple, il a été constaté que le sol forestier contient un plus grand nombre de microbes cellulolytiques que le sol agricole, aride, de jardin et le compost (**Houfani et al. 2019**). Les cellulases commerciales destinées à la bioconversion dans des applications industrielles sont produites à partir de champignons filamenteux tels que *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, etc. La production de cellulases par différents organismes en fermentation submergée (FML) a fait l'objet d'une plus grande attention mais a été jugée prohibitive en raison du coût élevé du génie des procédés (**Chandra et al., 2007**). Récemment, plusieurs études ont été menées sur la production de cellulases par fermentation en milieu solide (FMS) d'une manière rentable (**Gupta et al., 2015 ; Kuila et al., 2015 ; Mangalanayaki et Madhavan 2015**). Il a été confirmé que les champignons filamenteux sont de meilleurs producteurs de cellulase sous FMS que la fermentation submergée (**Shrestha et al., 2010**). En outre il existe une relation directe entre le substrat, les conditions de fermentation et la production de cellulase (**Yoon et al., 2014**), le contrôle du pH et de la température est essentiel pour la production et la libération des cellulases (**Dong et Tae, 1994**). Également, la caractérisation des enzymes d'intérêt industriel est l'une des étapes essentielles de leur exploitation dans divers domaines appliqués tels que la bio-industrie, l'agroalimentaire, etc.... (**Saidane et al.,2001**).

Afin de permettre une optimisation des processus ainsi qu'une réduction des coûts énergétiques et une amélioration de la sécurité alimentaire et de la qualité des aliments (**Minussi et al., 2002**), l'utilisation d'enzymes est très recommandée. La méthodologie des surfaces de réponse (RSM) s'est avérée puissante et utile pour l'optimisation de la production des métabolites cibles (**Deepak et al., 2008**). Il peut être utilisé pour évaluer l'importance de plusieurs facteurs, en particulier lorsque des interactions existent entre les facteurs et sont complexes à déterminer (**Converse et al., 1988**), a réduit le nombre d'expériences à réaliser (**Levin et al., 2008**), aussi, l'ensemble du processus peut être achevé dans un délai raisonnable. C'est une méthode avantageuse et favorable par rapport aux méthodes classiques d'optimisation (OFAT).

Ce travail s'inscrit dans la mouvance récente d'exploitation des déchets lignocellulosiques pour produire des enzymes hydrolytiques avec un prix de revient compétitif, les objectifs visés de cette étude relate :

- L'isolement, l'identification et le criblage des champignons producteurs d'enzymes hydrolytiques (cellulase, xylanase, amylase protéase et kératinase),
- Effet des paramètres de fermentation solide sur la production d'endoglucanase (CMCase) en utilisant la méthode d'une variable à la fois, également connue sous le nom de OFAT,
- Détermination des optima des facteurs sélectionnés par l'utilisation de la méthodologie des surfaces de réponses (RSM),
- Caractérisation d'une endoglucanase partiellement purifiée.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Chapitre I. Synthèse bibliographique

I.1. Enzymes potentiellement importantes en industrie

Les enzymes sont de plus en plus utilisées dans le monde industriel vu leurs nombreuses propriétés intéressantes. Dans plusieurs procédés industriels, les réactions d'hydrolyse et d'oxydation sont accomplies par des produits chimiques peu spécifiques qui occasionnent des pertes de rendement importantes et génèrent des sous-produits souvent difficiles et coûteux à éliminer. Spécifiques dans leur activité et exigeant moins d'énergie de réaction, les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés. Les enzymes présentent de nombreux avantages au niveau environnemental : biodégradabilité, action spécifique, faible toxicité et formation de sous-produits compatibles avec l'environnement (**Barnabé, 2003**).

Au cours des dernières années, la demande d'enzymes industriellement telles que les cellulases, les xylanases, les ligninases, les pectinases et les protéases a augmenté en raison de leurs applications étendues dans diverses industries. Ces enzymes sont produites à partir de différents microorganismes par la fermentation à l'état solide ou la fermentation submergée de la biomasse lignocellulosique de manière rentable (**Shahzadi et al., 2014**).

I.1.1. Les hydrolases

Les hydrolases sont des enzymes de dégradation qui provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes, elles sont activables par des cations. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, liaisons O-O des peroxydes, C-N des amides. Généralement les hydrolases, sont produites par les champignons. Il s'agit d'enzymes endocellulaires (catalase, lactase et invertase) ou exocellulaires (amylases, cellulases, pectinases et protéases) (**Bornscheuer, 2002**).

I.1.1.1. Les cellulases

Les cellulases sont un groupe d'enzymes responsables de la dégradation de la cellulose dans la nature. Les cellulases sont produites principalement par des microorganismes (bactéries, champignons et actinobactéries) au cours de leur croissance sur la matière cellulosique (**Lynd, 2002**), mais aussi par des organismes représentant le règne animal, y compris des insectes, des mollusques, des nématodes et des protozoaires (**Watanabe et Tokuda,**

2001). Les cellulases sont des hydrolases qui catalysent le clivage de liaisons β -1,4-glycosidiques de la cellulose avec addition concomitante de l'eau au point de clivage. Même si un seul type de liaison chimique est présent dans la cellulose, des enzymes avec différents modes d'action sont nécessaires pour une dégradation complète du polymère récalcitrant et insoluble. Dans la nature, un organisme peut produire les enzymes nécessaires à la dégradation complète de la cellulose, bien que l'action synergique de nombreux organismes ait également été suggérée (Wilson, 2011 ; Pirzadah et al., 2014 ; Jasani et al., 2016). Les systèmes d'enzymes libres les plus étudiés sont ceux des champignons aérobies et mésophiles : *Trichoderma reesei* (Schuster et Schmoll, 2010), *Humicola insolens* (Schülein, 1997) et *Phanerochaete chrysosporium* (Broda et al., 1994). Les souches industrielles de *T. reesei* sont des producteurs d'enzymes hautement efficaces, ce qui est la principale raison pour laquelle les cellulases de ce champignon dominant encore aujourd'hui les marchés de la cellulase (Martinez et al., 2008).

I.1.1.1.1. Mode d'action des cellulases et nomenclature

Les cellulases sont maintenant classées selon leur structure, comme toutes les enzymes agissant sur les sucres. Il existe trois types d'activités enzymatiques cellulolytiques complémentaires pour l'hydrolyse totale de la cellulose (Scriban, 1993).

- L'endo-cellulase (EGs) (EC 3.2.1.4) rompt les liaisons internes de la chaîne cellulosique, d'une façon aléatoire et entraîne la libération de cellodextrines, de la cellobiose et du glucose. Elle est très active sur les celluloses solubles. L'attaque «au hasard » de l'endocellulase a pour effet de créer de nouvelles extrémités non réductrices qui sont des sites réactifs pour la cellobiohydrolase (Hasper et al., 2002).
- L'exoglucanase ou cellobiohydrolase (CBHs) (EC 3.2.1.91), attaque les polymères de cellulose par les extrémités non réductrices et libère des résidus cellobiose. L'enzyme seule n'est active, ni sur la cellulose cristalline, ni sur les celluloses solubles (carboxyméthylcellulose). Par contre, elle attaque les celluloses partiellement dégradées. Le rôle essentiel de cette enzyme est de permettre l'action de l'endocellulase sur la cellulose cristalline (Scriban, 1993). La complémentarité des deux types d'enzymes explique en partie l'effet synergique du mélange. (Scriban, 1993 ; Josefsson, 2006).
- La cellobiase (BGLs) (EC 3.2.1.21) hydrolyse les liaisons β (1-4) glycosidiques de la cellobiose, pour donner deux molécules de glucose (Onsori et al., 2005).

Les cellulases sont classées dans le sous-groupe 4 du groupe 3 (hydrolases) :

Nom codifié de la Cellulase Ec : 3.2.1.4

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

Nom recommandé : cellulase

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

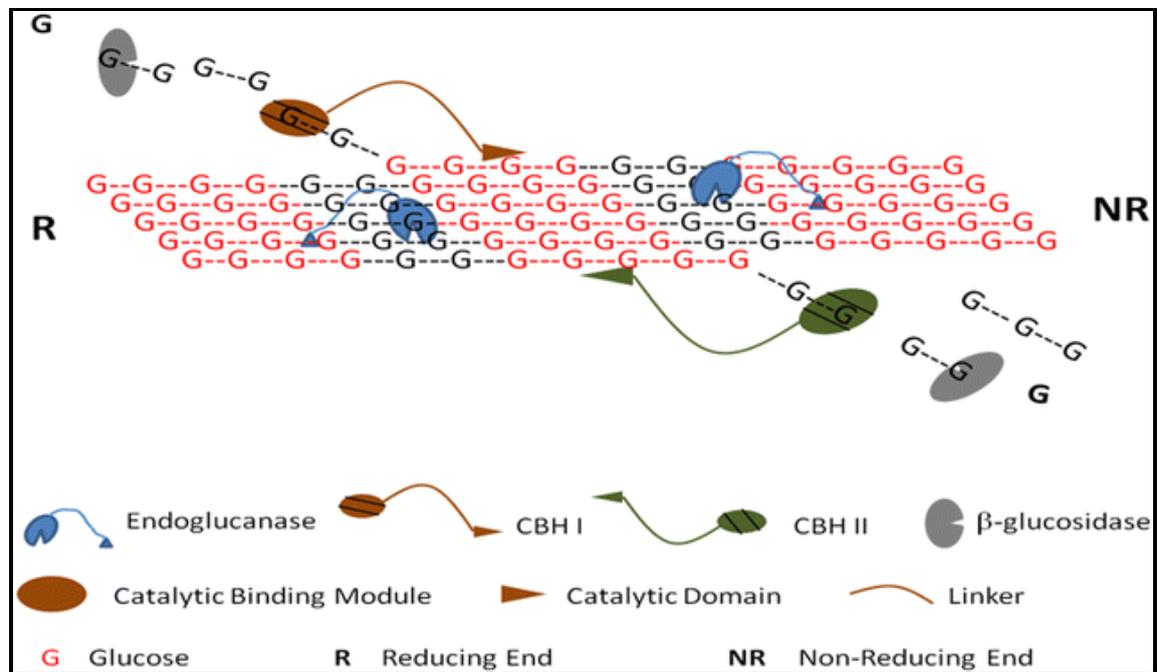


Figure 1. Représentation schématique de l'hydrolyse de cellulose amorphe et microcristalline par action de diverses enzymes cellulases. La couleur rouge représente la région cristalline et la couleur noire et la région amorphe. (Kumar et Muthy, 2013).

I.1.1.1.2. Synergie des cellulases

Pour réaliser une hydrolyse totale de la cellulose, le complexe enzymatique de la cellulase travaille en synergie, c'est-à-dire que l'activité des enzymes lors d'une mise en œuvre en commun est supérieure à la somme de leurs activités individuelles (Lynd et al., 2002), expliquée par une coopération d'action entre les trois composantes d'enzymes, dans laquelle le produit d'une réaction enzymatique devient le substrat pour une autre (Fang, 2008). Quatre formes de synergie ont été décrites :

- Une synergie endo-exo entre endoglucanases et exoglucanases (Lemos et al., 2003) ;
- Une synergie exo-exo entre exoglucanases agissant aux extrémités réductrices des chaînes de cellulose et celles agissant aux extrémités non-réductrices ;
- Une synergie entre les exoglucanases et les β - glucosidases qui hydrolysent le cellobiose, produit final inhibiteur des cellobiohydrolases (Lynd et al., 2002) ;
- Une synergie intramoléculaire entre domaines catalytiques et CBM (Mosier et al., 1999 ; Jossefson, 2006).

I.1.1.1.3. Caractéristiques des cellulases

- **Réaction et spécificité** : Elle est représentée par l'endohydrolyse des liaisons 1,4- β -D-glucosidiques de la cellulose et des lignines mais aussi l'hydrolyse des liaisons 1,4 et 1,3 en β -D-glucanes (Schamburg et Salzmann, 1991).
- **Substrats naturels** : La cellulase peut avoir différents substrats naturels tels que : la cellulose, dont la dégradation complète nécessite une action complémentaire des enzymes cellulolytiques ; il en est de même pour d'autres substrats cellulosiques tels que les Xyloglucanes ainsi que le coton (Lynd et al., 2002).
- **Activité enzymatique** : L'activité cellulase est exprimée en unités internationales. Elle correspond à la quantité d'enzymes dégradant la carboxyméthylcellulose en carbohydrates réduits (1 micromole de glucose par minute). Elle varie de 60U à 1168 U et plus pour les enzymes immobilisées (Withers, 2001 et Teeri, 1997).
- **Poids moléculaire** : Les cellulases ont des poids moléculaires très variables qui dépendent principalement de leurs origines. Certaines endoglucanases ont des poids moléculaires de 30 à 90 KDa, alors que d'autres sont de dimensions beaucoup plus faibles de l'ordre de 13 KDa (Odier et Rouau, 1985 ; Dan et al., 2000). Les exoglucanases ont des poids moléculaires de 30 à 50 KDa (Singh et al., 1990) alors que les β -glucosidases ont des masses moléculaires plus élevées variant de 90 à 240 KDa (Sanyal et al., 1988).
- **pH optimum** : La plupart des préparations cellulolytiques étudiées ont un pH optimum variant de 3 à 7 (Lynd et al., 2002). Celles d'origine fongique ont une gamme plus limitée (pH de 4 à 5) contrairement aux cellulases bactériennes dont le pH optimum est proche de la neutralité (Buchholz et al., 1983).
- **Température optimale** : La température optimale des cellulases fongiques varie entre 40 et 70 °C alors que celle des bactéries varie entre 50 et 100°C, ce qui explique leur utilisation en industrie du textile (Ando et al. 2002).

I.1.1.1.4. Applications industrielles de la cellulase

- **Industries alimentaires** : Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993). Des traitements de différents produits pour améliorer leurs qualités, où les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes.
- **Industrie des textiles et des détergents** : Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par

élimination des tâches (**Gusakov et al., 2007**). Elles sont utilisées aussi dans les lessives afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (**Maurer, 1997 ; Cavako-Paulo, 1998**).

- **Papeterie** : Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (**Scriban, 1993**). Elles contribuent également à l'amélioration de la qualité du papier (**Odier et Rouau, 1985**).
- **Nutrition animale** : L'addition des cellulases, aux aliments pour volailles ou porcins, améliore leur digestibilité, ce qui réduit l'excrétion de cellulose non digérée (et donc diminue la charge polluante des excréta) (**Scriban, 1993 ; Gusakov et al., 2000**) et améliore la valeur nutritive de l'aliment (**Kolarova et Farkas, 1981 ; Odier et Rouau, 1985**).
- **Domaine thérapeutique** : L'utilisation quasi confidentielle de certaines cellulases dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive (**Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1993**).
- **Industrie du bioéthanol** : Le bioéthanol et l'éthanol élaboré à partir de la biomasse végétal, le rendement énergétique et voisin de celui de l'essence, il est obtenu à partir de substrats fermentescible (canne à sucre betterave sucrière, maïs, orge, blé, pomme de terre ...), ce biocarburant est appelé carburant de première génération, le carburant de deuxième génération est obtenu à partir de la cellulose (résidus agricole: la paille ou les cannes de maïs, résidus forestiers) (**Pimentel et Patzek, 2005**).

1.1.1.2. Les xylanases

Les xylanases sont des groupes d'enzymes qui provoquent l'hydrolyse de l'hémicellulose (**Oydeji et al., 2018**), comprenant de l'endo-1,4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) et de la β -xylosidase (EC 3.2.1.37). Elles hydrolysent le xylane (présent dans les hémicelluloses des plantes) en sucres monomères (**Collins et al., 2005**). Parmi celles-ci, l'endoxylanase (EC 3.2.1.8), souvent désignée sous le nom de xylanase, qui catalyse l'hydrolyse des liaisons β -1,4 dans le xylane, est particulièrement importante, car elle rompt le squelette principal du xylane afin de l'hydrolyser. Le rôle des enzymes d'assistance tels que l' α -L-arabinofuranosidase, l' α -glucuronidase et l'acétylxylanestérase intervient en fonction de la nature de la chaîne latérale à laquelle le xylane est associé. Ces chaînes latérales aident à la décomposition complète du xylane jusqu'à son monomère, le xylose (**Thomas et al., 2016**).

1.1.1.2.1. Mode d'action des xylanases et nomenclature

L'hydrolyse complète des xylanes requiert l'action combinée d'endo- et d'exoenzymes qui, non seulement hydrolysent les liaisons au sein de la chaîne principale, mais également

libèrent les constituants des chaînes latérales. Non seulement les enzymes qui attaquent les liaisons intérieures de type β -1,4-xylosidique appelées endo β 1,4-xylanases (EC 3.2.1.8) sont nécessaires, mais également les exo- 1,4- β -xylosidases (EC 3.2.1.37) hydrolysant les petits oligomères libérés par les endoxylanases, en xylose. Les enzymes accessoires ou enzymes de débranchement éliminant les chaînes latérales sont aussi nécessaires. Ce sont les α -L-arabinofuranosidases ou xylanes-1,4 β -xylonidases (EC 3.2.1.55), les α -glucuronidases, les acétyl estérases, acétyl-xylan estérases et coumarique et férulique estérases.

Les xylanases ont été signalées pour la première fois en 1955 et ont été initialement appelées pentosanases. Elles ont été reconnues par l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire en 1961 et ont reçu le code enzymatique EC3.2.1.8. Elles ont été désignées par divers noms. Les termes synonymes couramment utilisés comprennent la xylanase, l'endoxylanase, l'endo-1,4- β -D-xylanase, la β -1,4-xylanase et la β -xylanase, mais le nom officiel est l'endo-1,4- β -xylanase. Basé sur les similitudes des séquences d'acides aminés et l'analyse des groupes hydrophobes (**Kuno et al., 2000**), elles appartiennent essentiellement au groupe d'enzymes hydrolases, précisément aux glycosides hydrolases. La classification par glycoside hydrolase ou par famille de glycoside hydrolase a placé la xylanase dans deux familles GH10 et GH11 (**Chakdar et al., 2016**). La famille 10 (> 30 kDas avec de faibles valeurs de pI) et la famille 11 (<30 kDas et des valeurs du point isoélectrique pI élevées), bien que d'autres familles, y compris les familles 5, 7, 8 et 43, contiennent également certaines enzymes xylanolytiques (**Thomas et al., 2016**).

I.1.1.2.2. Propriétés des xylanases des moisissures

Selon **Bakri (2003)**, la température optimale des endoxylanases varie entre 40 et 60 °C. **Kulkarni et al. (1999)** observent que les xylanases de bactéries sont plus thermostables que les xylanases de moisissures. En général, les xylanases de différents microorganismes sont souvent stables sur une gamme de pH 3-10 et montrent un optimum de pH dans la gamme 4-7. Les points isoélectriques varient entre 3 et 10. Elles constituent une unité protéique de poids moléculaire variable entre 8-145 KDa. La composition en acides aminés est dominée par les acides aspartique, glutamique, glycine, sérine et thréonine (**Bakri, 2003**).

I.1.1.2.3. Les sources de xylanases

Les xylanases microbiennes sont largement préférées dans les applications industrielles non seulement parce qu'elles sont principalement produites par les champignons et les bactéries, mais aussi en raison des divers autres avantages tels que la production contrôlée dans des systèmes fermés, la multiplication rapide, la facilité de

manipulation, le faible coût de production, l'utilisation de sources de carbone bon marché, l'exigence minimale d'espace, la haute capacité de biodégradation, etc. L'amélioration des applications et des caractères pour la production à grande échelle est mise à jour régulièrement. Les xylanases dérivées de micro-organismes ont de nombreuses applications potentielles (**Xu et al., 2005**).

Le xylène n'est pas aléatoirement hydrolysé mais les liaisons sélectionnées pour l'hydrolyse dépendent de la nature du substrat tel que la longueur de la chaîne, le degré de ramification et la présence de substituant (**Liab et al., 2000**).

I.1.1.2.4. Applications industrielles des xylanases

La xylanase a de multiples applications biotechnologiques pour diverses industries, mais la majeure application de ces enzymes, est confinée dans les pâtes et papiers, les combustibles, l'alimentation et dans les industries boulangères et à une moindre étendue dans les produits chimiques, la brasserie et le vin, les aliments pour animaux, les textiles et le blanchiment (**Kapilan et Arasaratnam, 2017**). D'autres applications existent, dans l'extraction du café et dans la préparation des cafés solubles, dans les détergents, dans la production de polysaccharides actifs pharmacologiquement (pour une utilisation comme agents antimicrobiens ou comme antioxydants), dans la production des alkyl glycosides (pour une utilisation comme surfactants), etc. (**Collins et al., 2005**). Les xylanases sont aussi utilisées en combinaison avec d'autres enzymes, et en particulier avec d'autres hydrolases, mais aussi avec des protéases, oxydases, isomérases et pectinases.

I.1.1.3. Les protéases

Les protéases sont parmi les enzymes hydrolytiques qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique, en scindant la liaison qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique elles sont produites extracellulairement comme intracellulairement (**Kumar et al., 2008**) Les enzymes protéolytiques sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (**Gupta et al., 2002; Sandhya et al., 2005**).

D'après "*The Enzyme Commission of Classification*", les protéases appartiennent au groupe 3 (les hydrolases) et sous-groupe 4 (qui hydrolysent les liaisons peptidiques) (**Rao et al., 1998 ; Sumantha et al., 2006 ; Wilkesman et Kurz, 2009**).

Les protéases ou peptidases (EC.3.4) peuvent être classées selon la nature chimique du site actif, le type de réaction catalysée et la structure et l'homologie moléculaire (**Polaina et maccabe, 2007**). Leur classification se base sur plusieurs critères tels que la longueur de la chaîne

polypeptidique, le mode d'attaque de la chaîne, le pH d'activité et la nature de résidu impliqué dans le site actif (**Colwell et Grigorova, 1989 ; Rao et al., 1998**).

I.1.1.3.1. Mode d'action

Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques des protéines. En fonction de leur mode d'attaque, elles sont réparties en deux groupes: Les exopeptidases qui réalisent une hydrolyse à partir des extrémités N-terminale, ou C- un dipeptide ou un tripeptide. Les endopéptidases qui hydrolysent une liaison peptidique interne en libérant des peptides plus petits (Scriban, 1999 ; Rao et al, 1998).

I.1.1.3.2. Propriétés des protéases

Les protéases constituent un groupe très large et complexe contenant des enzymes qui diffèrent dans leurs propriétés tels que : le site actif, le mécanisme catalytique, les optima du pH et de température, le profil de la stabilité et la spécificité du substrat (**Sumantha et al., 2006 ; Vishwanatha et al., 2009**). La spécificité d'action des enzymes protéolytiques est régie par la nature de l'acide aminé et d'autres groupes fonctionnels (aromatiques, aliphatiques ou la présence de sulfure) autour de la liaison à hydrolyser (**Sumantha et al., 2006 ; Wladyka et Katarzyana, 2008**). Les champignons produisent un spectre plus large d'hydrolases que les bactéries. Ainsi, *Aspergillus oryzae* produit des protéases acides, neutres et alcalines. En fait, les protéases fongiques sont actives dans une large gamme de pH (entre 4 et 11) et montrent une large spécificité vis-à-vis des substrats (**Rao et al., 1998 ; Mathieu, 2005**).

I.1.1.3.3. Sources de protéases

Les protéases microbiennes sont plus intéressantes que celles provenant des sources végétales ou animales. Les champignons produisent un spectre plus large d'hydrolases que les bactéries. (**Gupta et al., 2002**). Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc. Cependant, elles ont un rendement réactionnel et une thermo tolérance plus faible que les protéases bactériennes (**Rao et al., 1998 ; Mathieu, 2005**).

I.1.1.3.4. Applications industrielles des protéases

Les protéases représentent la seule classe des enzymes qui occupe une place essentielle dans les différentes applications industrielle, biotechnologique, médicinale et dans les domaines de recherche (**Coral et al., 2003 ; Sandhya et al., 2005**). Elles représentent 65% du total des ventes des enzymes (**Ibrahim et al., 2015**), elles sont utilisées essentiellement dans les détergents (**Gupta et al., 2002**), la transformation de la viande (**Rao et al., 1998**), la fabrication du fromage

(Gupta, et Khare,2007), l'industrie alimentaire (Sullivan et Calkins, 2010), la fabrication du pain (Elms et al., 2006), le traitement et le dégomme de la soie dans les industries textiles (Ravel et Banerjee, 2003), les industries du tannage (Khan ,2013). C'est pourquoi des recherches ont été menées sur la production de protéases pour répondre aux besoins de l'industrie (Ahmad et al.,2020).

I.1.1.4. Les kératinases

Les kératinases (EC 3.4.21/24/99,11) nommées aussi enzymes kératinolytiques représentent l'un des plus importants groupes d'enzymes protéolytiques, généralement des serines protéases ou des métalloprotéases qui hydrolysent les kératines (Pandey et al., 2017). Il s'agit d'une enzyme extracellulaire produite dans un milieu contenant des substrats kératiniques tels que les cheveux et les plumes (Selvam et Vishnupriya, 2012), qui sont des protéines fibreuses insolubles avec une très grande stabilité et un taux de dégradation faible (Sinoy et al., 2011). Les kératinases sont largement produites sur milieu contenant un substrat kératinique comme seule source de carbone et d'azote (Szabo et al., 2000).

I.1.1.4.1. Mode d'action

Les kératinases attaquent principalement les ponts disulfures du substrat non soluble par clivage de ces derniers ce qui permet l'attaque des protéases extracellulaires et donne en définitive une accumulation de sulfocysteine, l'excès de soufre est oxydé en sulfite et en sulfate ou en thiosulfate qui se concentre dans le milieu réactionnel (Suh et al., 2001 ; Anbu et al., 2007 ; Pillai et al., 2008 ; Sahoo et al., 2012). Ces enzymes sont très prometteuses du point de vue biotechnologique, puisqu'elles pouvaient être appliquées pour traiter les déchets contenant de la kératine provenant des industries de la plume et de la volaille et pour améliorer la valeur nutritive des farines de plumes (Selvam et Vishnupriya, 2012).

I.1.1.4.2. Propriété des kératinases

Les kératinases sont des métallo enzymes qui appartiennent à la famille des protéases à sérine où les groupements –SH sont impliqués dans le maintien de l'activité enzymatique. Elles ont un poids moléculaire allant de 18 à 315 Kda (Cai et al., 2008).

La température optimale d'activité des kératinases s'étend de 30 à 80°C, de plus les kératinases de *Chyso sporium keratinophilum* et *Fervidobacterium islandicum* A W-1 présentent respectivement des températures optimales exceptionnelles de 90 et 100°C (Nam et al., 2002). Il est indiqué aussi que la stabilité thermique de ces enzymes augmente en présence de calcium (Feder et al., 1971 ; Riffel et al., 2003 ; Gessesse et al., 2003). Les kératinases sécrétées par les Actinobactéries présentent un maximum d'activité à un large éventail de pH compris entre 7 à 12

et résistent à des températures très élevées allant de 55 à 90°C, et les kératinases sécrétées par *Aspergillus fumigatus* présentent un maximum d'activité à pH de 6,5-9 et une température de 45°C (Onifade et al., 1998).

I.1.1.4.3. Sources microbiennes des kératinases

Les kératinases sont produites par les bactéries, les actinobactéries, les moisissures et les levures. Parmi toutes les sources de kératinases : Les bactéries sont productrices, notamment par les espèces appartenant au genre *Bacillus* particulièrement *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis* (Thys et al., 2004 ; Devi et al., 2008 ; Gupta et al., 2013). Les actinobactéries du genre *Thermoactinomyces* (Saha, 2009 ; Gousterova et al., 2005).

Les champignons les plus producteurs sont : *Microsporum* sp, *Epidermophyton* sp, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus Niger* et *Aspergillus versicolor* (Lopes et al., 2011).

I.1.1.4.4. Applications industrielles des kératinases

Les kératinases ont des applications biotechnologiques impératives, notamment l'amélioration enzymatique de la farine de plumes, la production d'acides aminés rares (comme la sérine, la cystéine et la proline) et de peptides, la conversion des plumes en produits à valeur ajoutée comme les engrais, les colles, les films et les feuilles, ainsi que l'industrie du cuir, détergent, textile, médecine et cosmétique (Onifade et al., 1998 ; Paul et al., 2014).

I.1.1.5. Les amylases

Les amylases (EC :3.2.1) sont un groupe d'hydrolases qui peuvent cliver spécifiquement les liaisons glycosidiques dans l'amidon. Selon Michelin et al. (2010) et Gupta et al. (2003), les glycoside hydrolase GH peuvent être classées en trois grands groupes : les endoamylases (l' α -amylase (EC 3.2.1.1)) ; les exoamylases regroupent la β -amylase (EC 3.2.1.2), l' α -glucosidase (EC 3.2.1.20) et la glucoamylase (γ -amylase (EC 3.2.1.3)) et les enzymes débranchantes regroupent la pullulanase (EC 3.2.1.41) et l'isoamylase (EC 3.2.1.68) qui hydrolysent les liaisons α -1,6 de l'amylopectine (Agrawal et al., 2005 ; Akkaya et al., 2012). Généralement, ces trois groupes travaillent en synergie. L'action synergique trouvée dans les complexes amylolytiques est bénéfique pour l'hydrolyse de l'amidon, car elle augmente la vitesse de réaction globale et diminue la rétro-inhibition des produits (Castro et al., 2011).

I.1.1.5.1. Mode d'action

Le mécanisme d'action de l' α -amylase nécessite la participation de 3 fonctions du site actif impliquant une attaque nucléophile, un stabilisateur de la charge positif de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé. Ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du

substrat. Ce mécanisme est caractéristique de l'enzyme dans les conditions expérimentales telles que la T° et le pH. (**Berry et Paterson, 1990**).

I.1.1.5.2. Sources d'amylases

Les amylases sont parmi les plus importantes enzymes de conversion de l'amidon et peuvent être dérivées de plusieurs sources telles que les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux où ils jouent un rôle dominant dans le métabolisme des glucides (**Stanley et al., 2005**). Les enzymes de sources fongiques et bactériennes ont dominé les applications dans les secteurs industriels. L'avantage majeur de l'utilisation de champignons pour la production d'amylase est la solution la plus économique et la capacité de production en vrac. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* et *Rhizopus* sont utilisés comme source fongique de α -amylase (**Pandey et al., 2005**).

I.1.1.5.3. *Les propriétés de l' α -amylase*

Selon **Gupta et al. (2003)** La masse moléculaire des α -amylases varie selon l'origine de l'enzyme de 40 à 70 kDa. Il a été rapporté que la plus faible masse moléculaire est retrouvée chez *Bacillus caldolyticus* avec 10 kDa. Par contre, l' α -amylase de *Chloroflexus aurantiacus* possède la masse moléculaire la plus élevée des α -amylases avec 210 kDa (**Ratanakhanokchai et al., 1992**). Pour les champignons la plupart des études sur la production d' α -amylase révèlent des rendements optimaux de température dans l'intervalle de 25 à 40°C (**Gupta et al., 2003**). Cependant, les champignons thermophiles, tels que *Thermomyces lanuginosus* (**Mishra et Maheshwari, 1996**), ont enregistré une production optimale de l'enzyme à 50°C. Les températures optimales des α -amylases bactérienne varient de 50 à 95°C. Certaines souches hyperthermophiles peuvent résister à des températures supérieures à 100 °C (**Sindhu et al., 2017**). La plupart des α -amylases ont un pH optimal dans une gamme acide à neutre (**Pandey et al., 2000 ; Sun et al., 2010 et Bozic et al., 2011**).

I.1.1.5.4. Domaine d'application de l'amylase

Selon **Hmidet et al. (2009)**, les amylases sont parmi les enzymes les plus étudiées. Contrairement à la spécificité de leur action, leur diversité a attiré l'attention du monde entier pour tenter d'exploiter leurs applications potentielles dans les industries biotechnologiques et autres (**Wang et al., 2011a**). Elles sont très demandées dans plusieurs domaines surtout le secteur agroalimentaire et médical. Les amylases sont d'une grande importance en biotechnologie. Elles trouvent des applications très diverses dans les secteurs de la détergence, de l'alimentaire, des bioénergies, de l'industrie du papier, des colles ou encore de l'industrie pharmaceutique (**Sindhu et al., 2017**).

I.2. Biomasses lignocellulosiques et coproduits de l'agro-industrie

Le terme biomasse regroupe tous les types de matière organique provenant d'un processus biologique. Dans ce sens, la formation de biomasse végétale est due au processus de photosynthèse qui forme des structures de haut contenu énergétique. Les forêts représentent approximativement 27% de la superficie terrestre, faisant du bois le principal produit extrait, avec une consommation mondiale d'environ 3.500 millions de mètres cubes par an (augmentation de 65% depuis 1960). Plus de la moitié de cette consommation de bois est utilisée comme combustible, le reste étant utilisé dans la production de cellulose et de papier, comme matériau de construction, ou autres (Martinez *et al.*, 2005).

I.2.1. Les sources de la biomasse lignocellulosique

Les biomasses lignocellulosiques et la plupart des coproduits de l'agro-industrie sont disponibles à grande échelle, à faible coût, n'entrent pas en compétition avec l'alimentation et présentent un faible impact sur les ressources fossiles.

Les ressources lignocellulosiques et autres coproduits de l'agro-industrie peuvent être regroupés en cinq catégories (Zheng et Rehmann, 2014) :

- ✓ Les résidus de l'agriculture,
- ✓ Les cultures énergétiques,
- ✓ Les déchets solides municipaux,
- ✓ Les résidus forestiers,
- ✓ Les déchets de l'agroalimentaire et des autres industries.

I.2.2. Structure et composition de la biomasse lignocellulosique

Un des problèmes inhérents à l'utilisation de biomasse ligno-cellulosique est sa structure complexe. A l'échelle cellulaire (Figure2), la paroi lignocellulosique, aussi appelée paroi végétale, est un véritable cadre dans lequel est contenue la cellule. Cette paroi est à l'origine des propriétés mécaniques et chimiques des végétaux. A l'échelle moléculaire, la paroi végétale est de nature polymérique et est constituée principalement d'une matrice macromoléculaire composite, une fraction holocellulosique de nature glucidique et une fraction ligneuse de nature phénolique.

La fraction glucidique se compose de différentes macromolécules appelées cellulose et hémicelluloses alors que la fraction phénolique se compose d'une macromolécule appelée lignine (ou protolignine dans son état natif). Les macromolécules sont agencées de façon complexe dans

la paroi végétale (**Harris et Stone, 2009**), les microfibrilles de cellulose étant englobées dans une matrice de protolignine et liées à cette dernière par les hémicelluloses. Divers composés, appelés extractibles, sont piégés dans cette matrice macromoléculaire. Ainsi, la biomasse lignocellulosique est hétérogène dans sa composition et sa structure chimique (**Carillon, 1987**).

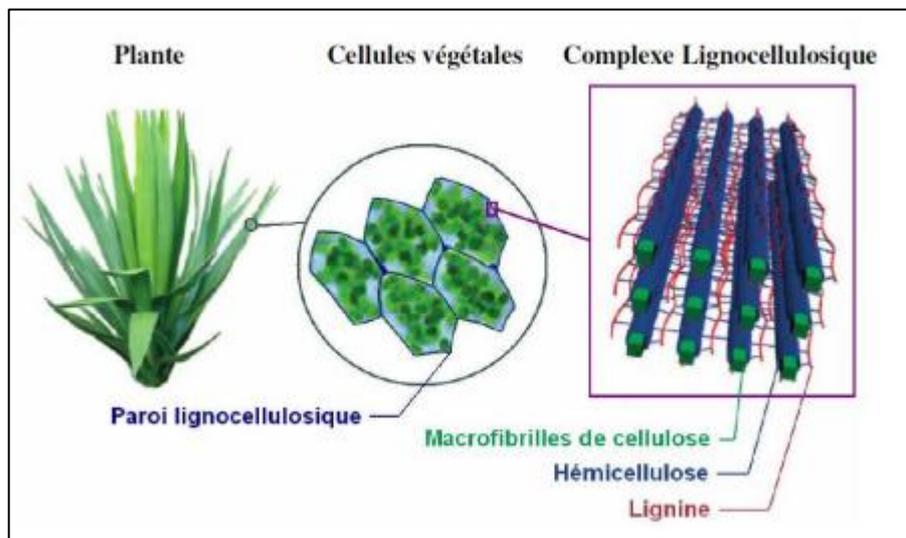


Figure 2. Structure cellulaire et moléculaire de la biomasse lignocellulosique (**Zakzeski et al., 2010**)

1.2.2.1. Cellulose

La cellulose est le biopolymère le plus abondant à la surface de la terre. C'est un homopolymère dont le motif monomérique est le glucose dans la configuration D. Les molécules de glucose sont liées de façon linéaire par des liaisons osidiques β -1-4, le motif dimérique constitutif de la cellulose étant le cellobiose (Figure3). Cette liaison osidique confère aux chaînes de glucose une conformation tridimensionnelle spécifique stabilisée par des liaisons hydrogène intra- et inter-moléculaires. Les chaînes de glucose s'associent entre elles pour former des microfibrilles (**Barnoud, 1980**).

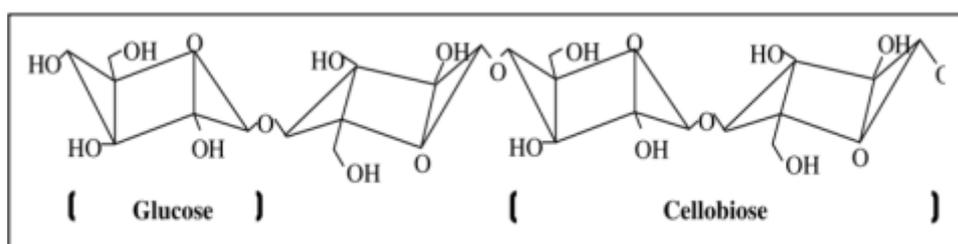


Figure 3. Structure moléculaire de la cellulose (**Zhu et al., 2020**).

La cellulose est insoluble dans les solvants traditionnels et est résistante aux dégradations chimiques. Son hydrolyse nécessite le recours à des températures élevées et la présence d'acide alors qu'en présence d'une solution d'hydroxyde de sodium concentrée, elle reste insoluble mais gonfle de trois fois son volume (procédé de mercerisation). Les microfibrilles de cellulose sont un mélange intime de régions amorphes et de régions cristallines (20 à 40 unités de glucose) fortement orientées le long de l'axe de la fibre. La proportion entre région cristalline et amorphe définit le degré de cristallinité de la cellulose. Il est variable selon son origine (40 à 50% dans les bois, 60% dans le coton). La cellulose est un polymère dont les masses moléculaires sont faiblement dispersées et de faible polymolécularité (Stevanovic et Perrin, 2009).

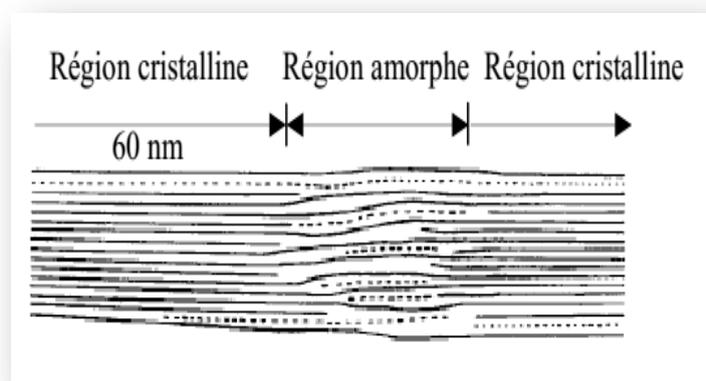


Figure 4. Les régions cristallines et amorphes dans les microfibrilles de cellulose (Navi et Heger, 2005).

1.2.2.2. Les hémicelluloses

Après la cellulose, l'hémicellulose est le deuxième glucide majeur de la lignocellulose. Les hémicelluloses sont un groupe diversifié de polymères de sucres hétérogènes à chaîne courte linéaires et ramifiés, généralement constitués de cinq sucres différents : le L- arabinose, le D-galactose, le D-glucose, le D-mannose et le D-xylose (Zhao et al ; 2012), dont, le L-arabinose et le D-xylose sont des pentoses (C5) tandis que le reste sont des hexoses (C6) (figure5). Le type le plus courant de polymère de sucre de la famille de l'hémicellulose est le xylane. En outre, les hémicelluloses peuvent également contenir de faibles quantités d'autres sucres tels que l' α -L-rhamnose et l' α -L-fucose, des acides organiques tels que l'acide acétique, l'acide 4-O-méthylglucuronique, l'acide galacturonique et l'acide ferulique et les groupes acétyle peuvent être partiellement substitués aux groupes hydroxyle des sucres (Gírio et al ;2010 ; Mussatto et Teixeira, 2010 ; Martins et al ; 2011 ; Xu et al ; 2013).

Contrairement à la cellulose les hémicelluloses (figure 5) manquent de cristallinité en grande partie du fait de leur structure ramifiée à chaîne courte en combinaison avec la présence de groupes acétyle attachés aux chaînes polymères (Mussatto et Teixeira, 2010). Son degré de polymérisation se compose entre 70 et 200, étant ainsi un polymère amorphe et facilement dégradable (Zhao et al., 2012).

La diversité des hémicelluloses se traduit par des propriétés bio-physico-chimiques très variables selon l'espèce végétale considérée. En outre la variabilité des unités monomériques qui les constituent ne leur permet pas de développer une structure cristalline, bien que les hémicelluloses puissent être co-cristallisées avec la cellulose.

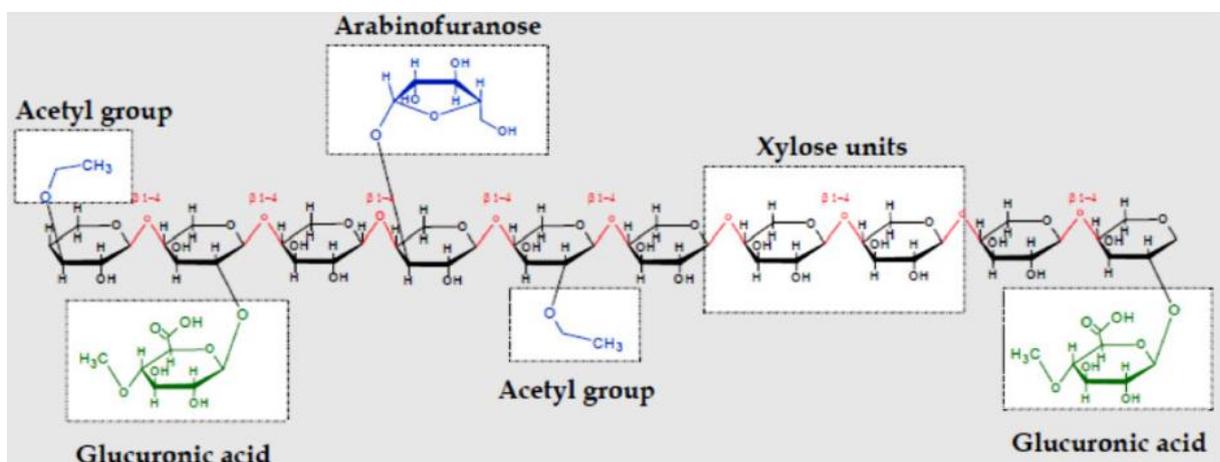


Figure 5. Schéma structural de l'hémicellulose (Mussatto et al., 2012).

1.2.2.3. Lignines

La lignine est le troisième polymère naturel le plus abondant. Dans la paroi cellulaire végétale, la lignine remplit les espaces entre la cellulose et les hémicelluloses, et agit comme une résine qui unit l'ensemble de la lignocellulose (biomasse lignocellulosique). La lignine est formée de façon aléatoire par la polycondensation et par la déshydrogénation enzymatique de trois alcools phénylpropénoïques en configuration trans (Figure 6), l'alcool coumarylique, l'alcool sinapylique et l'alcool coniférylique. Ces trois alcools peuvent être désignés sous le terme général de monolignols (Gellerstedt et Henriksson, 2008).

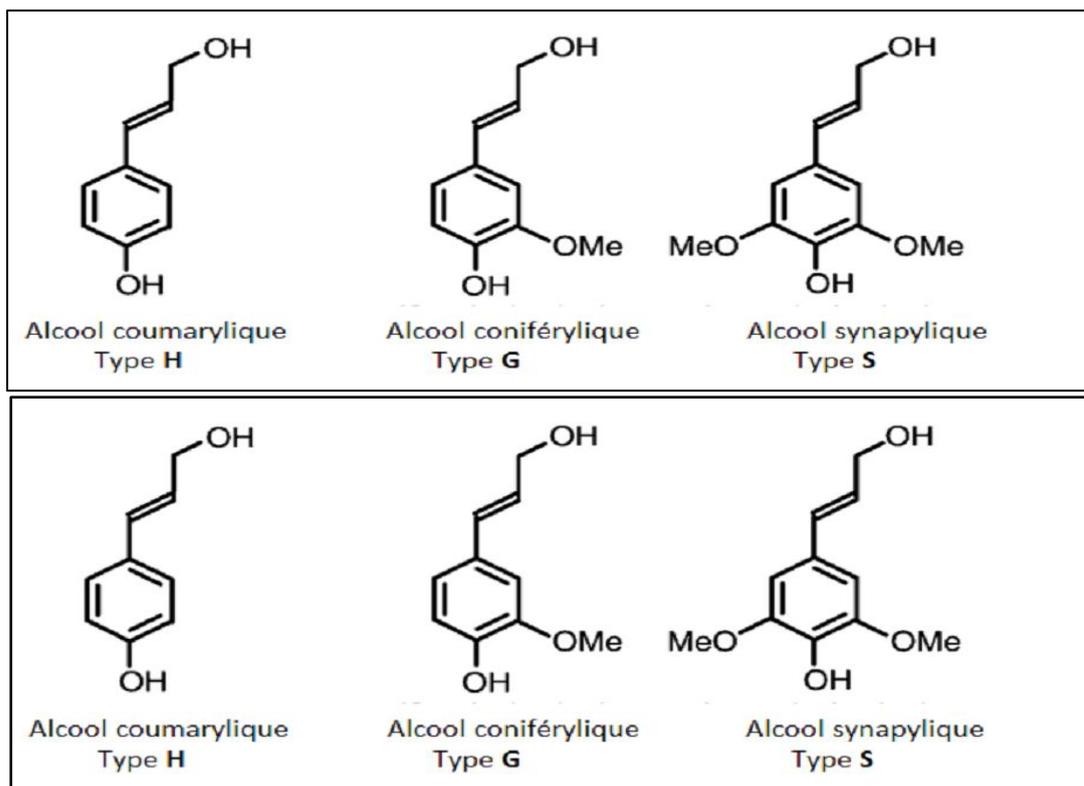


Figure 6. Les trois monomères de la lignine. De gauche à droite : l'alcool coumarylique (type H), l'alcool coniférylique (type G) et l'alcool synapylique (type S).

La composition de la lignine (Figure7) est souvent caractérisée par la répartition en motifs guaiacyle (G), syringyle (S) et p-hydroxybenzoyle (H) ainsi que par la distribution des types de liaison entre les unités dans le polymère. Le dosage des principales fonctions (hydroxyl, méthoxyl) retrouvées dans les unités constitutives de la lignine renseigne également sur ses propriétés et sa réactivité (**Dence, 1992**).

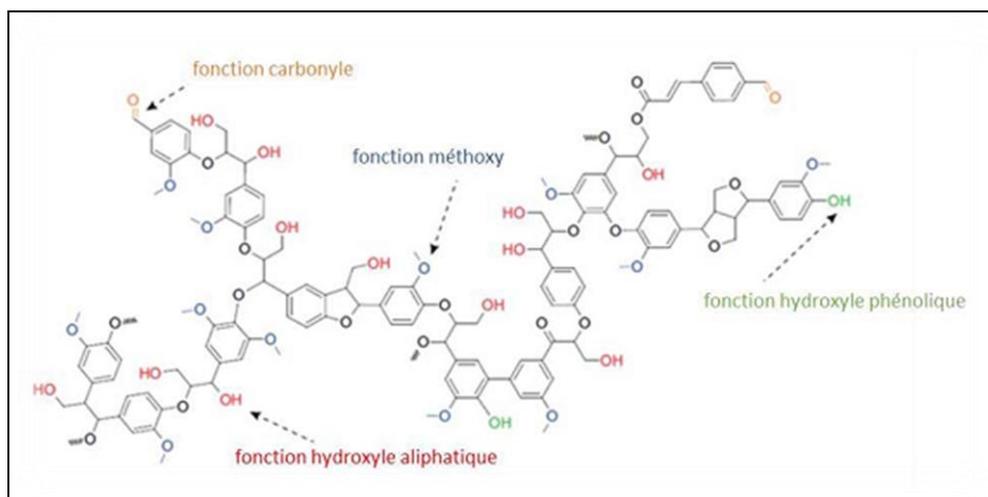


Figure 7. La lignine et ses principaux groupements fonctionnels (d'après Zakzeski et al., 2010).

En tant que composant majeur de la paroi cellulaire, la lignine assure une rigidité, le transport interne de l'eau et des éléments nutritifs, et la protection contre les attaques des microorganismes (**Buranov et Mazza, 2008**). La lignine est toujours associée aux polysaccharides (en particulier avec les hémicelluloses) via des liaisons covalentes sur deux sites : α -carbone et C4 dans le noyau benzénique et cette association est appelée complexe lignine-carbohydate (LCC) ou complexe lignine-polysaccharides (**Jeffries, 1991**).

I.2.3. Valorisation de la biomasse

La valorisation de la biomasse végétale issue de végétaux d'origine agricole ou forestière, s'inscrit dans une démarche de développement durable selon le concept de bioraffinerie (figure 8). La recherche se focalise actuellement sur le développement de nouvelles technologies valorisant la biomasse lignocellulosique, la source de carbone renouvelable la plus abondante de la planète.

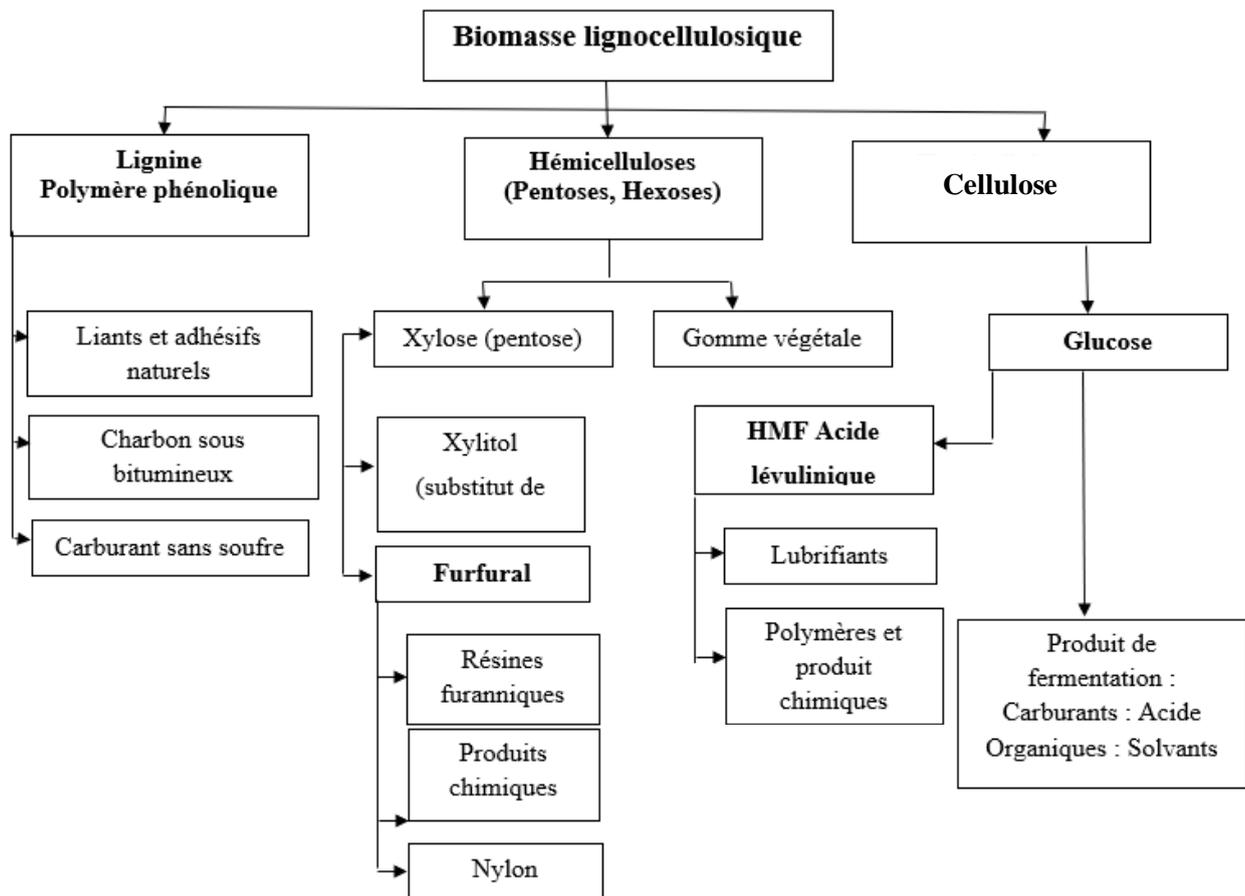


Figure 8. Transformations potentielles des différentes fractions issues de la bioraffinerie des biomasses lignocellulosiques (**Kamm et Kamm, 2004**).

De plus la valorisation de ces ressources permet de répondre à un ensemble de problématiques actuelles comme l'épuisement de certaines matières premières, l'utilisation raisonnée des excédents agricoles des pays industrialisés et plus particulièrement de l'Union Européenne et enfin de limiter les problèmes de pollution générés par les industries de transformations traditionnelles (Carillon, 1987).

I.2.4. Le procédé de conversion par voie biochimique de la biomasse lignocellulosique en bioproduits

Le procédé de conversion par voie biochimique de la biomasse lignocellulosique en bioproduits est composé des phases suivantes :

- Récolte et de stockage de la matière première ;
- Prétraitement : Hydrolyse enzymatique ;
- Fermentation des hydrolysats en bioproduits ;
- Extraction et purification des produits finaux.

Il existe différentes configurations de ce procédé dont les principales variantes concernent les phases d'hydrolyse enzymatique et de fermentation des hydrolysats en bioproduits. En effet, celles-ci peuvent être soit séparées (procédé de SHF ou Separate Hydrolysis and Fermentation), soit couplées (procédé de SSF ou Simultaneous Saccharification and Fermentation), soit réalisées selon un procédé intermédiaire entre les deux précédents (procédé de HSF ou Hybrid Saccharification and Fermentation). Il existe également deux autres conceptions de ce procédé: le procédé SSCF ou Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation, consistant à réaliser la fermentation simultanée de tous les glucides libérés (pentoses et hexoses), contrairement à une fermentation exclusive des hexoses dans le cas du procédé SSF; et le procédé CBP ou Consolidated BioProcessing, consistant à réaliser en une seule et même étape (ou un même réacteur) les phases de production d'enzymes, d'hydrolyse enzymatique et de fermentation des hydrolysats en bioproduits (Didderen et al., 2008).

I.3. Les enzymes lignocellulolytiques

Les enzymes lignocellulolytiques, une des puissantes enzymes produites par les microorganismes, peuvent être largement exploitées dans diverses industries à base de lignocelluloses (**Prakash et al., 2013**).

Différentes biomasses lignocellulosiques telles que le son de blé, la paille de blé, le son de riz, la paille de riz, la bagasse de canne à sucre, l'épi de maïs, la farine de maïs et d'autres résidus agro-industriels sont utilisées pour la production d'enzymes industrielles (tableau I). Les enzymes lignocellulolytiques sont les plus importantes parmi elles, car elles sont également utilisées pour l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique dans d'autres produits à base d'enzymes (**Shahzadi et al., 2014**). Les polysaccharides (cellulose et hémicelluloses) sont hydrolysés par les cellulases et les xylanases à des sucres monomères tels que le glucose, le xylose, le mannose, l'arabinose et le galactose. Ces sucres monomères sont utilisés comme sources de carbone pour la production de différents produits industriels tels que l'éthanol, le xylitol, le biobutanol, le bio-hydrogène, les polysaccharides microbiens, les acides organiques et les protéines d'origine unicellulaire, etc. (**Chandel et al., 2012a ; Chandel et al., 2012b**).

Tableau I : Valorisation de la biomasse lignocellulosique dans la production d'enzymes

Substrat	Microorganismes	Enzymes produits	Références
Son de blé	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cellulase et xylanase	Pathak et al., 2014
	<i>Coprinus cinereus</i>	Xylanase	Dutt et al., 2013
	<i>Bacillus pumilus</i>	Endoxylanase	Poorna et Prema, 2007
	<i>Trichoderma afroharzianum</i> isolate AZ 12	Xylanase	Azzouz et al., 2020a
	<i>Trichoderma harzianum</i> UzCF-28	Cellulase et xylanase	Azimova et al., 2020
	<i>Aspergillus niger</i>	Xylanase	Azzouz et al., 2020 b
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Amylase	Singh et al., 2014a
	<i>Trichoderma viride</i>	Cellulase	Iqbal et al., 2011
	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Carboxymethyl Cellulase</i>	Iqbal et al., 2010
	<i>Aspergillus niger</i>	Cellulases	

		Xylanase	Kang et al., 2004
Paille de riz	<i>Bacillus pumilus</i>	Endoxylanase	Poorna et Prema, 2007
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Cellulase	Soni et al., 2010
	<i>Trichoderma reesei</i>	Cellulase	Rocky-Salimi et Hamidi-Esfahani, 2010
Épi de maïs	<i>Trichoderma reesei</i>	Cellulase	Liming et Xueliang, 2004
Épluchure d'épis	<i>Trichoderma reesei</i>	Cellulase	Verma et al., 2011
Ecorce de banane	<i>Trichoderma viride</i>	Cellulase	Sun et al., 2011

I.3.1. Les Champignons source d'enzymes lignocellulolytiques

I.3.1.1. Généralités sur les champignons

Les champignons sont des êtres eucaryotes, hétérotrophes, unicellulaires ou filamenteux, sans organisation tissulaire et qui peuvent se reproduire soit sexuellement soit de façon asexuée, ne sont pas chlorophylliens, donc sont incapables de photosynthèse et doivent rechercher leur carbone dans les composés organiques (**Botton et al., 1990**). Ils sont d'une grande importance, pas seulement en ce qui concerne la santé et l'industrie mais aussi du point de vue économique, grâce à leurs propriétés métaboliques. (**Awad, 2005 ; Kalyani et al., 2016**). Ils occupent une place importante parmi les microorganismes du sol, par leur rôle et leur abondance, ils représentent 75% de la biomasse microbienne du sol (**Harms et al., 2011**), interviennent dans les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote et contrôlent la transformation de la matière organique et la disponibilité des nutriments (**Kirk et al., 2004**).

Les champignons sont également des micro-organismes particuliers en raison de leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et génétiques, ils sont capables de coloniser toutes les matrices (sol, air, eau) en milieu naturel et jouent un rôle clé dans le maintien de l'équilibre des écosystèmes (**Gupta et Shrivastava, 2014**).

I.3.1.2. Propriétés principales des champignons

Le tableau II résume l'essentiel des propriétés principales des champignons (formes, habitats naturels, croissances des hyphes, métabolisme générale et mode de reproduction).

Tableau II : Propriétés principales des champignons (Delarras, 2007).

Critères	Caractéristique
Formes	- Structure filamenteuse, hyphes ou filaments à paroi souvent composées de chitine, septes ou phones - Espèces dimorphiques avec une forme levure qui se multiplie par bourgeonnement ou scissiparité
Croissance des hyphes	-Croissance strictement apicale, puis ramification de l'hyphe conduisant à la formation d'un mycélium ou thalle
Métabolisme générale	-Chimiohétérotrophes - Source de carbone et d'énergie : molécules carbonés organiques - Suivant les espèces, peuvent lyser les polymères complexes grâce à des enzymes extracellulaires : cellulose, amidon, pectines, mais aussi des protéines et des lipides
Mode de reproduction	Sexuée ou asexuée par l'intermédiaire des spores
Habitats naturels et autres	- Air, eaux, sols ...vivent en saprophytes ou parasites - Champignons pathogène pour l'homme - Matières premières alimentaires, aliment pouvant être contaminés par des moisissures toxigènes

1.3.1.3. *Activité lignocellulolytique des champignons*

Les champignons peuvent dégrader tous les composés organiques naturels, grâce à la production d'enzymes, telles que les amylases, lipases et protéases. Ceux-ci leur permettent d'utiliser des substrats comme les féculents, les matières grasses et les protéines. Certaines espèces peuvent utiliser la pectine, la kératine, la chitine, la lignine, la cellulose et l'hémicellulose comme sources de carbone (Gupta et Shrivastava, 2014). Certaines de ces souches industrielles produisent plus de 100 g/l de cellulases et hémicellulases (Balan et al., 2013). Les Principaux genres des moisissures productrices d'enzymes lignocellulolytiques appartiennent au groupe des Ascomycètes et Basidiomycètes. Les champignons cellulolytiques sont regroupés en espèces de pourriture blanche, de pourriture brune et de pourriture molle, les champignons de la pourriture blanche, environ 2000 espèces, principalement des Basidiomycètes peuvent métaboliser la lignine ; ceux de la pourriture brune, environ 200 espèces de Basidiomycète également dégradent les composants de la cellulose et hémicelluloses et exercent peu d'effets sur la lignine. Les espèces de la pourriture molle (Ascomycètes) possèdent des

capacités intermédiaires, elles sont capables de dégrader la cellulose et l'hémicellulose rapidement, mais la lignine plus lentement (**Moore et al., 2011**).

1.3.1.4. Les champignons filamenteux cellulolytiques

La caractéristique principale de champignons filamenteux est l'hyphe. La croissance des hyphes fournit les moyens pour la colonisation de substrats, la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, l'assimilation des nutriments, régulation de la morphogenèse, et la reconnaissance de signaux de l'environnement (**Roberson et al., 2010**). En dépit de la concurrence des bactéries, les moisissures occupent une place importante sur le marché des cellulases dont les producteurs principaux sont le genre *Aspergillus* et *Trichoderma*. Ces champignons filamenteux sont les plus connus et les plus efficaces pour la dégradation des polysaccharides des parois cellulaires végétales, en produisant des mélanges d'enzymes hydrolytiques extra cellulaires (**Hasper et al., 2002**). Les moisissures des genres *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* et *Phanerochaete* ont été rapportés comme étant les meilleurs producteurs de cellulases et les enzymes brutes produites par ces micro-organismes sont commercialisées (**Dashtban et al., 2009**). Le système de dégradation de la cellulose par ces moisissures est complexe et constitué de : endoglucanases (CMCase), l'exoglucanase et β -glucosidases qui agissent en synergie lors de l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique en sucres (**Saini et al., 2015 ; Bajaj et Mahajan, 2019**).

Dans le groupe des champignons imparfaits, *Trichoderma reesei* est l'espèce la plus étudiée en raison de ses potentialités commerciales. A l'heure actuelle les souches de *Trichoderma viride* et d'*Aspergillus niger* sont les plus importantes sources de cellulases à vocation industrielle (**Moloney et al., 1983**). Les espèces d'*Aspergillus* (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus wentii*) sont capables de produire des cellulases en faible quantité. D'autres espèces d'*Aspergillus* comme *Aspergillus terreus* et *Aspergillus fumigatus*, sont capables de se développer sur la cellulose microcristalline en produisant des quantités importantes de β -glucosidases. Les cellulases produites par des espèces d'*Aspergillus* sont généralement riches en endo- β -glucanase et β -glucosidase, mais pauvres en exo et β -glucosidases, de ce fait elles ont une action limitée sur la cellulose microcristalline (**Riccio et al., 1999**). *Aspergillus niger* est un bon exemple, il produit la cellulase, les amylases, l'invertase et la pectinase, employées principalement comme des catalyseurs biologiques en glucoserie, brasserie et pour la fabrication des boissons. Cette moisissure secrète aussi des protéases, des lipases et des estérases, utilisées dans différentes applications alimentaires (**Kosikowski, 1988 ; Scriban, 1999**).

Tableau III : Les principaux champignons filamenteux utilisés dans la production de cellulases (Singhania, 2009).

Genre	Espèces
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. aculeatus</i>
<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i> , <i>F. fusosporium</i>
<i>Humicola</i>	<i>H. insolens</i> , <i>H. griesa</i>
<i>Melanocarpus</i>	<i>M. albomyces</i>
<i>Neorospira</i>	<i>N. crassa</i>
<i>Phanerochaete</i>	<i>P. chrysosporium</i>
<i>Penicillium</i>	<i>P. brasilianum</i> , <i>P. occitanis</i> , <i>P. purpurogenum</i> , <i>P. janthinellum</i>
<i>Talaromyces</i>	<i>T. emersonii</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>T. reesei</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. longibrachiatum</i>

I.3.1.4.1. Le genre *Trichoderma*

Le terme « *Trichoderma* » a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon (Roussos., 1985 ; Bissett., 1991). Les espèces de ce genre sont largement répartis dans le monde entier et présents dans presque tous les sols et autres habitats naturels, en particulier dans ceux contenant des matrices organiques et inorganiques (Montoya et al., 2016). Ce sont des colonisateurs omniprésents de l'eau cellulosique et peuvent donc souvent être trouvés partout où des matières végétales en décomposition sont disponibles, ainsi que dans la rhizosphère des plantes, où ils peuvent induire une résistance systémique contre les agents pathogènes (Atanasova et al., 2013). Elles appartiennent au grand groupe des champignons imparfaits sans reproduction sexuée connue (Taylor et al., 1999), donc sa multiplication s'effectue par l'intermédiaire d'un organe appelé conidie qui est de petite taille et ovoïde. La germination de cette conidie et le développement des tubes germinatifs sont influencés par différents facteurs tels que le pH, la nutrition, la lumière et les propriétés hydrologiques du sol (Magan, 1988). Après la germination de conidie, elle donne naissance à un mycélium de couleur blanche en avant puis viré en vert plus tard (Chabasse et al., 2002). Elle se développe à une température optimale qui varie entre 25 et 30°C (Montoya et al., 2016). Les champignons du genre *Trichoderma*, fait partie de meilleurs compétiteurs saprophytes et peuvent vivre aussi dans le milieu où la teneur en éléments nutritifs est faible, capable de développer aussi bien dans des sols acides comprise entre 2 et 7 (Begoude et al., 2007).

Les champignons appartenant au genre *Trichoderma*, jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique en attribuant une biofertilisation aux sols. En plus, en tant qu'une espèce appartenant au genre *Trichoderma* (figure 9), il est fréquemment employé dans les industries alimentaires car ces champignons peuvent produire des cellulases et d'autres enzymes qui dégradent les polysaccharides complexes (Harman, 2006). Le genre *Trichoderma* et les espèces de ce genre produisent des quantités importantes de cellulases (Makut et Godiya, 2010), et d'hémicellulases (Peterson et Nevalainen, 2012).

Les espèces de *Trichoderma* les plus connues sont : *Trichoderma harzianum*, espèce largement répandue dans le sol, céréales, papiers, textiles.... etc (Botton et al., 1990)

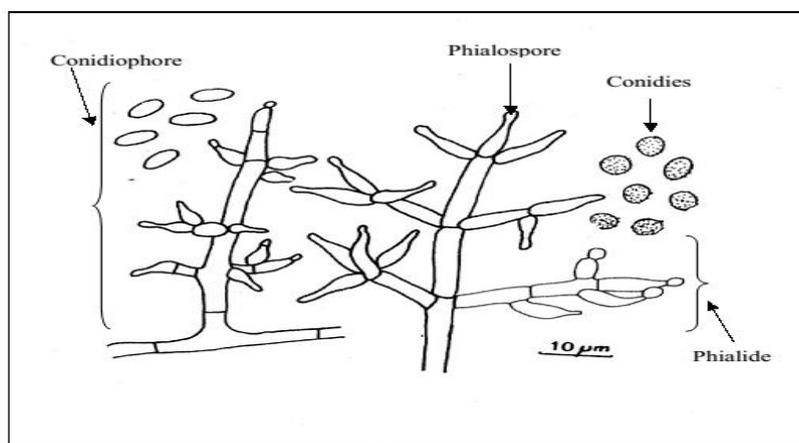


Figure 9. Morphologie de *Trichoderma* (Botton et al., 1990).

Taxonomie

La classification de ce champignon est basée sur les aspects cultureux et la morphologie des appareils sporogènes. Selon Bissett (2004), la position taxonomique actuelle des *Trichoderma* sp se présente comme suit (Bissett, 2004):

•Embranchement	<i>Amastigomycota et/ou Eumycètes</i>
•Sous embranchement	<i>Ascomycotina</i>
•Classe	<i>Sordariomycètes</i>
•Ordre	<i>Hypocréales</i>
•Famille	<i>Hypocraceae</i>
•Genre	<i>Trichoderma</i>

I.3.1.4.2. Le genre *Aspergillus*

L'*Aspergillus* est parmi les champignons les plus abondants dans le monde (**Bleichrodt et al., 2013**). C'est un genre fongique asexué qui attire le plus souvent les biotechnologistes. Il est caractérisé par la production d'un grand nombre de spores en chaînes. La sporulation produit des conidies contenant des spores asexuées haploïdes, disséminées dans l'atmosphère après maturation. La croissance végétative est initiée par la germination des spores avec formation d'un hyphes tubulaire (extension strictement apicale) donnant naissance à un réseau mycélien par ramification, qui acquiert les éléments nutritifs de l'environnement (**Ward et al., 2005**). Les caractères de colonies utilisés pour caractériser les espèces de ce genre comprennent : les taux de croissance des colonies, la texture, le degré de sporulation, la couleur du mycélium, pigments solubles, les sécrétions et le revers de colonies (**Prakash et Jha, 2014**).

Ces champignons poussent rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt, Sabouraud et PDA). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais l'*Aspergillus niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*Aspergillus niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunâtres et à maturité elles deviennent noires (**Guillaume, 2006**). Il se caractérise par des longs hyphes qui se terminent par la formation d'une structure globuleuse, contenant des spores ressemblant la forme d'un goupillon (figure10) (*an aspergillum* en latin) d'où le nom *Aspergillus* (**Kozakiewicz et Smith, 1994 ; Brakhage et al., 1999 ; Pasqualotto, 2010 ; Machida et Gomi, 2010**). Elle est la caractéristique microscopique la plus utilisée dans la taxonomie d'*Aspergillus* (**Prakash et Jha, 2014**).

Quelques espèces du genre *Aspergillus* sont capables de produire des cellulases parmi les quelles *A. oryzae*, *A. versicolor*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. wentii*. Cette production de cellulases reste cependant faible et limitée à des conditions particulières de culture (**Roussos, 1981**). D'autres espèces d'*Aspergillus* comme *A. terreus* et *A. fumigatus* sont capables de se développer sur la cellulose microcristalline en produisant des quantités importantes de β -glucosidase (**D'souza et Volfova, 1982 ; Wase et Vaid, 1983**). *A. niger* est une espèce cosmopolite (**Farr et Rossman, 2017**). Cette espèce est couramment utilisée dans les industries biotechnologies comme hôtes de production de l'acide citrique et les enzymes industriels (**Romsdahl et al., 2018**). Parmi les quelles : les cellulases, les pectinase, les xylanases, les amylases, les glucoamylases et les protéases (**Murphy et Horgan, 2005 ; Ward et al., 2005**).

Taxonomie

En raison de son importance économique, l'*Aspergillus* est l'un des genres les mieux décrits du point de vue taxonomique parmi les champignons filamenteux. **Al-Musallam (1980)** a

révisé la taxonomie du groupe *A. niger* en prenant essentiellement les caractéristiques morphologiques en compte. La position systématique d'*A. niger* est résumée comme suivant: (Chabasse et al., 1999)

- **Phylum** : Tallophyta
- **Sous-phylum** : Fungi (Mycota)
- **Division de sous-phylum** : Eumycota
- **Subdivision** : Deuteromycotina (Fungiimperfecti)
- **Classe** : Hyphomycètes (forme filamenteuse)
- **Ordre** : Moniliales
- **Famille** : Moniliaceae
- **Sous-famille** : Hyalosporae
- **Tribu** : Aspergilleae
- **Genre** : *Aspergillus*
- **Espèce** : *Aspergillus niger*.

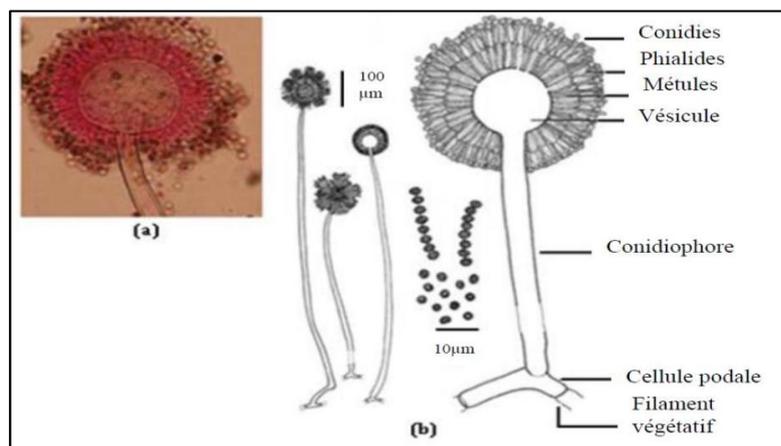


Figure 10. Aspect microscopique (a) et représentation schématique (b) de la conidiophore du genre *Aspergillus* (Pasqualotto, 2010).

I.3.1.4.3. Le genre *Sarocladium*

Sarocladium est un genre hyphomycète appartenant à la famille des Hypocreaceae, ordre Hypocreales et classe de sordariomycètes (Maharachchikumbura et al. 2015, 2016), a été bien étudié par différents auteurs (Summerbell et al. 2011 ; Yeh et Kirschner, 2014 ; Giraldo et al., 2015). Les genres *Sarocladium* et *Acremonium* sont un groupe très diversifié de champignons morphologiquement et génétiquement apparentés qui se trouvent généralement dans l'environnement. De nombreuses espèces de ces genres sont des saprophytes présents dans le sol et en association avec des plantes, membres spécialement des Poaceae, y compris le bambou, le riz, le maïs et les espèces de graminées fourragères et de mauvaises herbes (Wicklow et al., 2005 ; Summerbell et al., 2011 ; Liu et al., 2017 ; Maia et al., 2018 ; Gama et al., 2020), ou

poussent sur des matières organiques en décomposition. Sur la base des séquences d'ADNr et d'espaceur interne transcrit (ITS), certaines espèces d'*Acremonium* ont récemment été déplacées vers le genre *Sarocladium*. La plupart des espèces de *Sarocladium* sont des agents pathogènes pour les plantes et les humains, comme *S. oryzae*, *S. kiliense* et *S. strictum*, et comprennent un endophyte du maïs, *S. zae* (**Giraldo et al., 2015 ; Summerbell et al., 2011**). Bien que les deux genres soient morphologiquement similaires et appartiennent à l'ordre des Hypocreales, ils sont phylogénétiquement éloignés : l'espèce type *Acremonium* est apparentée aux Bionectriaceae tandis que celle de *Sarocladium* est toujours considérée comme *Incertae sedis* (**Summerbell et al., 2011**). En outre selon **Pramunadipta et al. (2020)**. Les isolats de *Sarocladium* sp se développent lentement (environ 1,9 mm /jour) sur PDA à 25°C dans l'obscurité. Les caractéristiques de la colonie de *Sarocladium* sp étaient cotonneuses, la couleur du mycélium produit varie du blanc au jaune clair, se transforme parfois en orange pâle avec l'âge et en orange pâle en vue inverse. Les hyphes végétatifs de *Sarocladium* sp sont septées, hyalines, lisses et à paroi mince. Les conidiphores de *Sarocladium* sp sont hyalins, à paroi lisse et peuvent être simples ou ramifiés. Les conidies sont cylindriques, hyalines et aseptisées, de taille 1,6-4,8 µm x 0,6-1,7 µm et disposées en têtes gluantes, chlamydo-spores non observées. Ces caractères sont similaires aux caractéristiques morphologiques de *S.oryzae*, qui est un champignon à croissance lente (**Bigirimana et al., 2015**), a des colonies blanches, orange-blanc sur PDA à 25°C avec la formation de conidies dans les têtes visqueuses et ne pas produire les chlamydo-spores (**Giraldo et al., 2015**).

En biotechnologie, *S. kiliense* (figure11), qui appartenait au genre *Cephalosporium*, produit de la céphalosporine C, un antibiotique similaire à la pénicilline (**Arora et al., 1992**). De plus, comme *S. kiliense* appartient au genre *Acremonium*, ce genre peut dégrader les polysaccharides, la pectine, la carboxyméthylcellulose, les xylanes, est également connu pour oxyder le manganèse dans le sol et produire des protéases, amylases alcalines (**Domsch et al.,1980**) et dégrader la cellulose et la chitine (**Baldrian et al., 2011**).

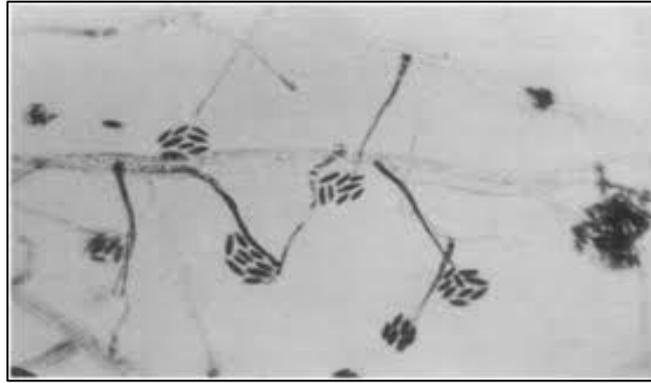


Figure 11. Aspect microscopique de *Sarocladium kiliense* (Fridkin et al., 1996).

I.4. Fermentation sur milieu solide (FMS)

I.4.1. Définition

La fermentation en milieu solide correspond à la croissance de microorganismes aérobies ou anaérobies sur des particules solides humides en l'absence ou la quasi-absence d'eau libre (Durand, 2003 ; Gervais et al. 2003 ; Rahardjo et al. 2006). Ces microorganismes croissent sur une matrice solide à la quelle est liée une phase liquide et une phase gazeuse est piégée dans ces particules ou entre elles (Rahardjo et al. 2006). La plupart des procédés de fermentation en milieu solide implique des champignons filamenteux. Néanmoins, il existe quelques procédés qui intègrent les bactéries et les levures.

I.4.2. Avantages de la fermentation à l'état solide

L'utilisation des procédés de fermentation à l'état solide possède plusieurs avantages. En effet, ces derniers sont des procédés simples qui ont recours à des technologies simples. Ils ne demandent pas des équipements sophistiqués et chers pour contrôler les paramètres environnementaux. De plus, les produits de la fermentation en culture solide sont la plupart du temps concentrés, ce qui facilite leur purification. En outre, la faible humidité du milieu et le grand volume utilisés en SSF réduisent la possibilité de contamination par d'autres microorganismes. Cependant, la majorité des bactéries demandent des taux d'humidité élevés pour survivre. De plus, lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides, il n'y a pas de production de mousses, les volumes des déchets générés sont faibles. Étant donné que la plupart des procédés de fermentation solide mettent en œuvre des moisissures, ils ne nécessitent pas de stérilisation préalable du substrat. Ce qui réduit le cout énergétique nécessaire (Durand, 1983). Les enzymes produits lors d'une fermentation solide sont moins sensibles aux répressions

cataboliques et aux inductions (**Singhania et al., 2009**). La fermentation solide possède une réputation de technique simple à mettre en œuvre, facilement applicable en milieu rural, de moindre coût car peu exigeante en matériel, ne nécessitant pas obligatoirement une stérilisation énergétique du substrat de culture et requiert un faible espace. Elle assure une forte productivité en métabolites. Egalement, la faible teneur en humidité empêche la contamination bactérienne. La FMS peut être particulièrement avantageuse pour la culture des champignons filamenteux, conduisant à une productivité enzymatique plus élevée, comparée aux processus **FML (Kuhad et al., 2016 ; Farinas et al., 2015 ; Hansen et al., 2015)**. Un autre avantage de la FMS par rapport à FML est le coût d'exploitation en raison de l'utilisation des déchets agro-industrielle comme substrat solide à faible coût (**Bettache et al., 2014**).

I.4.3. Inconvénients des fermentations solides

Les microorganismes utilisés sont limités. En effet, seuls les microorganismes se développant bien aux basses humidités peuvent être employés. Les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur milieux solides sont faibles. Les problèmes de transfert d'oxygène et de chaleur rendent difficile l'augmentation d'échelle des procédés. En effet, la faible quantité d'eau ralentit les échanges de chaleur, pouvant créer des problèmes de surchauffe lorsque des masses importantes sont mises en fermentation. L'évaporation compense partiellement cet échauffement, mais en réduisant l'eau disponible. L'évacuation des calories métaboliques peut donc poser un problème qu'il s'agit de résoudre lors du passage de petits essais de laboratoire aux applications en vraie grandeur. La nature solide et hétérogène des substrats utilisés complique le suivi direct des paramètres de fermentation. Les sondes utilisées en fermentation liquide ne sont pas utilisables, jusqu'à ce que **Bellon-Maurel et al. (2003)** proposent de nouveaux types de sondes adaptées aux cultures solides. Il est pratiquement difficile d'assurer une distribution parfaitement homogène de substances ajoutées au substrat et donc du milieu de culture. Ce qui rend le contrôle en direct des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration des nutriments, assez aléatoire. Les microorganismes étant inséparables du substrat, l'estimation de la biomasse est délicate.

I.4.4. Les diverses étapes suivies en fermentations solides

Les différentes étapes suivies au cours d'une fermentation solide sont : la préparation du substrat ou du milieu de culture, la stérilisation du milieu (généralement à 121 °C pendant 21 minutes) suivie par le refroidissement de celui-ci, l'inoculation du milieu de culture, l'incubation

du milieu inoculé en maintenant dans la mesure du possible les conditions environnementales optimales (température, pH, teneur en eau).

1.4.4.1. La préparation du substrat carboné

Le support est l'un des paramètres les plus importants en fermentation en milieu solide. Il doit être choisit avec attention en fonction de plusieurs facteurs comme la taille des particules, la porosité, la composition biochimique dans le cas d'un support organique puisque celle-ci aura une incidence sur les microorganismes et sur le profil enzymatique (substances inductrices), sa capacité de rétention d'eau et/ou sa capacité à contenir les éléments nutritifs (source de carbone, d'azote et de sels minéraux), sa disponibilité et son coût (**Manpreet et al, 2005 ; Krishna, 2005**). Les substrats carbonés sont classés en deux catégories, les supports inertes et les supports organiques, et se présentent sous trois formes :

1. Matériaux organiques naturels (amylacés ou lignocellulosiques). Ce sont généralement des sources de polymères insolubles, complexes et hétérogènes (bagasse, pulpes de betterave, paille, bois, son de blé, manioc, ...). Ils servent à la fois de substrat (source de carbone) et de support ;
2. Matériaux synthétiques (mousse de polyuréthane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif ;
3. Matériaux minéraux (granulés d'argile, perlite, pouzzolane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif (**Durand ,1998**).

1.4.4.2. L'inoculation du milieu de culture

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

1.4.4.3. Les facteurs influençant la fermentation en milieu solide

- **La température** : A l'échelle industrielle, les contrôles de la température de culture et de l'humidité du milieu sont très importants pour le scaling up (**Bellon-Maurel et al., 2003**). La faible conductibilité thermique des substrats utilisés et leur faible teneur en eau réduisent le transfert de chaleur, qui lui-même dépend de la taille des particules de la couche solide. Une élévation de la température dans la masse fermentable due à un dégagement de chaleur métabolique peut aller jusqu'à atteindre 80°C, causant un assèchement de la culture et une baisse de l'*aw* et de la disponibilité en nutriments. La température de la culture à l'échelle industrielle est généralement régulée par l'injection d'air forcé, l'agitation du réacteur ou par le phénomène d'évaporation (**Bellon Maurel et al., 2003**).
- **La teneur en eau** : L'eau est impliquée dans la croissance cellulaire et les réactions métaboliques, les activités enzymatiques, les transports des éléments nutritifs, des métabolites extracellulaires et des gaz au cours de la fermentation solide (**Bellon-Maurel et al., 2003 ; Gervais et al., 2003**). Les variations de la teneur en eau sont dues à l'évaporation causée par la chaleur métabolique, à l'hydrolyse du substrat et aux productions d'eau métabolique. La teneur en eau est habituellement déterminée par les mesures de la matière sèche, laquelle, cependant, ne différencie pas l'eau disponible pour les activités microbiennes (l'activité d'eau, *aw*) de l'eau liée au substrat indisponible aux microorganismes.
- **Le pH** : Des variations de valeur du pH résultent d'une consommation en substrat (exemple de l'hydrolyse des protéines) et/ou des synthèses métaboliques (exemple des acides organiques). Les variations de pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques (**Bellon-Maurel et al., 2003**). Il est ainsi difficile de contrôler le pH efficacement en fermentation solide. Lorsque cela est nécessaire, la méthode standard est de tamponner le milieu de culture avec un mélange adéquat de composés azotés (urée, sels ammoniacaux), des sels de Ca²⁺ ou des solutions alcalines. Pendant la fermentation, le pH peut être régulé par l'addition d'acides ou de bases à l'eau de refroidissement de la masse fermentable.
- **L'aération de la culture** : L'aération des cultures solides joue quatre fonctions, à savoir le maintien des conditions d'aérobies, l'élimination du dioxyde de carbone, la régulation de la température de culture et la régulation de la teneur en eau (**Raimbault, 1998**). En fermentation liquide, l'aération est souvent le facteur limitant de la croissance microbienne à cause de la faible solubilité de l'oxygène dans l'eau. L'aération en fermentation solide est plus facile qu'en fermentation liquide à cause d'une part, de la diffusion rapide de l'oxygène dans le film humide entourant les particules de substrat, et d'autre part à cause aussi des grandes surfaces de contact entre la phase gazeuse, le substrat et les mycéliums aériens.

I.4.4.4. Application de la fermentation en milieu solide

La fermentation en milieu solide s'est développée progressivement à d'autres domaines d'applications autres que l'alimentaire (tableau IV). La première production industrielle d'enzymes a été réalisée par Jokichi Takamine par fermentation de son de blé avec une souche d'*Aspergillus oryzae* (Murooka et Yamshita, 2008).

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

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

I.4.4.5. Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et de fermentation en milieu liquide ou submergée

La culture des champignons pour la production d'enzymes s'effectue soit sur substrat solide, soit en culture submergée (tableau V), comme c'est le cas pour la production de la plupart des métabolites d'origine microbienne. Au cours des trente dernières années, un nombre important de ces fermentations est réalisé sur des déchets agroalimentaires pour produire principalement des hydrolases (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996).

Tableau V: Comparaison entre FMS et FML (Raimbault, 1998 ; Assamoi et al., 2009).

Facteur	Fermentation solide (FMS)	Fermentation liquide (FML)
Substrat	Polymères insolubles (amidon, pectine, cellulose, lignine)	Substrats solubles (sucres)
Eau	Consommation limitée de l'eau ; <i>aw</i> faible	Des grands volumes d'eau sont consommés
pH et Température	Contrôle aléatoire et transfert difficile de la chaleur	Contrôle facile
Aération (O₂)	Aération facile et diffusion rapide de l'oxygène	Faible solubilité de l'(O ₂) dans l'eau
Scale up	Nécessité de nouveaux équipements	Equipements industrielles Disponibles
Fermentation	Fermentation discontinue (batch)	Fermentation continue
Contamination	Risque de contamination fongique	Risque de contamination Bactérienne
Demande énergétique	Besoin énergétique faible	Consommation élevée d'énergie
Biomasse	Inséparable du substrat	Facilement séparable
Produit	Concentré	Très dilué
Pollution	Pas d'effluents	Grands volumes d'effluents

I.4.4.6. La matière première

I.4.4.6.1. Son de blé

Le son de blé est l'un des sous-produits de la mouture sèche du blé tendre. Il se compose de couches extrêmes du grain de blé. Il représente 10 à 17% du blé moulu (Hassan et al., 2008). Il représente entre 11 et 15% de la masse totale du grain de blé (Hemery et al., 2007) et son rôle est de protéger la graine. Les enveloppes sont constituées de cellulose, hémicellulose et de lignine formées par un ensemble de monosaccharides dont la teneur est variable. La composition des sucres complexe est illustré dans le tableau VI (Menon et Rao, 2012 ; Miron et al., 2001). Le son de blé est l'un des substrats les plus attractifs, est utilisé en fermentation en

milieu solide pour la production d'enzymes, de métabolites secondaires et autres produits d'intérêt biotechnologiques. Il a pour avantage de faciliter la pénétration du mycélium dans le substrat et d'être bon marché. Le son de blé a une bonne capacité de rétention de l'eau pouvant aller jusqu'à 80% (**Abdullah et al., 1985**). Ainsi, il est possible de travailler avec une humidité importante permettant une bonne croissance des champignons.

Tableau VI : Composition biochimique de son de blé (**Menon et Rao, 2012 ; Miron et al., 2001**).

Constituants en sucre	Pourcentages %
Cellulose	(10,5-14,8)
Hémicellulose	(35,5-39,2)
Lignine	(8,3-12,5)

I.4.4.6.2. Paille de blé

Le terme paille est utilisé pour désigner les tiges et feuilles sèches débarrassées de grains. La paille est constituée de trois parties majeures : la tige, les nœuds et les feuilles (**Harper et al., 1981**). Dans le cas du blé, il y a 5 à 6 nœuds sur la plante à maturité. Les entre-nœuds, qui représentent environ 50 % de la masse de la paille, lui donnent sa résistance mécanique alors que les nœuds et les feuilles ont une moins bonne tenue mécanique, car ils contiennent plus de minéraux et moins de cellulose (**Marechal, 2001**).

Avec l'explosion des problématiques de raréfaction des ressources pétrochimiques et de développement durable, des travaux sur la valorisation de la paille ont pris leur essor. Les premières études se sont focalisées sur la valorisation de la fraction lignocellulosique des pailles de blé pour la fabrication de bioéthanol (**Kristensen et al., 2007 ; Qureshi et al., 2007**), d'agromatériaux (**Markessini et al., 1997 ; Panthapulakkal et al., 2006**), de biocomposites (**Alemdar et al., 2008**), ou encore la production de biohydrogène ou de biogaz (**Kaparaju et al., 2009**).

La composition des sucres complexes de la paille de blé est illustrée dans le tableau VII (**Iqbal et al., 2013 ; Anwar et al., 2014**)

Tableau VII : Composition biochimique de la paille de blé (**Iqbal et al., 2013 ; Anwar et al., 2014**).

Constituants en sucre	Pourcentage %
Cellulose	(29 -35)
Hémicellulose	(26-32)

Lignine	(16-21)
---------	---------

I.5. Méthodes d'optimisation de la production d'endoglucanase

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

I.5.1. La méthode expérimentale classique (*one-factor -at-a-time*)

Cette méthode consiste à faire varier successivement un seul facteur en maintenant les autres constants. Elle présente l'avantage d'être facile et simple, en plus les effets individuels des composants de milieu de culture et les conditions de processus de fermentation sont capables d'être visualisés sous forme de graphes. En plus elle présente des limitations du fait qu'elle ignore les interactions entre les paramètres, le temps consommé est important, les coûts élevés surtout en cas d'un grand nombre de variables, conduisant à une expérimentation étendue (**Wang et Wan, 2009**).

I.5.2. La méthode statistique des 'Plans d'expérience'

Défini comme étant la méthode mathématique et statistique qui permet de modéliser et d'organiser au mieux des essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles (**Goupy et Creighton, 2006**).

Les limites de la méthode classique (OFAT) sont évitées par l'utilisation des plans statistiques qui permettent de mesurer l'effet de plusieurs facteurs ainsi que leurs interactions (**Kammoun et al., 2008**) et leurs sources de variation supposées (**Vivier, 2002**). Un plan d'expérience consiste en la mise en œuvre organisée d'un ensemble d'unités expérimentales d'une manière à révéler les effets de différents traitements.

L'objectif principal de la théorie des plans d'expériences est d'assurer la meilleure précision possible, avec un maximum d'information et un minimum d'essais sans sacrifier la qualité, après avoir fait varier simultanément les niveaux d'un ou de plusieurs facteurs (**Goupy et Creighton, 2006**).

I.5.2.1. La méthode de surface de réponse (RSM)

C'est l'un des différents types de plans d'expériences disponibles actuellement, elle permet de régler les paramètres pour atteindre un optimum entre les niveaux des facteurs étudiés

(Faucher, 2006). Le principe de toutes les méthodes d'optimisation consiste à explorer cette surface de façon à localiser un éventuel extremum dans un domaine expérimental donné. Ces plans utilisent des modèles polynomiaux du second degré avec interaction d'ordre 2 (Goupy et Creighton, 2006).

Il existe de nombreux types de plans d'expériences permettant de construire des surfaces de réponse tels que: les plans composites centrés, plans de Doehlert et plan Box-Behnken (Faucher, 2006).

Les modèles statistiques pour optimiser les composants et les conditions des milieux de cultures sont de plus en plus utilisés dans la biotechnologie actuelle grâce à son applicabilité facilitée par l'informatique (Reddy et al., 2008). Ces plans sont également appliqués dans les processus d'optimisation de la fermentation des cultures par les bactéries (Tari et al., 2006 ; Oskouie et al., 2008 ; Reddy et al., 2008 ; Rai et Mukherjee, 2010), les cellules animales (Castro et al., 1992) et les moisissures (Hajji et al., 2008 ; Kammoun et al., 2008 ; Lakshmi et al., 2009).

I.6. Purification d'une enzyme

Les enzymes industrielles produites nécessitent généralement peu de traitement en aval et sont donc relativement utilisés à l'état brut. Par contre leurs applications dans les secteurs agroalimentaires, pharmaceutiques et cliniques nécessitent une grande pureté de l'enzyme (Gupta et al., 2003 et Sindhu et al., 2017). Différentes stratégies pour la purification des enzymes ont été étudiées, en exploitant les caractéristiques spécifiques de la biomolécule cible.

I.6.1. L'ultrafiltration

L'ultrafiltration est une technique de séparation membranaire, mettant en jeu un gradient de pression, qui est utilisée pour séparer des molécules de faibles tailles (entre 5 nm et 0,1 µm) en solution (Tableau VIII). C'est une méthode rapide est relativement peu coûteuse qui peut être mise en œuvre à température ambiante et permet la concentration et la purification simultanée des molécules sans engendrer leur dénaturation .

Les modules d'ultrafiltration peuvent être de diverses natures (fibres creuses, spiralés, plans, tubulaires) et composés de membranes différentes : isotropes (microporeuses, denses, chargées) ou anisotropes (composites). Elles se caractérisent par leur seuil de coupure (MWCO : Molecular Weight Cut-Off) qui représente le poids moléculaire de la plus petite molécule retenue à 90 % par la membrane (Baker, 2000).

Tableau VIII : Classification des techniques de séparation membranaire (Baker, 2000).

Technique de séparation	Diamètre moyen de pore	Force motrice	Exemples de molécules séparées
Microfiltration	10 – 0,1 μm	Gradient de pression	Petites particules, colloïdes, bactéries
Ultrafiltration	0,1 μm – 5 nm	Gradient de pression	Macromolécules, émulsions
Nanofiltration	1 – 5 nm	Gradient de pression	Molécules de faible poids moléculaire (sucres, sels)
Osmose inverse	<1 nm	Gradient de pression	Sels
Electrodialyse	<5 nm	Gradient de potentiel électrique	Molécules organiques
Electrofiltration	10 μm – 5 nm	Gradient de potentiel électrique	Petites particules, colloïdes, bactéries, macromolécules, émulsions
Dialyse	<5 nm	Gradient de concentration	Métabolites, sels minéraux
Perméation de gaz	Molécules de gaz	Gradient de pression partielle des molécules	Mélange de gaz

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Chapitre II. Matériel et méthodes

II.1. Zones de prélèvement et échantillonnage

Les zones d'étude ont été choisies sur la base de leur degré de richesse en microorganismes. Les champignons utilisés dans cette étude ont été isolés à partir d'échantillons de sol riches en matière organique provenant de plusieurs régions d'Algérie : Mascara avec coordonnées géographiques (Latitude : **35.3833**, Longitude : **0.15 35° 22' 60" Nord, 0° 9' 0" Est**) et Bordj Bou Arreridj (Latitude : **35.9796** - Longitude : **4.7474735° 58' 47" Nord, 4° 44' 51" Est**) (figure 12) sur une profondeur de 5 à 10 cm après enlèvement de la couche superficielle. Les échantillons du sol ont été prélevés le 17/04/2018. Tous les prélèvements du sol sont réalisés dans des conditions d'asepsie et récupérés dans des flacons ou des sachets stériles pour éviter tout risque de contamination entre les échantillons (Davet et Rouxel, 1997).



Figure 12. Localisation géographique des zones d'échantillonnage

II.1.1. Isolement des champignons telluriques productrices d'enzymes hydrolytiques

L'isolement a été réalisé selon la méthode de suspension - dilution (Davet et Rouxel, 1997). La diminution de la charge microbienne par dilution de l'échantillon de sol à analyser est réalisée dans le but d'une purification ultérieure plus aisée et l'obtention de colonies bien séparées à partir des cultures mixtes. Le principe consiste tout d'abord, à préparer la solution mère de chaque échantillon. Cette dernière est préparée, en ajoutant 1g de sol dans 9 ml d'eau physiologique stérile,

Des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-5} ont été effectuées ; chaque dilution subit une homogénéisation à l'aide du Vortex. Un volume de 0,1 ml de chaque dilution est ensuite ensemencé dans des boîtes de Pétri sur PDA (Pomme de terre Dextrose Agar) (**Tournas, 2005**) (annexe 1) additionné de 5 mg/ l de gentamycine (**Botton, 1985**) pour inhiber la croissance bactériennes (**Botton et al., 1990**). Les préparations sont incubées à 28°C jusqu'au développement des colonies (3 à 7 jours).

II.1.2. Purification des souches isolées

La pureté des souches est vérifiée par repiquage successif sur milieu PDA (**Ouattara-Sourabie et al., 2011**). La technique consiste à prélever avec une aiguille stérile un fragment mycélien à la marge du thalle à repiquer et la transférer aseptiquement dans une autre boîte de Petri afin d'obtenir un développement typique du champignon, l'inoculation est réalisée en un seul point au centre de la boîte (**Botton et al., 1990**).

II.1.3. Conservation des souches

- Par cryoconservation

La congélation a été effectuée par un transfert aseptique de 2 à 3 disques (6 mm de diamètre coupés à partir de la gélose d'une culture jeune) dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml contenant 1 ml de mélange de PDB (Potato-Dextrose-Broth,) à 20 % de glycérol ; ce dernier est utilisé comme agent cryoprotecteur (**Nagai et al., 2005**). 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**).

- Sur gélose inclinée

Consiste à repiquer les souches fongiques purifiées en tube sur gélose PDA inclinée incubées à 28°C pendant 7 jours puis stockées à 4°C (**Takahashi et al., 2008 ; Patidar et al., 2005**), pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (**Botton et al., 1990**).

II.2. Criblage des isolats pour la production d'enzymes hydrolytiques

Le premier criblage a été fait par méthode qualitative (méthode de diffusion sur gélose) et la deuxième méthode de criblage par culture liquide (fermentation liquide). L'activité enzymatique extracellulaire a été testée sur milieux solides pour toutes les cultures d'isolats, les souches dont le résultat était positif lors du premier criblage ont été testées sur milieu liquide (criblage quantitatif).

II.2.1. Mise en évidence des activités enzymatiques (criblage qualitatif)

Le principe de cette technique est la mise en évidence de la détection des zones d'hydrolyse par l'utilisation de réactifs spécifiques. La production d'enzymes est recherchée qualitativement sur milieu solide. Les enzymes à étudier sont : Amylase, cellulase, xylanase, protéase et kératinase. La détection des activités hydrolytiques repose sur l'ensemencement d'un disque gélose (6mm) de la culture fongique sur des milieux gélosés sélectifs, dont le substrat de l'enzyme recherchée est la seule source de carbone et d'énergie (Sohail et al., 2009). Un pour cent (1%) pour chaque substrat utilisé et 1.8% d'agar. L'activité hydrolytique est déterminée en ensemençant les moisissures par touche au centre de la boîte de Petri puis ces dernières sont incubées à 25° C pendant 7 jours.

II.2.2. Recherche des carbohydrases

II.2.2.1. Amylase

La détection est effectuée sur milieu PDA additionné d'amidon soluble à 1% à pH 6.0 (Jalgaonwala et Mahajan, 2011). Après incubation (28°C/ 7jours), une solution de lugol dilué est versée sur la surface de la boîte pendant 30 secondes, suivie d'un rinçage avec de l'eau distillée.

II.2.2.2. Cellulases et xylanase

Le milieu de culture décrit par Mandels et Weber (Mandels et Weber, 1969) (Annex I) a été utilisé pour étudier la capacité des isolats fongiques à produire la cellulase et la xylanase en utilisant respectivement 1% de carboxyméthyl cellulose (CMC) et de xylane de bouleau. Les boîtes ont été inondées avec 0,25% w/v d'iode aqueux (I₂ et KI) (Annex II) et laissé agir pendant 15 minutes, puis versé la solution de coloration et lavé la surface de la gélose avec de l'eau distillée. Ensuite, les boîtes ont été rincées avec du NaCl 1M. La zone d'hydrolyse de la cellulose apparaissait comme une zone claire autour de la colonie (Wongpaisal et al., 2016). La dégradation du xylane autour de la colonie est apparue comme une zone jaune opaque contre une couleur bleu /violet rougeâtre pour le xylane non dégradé (Pointing, 1999).

II.2.3. Recherche des protéases

II.2.3.1. Protéase

L'activité protéasique a été déterminée par culture de champignons en milieu supplémenté avec 1% de lait écrémé (Gupta et al., 2002). Les boîtes ont été observées pour la zone claire autour de la colonie fongique, ce qui indique la dégradation de la caséine.

II.2.3.2. *kératinase*

Cette activité a été testée sur milieu supplémenté avec 1% de plumes de poulet comme source de kératine selon la méthode de **Wawrzkiwicz et al. (1991)**. La kératine solubilisée dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), a été précipitée par l'acétone et après séchage (Annexe III) elle a été ajoutée au milieu gélosé stérile. Les milieux ont été autoclavés et inoculés avec des blocs d'agar (6 mm de diamètre, d'une colonie âgée d'une semaine cultivée sur des boîtes PDA) au centre des boîtes contenant le substrat. Ces derniers ont été incubés à 28 °C pendant 5 à 7 jours. Après incubation, les activités sont révélées par l'apparition d'une zone claire entourant la croissance des colonies.

II.3. Production des enzymes hydrolytiques par fermentation sur milieu liquide (criblage quantitatif)

La production d'enzymes hydrolytiques (Amylase, cellulase, xylanase, protéase et kératinase) est réalisée dans des fioles Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml du milieu de culture liquide de composition adéquate au type d'activité enzymatique d'intérêt (Annex I). Pour obtenir des enzymes hydrolytiques les champignons ont été cultivés dans ce milieu avec 1% de chaque substrat : Son de blé pour amylase, cellulase et xylanase ; caséine pour protéase et plumes de poulet pour la kératinase, puis stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes avant l'inoculation. L'inoculum sous forme de disque de mycelium est préparé en coupant la gélose à partir de la périphérie des champignons cultivés activement (**Philippoussis et al., 2011**). Les disques de mycélium (6 mm de diamètre) ont été prélevés et utilisés pour inoculer le contenu des Erlenmeyer, la culture a été incubée dans un incubateur à agitation (150 rpm) pendant 7 jours à 28 °C, après incubation, elle a été filtrée en utilisant du papier filtre Whatman n°1. Les filtrats ont été centrifugés à 10000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Les surnageants clairs ont été utilisés comme source d'enzymes extracellulaires brutes (**Chakraborty et al., 2016**).

II.3.1. Détermination des activités enzymatiques

II.3.1.1. *Activités carbohydrases*

Les activités : Amylase, CMC_{Case} et xylanase, exoglucanase et papier filtre ont été déterminés en utilisant le DNS (**Ghose, 1987**) (Annex II).

II.3.1.1.1. Activité amylase

L'amidon soluble a été utilisé à 1% w/v comme substrat (**Bernfeld, 1955**). Le filtrat de culture brut a été utilisé comme échantillon d'enzyme dilué dans du tampon citrate de sodium (0.05m M ; pH 5.9). Le mélange de réaction contenait 200 µl de solution de l'enzyme amylase,

200 µl de tampon citrate de sodium (0.05 mM ; pH 5.9) et le substrat a été incubé à 25°C pendant 5 minutes pour une réaction enzymatique (Annex III).

II.3.1.1.2. Activités CMCCase (endoglucanases) et exoglucanase

Ces activités ont été déterminées en utilisant le carboxyméthyl cellulose (CMCase) et l'avicel (exoglucanase) à (2%) comme substrat dans un tampon citrate de sodium, (50 mM, pH 4.8). Le mélange réactionnel contenait 0,5 ml d'extrait enzymatique et 0,5ml de substrat, ce mélange a été incubé à 50 °C pendant 30 minutes (Annex III).

II.3.1.1.3. Activité papier filtre (APF)

Elle détermine l'activité totale dans un complexe cellulasique. Le mélange réactionnel est constitué d'une solution d'enzyme (0.5 ml), 1 ml de tampon citrate (0,05mM, pH 4.8) et de 50 mg de papier filtre Wattman N° 1 (des morceaux de 1 x 6 cm), incubés à 50°C pendant 60 minutes (**Tanveer et al., 2014**) (Annex III).

II.3.1.1.4. Activité xylanase

L'activité xylanase est déterminée dans des conditions similaires à celles décrites dans l'activité de CMCCase, sauf qu'une solution de xylane de bouleau de 2% est utilisée comme substrat à la place de CMC (**Tao et al., 2010**).

Les sucres réducteurs libérés (maltose /glucose/ xylose) ont été mesurés par le 3,5- acide dinitrosalicylique (DNS) selon la méthode de **Miller (1959)**. L'absorbance des solutions a été mesurées à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS. Une unité internationale a été définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 µmol de sucre réducteur par millilitre par minute dans les conditions de dosage données à partir d'une courbe d'étalonnage standard (maltose /glucose/ xylose) (Annex III).

II.3.1.2. Activités protéase

L'activité protéase a été dosée par la méthode de **Hagihara et al. (1958)** utilisant la caséine comme substrat. Une unité d'activité enzymatique a été prise comme la quantité d'enzyme libérant 1 µg de tyrosine par ml par minute dans les conditions d'essai. L'absorbance de la solution a été mesurée à 595nm en utilisant spectrophotomètre UV-VIS. L'estimation de l'activité enzymatique est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage standard de tyrosine (Annex III).

II.3.1.3. Activités kératinase

L'activité a été déterminée par la méthode de l'assimilation de la keratine à 1% dans le tampon Tris-HCl (0.05 M pH 8.0) comme substrat selon **Cai et al. (2008)**. Une unité d'activité

kératolytique (U/mL) a été définie comme une augmentation de l'absorbance à 280nm avec celle du témoin pour 0,01 par minute dans les conditions standard et l'équation suivante a été utilisée : $U = \frac{4 \times n \times A_{280}}{(0.01 \times T)}$. Où 4 est le volume de réaction final (ml), n est le taux de dilution et T est le temps d'incubation (min) (Annex III).

Le blanc est préparé de la même façon, sans l'addition de substrat. Chaque dosage est effectué en triplicate.

II.3.2. Utilisation des souches les plus performantes pour la production des cellulases

Trois souches qui représentent la plus grande capacité de production d'enzyme ont été sélectionnées et utilisées pour la suite des expériences.

II.3.3. Identification des souches fongiques sélectionnées

Elle a été réalisée selon les clefs de détermination de (**Botton et al., 1999 ; Guiarud, 2003**) ainsi que celles de **Chabasse et al. (2002)** pour classer les souches fongiques par genres. Elle est basée sur les caractères cultureux (Identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique) (**Botton et al., 1999 ; Cahagnier,1998 ; Guillaume,2006 ; Pitt et Hoecking, 2009**).

II.3.3.1. Observation macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation des colonies à l'œil nu et permet la détermination des caractères suivants :

- Vitesse de croissance,
- Texture et couleur du thalle,
- Mode de sporulation,
- Couleur du revers de la colonie.

II.3.3.2. Observation microscopique

L'examen microscopique est basé sur les caractères morphologiques, en notant les types de spores sexuelles (oospores, zygosporos, ascospores, basidiosporos) ou asexuées, aspect du thalle, couleur et disposition des spores, conidies (uni- ou pluricellulaires, solitaires, en amas ou en chaînes, forme (ronde, ovale, en massue...) (**Mouria et al., 2012**). La morphologie et les examens microscopiques des différents isolats de cultures pures ont été utilisés pour déterminer les structures reproductrices et végétatives (**NaveenKumar et Thippeswamy, 2013**).

Un petit morceau de scotch est appliqué par la face collante sur la colonie à l'aide d'une pince puis déposé sur une lame porte –objet contenant quelques gouttes de lactophénol (**Chabasse et al., 2002**). Aussi, un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine stérile et déposé sur une lame porte-objet. Le frottis ainsi préparé est ensuite coloré par l'une des solutions suivantes : bleu de coton, rouge Congo ammoniacal, lugol ou le KOH à 10%. Ensuite la lame est recouverte d'une lamelle, puis observée au microscope photonique à un grossissement $\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$ (**Chabasse et al., 2002**).

II.3.3.3. Caractérisation moléculaire des isolats sélectionnés

II.3.3.3.1. Extraction d'ADN, amplification PCR et séquençage

Le mycélium fongique frais cultivé sur PDA pendant 10 jours à 25 °C dans l'obscurité a été utilisé pour l'extraction d'ADN à l'aide d'un kit commercial d'extraction d'ADN génomique fongique NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel Germany), en suivant les protocoles du fabricant. La partie de L'ADN (ITS) a été amplifié par PCR, le séquençage de la région ITS (ADN de la région de l'espaceur interne transcrit) et de la région du gène EF1- α (facteur d'élongation de traduction) des champignons ont été amplifiés avec les paires d'amorces ITS1-F (**Gardes et Bruns, 1993**) (5'CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A3') / ITS4 (**White et al. 1990**) (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') et EF1-728F (5' CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG) /EF2 (5' TAC TTG AAG GAA CCC TTA) (**Carbon et Kohn, 1999**), une partie du gène 28S de l'ARN ribosomique (LSU) et de gène β -tubuline ont été amplifiées par l'utilisation des paires d'amorces NL1/NL4b et bt2a/bt2b, respectivement (**O'Donnell 1993 ; Glass et Donaldson, 1995**).

L'amplification a été réalisée avec un volume total de 25 μ L, qui contient 2 μ L d'ADN génomique, 1 μ L de 10 μ M d'amorces (sens et antisens), 5 μ L de tampon 5X Taq Promega, 1,5 μ L de 25 mM, MgCl₂, 0,2 μ L de mélange dNTP 25 mM, 0,2 de 5U/ μ L Taq ADN polymérase Promega et 14,10 μ L d'eau stérilisée doublement distillée (ddH₂O). Des conditions de cycle différentes ont été utilisées pour les différentes régions des gènes. Pour la région ITS : dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 s, la température d'hybridation est de 55°C pendant 30 s, extension à 72°C pendant 45s, suivie d'une extension finale à 72°C pendant 7 min. Les mêmes conditions de cyclisme ont été utilisées pour la région EF1- α modifiant la température dU circuit à 52 °C. Pour la partie du gène 28S de l'ARN ribosomique (LSU) les conditions sont : 95 °C pendant 2 min ; 30 cycles de 95 °C pendant 30 s, 55 °C

pendant 30 s, et 72 °C pendant 1 min. Pour β -tubuline, 96 °C, 3 min de dénaturation initiale et des cycles de 95 °C, 30 s, 57 °C, 45 s, 72 °C.

Le produit de PCR est stocké avant révélation à 10°C jusqu'à utilisation.

II.3.3.3.2. Révélation des produits PCR

Les produits d'amplification ont été révélés après une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% avec dépôt de 10 μ l de produits de PCR. La migration est suivie d'une coloration dans un bain de bromure d'éthidium (0,5 μ g/ml). L'ADN a été visualisé et photographié sous UV par l'utilisation du Gel doc système de biorad (USA).

II.3.3.3.3. Purification des produits PCR

Les produits PCR ont été purifiés par le kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up de Macherey- Nagel (Germany).

II.3.3.3.4. Séquençage des produits de PCR

Les produits PCR isolés et purifiés ont été séquencés par la technique de Sanger (**Sanger et al. 1977**) en utilisant le kit BigDye v3.1 d'Applied Biosystems et les amorces PCR utilisées pour l'amplification des fragments d'intérêt. Les séquences obtenues sont analysées par l'utilisation du logiciel CHROMAS PRO. Les séquences finales sont comparées avec celles de la banque de données GeneBank par l'utilisation du Programme BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast) de NCBI pour l'identification des Isolats étudiés en se basant sur le % d'homologie avec les souches de références.

II.3.4. Mise en œuvre de la FMS et obtention des extraits enzymatiques bruts

II.3.4.1. Préparation de l'inoculum

Après sporulation des souches fongiques ensemencées préalablement sur milieu PDA, incubées à 28 \pm 2°C pendant 7-10 jours, chaque boîte est lavée avec 10 ml d'eau distillée stérile contenant 1 % (v/v) de Tween-80. À l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose afin de mettre en suspension les spores fongiques. La solution obtenue est conservée dans des flacon stériles pour être utilisées comme inoculum pour la production d'enzymes (**Sandhu et al., 2013 ; Ang et al., 2015**). La concentration en spores est déterminée par le dénombrement de la dilution appropriée à l'aide d'une cellule Malassez sous microscope optique. La suspension obtenue est ensuite utilisée pour l'ensemencement des substrats (**Belhamiche et al., 2011 ; Patel et al., 2014**).

II.3.4.2. Préparation du substrat solide de fermentation

La paille de blé est la matière première principalement utilisée comme substrat de fermentation solide pour la production d'endoglucanase. Ce substrat a été obtenu à partir de sources locales (Ferme agricole, au village de Hamadia, wilaya de Bordj Bou Arreridj à l'Est de l'Algérie). Elle est lavée à l'eau du robinet, rincée à l'eau distillée, séchée à 65°C pendant 48 heures. Ensuite, le substrat a été broyé à l'aide d'un mixeur et tamisé à fin d'obtenir une poudre de paille puis stockés à température ambiante dans des récipients étanches à l'air (**Menez et al., 2017**). Dans les fermentations à l'état solide, la paille de blé a été autoclavée avant l'inoculation. L'autoclave a modifié la morphologie de la paille de blé, ce qui est considéré comme un prétraitement hydrothermique doux de la paille de blé (**Pensupa et al., 2013**), la réduction de la taille des particules de ce substrat est appliquée comme un prétraitement mécanique pour faciliter la manutention des matériaux et pour augmenter le ratio Surface/Volume (**Harmsen et al., 2010**).

Le taux d'humidité des substrats sont déterminées avant le lancement de chaque fermentation (Annex IV).

II.3.4.3. Conduite de la fermentation solide

L'extrait enzymatique brut des cultures a été préparé selon les procédures décrites par **Menezes et al. (2017)**.

- Les milieux de culture de type solide sont répartis à raison de 05 g de substrat sec par Erlenmeyer de 250 ml, dont le taux d'humidité initial est déterminé.
- L'humidité finale est ajustée avec le milieu Mendels et Weber (agent humidifiant) à pH=5 à un taux de 70% pour le substrat utilisé en FMS.
- Les Erlenmeyer sont fermés avec du coton cardé et recouvert avec le papier aluminium puis stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15min. Après refroidissement, les Erlenmeyer sont inoculés avec une suspension sporales à raison de 10^7 spores/g de substrat (poids sec), l'ensemble est bien homogénéisé à l'aide d'une spatule stérile (**Liao et al., 2015**).
- Les Erlenmeyer sont incubées à 28°C dans une étuve pendant 7 jours (**Sandhu et al., 2013**)

II.3.4.4. Extraction du surnageant brut

Après incubation, les 5g du substrat sont misent en suspension dans 50 ml d'eau distillée. Afin de récupérer le maximum d'enzymes extracellulaires, l'homogénéisation est réalisée dans un mixer pendant 2min par intermittence pour éviter l'augmentation de la

température, le mélange est centrifugé à 10000g pendant 15 min à 4°C (Roussos *et al.*, 1994). Le surnageant clair récupéré représente l'extrait enzymatique brut (De Cassia Pereira *et al.*, 2015 ; Moretti *et al.* 2012), est conservé à 4°C (Bansal *et al.*, 2012).

II.3.5. Optimisation de la production d'endoglucanases

II.3.5.1. Optimisation des paramètres de la fermentation sur milieu solide par la technique de *one factor at a time* (OFAT)

La première méthode adoptée pour l'optimisation des conditions de production d'endoglucanase par les trois souches fongiques sélectionnées dans cette étude (Mtr6, BAS1, BbV1), est la technique d'optimisation classique (*one factor at a time*).

Les variables étudiées sont : la température, humidité, le temps d'incubation et la charge d'inoculum.

Cette méthode est basée sur la variation d'un seul facteur pendant que les autres facteurs sont gardés à des niveaux constants. Ce protocole permet d'évaluer l'effet individuel d'un paramètre et d'incorporer par la suite sa valeur optimale avant de passer à l'optimisation du paramètre suivant (Kumar *et al.*, 2003 ; Wang *et Wan*, 2009). Après chaque étape d'optimisation, la mesure de l'activité CMC_{ase} (Ghose, 1987) des extraits enzymatiques est déterminée dans les conditions standards. L'activité enzymatique est calculée en unité par gramme de matière sèche (U/g) (El-Ghonemy *et al.*, 2014). Tous les dosages sont conduits en triple.

II.3.5.2. Paramètres cinétiques

II.3.5.2.1. Temps d'incubation

Dans cette étude, la fermentation est effectuée dans des Erlénes de 250 ml contenant 5g de substrat, humidifié à 70 % avec milieu MW, inoculés avec 10^7 spores/g de substrat sec. Puis incubées à 28°C pendant 10 jours. Les Erlénes sont prélevés toutes les 24 heures jusqu'au 10ème jour.

II.3.5.2.2. Humidité

L'activité enzymatique de CMC_{ase} a été déterminée dans des Erlénes de 250 ml contenant 5 g de substrat, humidifier aux différents taux d'humidité allant de 50% jusqu'à 90 % de milieu MW avec un intervalle de 5%, inoculées avec 10^7 spores /g de substrat sec puis incubé à 28°C pendant un temps optimal déterminé précédemment.

II.3.5.2.3. Température

Afin de déterminer la meilleure température pour la production de CMCase par *Trichoderma afroharzianum*, Mtr6, *Aspergillus foetidus* .BAS1 et *Sarocladium kiliense*. BbV1. Les fermentations ont été réalisées à 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 et 40°C avec une humidité optimale et pendant un temps optimal déterminés précédemment.

II.3.5.2.4. Charge de l'inoculum

Dans le but de visualisé la taille d'inoculum optimale pour la production des enzymes, des fermentations ont été réalisées à 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 spores /g de substrat sec avec une humidité optimale et pendant une température et temps optimales déterminés précédemment.

II.3.6. Optimisation de la production d'endoglucanases par méthode des surfaces de réponse (RSM) pour la souche BbV1

Quatre paramètres ont été choisis pour l'optimisation de la production d'endoglucanases en utilisant le Box-Behnken design (BBD) (Box et Behnken, 1960) à partir de la souche BbV1 à savoir, la température (X1), l'humidité (X2), le temps d'incubation (X3) et la charge de l'inoculum (X4). Le plan expérimental élaboré consistait en 27 essais et chaque variable sélectionnée est analysée à trois niveaux (-1), (0) et (+1) (tableau X).

L'activité enzymatique ($U\ g^{-1}$ de substrat sec) a été mesurée après la période d'incubation souhaitée comme réponse.

La réponse est modélisée à l'aide de l'équation polynomiale suivante (Eq. (1)) :

$$Y = B_0 + \sum B_i X_i + \sum B_{ii} X_i^2 + \sum B_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Où Y est la réponse prédite (activité endoglucanase), B_0 est le terme d'interception et B_i, B_{ii}, B_{ij} sont respectivement l'effet linéaire, l'effet carré et l'effet d'interaction et X_i est la valeur codée sans dimension des variables indépendantes à l'étude. Cette conception a été utilisée pour optimiser les niveaux de paramètres pour améliorer la production d'enzymes en évaluant les effets principaux, les effets d'interaction et les effets quadratiques. L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences (Goupy, 2006). Le modèle mathématique polynomial développé pour l'optimisation est un modèle de second degré (Quadratique) et la matrice d'expérience du plan Box-Behnken (BBD) est réalisé par le logiciel statistique JPM (version d'essai 6.0). La surface de réponse (RSM) a été conduite pour déterminer les variables de

processus de production de CMC_{Case}. Les valeurs codées et naturelles des quatre paramètres étudiés ont été données dans le tableau IX.

Tableau IX : Les valeurs codées et naturelles des facteurs à différents niveaux de BBD

Facteurs	Symbole codé	Niveaux de facteurs		
		Bas (-1)	Centré (0)	Haut (+1)
•Température (°C)	X ₁	24	26	28
•Humidité (%)	X ₂	60	80	100
• Temps d'incubation (jours)	X ₃	6	8	10
• Charge de l'inoculum (spore/g)	X ₄	10 ⁴	10 ⁵	1.9x10 ⁵

II.4. Caractérisation de l'endoglucanase (CMC_{Case}) partiellement purifiée

II.4.1. Préparation de l'extrait enzymatique

Les propriétés des CMC_{Case} des trois souches sélectionnées, sont étudiées en cultivant les souches dans les conditions optimales dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu à base de paille de blé. L'extrait enzymatique issu de cette fermentation est centrifugé à 10000 g pendant 15 min. Le surnageant qui constitue l'extrait enzymatique brut est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

II.4.2. Purification partielle d'endoglucanase par ultrafiltration

L'extrait enzymatique brut a été concentré par des tubes d'ultrafiltration de 50 ml AMICON 10 KD, permettant une concentration des protéines dont le poids moléculaire varie entre 30 et 90 KD. Le concentrât est obtenu après une centrifugation à 7000 g pendant 30 min.

II.4.2.1. Effet de la température sur l'activité endoglucanase

La température optimale de l'enzyme est déterminée en mesurant l'activité CMC_{Case} à diverses températures : 40.50.60.70.80 et 90 C° à pH 4,8 (Tao et al., 2010). En conservant toutes les autres conditions telles que décrites dans le test standard. La réaction enzymatique est effectuée pendant 30 min (De Almeida et al., 2013).

II.4.2.2. Thermostabilité

L'étude de la stabilité thermique de la CMC_{Case} produite est effectuée à température optimale déterminés précédemment (60°C pour Mtr6, et BAS1 et à 40°C pour BbV1) avec des

prélèvements toutes les 15 min. L'activité résiduelle est déterminée à la température optimale en utilisant le test standard (De Almeida et al., 2013).

II.4.2.3. Effet du pH

L'effet du pH sur la CMCase est déterminé par la mesure des activités enzymatiques à différents

pH : 3,0. 4,0. 4,8. 5,0. 6,0. 7,0. 8,0 et 9,0 avec des tampons à 50mM suivant :

- Le citrate de sodium pour pH de 3,0 à 6,0
- Phosphate de sodium pour pH 6,0 et 7,0
- Tris-HCl pour pH 8,0 et 9,0 (Da Vinha et al., 2011).

II.4.2.4. Affinité vis-à-vis du substrat

L'affinité a été déterminée vis-à-vis de quatre substrats à citer : Cellulose, l'avicel, 4-Nitrophenyl- β -D- glucopyranoside (PNPG) et la carboxyméthyl cellulose (CMC) à une concentration de 2% dans le tampon citrate de sodium 50 mM à pH optimum (4,8) (Lee et al., 2008).

II.4.2.5. Effet d'ions métalliques et réactif chimique EDTA

FeSO₄, MgSO₄, HgSO₄, Na₂SO₄, Ag₂SO₄, ZnSO₄, CuSO₄ ont été testés à une concentration de 5mM. Les ions sont additionnés au mélange réactionnel contenant le CMC à 2%.

L'effet de l'éthylène diamine acétate (EDTA) est recherché dans les mêmes conditions réactionnelles. L'activité relative à 100% est exprimée comme étant l'activité observée en absence des ions métalliques et de réactif chimique.

II.4.3. Analyses statistiques

Les données obtenues ont été analysées statistiquement à l'aide de l'analyse de variance (ANOVA) Graph pad prism 8. Pour toutes les analyses, la différence est considérée comme étant significative lorsque $p < 0,05$

Chapitre III

Résultats et discussion

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Isolement et identification des champignons telluriques

Les travaux de recherche suivants ont été réalisés pour trouver une source potentielle de production d'enzymes d'intérêt industriels chez les champignons. La fiabilité des résultats d'une recherche scientifique dépend d'une bonne réalisation d'échantillonnage, qu'il s'agisse d'isolements à partir du sol ou à partir d'un végétal (**Davet et Rouxel, 1997**). Quarante souches de moisissures ont été isolées de sols riches en matières organiques de deux régions d'Algérie (Mascara à l'Ouest et Bordj Bou Arrerridj à l'Est). Dans cette étude la même densité de souches fongiques a été observée dans les sols des deux sites (20 isolats, qui correspond à 50 % pour chaque région), Mascara (Mtr1, Mtr2, Mtr4, Mtr5, Mtr6, Mtr8, Mtr9, Mtr12, Mtr13, Mtr15, BAS3, BAS4, BAS5, BAS7, BAS9, BAL3, BAL4, BPn1, MFS1, MCL1) et Bordj Bou Arrerridj (Mtr3, Mtr7, Mtr10, Mtr11, Mtr14, Mtr16, BbV1, BAS1, BAS2, BAS6, BAS8, BAS10, BAL1, BAL2, BAL5, MFS2, BPn2, BPn3, MCL2, BCL1). Ce résultat s'explique par une ressemblance entre le climat des deux sites (climat sec). Dans ces conditions, l'activité de l'eau est de 0.65, qui est la limite de la disponibilité en eau pour que les moisissures croissent (**Raimbault, 1983 ; Guiraud, 1998**).

III.1.1. Etude macroscopique et microscopique des isolats

La caractérisation et l'identification des isolats ont été faites à l'échelle du genre, à partir des caractères morphologiques des colonies qui ont été déterminées avec une culture de 5 jours incubée à 25 °C dans la gélose de Pomme de terre Dextrose (PDA). La morphologie des cellules a été complétée par un examen microscopique effectué entre lame et lamelle/scotch des cultures ayant servi à l'étude des caractéristiques culturelles (**Guiraud, 2003**).

Les caractères macroscopiques (l'aspect du mycélium des souches isolées, la surface et la consistance des colonies, ainsi que la présence ou l'absence de pigments) et l'étude microscopique qui porte sur l'observation des structures caractéristiques des souches fongiques isolées (mycélium, conidiophore, conidies, etc.) (tableau X) ont permis de mettre en évidence huit (08) genres de moisissures à savoir *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Culvularia*, *Sarocladium*, avec la dominance du genre *Trichoderma* (40%), *Aspergillus* (22,5%), *Alternaria* (12,5%), *Penicillium* (10%) , *Fusarium* et *Culvularia* (5%), *Cladosporium* et *Sarocladium* (2,5%) (figure13).

Tableau X: Principaux caractères macroscopiques et microscopiques des isolats.

Code des souches	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques	Genre
Mtr1, Mtr2, Mtr3, Mtr4, Mtr5, Mtr6, Mtr7, Mtr8, Mtr9, Mtr10, Mtr11, Mtr12, Mtr13, Mtr14, Mtr15, Mtr16	-Une croissance très rapide et le mycélium envahit facilement le milieu. -Les colonies sont laineuses de couleur blanche au départ, puis apparaissent en vieillissant des touffes verdâtres isolées ou disposées en anneaux concentriques sur le milieu de culture.- Le verso reste incolore.	-Les isolats possèdent des conidiophores avec des ramifications en structure pyramidale et des phialides de forme allongée, cylindrique, ou gonflée -Hyphes cloisonnés -Conidies de couleur verte qui se rassemblent en amas au sommet des phialides, et forment ainsi des fausses têtes.	<i>Trichoderma</i>
BbV1	-Une croissance lente sur PDA. -Les caractéristiques de la colonie étaient cotonneuses, -la couleur du mycélium produit varie du blanc au jaune clair, se transforme en orange pâle avec l'âge et en orange pâle en vue inverse.	-Hyphes cloisonnés et hyalins -Conidiophores constitués de phialides simples ou de courtes branches latérales - Les phialides sont aciculaires et très étroites - leurs conidies sont cylindriques, disposées en têtes gluantes, groupées dans la même lignée.	<i>Sarocladium</i>
BAS1, BAS2, BAS4, BAS5, BAS6, BAS7, BAS8, BAS9, BAS10	-Une croissance rapide. -Un mycélium d'aspect velours formé de courts filaments aériens blancs cotonneux au départ devenant poudreux avec l'apparition de spores de couleurs différentes : brune, verte, jaune ou noires selon les espèces	- Thalle à mycélium cloisonné - Conidiophores nombreux, dressés, non ramifiés, terminés en vésicules - Phialides formés directement sur la vésicule - Conidies en chaînes divergentes - Cellules à paroi épaisse	<i>Aspergillus</i>
BAL1,BAL2, BAL3, BAL4, BAL5	-Une croissance rapide -Les colonies sont duveteuses à laineuse de couleurs blanc-gris au départ, devient rapidement foncé (vert foncé à noire)	- Conidiophores à croissance sympodiale, noirs - Conidies bourgeonnées, en chaînes acropétales, noires, souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement	<i>Alternaria</i>

BAS3, BPn1, BPn2, BPn3	<ul style="list-style-type: none"> -Une croissance rapide -Les colonies sont duveteuses, poudreuses de couleurs verte, grise et jaune -Le revers incolore ou foncé -Le revers est incolore ou foncé. Un pigment diffuse parfois dans la gélose 	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores isolés, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille - Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore - Conidies disposées en longue chaînes, globuleuses, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses 	<i>Penicillium</i>
MFS1, MFS2	<ul style="list-style-type: none"> -Une croissance rapide. -Les colonies sont duveteuses ou cotonneuses de couleurs violet ou lilas et blanche 	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores très ramifiés - Phialides plus ou moins allongées pouvant produire deux types de conidies : des macroconidies fusiformes, des microconidies septées fusiformes ou ovoïdes. 	<i>Fusarium</i>
MCL1, MCL2	<ul style="list-style-type: none"> -Une croissance lente à modérément rapide sur PDA. -Les colonies sont de texture laineuse de couleur blanche au départ puis brun olive -Le verso est foncé 	<ul style="list-style-type: none"> -Conidies pluricellulaires cloisonnées transversalement, disposées en grappes au sommet d'un conidiophore à aspect géniculé -Les spores brunes légèrement incurvées, présentent une cellule centrale plus grosse 	<i>Curvularia</i>
BCL1	<ul style="list-style-type: none"> -Une croissance lente à modérément rapide sur PDA. -Les colonies ont une texture veloutée ou floconneuse de couleur va du vert olive à brun noir très foncé -Le revers est brun noir 	<ul style="list-style-type: none"> -Blastospores uni ou pluricellulaires disposées en chaînes acropètes -La paroi des conidies, de forme généralement elliptique à cylindrique, est lisse 	<i>Cladosporium</i>

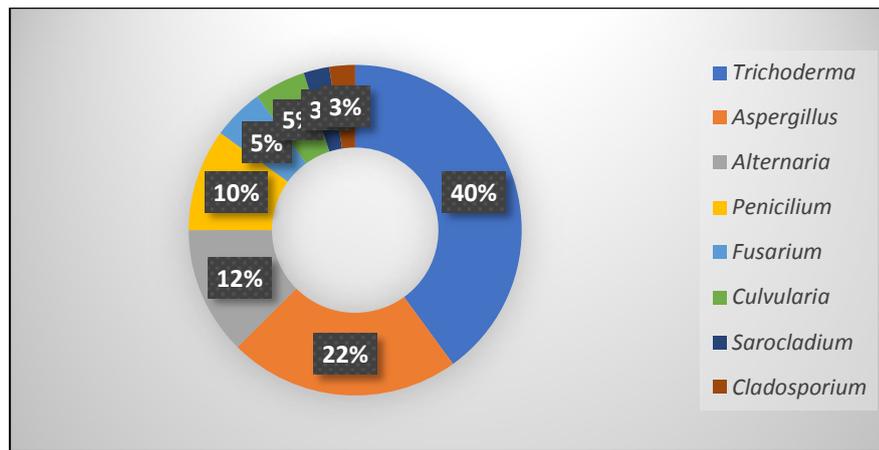


Figure 13. Le pourcentage d'isolats fongiques par genre

III.2. Production des enzymes hydrolytiques extracellulaires

III.2.1. Criblage qualitatif des isolats

Les tests qualitatifs sont des outils puissants et particulièrement utiles pour le criblage d'un grand nombre d'isolats fongiques pour plusieurs classes d'enzymes (**Pointing, 1999**).

Les résultats des essais qualitatifs réalisés sur des milieux solides pour la production d'enzymes hydrolytiques par les 40 isolats fongiques (figure 14) sont présentés dans le tableau XI.

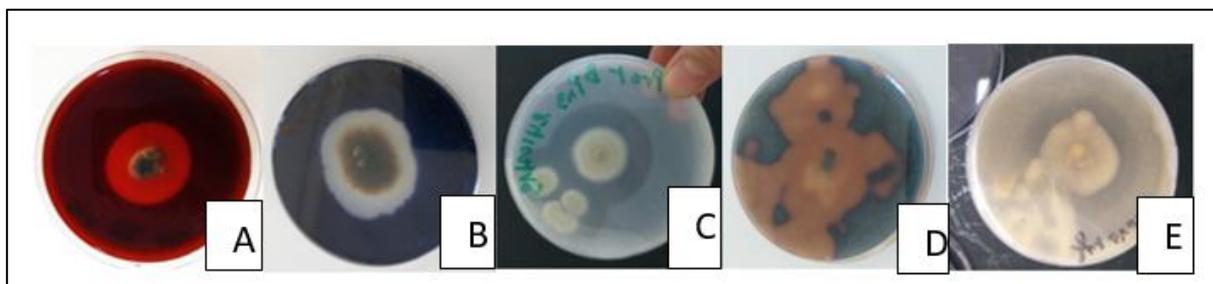


Figure 14. Détection des activités enzymatiques à l'aide de boîtes de Petri contenant des milieux spécifiques. (A) Activité cellulolytique, (B) Activité amylolytique, (C) Activité protéolytique, (D) Activité xylanolytique, (E) Activité kératinolytique.

Les quarante isolats fongiques utilisés dans les tests qualitatifs ont été soumis à des tests d'activités hydrolytiques pour confirmer la production de cellulase, xylanase, amylase, protéase et kératinase. Les résultats montrent l'existence d'une flore fongique plus ou moins variée qui possède une ou plusieurs activités enzymatiques (tableau XI).

Tableau XI : Activité enzymatique d'isolats fongiques sur des milieux solides

Isolat	Activité enzymatique				
	Cellulase	Xylanase	Amylase	Protéase	Kératinase
Mtr1	-	-	-	-	-
Mtr2	++	++	+++	-	-
Mtr3	-	-	-	+	-
Mtr4	+++	+++	+/-	-	-
Mtr5	++	++	-	-	-
Mtr6	+	++	+++	+	-
Mtr7	-	-	-	-	-
Mtr8	+	+	-	+	+
Mtr9	+	+	-	-	-
Mtr10	+	+	-	-	-
Mtr11	++	++	+++	-	-
Mtr12	-	-	-	-	-
Mtr13	-	-	-	-	-
Mtr14	-	-	-	-	-
Mtr15	-	-	-	-	-
Mtr16	+++	+++	-	-	-
BAL1	+++	+/-	-	-	-
BAL2	++	+	+++	+/-	-
BAL3	-	-	-	-	-
BAL4	+	-	-	-	-
BAL5	+++	+++	+++	-	+/-
MFS1	-	-	-	-	-
MFS2	-	-	-	-	-
BbV1	+++	+++	+++	+++	+++
BCL1	+++	+	-	-	-
MCL1	+	+	++	+++	+++
MCL2	+	-	-	-	-
BPn1	+++	+++	+	-	-
BPn2	++	+/-	-	-	-
BPn3	++	+	+++	+++	+++
BAS1	+++	+++	+ /-	+++	++
BAS2	+++	+++	+++	-	-
BAS3	+++	+++	-	+++	++
BAS4	-	-	-	-	-
BAS5	-	-	+/-	-	-
BAS6	-	+/-	-	-	-
BAS7	-	-	-	-	+/-
BAS8	-	+/-	-	-	-
BAS9	-	-	-	-	+/-
BAS10	-	-	+/-	-	-

+++ Forte activité, ++ Activité modérée, + Faible Activité, +/- Activité suspecte, - Pas de zone d'hydrolyse

Parmi les 40 souches isolées, 23 souches ont montré une activité cellulase, 18 souches ont produit de la xylanase, 10 souches ont présenté une activité amylase, 8 sont capables de produire de la protéase, et 6 souches sont positives pour l'activité kératinase. La distribution de la production d'enzymes hydrolytiques parmi les 40 isolats fongiques testés a été présentée par pourcentage dans la figure 15.

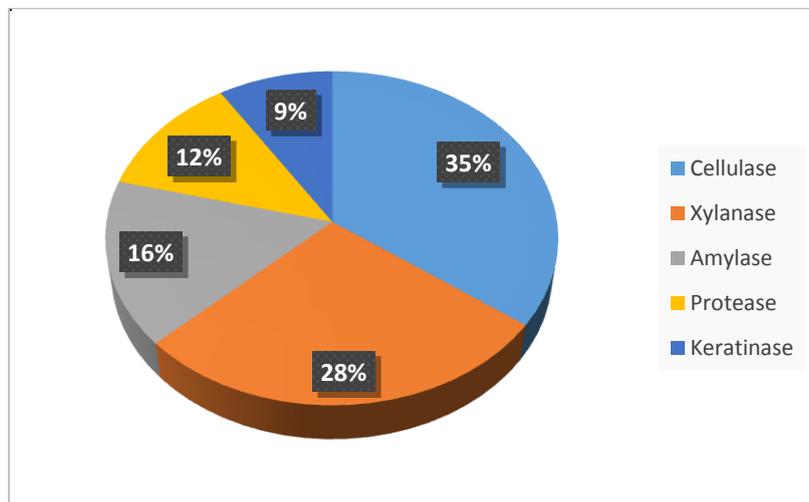


Figure 15. Pourcentage d'isolats fongiques en fonction des activités hydrolytiques.

Les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (**Rahardjo et al., 2006**). La figure 15 confirme que sur 40 souches isolées dans le cadre de ces travaux, 35 % présentaient une activité cellulolytique. Parmi celles-ci, les isolats Mtr4 (*Trichoderma* sp.), Mtr16 (*Trichoderma* sp.), BAL1(*Alternaria* sp.), BAL5 (*Alternaria* sp.), BbV1(*Sarocladium* sp), BCL1(*Cladosporium* sp), Bpn1(*Penicillium* sp), BAS1(*Aspergillus* sp), BAS2 (*Aspergillus* sp) et BAS3(*Aspergillus* sp) présentent une zone d'hydrolyse plus large, ce qui suggère que ces champignons ont une activité cellulase plus élevée que les autres isolats. Mtr2 (*Trichoderma* sp), Mtr5 (*Trichoderma* sp), Mtr11 (*Trichoderma* sp), BAL2 (*Alternaria* sp), Bpn3 (*Penicillium* sp), Bpn2 (*Penicillium* sp) ont une activité modérée et Mtr8 (*Trichoderma* sp), Mtr9 (*Trichoderma* sp), Mtr10 (*Trichoderma* sp), Mtr6 (*Trichoderma* sp), BAL4 (*Alternaria* sp), MCL1(*Culvularia* sp), MCL2 (*Culvularia* sp) ont présenté une faible activité.

Les résultats obtenus confirment la production d'endoglucanases sur milieu solide. L'hydrolyse du CMC semble un bon indicateur du pouvoir cellulolytique ; les réactions positives sont faciles à détecter et évaluer, de ce fait elle est fréquemment utilisée (**Jo et al., 2011 ; Kamsani et al., 2016**). La solution de Lugol a été trouvée meilleure pour révéler la dégradation de CMC (Figure 14A). (**Kasana et al., 2008**).

La production de xylanases extracellulaires se traduit par la formation de zones claires autour des colonies (Figure 14D). Ces zones sont dues à la dégradation du xylane de bouleau par les xylanases. 28 % des isolats ont donné des résultats positifs pour la xylanase : Mtr4 (*Trichoderma* sp), BAL5 (*Alternaria* sp), BbV1 (*Sarocladium* sp), Bpn1 (*Penicillium* sp), BAS1 (*Aspergillus* sp), BAS2 (*Aspergillus* sp), BAS3 (*Aspergillus* sp) présentaient des halos plus importants dans le milieu solide, indiquant une activité xylanolytique plus élevée de ces isolats. Alors que Mtr2 (*Trichoderma* sp), Mtr5 (*Trichoderma* sp), Mtr6 (*Trichoderma* sp), Mtr11 (*Trichoderma* sp) ont une activité modérée et BCL1 (*Cladosporium* sp), BAL2 (*Alternaria* sp), MCL1 (*Culvularia* sp), Bpn3 (*Penicillium* sp), Mtr8 (*Trichoderma* sp), Mtr9 (*Trichoderma* sp), Mtr10 (*Trichoderma* sp) une activité faible.

Le pourcentage d'isolats producteurs d'amylase est de 16 % : Mtr2 (*Trichoderma* sp), Mtr6 (*Trichoderma* sp), Mtr11 (*Trichoderma* sp), Mtr16 (*Trichoderma* sp), BAL2 (*Alternaria* sp), BAL5 (*Alternaria* sp), BbV1 (*Sarocladium* sp), Bpn3 (*Penicillium* sp) et BAS2 (*Aspergillus* sp) ont fourni des halos plus importants que le *Penicillium* sp (Bpn1) qui a une faible activité. En effet, l'iode se combine avec l'amidon, et donne un complexe de coloration bleu foncé plus ou moins intense selon sa concentration. Preuve de la dégradation de l'amidon par l'amylase, les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases (figure 14B). Le diamètre des zones d'hydrolyse, est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante (**Fossi et al., 2005**).

En ce qui concerne la production de protéase, 12 % des isolats ont donné des résultats positifs. Les plus grands halos indiquant une protéase plus élevée sont la souche Bpn3 (*Penicillium* sp), BAS1 (*Aspergillus* sp), BAS3 (*Aspergillus* sp), MCL1 (*Culvularia* sp) et BbV1 (*Sarocladium* sp), suivis par Mtr3 (*Trichoderma* sp), Mtr6 (*Trichoderma* sp), Mtr8 (*Trichoderma* sp) qui ont une faible activité. La zone claire interne indique une protéolyse (Figure 14C), car les protéines du lait (caséines) dans ce milieu sont la seule source d'azote ; la croissance elle-même implique donc la capacité des champignons à digérer les caséines en produisant des enzymes protéolytiques (**Hadda et al., 2015**). L'activité de la kératinase a été vérifiée pour trois isolats : Bpn3 (*Penicillium* sp), MCL1 (*Culvularia* sp) et BbV1 (*Sarocladium* sp) avec une forte activité, suivi de BAS1 (*Aspergillus* sp), BAS3 (*Penicillium* sp) qui ont une activité modérée par rapport à Mtr8 (*Trichoderma* sp) qui a une faible activité. La zone claire sous forme de halos a été visualisée autour de la colonie fongique (**Prathyusha et al., 2015**) indique la dégradation de la kératine (Figure 14E).

Les champignons produisent une variété d'enzymes pour se maintenir en vie, ces enzymes ouvrant d'énormes possibilités devant leurs utilisations industrielles et écologiques

(Hanson, 2008 ; Horgan et Murphy, 2011). La production d'exoenzymes est soumise à plusieurs mécanismes de régulations, dont l'induction enzymatique par un substrat approprié et aussi la répression par les produits cataboliques finaux (Archer et Wood, 1995 ; Kobakhidze et al., 2016). Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures et la plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Compaoré et al., 2016). Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extra cellulaires) ou liées à la paroi (Davet, 1996). Les enzymes fongiques restent toujours les outils clés de la biotechnologie et reflètent de plus en plus l'importance et le rôle infini des moisissures dans les différentes applications alimentaires. Selon Botton et al. (1999), environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique.

III.2.2. Production des enzymes hydrolytiques sur milieu liquide (Fermentation submergée)

Les résultats de la production d'enzymes montrent que la souche *Trichoderma* sp. (Mtr6) a produit un maximum de CMCcase qui est de (5,10 UI/ml), *Penicillium* sp (BAS3) produit un maximum d'activité papier filtre avec (1,94UI/ml), *Alternaria* sp (BAL2) avec une production maximale d'exocelulase de (1,49 UI/ml) (Figure 16A). Pour l'activité xylanase, *Trichoderma* sp (Mtr6) a produit (98,25UI/ML) bien qu'elle ne fasse pas partie des souches qui présentent une zone d'hydrolyse plus importante (Figure16B).

L'activité de la xylanase est élevée par rapport à celle de la cellulase car les hémicelluloses sont les composés polysaccharidiques les plus facilement hydrolysés de la paroi cellulaire végétale (Flannigan, 1970). Par contraste avec la cellulose, les hémicelluloses sont des polymères facilement hydrolysables par voie chimique ou par voie enzymatique (Kumar et al., 2009).

Le terme cellulases fait référence à un groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la cellulose en sucres. Les microorganismes cellulolytiques jouent un rôle important dans la biosphère en recyclant la cellulose, le glucide le plus abondant produit par les plantes (Kasana et al., 2008). Les champignons sont généralement capables de produire des endoglucanases (Cai et al., 1994, Buswell et al., 1996 ; Pointing et al., 1999, Ahlawat et al., 2008).

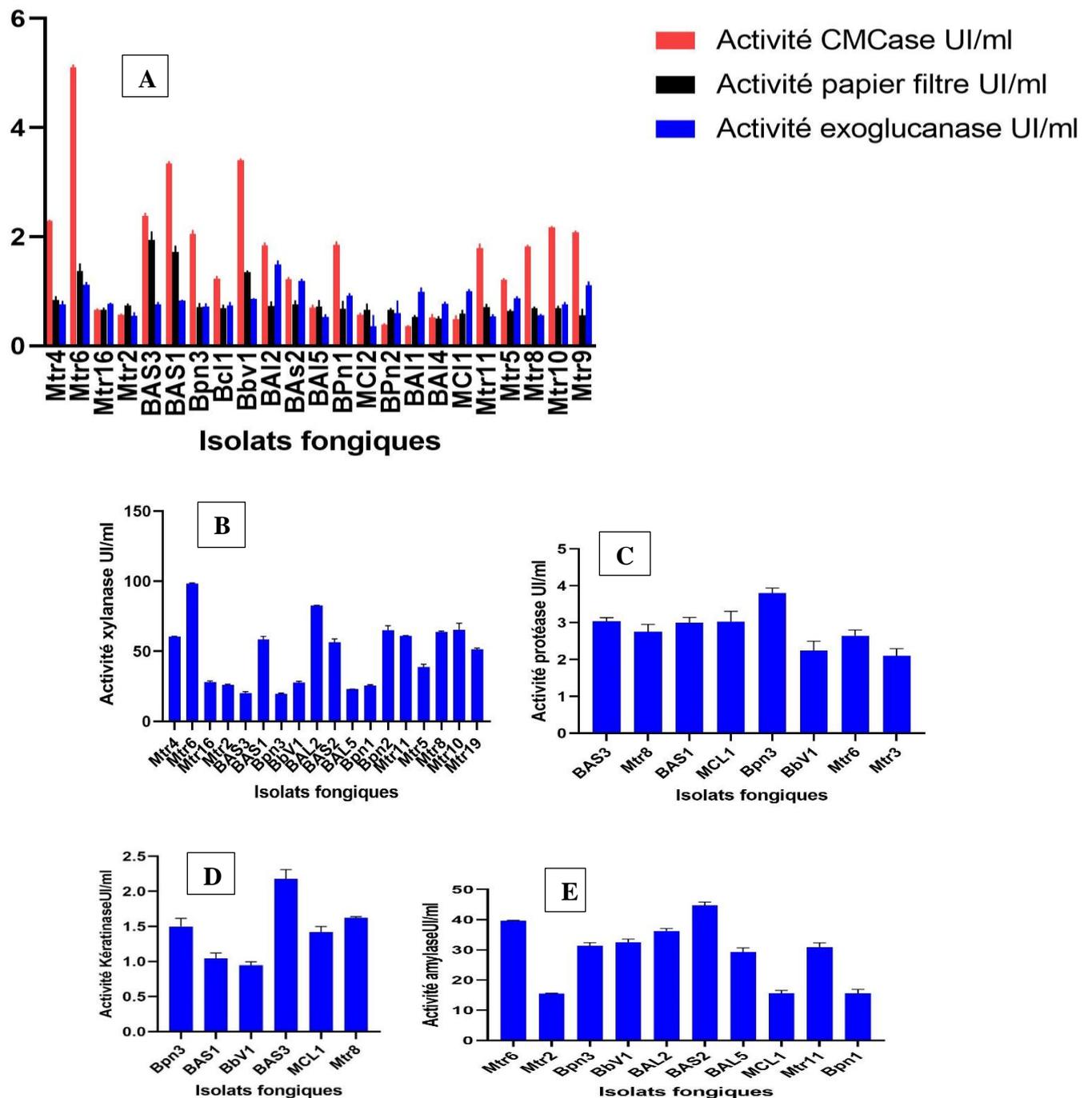


Figure 16. Activités des enzymes extracellulaires des isolats fongiques. **A** (Activités CMCCase, papier filtre et exoglucanase), **B** (Activité xylanase), **C** (Activité protéase), **D** (Activité kératinase), **E** (Activité amylase).

Selon la figure 16A, la valeur moyenne de l'activité enzymatique de l'endoglucanase (EG) est supérieure à celle de l'activité enzymatique de papier filtre (FP-ase). Cela s'explique par le fait que l'enzyme cellulase est un complexe enzymatique composé de plusieurs protéines, telles que l'endoglucanase (CMC-ase), l'exoglucanase et la β -glucosidase (Iqbal *et al.*, 2011). La CMC-ase est une partie du complexe de la cellulase, ce qui permet de tester l'activité enzymatique en utilisant un substrat CMC (carboxyméthylcellulose) plus simple. Ceci est lié à

l'activité enzymatique spécifique entre l'enzyme et son substrat, alors que l'activité enzymatique du papier filtre (FP-ase) présente l'activité totale de la cellulase (**Oberoi et al., 2008**), ainsi, dans le test d'activité enzymatique utilisant le substrat de papier filtre Whatman n°1 qui était plus complexe, parce qu'il impliquait trois composants des enzymes de la cellulase qui nécessitent la synergie des trois complexes enzymatiques pour décomposer la cellulose. L'activité APFase ne corrèle pas toujours avec l'activité CMCase la même remarque a été rapportée par **Mahdi et al. (2011)**.

Les xylanes sont les composés prédominants dans la fraction hémicellulose, elle est dépolymérisée en xylose et autres sucres par les xylanases (E.C. 3.2.1.8) (**Girio et al., 2010 ; Selvam et al., 2014 ; Kandasamy et al., 2016**). D'après la figure 16B, la souche Mtr6 (*Trichoderma* sp) est la plus productrice de xylanase, les champignons de ce genre sécrètent un grand nombre et une variété d'enzymes qui peuvent agir sur les polysaccharides présents dans les parois cellulaires des plantes (**Ang et al., 2015**). Ces enzymes comprennent les cellulases, les hémicellulases, les pectinases, les estérases, les oxydoréductases et les protéases (**Chandra et al., 2010**). Les polysaccharides, en particulier les celluloses et les hémicelluloses, sont très bon marché et facilement disponibles sous forme de déchets industriels, comme le papier et la pâte à papier, l'agriculture, l'alimentation humaine et animale et les déchets municipaux. Dans les pays en voie de développement, ces déchets ne sont pas éliminés ou traités correctement et deviennent la principale cause de pollution de l'environnement (**Dashtban et al., 2009**).

Les moisissures constituent le groupe le plus intéressant à cause de leur taux de production de xylanase élevé (**Bakri, 2003**). *Aspergillus* sp (BAS2) présente une activité amyliase de 44,67 U/ml, révélé être un producteur d'amylase (Figure 16E).

Les amylases (endo-1,4-dglucan glucohydrolase, E.C. 3.2.1.1) sont des enzymes extracellulaires qui coupent de manière aléatoire les liaisons 1,4-D-glucosidiques entre les unités de glucose adjacentes dans la chaîne amylose linéaire (**Goesaert et al., 2009**). Ils représentent 25 % de la production mondiale d'enzymes (**Gurung et al., 2013**) et sont d'une grande importance biotechnologique, étant utilisées dans les industries suivantes : production de sucre isomérisé et de biocarburant à partir d'amidon, applications en boulangerie, industries du textile et du papier, produits pharmaceutiques et détergents (**Tamamura et al., 2014 ; Sahnoun et al., 2015**). Par conséquent, la recherche de nouvelles sources de cette enzyme hydrolytique est apparue comme une approche de recherche intéressante. L'amylase d'origine fongique est plus stable que l'amylase bactérienne (**Amirita et al., 2012**).

De nombreuses souches amylolytiques appartiennent au genre *Aspergillus* sont des enzymes amylolytiques dominantes dans la nature (**Akbarzadeh et al., 2006 ; Sohail et al.,**

2005). Chimata et al. (2010) ont rapporté que l'*Aspergillus* MK07 produisait la plus grande partie de l'amylase après 5 jours d'incubation sur le son de blé. L'activité protéase extracellulaire maximale a été observée chez *Penicillium* sp (Bpn3) avec (3,80 U/ml) (Figure 16C).

Les protéases microbiennes jouent un rôle important dans les processus biotechnologiques et elles représentent environ 60 % du total des enzymes utilisées (**Gupta et al., 2002**). Les protéases sont produites par un large éventail de microorganismes, notamment des bactéries, des champignons et des levures. La protéase fongique est l'une des principales raisons de la grande popularité des champignons dans l'industrie de la fermentation. Elles trouvent des applications dans divers secteurs industriels comme les détergents, l'alimentation, les produits pharmaceutiques, le cuir, les diagnostics, la gestion des déchets et l'argent (**Rao et al., 1998 ; Gupta et al., 2002**).

Les champignons sont une source intéressante de protéases en raison de leur faible encombrement pour la culture et de leur aptitude à la manipulation génétique (**Sandhya et al., 2005**). *Penicillium*, *Aspergillus* et *Rhizopus* sont particulièrement utiles pour produire des protéases. Plusieurs espèces de ces genres sont généralement considérées comme sûres pour la production de cette enzyme (**Devi et al., 2008**).

D'après la figure 16D, l'activité extracellulaire maximale de la kératinase était de 2,18 UI/ml pour le *Penicillium* sp (BAS3). Les kératines, sont des protéines structurelles insolubles de la laine et des plumes et l'un des biopolymères hautement rigides les plus abondants au monde. Elles sont connues pour leur dégradation difficile et leur grande stabilité puisque les polypeptides sont fortement stabilisés et abondamment tassés par des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes (**Brandelli, 2008**). Les kératinases provenant des microorganismes sont également utilisées dans la préparation de suppléments protéiques, de nutriments pour animaux, de cosmétiques, de fabrication de cuir, de traitement des textiles, de formulation de détergents et d'engrais azotés pour les plantes (**Goushterova et al., 2005**).

Selon **Marcondes et al. (2008)**, les genres *Penicillium*, *Sarocladium*, *Aspergillus*, *Culvularia*, *Acremonium*, *Alternaria* et *Paecilomyces* sont les champignons filamenteux les plus connus pour la production de kératinase lorsqu'ils sont cultivés sur des plumes de volaille comme substrat. Seules trois souches (*Penicillium* sp (BPn3), *Culvularia* sp (MCL1) et *Sarocladium* sp (BbV1) ont produit toutes les enzymes étudiées. Dix isolats ne produisaient aucune des enzymes hydrolytiques étudiées : *Trichoderma* sp (Mtr1), *Trichoderma* sp (Mtr7), *Trichoderma* sp (Mtr12), *Trichoderma* sp (Mtr13), *Trichoderma* sp (Mtr14), *Trichoderma* sp (Mtr15), *Alternaria* sp (BAL3), *Fusarium* sp (MFS1), *Fusarium* sp (MFS2) et *Aspergillus* BAS4. Cependant, un résultat négatif ne confirme pas l'incapacité d'une souche à produire l'enzyme. Cela signifie que

le milieu est inadéquat pour la détection de l'enzyme, ou que l'enzyme n'a pas été libérée du mycélium (Chamekh et al., 2019).

III.3. L'enzyme choisie parmi les cinq enzymes hydrolytiques testées

Dans cette étude, 23 souches (35 %), ont montré une activité cellulase parmi les 40 souches isolées à partir de sols riches en matière organique. Sethi et al. (2013) et Soares et al. (2012) ont confirmés que plusieurs microorganismes cellulolytiques ont été isolés dans divers environnements, comme le sol. Les cellulases sont le troisième plus grand produit enzymatique industriel dans le monde, en volume de dollars, mais deviendra certainement le plus grand volume d'enzyme industrielle lors de son utilisation pour la conversion de la biomasse en biocarburants (Singhania, 2010). Les souches isolées, dotées d'un pouvoir enzymatique sont sélectionnées comme étant champignons producteurs d'enzymes. Les souches : *Trichoderma* sp (Mtr6), *Aspergillus* sp (BAS1) et *Sarocladium* sp (BbV1) sont parmi les 23 souches cellulolytiques qui présentent les meilleures activités par rapport aux autres isolats.

III.3.1. Identification des isolats présentant de meilleures activités hydrolytiques

Les champignons filamenteux sélectionnés précédemment après criblage qualitatif et quantitatif de leur activité cellulolytique (Mtr6, BAS1, BbV1) ont subi une identification morphologique (macroscopiques et microscopiques) et une étude moléculaire résumés ci-dessous :

III.3.1.1. Isolat Mtr6

Colonie à Thalle à croissance très rapide, envahissement de la boîte entre le 3ème et le 5ème jour d'incubation à 28°C sur PDA, Les colonies sont floconneuses ou bien compactées en touffes. Le mycélium fongique est apparu blanchâtre au début et s'est transformé en vert pendant la phase de sporulation. Sur le plant microscopique, le mycélium est composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores sont forme conique ou pyramidale, ils sont ramifiés et portent des phialides en forme de flasque ou de quilles. A leurs tours, les phialides portent des spores (figure17).

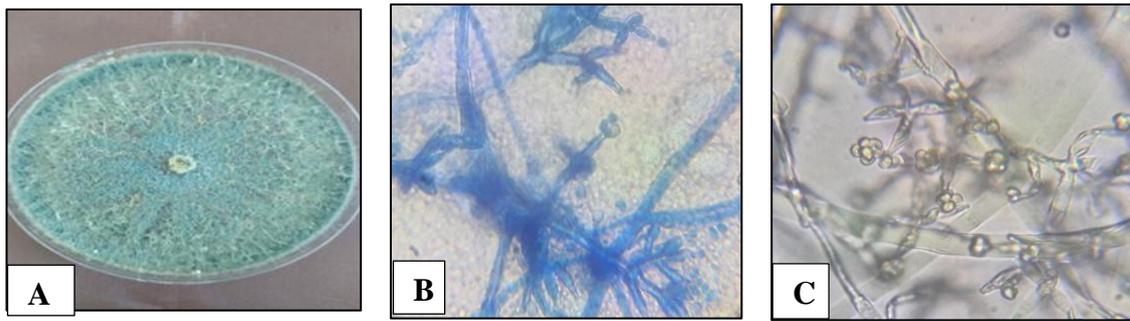


Figure 17. Morphologie de l'isolat Mtr6. (A) : Colonie sur PDA, (B et C) : Aspect microscopique au microscope optique avec le bleu coton (Grossissement x100).

L'identification morphologique a permis d'identifier l'isolat Mtr6 au niveau du genre comme appartenant au genre *Trichoderma*. L'identification au niveau de l'espèce a ensuite été confirmée par l'identification moléculaire. Les gènes séquencés (espaceur transcrit interne ADN_r : 600 pb) et le facteur d'élongation de traduction (EF1- α : 450bp) ont été disposés dans la base de données NCBI/ GenBank par l'utilisation du Programme BLAST et ont montré que l'isolat Mtr6 partageait 99% de similarités avec *Trichoderma afroharzianum* (Figure18). Sur la base de l'identification morphologique et moléculaire, l'isolat Mtr6 a été identifié comme étant *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6.

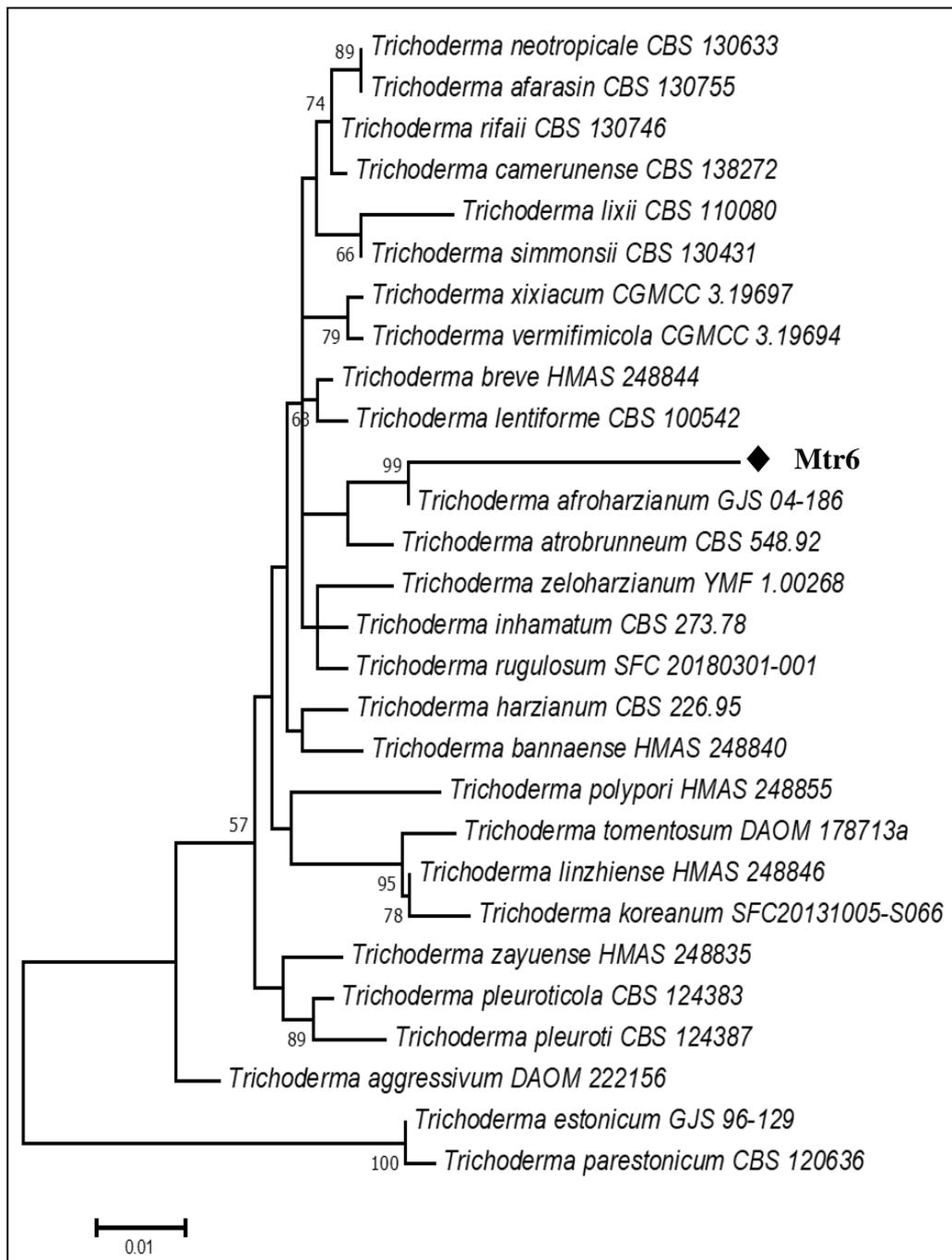


Figure 18. Arbre phylogénétique de l'isolat **Mtr6** généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données des séquences ITS-TEF1. L'arbre est enraciné avec *Trichoderma estonicum* GJS 96-129 et *Trichoderma parestonicum* CBS 120636. Les valeurs maximales du bootstrap $ML \geq 50\%$ sont représentées au niveau des nœuds.

III.3.1.2. Isolat BbV1

Les principaux caractères macroscopiques et microscopiques de l'isolat BbV1 sont présentés dans le tableau X car c'est la seule souche du genre *sarocladium* sp.

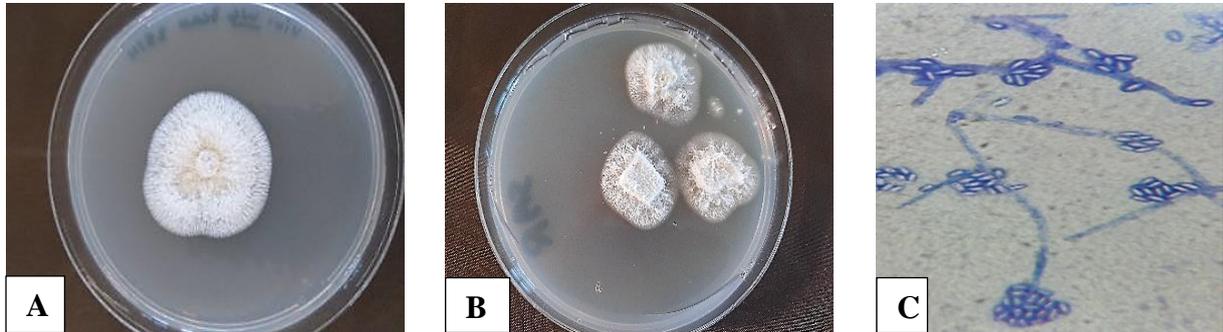


Figure 19. Morphologie de l'isolat BAS1. (A et B) : Colonie sur PDA, (C) : Aspect microscopique au microscope optique par le bleu coton (Grossissement x100).

Le séquençage des différentes régions de l'ADN (ITS, EF1- α et LSU) de l'isolat BbV1 a confirmé l'appartenance de ce dernier au genre *sarocladium* et a permis d'approfondir l'identification jusqu'au niveau de l'espèce. L'arbre concaténé (figure 20) a montré la position taxonomique proche de l'isolat BbV1 avec l'espèce *Sarocladium kiliense*, avec un pourcentage de similarité de 99%.

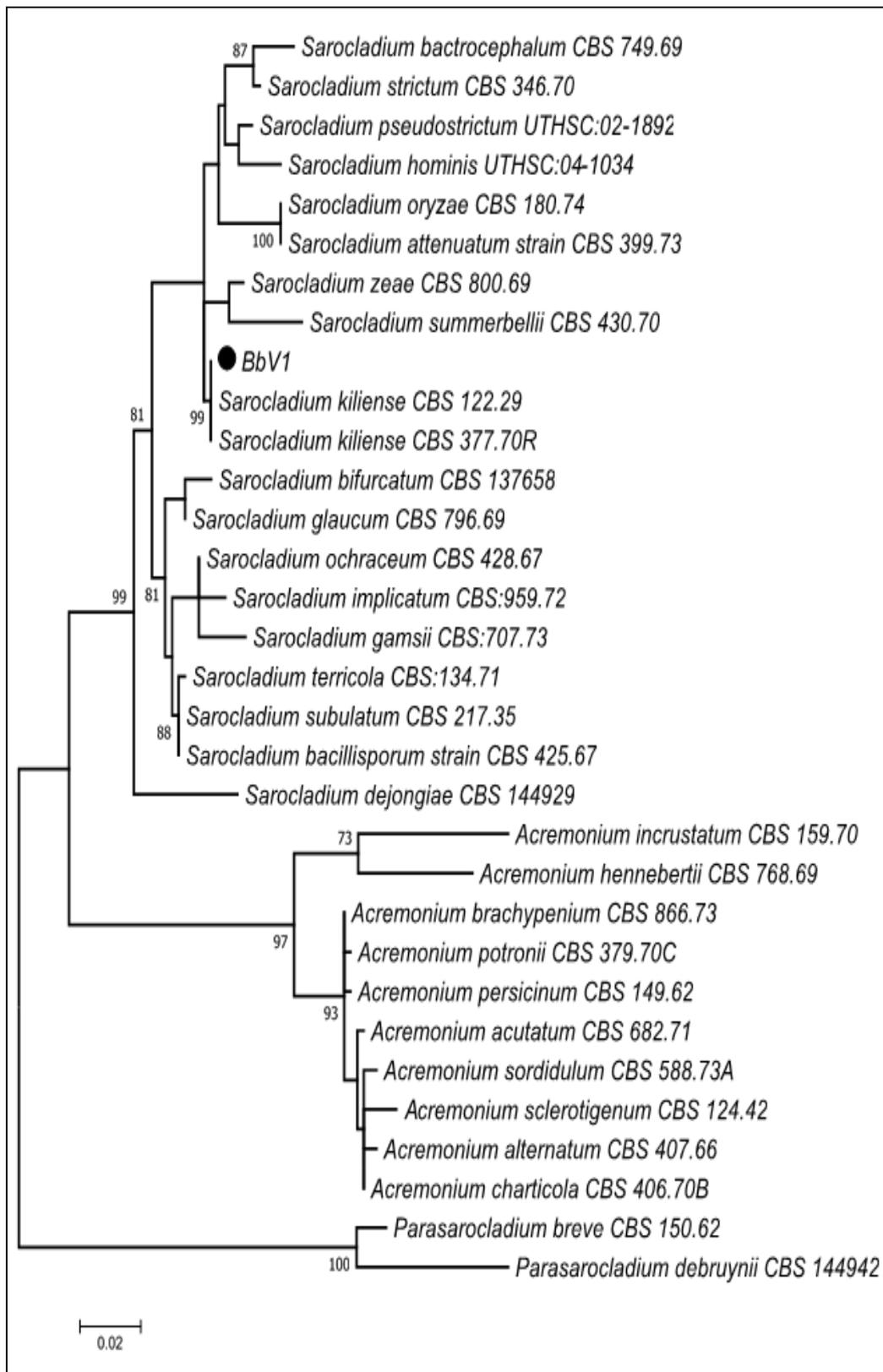


Figure 20. Arbre phylogénétique de l'isolat **BbV1** généré par une analyse de Maximum de Vraisemblance (ML) basée sur le modèle à 2 paramètres de Kimura utilisant MEGA7 pour l'alignement des données de séquences LSU. L'arbre est enraciné avec *Parasarocladium breve* CBS 150.6 et *Parasarocladium debruyinii* CBS 144942. Les valeurs de bootstrap de vraisemblance maximale MLBS \geq 70 % sont données aux nœuds.

III.3.1.3. Isolat BAS1

Colonie caractérisée par une croissance rapide (3 à 5 jours) a température 28°C.

Sur PDA, la couleur des colonies est d'abord blanche, puis jaune, et enfin granuleuses noires tandis que le revers est incolore à jaune pâle. L'aspect microscopique montre un Conidiophore : lisse, hyalin ou brunâtre dans sa moitié supérieure, très long, une vésicule globuleuse, phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule et des conidies globuleuses brunes. La tête aspergillaire est bisériée radiée, noire à maturité.

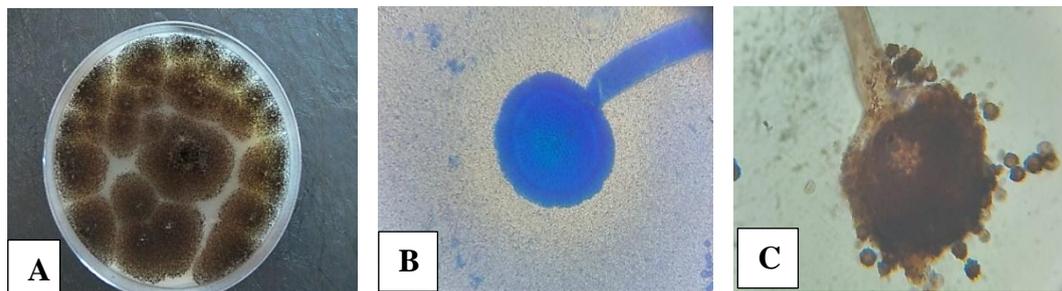


Figure 21. Morphologie de l'isolat BAS1. (A) : Colonie sur PDA, (B et C) : Aspect microscopique au microscope optique par le bleu coton et lugol respectivement (Grossissement x100).

Pour confirmer l'identité du BAS1, nous avons séquencé l'ADN de la région complète du gène de l'ADNr de l'espaceur transcrit interne (ITS) et de la région du gène β -tubuline .

Voici l'arbre phylogénétique généré par la séquence ITS pour l'isolat BAS1.

La qualité de la séquence β -tubuline n'était pas bonne, elle donne un **query cover très faible <7%**.

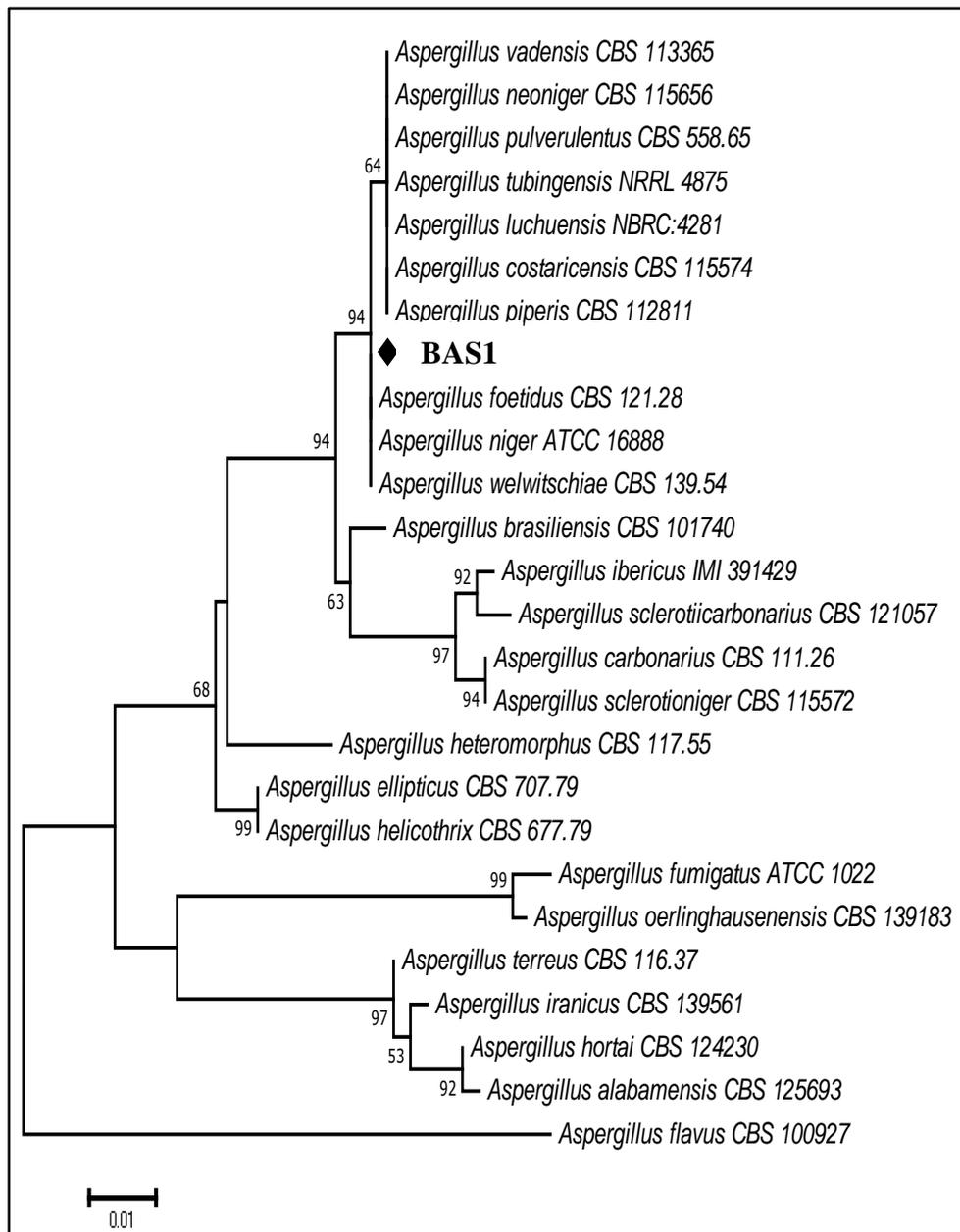


Figure 22. Arbre phylogénétique de l'isolat **BAS1** généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données de la séquence ITS. L'arbre est enraciné avec *Aspergillus flavus* CBS 100927. Les valeurs maximales du bootstrap ML $\geq 50\%$ sont représentées au niveau des nœuds.

Selon l'arbre phylogénétique l'isolat BAS1 fait partie d'un clade regroupant 3 espèces, mais d'après les résultats du blaste il est plus proche à l'espèce *Aspergillus foetidus* CBS 121.28. Cette dernière anciennement considérée comme le synonyme de *Aspergillus niger*.

Les genres fongiques les plus importants ayant fait l'objet d'une grande production de cellulases à usage industriel appartiennent à *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium* (Jung et al. 2015 ; Srivastava et al. 2018). En outre, les isolats d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sont également de grands producteurs de cellulases utilisées dans

l'hydrolyse de la biomasse et la production de biocarburants (**Vaishnav et al. 2018**). Selon **Biswas et al. (2014)** et **Bajaj et Mahajan (2019)**, les cellulases commerciales pour la bioconversion dans les applications industrielles sont produites à partir de champignons filamenteux tels que *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phanerochaete* etc.

Les champignons du genre *Trichoderma* sont les plus étudiés comme producteurs de cellulase (**Hansen et al. 2015, Singhania et al. 2006**). Ce genre a été enregistré comme l'un des plus importants producteurs commerciaux de cellulase et a été largement utilisé dans diverses industries. Ces espèces sont largement répartis dans le monde entier et présents dans presque tous les sols et autres habitats naturels, en particulier dans ceux contenant des matrices organiques et inorganiques (**Montoya et al., 2016**). Ce sont des colonisateurs omniprésents de l'eau cellulosique et peuvent souvent être trouvés partout où des matières végétales en décomposition sont disponibles, ainsi que dans la rhizosphère des plantes, où ils peuvent induire une résistance systémique contre les agents pathogènes (**Atanasova et al., 2013**).

Les cellulases sont des enzymes inductibles qui sont synthétisées par les microorganismes pendant leur croissance sur des matériaux cellulosiques (**Lee et Koo, 2001**). Les recherches sur les cellulases extracellulaires des champignons se sont concentrées principalement sur *Trichoderma* sp et des études sur d'autres champignons mésophiles ont suggéré la possibilité d'utiliser d'autres systèmes cellulasiques pour l'hydrolyse de la cellulose (**Dashtban et al., 2009**). Pratiquement, tous les champignons qui ont été rapportés pour la production de cellulases sont mésophiles et les producteurs de cellulases les plus connus sont *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Acremonium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium solani* et *Chaetomium* sp, entre autres mésophiles (**Kuzmanova et al., 1991 ; Teeri et Koivula, 1995 ; Bhat et Bhat, 1997 ; Schulein, 1997 et Reddy et al., 2014**). L'espèce la plus connue est *Trichoderma harzianum*, espèce largement répandue dans le sol, céréales, papiers, textiles.... etc... (**Botton et al., 1990**).

Selon **Bagewadi et al. (2018)**, la souche *Trichoderma harzianum* HZN11 se multiplie entre le 5^{ème} et le 6^{ème} jour, elle produit des mycéliums ramifiés et des spores bien développées. Le mycélium fongique est blanchâtre au début et s'est transformé en vert pendant la phase de sporulation.

Ces colonies sont floconneuses ou bien compactées en touffes (il existe des aspects intermédiaires). La coloration des colonies dépend de la pigmentation des phialides et le mycelium de substrat est généralement incolore. Sur le plant microscopique, le mycélium est composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores sont sous forme conique ou pyramidale, ils sont ramifiés et portent des phialides en forme de flasque ou de

quilles. A leurs tours, les phialides portent des spores (phialospores ou bien conidies) (**Landreau, 2001 ; Kubicek et al., 2003**). Ces résultats sont similaires à celle de l'isolat Mtr6 de cette étude.

Selon **Bagewadi et al. (2018)**, la souche isolée de *T. harzianum* HZN11 est un excellent producteur de pool cellulolytique requis pour une hydrolyse efficace de la biomasse. Il est intéressant de noter que l'isolat a également produit de la cellobiase en concentrations importantes, ce qui est une caractéristique unique. Habituellement, la cellobiase est déficiente dans la plupart des souches. Le pool de complexe cellulolytique des enzymes produites par cette souche pourraient être économiquement utilisées dans l'hydrolyse de la biomasse pour produire des sucres fermentables. **Iqbal et al. (2010)** ont étudié le potentiel de cette espèce pour l'hyperproduction de la troisième enzyme industrielle la plus demandée, la carboxyméthylcellulase, en utilisant de la paille de blé, un résidu agro-industriel bon marché et facilement disponible, comme substrat de croissance dans une technique de fermentation à l'état solide. (**Iqbal et al., 2010**).

Les *Aspergillus* constituent un groupe de moisissures qui a montré une diversité considérable et une dominance dans la production de métabolites bioactifs comme les antibiotiques et les enzymes. Ces composés ont témoigné d'un grand intérêt par leurs applications aux différents domaines biomédicaux et biotechnologiques (**Prakash et al., 2013**).

Les *Aspergillus* sont connus pour produire une gamme étendue d'enzymes dégradant les parois cellulaires des plantes et l'un des principaux agents microbiens de décomposition et la source la plus courante de la production d'enzymes cellulolytiques (**Sarkar et Aikat, 2014 ; Kumar et al. 2016**). De nombreuses espèces de ce genre ont été identifiées comme possédant tous les composants du complexe cellulase. Selon **Deeijing et Dittamart (2015)**, le champignon *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 a produit la plus forte activité de cellulase. **Pasha et al. (2013)** ont isolé *Aspergillus foetidus* MTCC 10367 de l'industrie alimentaire en Inde. Cet isolat fongique a été criblé pour l'hydrolyse et la dépolymérisation de multiples enzymes d'importance industrielle telles que les pectinases, les cellulases, les protéases, les phytases et les amylases qui ont des applications biotechnologiques pertinentes dans plusieurs domaines industriels. La capacité d'*Aspergillus foetidus* à produire des variétés d'enzymes hydrolytiques et fournit des informations supplémentaires pour soutenir la recherche future sur le potentiel industriel de ces enzymes (**Deeijing et Dittamart 2015**).

Aspergillus niger, espèce dominante des *Aspergillus*, caractérisée par une croissance rapide (2 à 3 jours), la couleur de colonies d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses

noires tandis que le mycelium de substrat est incolores à jaune pâle (**Chabasse et al., 2002**). L'aspect microscopique de ce genre montre un conidiophore : lisse, hyalin ou brunâtre dans sa moitié supérieure, très long, une vésicule globuleuse, phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule et des conidies globuleuses brunes, échinulées à très verruqueuses, souvent disposées en chaînes. La tête aspergillaire est bisériée radiée, noire à maturité (**Chabasse et al., 2002**). BAS1 dans cette étude présente les mêmes caractéristiques. Cette espèce est largement utilisée comme productrice d'enzymes. En outre les *Aspergillus* peuvent cohabiter dans des environnements extrêmes où les conditions de vie sont particulières : température et pression élevées, pH acides et représentent une importante source à exploiter pour développer des procédés biotechnologiques nouveaux (**Bhat, 2000 ; Peciulyte, 2007**).

La production de cellulases par les champignons Ascomycota a été rapportée par *Trichoderma* sp, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp. Cependant, peu de recherches ont été rapportées sur la détection de l'activité cellulase extracellulaire par *Sarocladium* sp (anciennement *Acremonium* sp) (**Fang et al., 2008 ; McDougall et al., 2002**), alors que ces champignons mésophiles ont la capacité de dégrader les polysaccharides tels que la cellulose (**Domsch et al. 1980 ; Baldrian et al., 2011 ; Goldbeck et al., 2012 ; Reddy et al., 2014 ; Tarayre et al., 2015 ; Tasia et al., 2017**).

Les résultats de l'étude macroscopiques et microscopiques pour l'isolat BbV1 sont similaires aux caractéristiques du genre *Sarocladium* (**Pramunadipta et al. 2020 ; Giraldo et al. 2015**) et plus précisément à l'espèce *Sarocladium kiliense* (**Pérez-Cantero et Guarro, 2020**) qui présente des caractéristiques morphologiques particulières permettant son identification par des traits phénotypiques. Plus précisément, ses colonies sont plates à légèrement ridées avec une surface humide et d'un blanc sale à orange pâle ou brun très pâle. Ses conidiophores sont constitués de phialides simples ou de courtes branches latérales portant jusqu'à quatre phialides, souvent issues de brins de corde avec plusieurs hyphes fascinées ensemble. Les phialides sont aciculaires et très étroites tandis que ses conidies sont hyalines, ellipsoïdales à cylindriques et portées sur des têtes gluantes. Selon **Tarayre et al. (2015)** la souche *Sarocladium kiliense*, a montré des activités enzymatiques différentes : β -glucosidase, endo-1,4- β -D-glucanase, endo-1,3- β -D-glucanase, activité FPcellulase et endo-1,4- β -D-xylanase.

III.3.2. Identification moléculaire des champignons par un ensemble commun de marqueurs

Trois problèmes principaux ont été constatés en ce qui concerne les ITS (la région de l'espaceur interne transcrit): le manque de succès de la PCR, l'incapacité d'obtenir des séquences propres en raison de l'hétérogénéité des séquences intra souches entre les copies, et l'absence d'un écart clair entre les régions ITS de certaines espèces proches. Avec la disponibilité croissante de séquences du génome représentant tous les grands groupes de champignons, de meilleures amorces ciblant les régions ITS pourraient être développées pour permettre l'amplification de (pratiquement) tous les champignons afin de surmonter le premier problème. Le deuxième problème peut être surmonté avec les technologies actuelles, soit en clonant d'abord les produits de la PCR avant le séquençage en utilisant l'approche Sanger, soit en utilisant directement les technologies récentes de séquençage de l'ADN (Buée et al., 2009 ; Chen et al., 2016 ; Mark et al., 2016). Un consensus se dessine sur le fait que le TEF1 pourrait être une excellente région secondaire d'identification pour la grande majorité des groupes de champignons afin d'aider à résoudre le troisième problème. Avec l'augmentation des données issues des études génomiques et évolutives de divers champignons, d'autres régions spécifiques aux taxons tels que l'ARNr, nLSU, TOP1, PGK et LNS2 pourraient devenir disponibles et utiles pour compléter les informations sur les taxons lorsque l'ITS et TEF1 sont insuffisants. En raison de leur haut débit, les technologies de séquençage de la prochaine génération seront de plus en plus utilisées et sont particulièrement puissantes pour les études des mycobiomes environnementaux où la richesse des espèces et, dans une moindre mesure, leur abondance relative, peuvent être analysées en même temps. Ces données continueront à fournir des informations sans précédent pour suivre les modèles spatiaux et temporels de la dynamique fongique dans les environnements naturels (Xu et al., 2016).

III.4. Effet des paramètres de fermentation solide sur la production d'endoglucanase en utilisant l'approche OFAT

Les paramètres efficaces pour la production d'endoglucanase par les isolats potentiels *Trichoderma afroharzianum* Mtr6, *Aspergillus* sp. BAS1 et *Sarocladium kiliense* BbV1 en fermentation à l'état solide ont été déterminés en étudiant les variables du processus : le temps d'incubation, la température, la charge de l'inoculum et l'humidité par l'approche OFAT. Les résultats de l'analyse OFAT sont présentés dans la figure 23.

III.4.1. Effet de temps d'incubation sur la production d'enzymes

Comme le montre la figure 23A, la période d'incubation optimale a atteint une activité endoglucanase de $34,27 \pm 0,012$ U/gds à 6 jours d'incubation pour *Trichoderma afroharzianum* Mtr6, *Aspergillus foetidus* BAS1 avec $24,76 \pm 0,002$ U/gds à 7 jours d'incubation, alors que $8,72 \pm 0,014$ U/gds est l'activité maximale de la souche *Sarocladium kiliense* BbV1, obtenue à 8 jours d'incubation ; la production diminue progressivement avec l'extension du temps d'incubation aux 10 ème jours d'incubation. Cela pourrait être dû à la dénaturation de l'enzyme suite à la variation du pH pendant la fermentation, ou à l'effet cumulatif du cellobiose, inhibiteur de l'enzyme CMCCase (Melo et al., 2007). Les résultats de la production de CMCases par *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 et *Aspergillus foetidus*. BAS1 sont similaires à celles obtnues par Akinola et al., (2012) qui a confirmé que la période de fermentation de 6 jours était la meilleure pour la production d'endoglucanase par *Trichoderma harzianum*. Reddy et al., (2015) a prouvé que l'activité maximale des enzymes cellulases ont été signalées au bout de 7 jours d'incubation par *Aspergillus niger*.

A. niger et *Trichoderma* sp. sont les espèces cellulolytiques les plus actives au cours de différentes périodes d'incubation. Pour atteindre le pic d'activité de la cellulase par ces isolats, le temps d'incubation était de 4 et 6 jours respectivement, ce qui convenait au point de vue commercial (Kang et al.,2004).

III.4.2. Effet de la température sur la production d'enzymes

De nombreux travaux ont fait état de températures différentes pour une production maximale de cellulase soit en flacon, soit en fermenteur, utilisant *Trichoderma* sp. Suggérant que la température optimale pour la production de cellulase dépend également du type du micro-organisme (Suto et Tomito, 2001 ; Liu et al., 2003).

L'activité endoglucanase maximale des souches *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1et *Sarocladium kiliense*. BbV1 sur la paille de blé ont été obtenue à 24°C, 28°C et 26°C respectivement avec $25,65 \pm 0,001$ U/gds (Mtr6), $29,73 \pm 0,006$ U/gds (BAS1) et $11,77 \pm 0,008$ U/gds (BbV1) (figure 23B). Ces résultats sont similaires à celles obtenues par Rubeena et al. (2013) et Ajijolakewu et al. (2016), avec une activité maximale de l'endoglucanase à 28°C pour *Aspergillus niger* en utilisant la paille de blé et le son de blé comme source de carbone (Jecu, 2000), et 26°C pour *Trichoderma asperillum* respectivement. Les résultats d'Akinola et al. (2012) ont confirmé que quelques souches de *Trichoderma harzianum* ont produit une endoglucanase maximale à une température de 25 °C.

La température d'incubation est un facteur important affectant la production d'enzyme en FMS. La température optimale dans une gamme de 25-30 °C ont été rapportés pour la production de cellulase dans divers champignons (**Gautam et al., 2011 ; Singhania et al., 2006**).

Selon **Bansal et al. (2012)**, les rendements les plus élevés de CMCCase ($297,00 \pm 10,46$ U / gd), ont été obtenus à 30 °C pour *Aspergillus niger* NS-2 et **Hanif et al. (2004)** ont également signalé une augmentation de la production de cellulase d'*Aspergillus niger* jusqu'à 30 °C. L'activité enzymatique de *Trichoderma harzianum* augmente en fonction de l'augmentation de la température, jusqu'à 35 °C, avec une activité maximale de $422 \pm 3,21$ IM / ml / min (**Iqbal et al., 2010**). La température d'incubation de 35°C a également été signalée pour la production maximale de cellulase par *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma reesei* (**Sharma et al., 2014**). Plusieurs auteurs ont rapporté des optima de production à 30°C par *Jonesia denitrificans* BN-13 (**Nawel et al., 2011**) ; 30°C par *Aspergillus niger* (**Javed et al., 2017**) et à 25°C par *Chryseobacterium sp* (**Nkohla et al., 2017**).

Lorsque la température est supérieure à l'optimum, l'activité CMCCase est progressivement réduite probablement en raison de la dénaturation enzymatique vue que les enzymes sont de nature protéique (**Tallapragada et Venkatesh., 2011 ; Harris, 2016**). Dans une étude de **Javed et al. (2006)**, une plage de température allant de 25 à 40 °C a été étudiée et une meilleure croissance d'*Aspergillus niger* et *Trichoderma viride* a été trouvée à 30°C.

III.4.3.Effet de l'humidité sur la production d'enzymes

Afin d'optimiser la teneur en humidité, différents pourcentages d'humidité ont été utilisés, allant de 50 % à 90 % de substrat lignocellulosique de la paille de blé avec un intervalle de 5 %. La présente étude indique que la production maximale d'endoglucanase a été observée à un niveau d'humidité de 90 % pour les trois souches à savoir : *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*.BAS1 et *Sarocladium kiliense*. BbV1 avec $32,96 \pm 0,01$, $23,31 \pm 0,03$ et $12,13 \pm 0,016$ U/gds respectivement (figure 23C).

Ce résultat (90% d'humidité) est proche du résultat obtenu par **Pensupa et al., (2013)**, qui est de 91,1 %. Ce résultat est peut-être dû à la surface élevée lors de l'utilisation de boîtes de Petri avec un taux de chargement relativement faible (2 g de paille de blé en poids sec par boîte de Petri), qui ont permis de surmonter la limitation du transfert d'oxygène. Des teneurs en humidité sont variés d'un substrat à un autre pour un microorganisme particulier (**Chugh et al., 2016**). Il a été signalé qu'un taux d'humidité plus élevé n'était pas favorable à la croissance des champignons en raison de la limitation du transfert d'oxygène au niveau des eaux de surface (**Gao et al., 2008 ; Delabona et al., 2013 ; khanahmadi et al., 2018**).

L'humidité joue également un rôle important dans la croissance des mycètes et la production des enzymes dans les FMS (**khushal, 2003**). L'hydratation est un facteur important qui influence sur le taux de croissance, l'évolution de la germination, la sporulation et le rendement du produit en FMS (**Elshichtawy et al., 2015**).

D'autre part la teneur en humidité inférieure au niveau optimal, réduit le gonflement du substrat qui rend le transfert des nutriments difficile (**Kar et al., 2013; Maan et al., 2016**). La teneur en eau nécessaire pour les cultures est dépendante des souches utilisées, mais sa limite basse serait fixée à 12%, seuil au-delà duquel les activités métaboliques cessent, et sa limite supérieure dépendrait principalement du support et de sa capacité de rétention (mais elle serait de 90% pour les substrats lignocellulosiques) (**Assamoi et al., 2009 ; Smith et al., 1983**). L'augmentation de l'humidité et la disponibilité de l'eau libre provoque une augmentation du taux de croissance, de la production de biomasse et de la biosynthèse d'enzymes (**Lakhtar, 2009**).

La teneur optimale en humidité pour la croissance et l'utilisation du substrat se situe entre 40 et 70% mais dépendait de l'organisme et du substrat utilisé pour la culture. (**Raimbault et Alazard, 1980**).

III.4.4. Effet de la charge de l'inoculum sur la production d'enzymes

Un niveau d'inoculum optimal est nécessaire pour maintenir l'équilibre entre la biomasse proliférée et les nutriments disponibles pour produire le maximum d'enzymes (**Maktar et al., 2013 ; Desai et Iyer, 2017**).

L'effet des concentrations initiales de l'inoculum sur la biosynthèse de CMC_{Case} est donné dans la figure 23D. En étudiant l'effet de différentes concentrations de l'inoculum (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 spores/g de substrat). L'activité maximale de l'endoglucanase est de $20,87 \pm 0,01$ U/gds pour *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 obtenue avec 10^7 spores/g de substrat la même charge d'inoculum que *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 a été enregistrée (10^7) pour *Aspergillus foetidus*. BAS1 avec $23,75 \pm 0,01$ U/gds et $11,82 \pm 0,006$ U/gds a été déterminée à 10^5 spores/g de la concentration d'inoculum pour la souche *Sarocladium kiliense*. BbV1. La sporulation fongique et les activités métaboliques sont fortement influencées par la taille de l'inoculum (**Domingues et al. 2000**). La taille de l'inoculum minimale nécessite plus de temps pour que les cellules puissent se multiplier à un nombre suffisant pour utiliser le substrat et produire puissamment l'enzyme (**Singh et Kaur, 2012 ; Garais et Kumar, 2013**). D'autre part, la diminution du rendement pour une charge au-delà de l'optimum revient aux stress oxydatifs

dans le milieu, en raison de la forte concentration initiale fongique, ou un déséquilibre nutritionnel causé par une énorme croissance entraînant l'autolyse cellulaire (Singh et Kaur, 2012 ; Thomas et al., 2016).

L'optimisation des paramètres de processus pour la production d'endoglucanase FMS en utilisant la paille de blé comme substrat a démontré l'impact de ces paramètres sur le rendement de la production de cette enzyme ainsi que leur nature indépendante dans l'influence de la capacité des souches *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 et *Sarocladium kiliense*. BbV1 à les synthétiser. La diminution de l'activité cellulasique au-delà du pic peut être due aussi à l'arrêt de la croissance et de la production en réponse à l'appauvrissement nutritif du milieu de culture (Santos et al., 2011). Selon Roussos et Raimbault (1982), la diminution de l'activité est due aussi à l'action des protéases libérées à la fin de la culture durant la phase d'autolyse du mycélium entraînant l'hydrolyse et la dénaturation des cellulases.

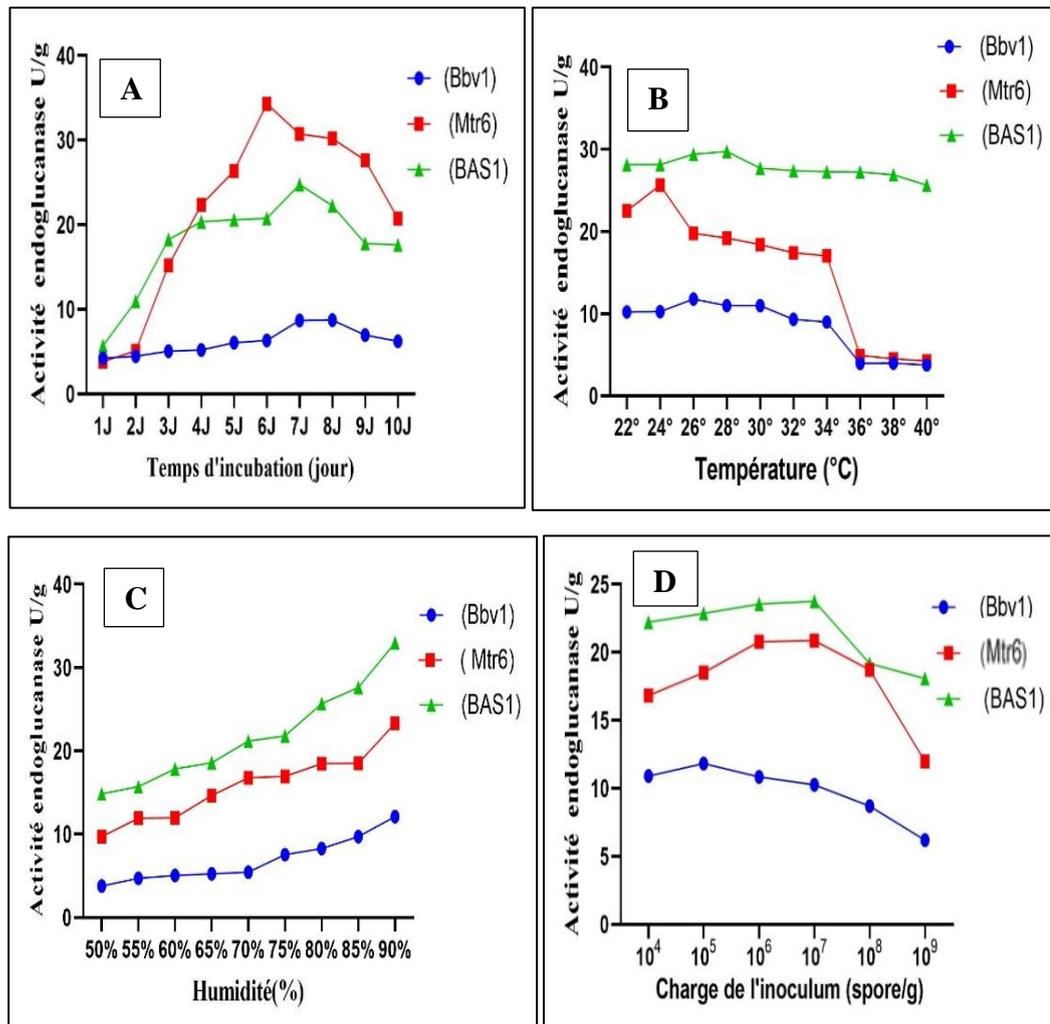


Figure 23 . Résultats de l'analyse de l'OFAT sur la production d'endoglucanase par les souches : *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus sp.* BAS1, *Sarocladium kiliense*.

BbV1. (A) Effet du temps d'incubation ; (B) Effet de la température ; (C) Effet de l'humidité ; (D) Effet de la charge de l'inoculum.

Les conditions de cultures telles que le temps d'incubation, la composition du milieu de fermentation et le genre du microorganisme utilisé, sont des paramètres qui contrôlent l'activité enzymatique ainsi que sa stabilité (Al-jazairi et al., 2015).

La plupart des chercheurs ont utilisé des cultures submergées (Limkar et al., 2019 ; Abdullah et al., 2019 ; Stephen et al., 2020), cela permet de contrôler le degré d'aération, le pH et la température du milieu, et le contrôle des autres facteurs environnementaux nécessaires à la croissance optimale des microorganismes. Ces dernières années, la fermentation à l'état solide a reçu un intérêt renouvelé de la part des chercheurs. Cela est dû à un certain nombre de facteurs économiques et techniques, comme la nature des substrats. Une aération inférieure à celle nécessaire pour les liquides pour éviter une agitation vigoureuse (Rodrigues et al., 2020). En outre, la fermentation submergée présente un inconvénient majeur lié à la faible concentration des produits finaux (Couto et Sanromán, 2005), ce qui nécessite une purification supplémentaire. Les processus supplémentaires en aval nécessaires à la fermentation submergée contribuent à augmenter le coût de production de la cellulase.

La FMS (fermentation en milieu solide) est particulièrement avantageuse pour la production d'enzymes par les champignons filamenteux, car ils peuvent être cultivés en l'absence d'eau libre (Raghavarao et al., 2003). Il a été confirmé que les champignons filamenteux sont de meilleurs producteurs de cellulase sous FMS (Shrestha et al., 2010), conduisant à une productivité enzymatique plus élevée, comparée aux processus FML (Kuhad et al., 2016 ; Farinas et al., 2015 ; Hansen et al., 2015). Un autre avantage de la FMS par rapport à FML est le coût d'exploitation en raison de l'utilisation des déchets agro-industrielle comme substrat solide à faible coût (Bettache et al., 2014). Du point de vue environnemental, l'avantage de la FMS est lié à l'utilisation de résidus agro-industriels comme substrat solide, agissant comme sources de carbone et d'énergie (Hansen et al., 2015). Le choix du milieu pour la production de cellulases peut fortement affecter le rendement, ainsi que le coût du produit final. Le choix le plus économique et le plus respectueux de l'environnement serait d'utiliser les déchets comme substrats contenant à la fois des sources de glucides et d'azote qui peuvent induire une production élevée d'enzymes. Les déchets agricoles et les déchets de bio raffinage en aval offrent de nombreuses possibilités de nouveaux moyens de production à faible coût (Sørensen et al., 2011 ; Sørensen et al., 2014). Du point de vue environnemental, l'avantage de la FMS est lié à l'utilisation de résidus agro-industriels comme substrat solide, agissant comme sources de carbone et d'énergie (Hansen et al., 2015). Cependant il existe une relation directe entre le

substrat, les conditions de fermentation et la production de cellulase (Yoon et al., 2014). En outre, plusieurs études ont été menées sur la production de cellulase sous la fermentation à l'état solide (FMS) de manière rentable (Gupta et al., 2015 ; Kuila et al., 2015 ; Mangalanayaki et Madhavan, 2015).

Afin de permettre une optimisation des processus ainsi qu'une réduction des coûts énergétiques et une amélioration de la sécurité alimentaire et de la qualité des aliments (Minussi et al., 2002), l'utilisation d'enzymes est très recommandée. Les conditions optimales de croissance peuvent varier d'une espèce à l'autre, chacune d'entre elles ayant un degré différent d'adaptation à son environnement (D'Halewyn et al., 2004). Selon Boiron (1996), le développement optimal (croissance et reproduction) des moisissures nécessite la connaissance et le contrôle des facteurs nutritionnels et physicochimiques du milieu de culture.

III.5. Détermination des optima des facteurs sélectionnés par l'utilisation de la méthodologie des surfaces de réponses (RSM) pour *Sarocladium kiliense* (BbV1)

Dans la présente étude, la conception de Box-Behnken a été utilisée pour optimiser la production d'endoglucanase. Le modèle consistant en 27 essais pour déterminer les valeurs optimales exactes et l'effet de quatre paramètres X1 (température °C), X2 (% d'humidité initiale), X3 (temps d'incubation) et X4 (taille de l'inoculum spr/g). L'activité d'endoglucanase de réponse et les résultats expérimentaux obtenus sont présentés dans le tableau XII.

Le plan statistique (RSM) est mis en œuvre pour établir la relation entre les variables et les réponses et pour concevoir les modèles avec un nombre minimum d'expériences (Das et Mishra, 2017), ce qui permet de réduire la consommation de réactifs et de diminuer considérablement le temps de travail au laboratoire. En outre, ces méthodes permettent de développer des modèles mathématiques qui permettent l'évaluation de la pertinence et de la signification statistique des effets des facteurs étant étudiés ainsi évaluer les effets d'interaction entre les facteurs (Rosli et al., 2020).

L'utilisation d'enzymes cellulolytiques a suscité une attention soutenue de la part des chercheurs en tant que stratégie compétitive pour la déconstruction rentable de matériaux cellulosiques largement disponibles. L'amélioration du traitement de la cellulose/xylose est un objectif important, qui implique l'exploitation de biocatalyseurs nouveaux ou meilleurs, avec des modes opérationnels adaptés et une méthodologie de biotraitement optimisée (Bala et Singh, 2019 ; Bugg et al., 2020).

Tableau XII : Plan d'expérience et résultats de RSM pour la production d'endoglucanase à partir de la souche *Sarocladium kiliense* (BbV1) en utilisant la paille de blé comme substrat de fermentation

Procès N°	Code valeur X ₁ X ₂ X ₃ X ₄	Valeur réelle				Y observé (U/gds)	Yprédit (U/gds)	Y résiduel (U/gds)
		X1	X2	X3	X4			
1	+ -00	28	60	8	10 ⁵	7.5	6.73	0.77
2	-00-	24	80	8	10 ⁴	6.08	6.60	-0.52
3	+0-0	28	80	6	10 ⁵	5.27	5.97	-0.70
4	0-+0	26	60	10	10 ⁵	9.15	9.59	-0.44
5	-00+	24	80	8	1.9 10 ⁵	10.75	10.45	0.3
6	--00	24	60	8	10 ⁵	10.31	10.79	-0.48
7	0+0-	26	100	8	10 ⁴	6.22	5.81	0.40
8	0000	26	80	8	10 ⁵	7.97	7.73	0.23
9	0-0-	26	60	8	10 ⁴	6.96	7.14	-0.18
10	00++	26	80	10	1.9 10 ⁵	10.75	10.72	0.03
11	0-0+	26	60	8	1.9 10 ⁵	9.78	10.03	-0.25
12	-0-0	24	80	6	10 ⁵	8	7.86	0.14
13	0++0	26	100	10	10 ⁵	6.87	8.11	-1.24
14	0+0+	26	100	8	1.9 10 ⁵	6.38	6.04	0.33
15	0000	26	80	8	10 ⁵	8	7.73	0.26
16	++00	28	100	8	10 ⁵	7.18	6.19	0.98
17	00—	26	80	6	10 ⁴	7.4	6.93	0.46
18	+0+0	28	80	10	10 ⁵	8.15	8.14	0.01
19	+00-	28	80	8	10 ⁴	6	6.94	-0.94
20	+00+	28	80	8	1.9 10 ⁵	6.09	6.21	-0.12
21	0—0	26	60	6	10 ⁵	9.13	8.53	0.6
22	0000	26	80	8	10 ⁵	7.23	7.73	-0.5
23	00+-	26	80	10	10 ⁴	8	7.21	0.78

24	-+00	24	100	8	10^5	5.75	6.02	-0.27
25	-0+0	24	100	8	10^5	11	10.15	0.85
26	00-+	26	80	6	$1.9 \cdot 10^5$	6.25	6.54	-0.29
27	0+-0	26	100	6	10^5	4.5	4.70	-0.20

Pour identifier l'effet de chaque facteur sur la production d'endoglucanase, la valeur F et les valeurs p ont été utilisées. Le p value des coefficients inférieur à 0,05 indique que la variable correspondante est significative (He et al., 2018). La valeur p a été utilisée comme un outil pour vérifier la signification de chaque coefficient, qui indique également la force de l'interaction entre chaque paramètre indépendant (Liu et al., 2003).

L'analyse de régression de l'étude d'optimisation a indiqué que les termes du modèle, X1, X2, X3, X4 et l'interaction entre les termes (X1, X2), (X1, X4) et (X3, X4) étaient significatifs ($p < 0,05$). Cependant, les effets quadratiques des quatre paramètres étudiés sont statistiquement non significatifs.

Ces résultats d'analyse de variance (ANOVA) indiquent que les quatre paramètres température, humidité initiale, temps d'incubation et taille de l'inoculum ont une relation directe avec la production d'endoglucanase.

L'analyse de la variance (ANOVA) pour la production d'endoglucanase a été effectuée, et les résultats sont présentés dans le tableau XIII. Le résultat de l'ANOVA montre une valeur p de 0,0006 et une valeur F de 7,6484, cette analyse démontre que le modèle est significatif.

Tableau XIII: ANOVA pour le modèle quadratique de surface de réponse

Source	p-value	F-value	Signification
X1	0.0015	16.725	Significatif
X2	0.0001	31.005	Significatif
X3	0.0005	21.840	Significatif
X4	0.0068	10.658	Significatif
X1*X2	0.0247	6.589	Significatif
X1*X3	0.9433	0.005	Non significatif
X2*X3	0.1803	2.024	Non significatif
X1*X4	0.0169	7.688	Significatif
X2*X4	0.1333	2.593	Non significatif
X3*X4	0.0360	5.575	Significatif
X1 ²	0.9973	0.000	Non Significatif
X2 ²	0.4255	0.680	Non Significatif
X3 ²	0.4217	0.692	Non Significatif
X4 ²	0.6262	0.249	Non Significatif
Modèle	0,0006	7,6484	Significatif

Manque d'ajustement	0,2118	4,1024	Non significatif
R ²		0.8992	
R ² Ajusté		0.78	

Selon les résultats obtenus dans le tableau XIII, la valeur de manque d'ajustement est de 4,1024 pour la valeur F et de 0,2118 pour la valeur p. Cela implique que le manque d'ajustement n'est pas significatif par rapport à l'erreur pure. Un manque d'ajustement non significatif indique que le modèle est bien adapté.

Le coefficient de détermination R² s'est avéré être de 0,8992, ce qui indique que la variation de l'échantillon de 89,92 % a été attribuée aux variables. Selon **Dagnelie (2008)**, le R² est un paramètre statistique qui indique la validité du modèle étudié. La mesure de la corrélation et de la signification statistique du modèle par le coefficient de détermination R² égal à 0,899 proche de 1 signifie l'adéquation du modèle (**Yatish et al., 2016**) et indique que 89,9% de la variabilité de la réponse par le modèle, ce qui signifie que seulement 10,1% des variations ne sont pas exprimées par le modèle.

Le coefficient de détermination ajusté (R² ajusté = 0,78%) a également été satisfaisant pour confirmer la signification du modèle. La valeur de R² ajusté confirme que les valeurs réelles sont proches des valeurs prédites (**Pérez-Rodríguez et al., 2014**). Selon la figure 24, les points se sont répartis autour de la ligne de régression. Le modèle peut être considéré comme de qualité suffisante, puisqu'il y a 89,9% de chances qu'il explique les variations mesurées de la réponse.

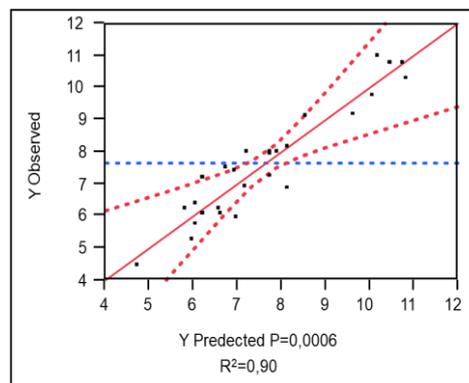


Figure 24. Corrélation entre les valeurs observées et prévues de l'activité endonucléase par le modèle de surface de réponse.

Le modèle peut être présenté comme suit :

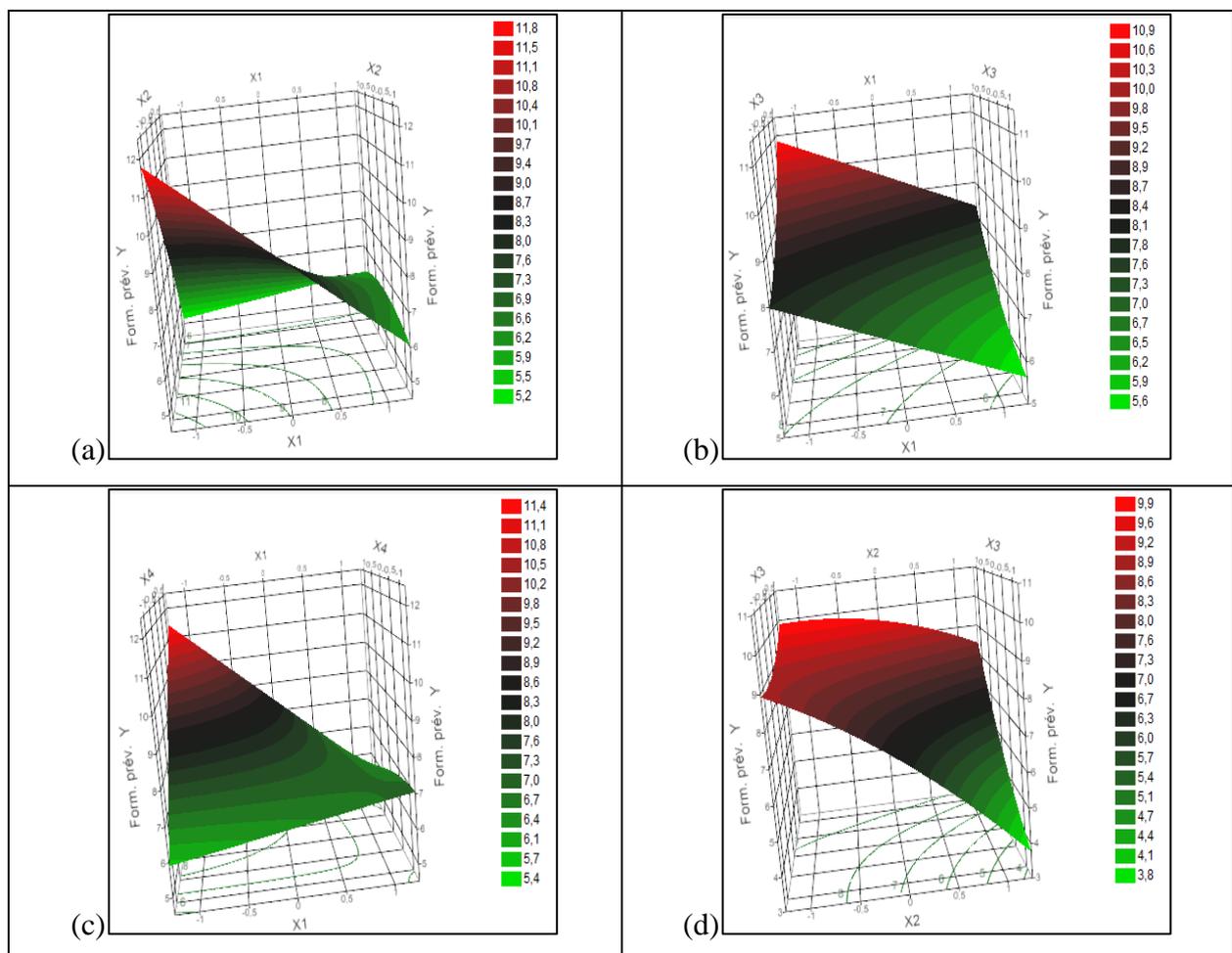
$$Y = 7,733 + 1,114X_3 + 0,778X_4 + 1,06X_1 * X_2 + 0,587X_2 * X_3 + 0,975X_3 * X_4 + 0,297X_3^2$$

Où Y est l'activité endoglucanase prévue et X1, X2, X3 et X4 sont des valeurs codées de la température, de l'humidité initiale, du temps d'incubation et de la concentration de l'inoculum,

respectivement. Le signe positif devant les termes indique un effet synergique, tandis que le signe négatif indique un effet antagoniste sur le produit enzymatique endoglucanase.

III.5.1.Effet d'interaction

Le modèle de prédiction a été présenté sous forme de graphes de surface de réponse (figure 25), afin de mieux comprendre les effets de l'interaction sur la production d'endoglucanase. Une optimisation valide de la production d'enzymes microbiennes est possible grâce à l'implication des graphiques en 3D qui permettent une visualisation directe de l'influence individuelle et interactive des variables (Singh *et al.*, 2014b ; Wang *et al.*, 2011b).



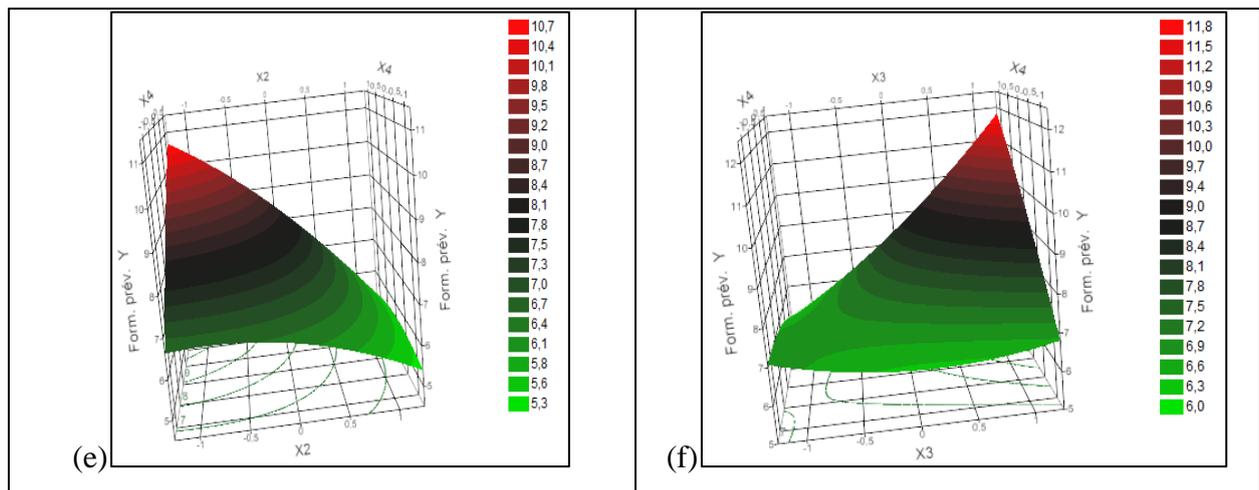


Figure 25 . Surface de réponse de l'interaction du paramètre sur l'activité de l'endoglucanase (U/g ds) : (a) température /humidité ; (b) température / temps d'incubation ; (c) température / taille de l'inoculum ; (d) humidité / temps d'incubation ; (e) humidité / taille de l'inoculum ; (f) temps d'incubation /taille de l'inoculum.

L'analyse de la courbe de surface de réponse indique que l'activité de l'endoglucanase augmente lorsque l'interaction entre les différents paramètres tend vers l'une des extrémités positive (+1) ou négative (-1) (figure25).

Les résultats obtenus montrent que l'interaction entre la température et l'humidité a un effet significatif sur la production d'endoglucanase par la souche *Sarocladium kiliense*. BbV1 avec une valeur p de 0,024 7. Selon les auteurs **Behnam et al. (2019)**, **Brijwani et al. (2010)**, **Ghoshal et al. (2012)**, **Pathania et al. (2017)**, l'interaction entre la température et l'humidité initiale a un effet sur la production d'endoglucanase par les souches *Trichoderma reesei* et *Aspergillus oryzae*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus delemar* F2, *Rhizopus oryzae*, respectivement.

L'interaction entre la température et la taille de l'inoculum a également un effet significatif sur la production d'endoglucanase par la souche *Sarocladium kiliense*. BbV1 avec une valeur p de 0,0169, ce qui confirme les résultats obtenus par **Saravanan et al. (2012)**, qui ont rapporté que le terme d'interaction entre la taille de l'inoculum et la température était significatif dans l'optimisation de la production de cellulase par la souche *Trichoderma reesei*.

D'autre part, l'interaction entre le temps d'incubation et la taille de l'inoculum a un effet significatif sur la production d'endoglucanase par la souche *Sarocladium kiliense*. BbV1 avec une valeur p de 0,0360. **Yasmeen et al. (2013)** ont indiqué que la courbe de niveau prédisait une

forte interaction entre la taille de l'inoculum et le temps d'incubation pour la production d'enzymes par *Schizophyllum commune* par la FMS, avec la tige de maïs comme substrat.

III.5.2. Validation des conditions optimisées

Les conditions optimales proposées par le modèle BBD pour l'activité endoglucanase sont présentées dans la figure 26. La production optimale d'endoglucanase de 15,03 U/gds peut être obtenue lorsque le niveau de code est comme suit : X1 (-1), X2 (-1), X3 (+1) et X4 (+1) ; dans les conditions suivantes : Température de 24°C, humidité initiale de 60%, durée d'incubation de 10 jours et concentration d'inoculum de $1,9 \cdot 10^5$ spr/g respectivement.

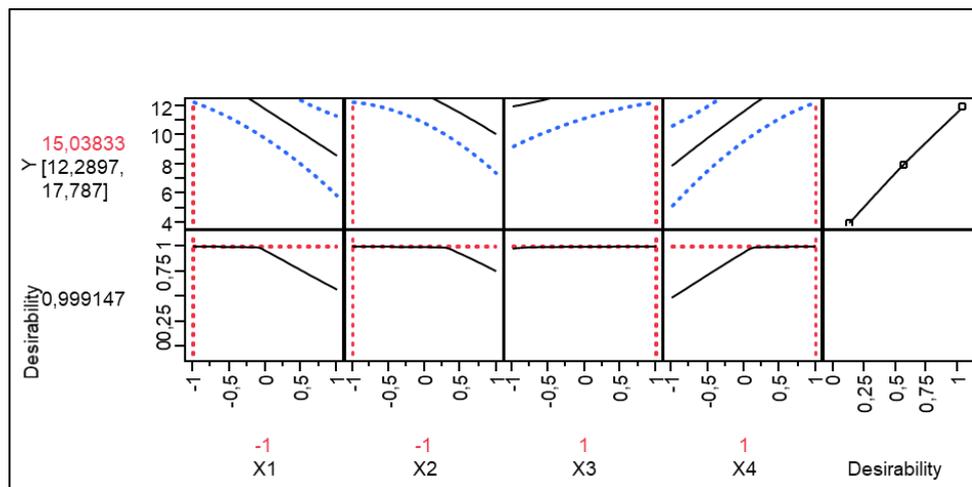


Figure 26 . Représentation du profil de prédiction et de désirabilité maximale.

Les conditions optimales obtenues à partir de RSM ont montré que la production d'endoglucanase par la souche *Sarocladium kiliense*. BbV1 était fortement affectée par les quatre paramètres sélectionnés. Les conditions de culture avec une température de 24°C, 60% d'humidité pendant 10 jours, avec une taille d'inoculum de $1,9 \cdot 10^5$ spr/g montrent une production d'endoglucanase plus élevée par rapport au milieu basal.

L'utilisation de la fermentation à l'état solide à l'aide de la biomasse lignocellulosique et d'inducteurs a contribué à augmenter la production d'enzymes cellulolytiques pour réduire les coûts, en soulignant l'importance d'optimiser le processus de fermentation et la capacité des micro-organismes à exprimer les enzymes (Ahmad et al., 2013 ; Forootanfar et al., 2011 ; Manavalan et al., 2013 ; Osma et al., 2011).

Dans la méthode FMS, le facteur vital est le temps d'incubation car il a un effet important sur la croissance et la biosynthèse du champignon, ainsi que sur la production de divers métabolites primaires et secondaires, tels que les enzymes (Lee et al., 2011 ; Vaithanomsat et al., 2010).

La période d'incubation optimale varie en fonction du type de substrat utilisé et de l'espèce de champignon employée dans le processus de fermentation. Dans notre étude, le temps d'incubation de 10 jours donne une activité endoglucanase plus élevée par la souche *Sarocladium kiliense*. BbV1. La production maximale de CMC_{ase} par *A. niger* a eu lieu après le 8^{ème} jour de fermentation solide (**Pothiraj et al., 2006**).

La température affecte le métabolisme microbien, régule la croissance, la formation de spores, la germination et la formation de produits. À des températures plus basses, les molécules se déplacent plus lentement, les enzymes ne peuvent pas servir de médiateurs aux réactions chimiques. À mesure que la température augmente, les molécules se déplacent plus rapidement, les enzymes accélèrent le métabolisme et les cellules augmentent rapidement en taille. Après une certaine valeur, toutes ces activités se font à un rythme trop élevé, et les enzymes commencent à se dénaturer (**Santos et al., 2016**).

De nombreuses études ont fait état de différentes températures optimales pour la production de cellulase, soit en flacons, soit en fermenteurs, en utilisant les espèces *Aspergillus* sp et *Trichoderma* sp, ce qui suggère que la température optimale pour la production de cellulase dépend du micro-organisme utilisé (**Gautam et al., 2011**). Il est important d'indiquer que l'usine de production de bioéthanol existante utilise des enzymes fongiques pour la dégradation de la biomasse à des températures modérées (**Elleuche et al., 2014**).

Le taux d'humidité optimal pour la croissance et l'utilisation du substrat se situe entre 40 et 70%, en tenant compte de l'organisme et du substrat utilisé (**Raimbault et Alazard ,1980**). Les résultats de ce travail corroborent avec ceux de **Liu et Yang (2007)**, qui ont constatés que l'humidité optimale dans le substrat solide est comprise entre 40 et 60% dans le cas de *Trichoderma koningii* pour la production d'endoglucase avec 10,5 U/gds. **Lee et al. (2011)** ont observé que la teneur en humidité optimale pour la production de cellulase par *Aspergillus niger* en utilisant la bagasse de canne à sucre et le tourteau de palmiste comme substrat était de 70 %, alors que 85% de la teneur en humidité a été jugée appropriée pour une production maximale de xylanase par l'isolat de *Trichoderma afroharzianum* AZ 12 utilisant le son de blé comme substrat (**Azzouz et al., 2020a**).

Une taille d'inoculum plus faible nécessite un temps plus long pour la multiplication fongique et l'utilisation du substrat, tandis qu'une taille d'inoculum plus élevée augmente la densité des spores ainsi que la teneur en eau du milieu, ce qui entrave la pénétration de l'oxygène et inhibe la croissance fongique et la production d'enzymes (**Vu et al., 2011**). Pour la taille de l'inoculum, le résultat optimal obtenu est de $1,9 \times 10^5$ spore/g, entraînant la plus forte activité de CMC_{ase} suggérée par l'optimisation RSM.

III.6. Caractérisation de la CMCase partiellement purifiée

III.6.1. Température et pH optimum

Le contrôle du pH et de la température est essentiel pour la production et la libération de cellulases.

Les effets de la température et du pH sur l'activité de l'endoglucanase des trois souches sélectionnées sont illustrés dans la figure 27. Elle révèle un optimum d'activité similaire pour les deux souches : *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 et *Aspergillus foetidus*. BAS1 avec 60°C et à pH4,8 et un optimum d'activité de la souche *Sarocladium kiliense*. BbV1 à 40°C et pH 5.

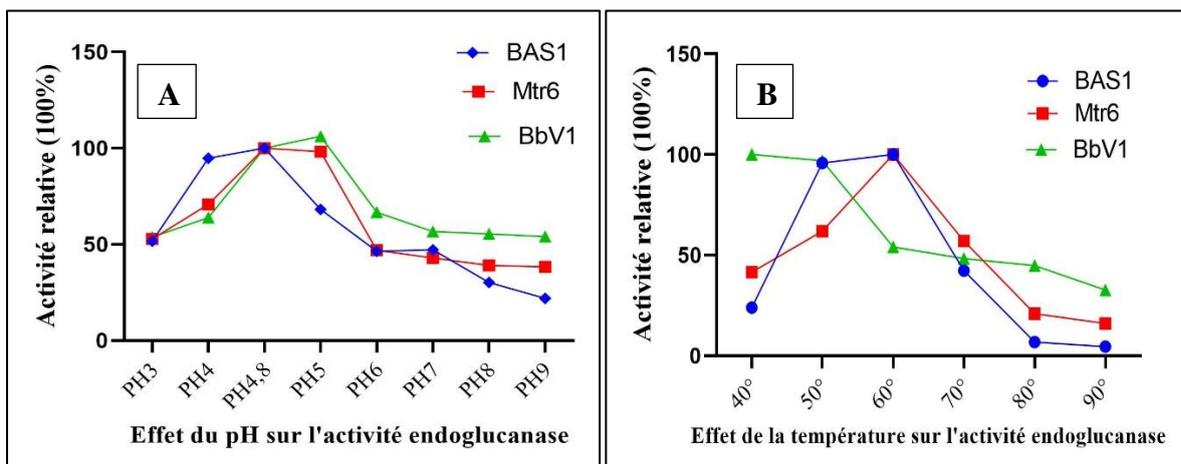


Figure 27. Effet de la température (A) et du pH (B) sur l'activité de l'endoglucanase

En fonction de la température optimale, les enzymes peuvent être classées comme mésophiles (40-60°C), thermophiles (50-80°C) et hyperthermophiles (>80°C) (Maheshwari et al., 2000). Des études ont confirmé que les températures optimales pour les activités des EG de champignons sont généralement entre 50 et 60 °C et stable entre 50 à 55 °C (Tao et al., 2010).

Les résultats rapportés pour *Trichoderma* sp et *Aspergillus* sp ont un optimum de 40-55°C, (Tangarone et al., 1989 ; Kotchoni et al., 2003).

Certains champignons thermophiles tels que *Sporotrichum pulverulentum*, *Aspergillus* (*A. wentii*, *A. versicolor*, *A. terreus*), *Malbranchea cinnamomea*, *Melanocarpus albomyces*, *Myceliophthora thermophila*, *Humicola insolens*, *Chaetomium thermophile* sont également connus pour leurs cellulases activant dans la plage de température de 60 à 65 °C (Ahirwar et al., 2017 ; Mahajan et al., 2016).

Les cellulases fongiques ont une gamme plus limitée, pH de 4 à 6 et une température optimale dans la gamme 40 et 70°C, *Trichoderma* sp (El-Zawahry et al., 2010), *Aspergillus sydowii* (Matkar et al., 2013). Des études ont rapporté des températures optimales de 55°C pour une endoglucanase de *Trichoderma reesei* (Samanta et al., 2012).

Les résultats de pH sont similaires à celles de **Pachauri et al. (2017)** qui ont fait état d'un maximum de pH avec 4,8 pour la cellulase de *Trichoderma longibrachiatum* et supérieur à celles produites par *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma longibrachiatum*, où les pH optimaux des activités CMCCase atteignent 4,5 et 4, respectivement (**Azimova et al., 2016 ; Dobrev et al., 2011**).

L'augmentation du pH par rapport à la valeur optimale de la cellulase a montré une tendance à la baisse de son activité. La raison de cette diminution de l'efficacité attribuable aux valeurs de pH basal revient à influencer les groupes d'acides aminés dans le site actif ou molécule d'enzyme sur l'état ionique du substrat (**Englard et Sifter, 1990**), de plus, les changements de pH peuvent modifier également la forme tridimensionnelle de l'enzyme. Les variations de pH du milieu entraînent la forme ionique du site actif de l'enzyme et modifient l'activité de l'enzyme et donc la vitesse de réaction (**Rajesh et al., 2012**). Une autre raison des faibles variations du pH optima pourrait être dû à la variabilité génétique entre les différentes espèces (**Iqbal et al., 2011**).

Tableau XIV: Comparaison du pH et des températures optimaux de la CMCCase de diverses espèces fongiques

Champignon	pH optimal	Température optimale (°C)	Référence
<i>Sarocladium kiliense</i> . BbV1	5,0	40	Cette étude
<i>Trichoderma afroharzianum</i> . Mtr6	4,8	60	
<i>Aspergillus foetidus</i> . BAS1	4,8	60	
<i>Acremonium sp.</i> EA0810	5,0	70	De Almeida et al. (2011)
<i>Penicillium simplicissimum</i> H-11	3.2	60	Bai et al. (2013)
<i>Penicillium funiculosum</i>	4.0	65	Karboune et al. (2008)
<i>Aspergillus niger</i> VTCC-F021	5	55	Pham et al. (2012)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i> NRRL 18756	5.5	50	Fawzi et Hamdy (2011)
<i>Trichoderma sp.</i>	5.0	50	El-Zawahry et al. (2010)
<i>Trichoderma viride</i>	6.5	55	Iqbal et al. (2011)

<i>Trichoderma harzianum</i> UzCF-28	5	50	Azimova et al. (2020)
<i>Trichoderma</i> sp. IS-05	3.0	60	Andrade et al. (2011)
<i>Aspergillus glaucus</i> XC9	4.0	50	Tao et al. (2010)
Autres CMCase d' <i>Aspergillus</i> sp	4,8	50	(Nazir et al., 2009 ; Elshafei et al., 2009 ; Tao et al., 2010)
<i>Aspergillus Oryzae</i> VTCC-F045	5.5	55	Nguyen et Quyen (2010)

III.6.2. Effet des ions métalliques et de réactif chimique EDTA

L'effet des ions métalliques et les réactifs chimiques sont très importants pour les applications industrielles car ils sont connus pour leurs effets sur la production et l'activité des enzymes (**Rani et al., 2004 ; Kotchoni et al., 2006**). Les ions métalliques agissent comme des cofacteurs ou inhibiteurs des enzymes (**Jabbar et al., 2008**).

Pour obtenir l'effet des ions métalliques (5mM), l'enzyme a été traitée avec différents métaux pendant 30 min à 50 °C. Ensuite, l'activité enzymatique a été déterminée à l'aide d'une procédure standard. Les résultats de l'activité de la cellulase en présence d'ions métalliques sont présentés dans le tableau XV.

Tableau XV : Effet des ions métalliques et de réactif chimique EDTA sur l'activité enzymatique

Ions métalliques et réactif chimique (5mM)	Activité relative (%) <i>Trichoderma afro harzianum. Mtr6</i>	Activité relative (%) <i>Aspergillus foetidus. BAS1</i>	Activité relative (%) <i>Sarocladium kiliense. BbV1</i>
Aucun (controle)	100	100	100
Fe ₂₊ (FeSO ₄)	114,32	111,57	60,23
Mg ₂₊ (MgSO ₄)	62,88	66,68	36,41
Hg ₂₊ (HgSO ₄)	60,93	17,56	31,56
Na ₂₊ (NaSO ₄)	69,13	70,97	41,04
Ag ₂₊ (AgSO ₄)	100,39	47,02	107,11
Zn ₂₊ (ZnSO ₄)	90,36	83,64	39,54
Co ₂₊ (CoSO ₄)	93,22	86,77	48,59
EDTA	129,82	65,09	33,61

Les ions métalliques peuvent influencer fortement l'activité enzymatique, en effet les résultats expérimentaux présentés sur le tableau XV indiquent que l'activité endoglucanase de la

souche *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 montrent que les ions FeSO_4 et Ag_2SO_4 stimulent l'activité enzymatique avec des activités relatives qui sont respectivement de 114,32% et 100,39%, d'un autre côté les autres ions inhibent cette activité avec des proportions variables (Tableau XV).

Pour *Aspergillus foetidus*.BAS1, FeSO_4 stimule l'activité endoglucanase avec une activité relative de 111,57%. Selon **Chen et al. (2001)** Les CMCase d'autres espèces fongiques sont fortement activées par, Fe^{2+} . Par ailleurs, les résultats montrent que l'ion HgSO_4 inhibe l'activité endoglucanase avec une diminution de 17,56%. La présence de Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} diminue ou supprime complètement l'activité de la cellulase (**Gao et al., 2008**). **Yang et al. (2008)** ont démontré que la cellulase produite par *Paecilomyces thermophile* a été fortement inhibée par le Hg^{2+} ; alors que l'activité est fortement renforcée en présence de Zn^{2+} .

L'activité relative d'endoglucanase de la souche *Sarocladium kiliense*. BbV1 en présence d' AgSO_4 est de 107,11%, cela signifie que cet ion stimule l'activité de l'enzyme. D'autre part les autres ions réduisent l'activité enzymatique (Tableau XV). Les CMCase d'autres espèces fongiques sont fortement activées par le Co^{2+} , Mn^{2+} (**Iqbal et al., 2011**), Cu^{2+} , Fe^{2+} (**Pham et al., 2012**), Fe^{2+} (**Chen et al., 2001**), Co^{2+} et Zn^{2+} (**Elshafei et al., 2009**) et principalement inhibée par le Hg^{2+} (**Iqbal et al., 2011 ; Elshafei et al., 2009 ; Gao et al., 2008 ; Akiba et al., 1995**).

Les ions Co^{2+} , Cu^{2+} et Mn^{2+} sont couramment cités dans la littérature comme des inhibiteurs de plusieurs cellulases microbiennes (**Tao et al., 2010 ; Shanmughapriya et al., 2010**). L'activité enzymatique est probablement inhibée par l'attaque de certains groupes au site actif de l'enzyme, par exemple, les groupes thiol, conduisant à l'inactivation de l'activité enzymatique (**Tao et al., 2010**).

Divers ions métalliques et composés chimiques peuvent influencer l'activité de la cellulase. Il a été signalé que généralement les ions métalliques tels que Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Ag^+ , Mn^{2+} , K^+ sont légèrement ou complètement inhibiteurs de la cellulase, alors que les ions métalliques tels que Ca^{2+} , Na^+ et Co^{2+} stimulent l'activité de la cellulase (**Dutta et al., 2008 ; Bagga et al., 1990 ; Nazir et al., 2009**).

Riou et al. (1998) ont étudié l'effet de différents ions sur la cellulase produite par *A. oryzae*, et a constaté que Ag^+ , Hg^{2+} inhibe légèrement ou complètement la cellulase. **Zafar et al. (2014)** ont montré une augmentation de l'activité enzymatique par Mg^{2+} mais l'activité de l'endoglucane a été inhibée par les ions Zn^{2+} , Hg^{2+} et Ni^{2+} .

L'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), peut augmenter, diminuer ou supprimer l'activité enzymatique, en fonction de la nature des enzymes (**Pal et al., 2010**).

D'après les résultats de cette étude, l'EDTA est un activateur de l'activité CMC_{Case} de la souche *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 (129,82%), alors que l'activité CMC_{Case} de la souche *Aspergillus foetidus*.BAS1 et *Sarocladium kiliense*. BbV1 sont réduites (65,09%) et (33,61%) respectivement. L'endoglucanase semi purifiée des souches *Aspergillus* sp.BAS1 et *Sarocladium kiliense*. BbV1 ont été inhibée par l'EDTA. L'inhibition par l'EDTA suggère que l'enzyme est une métalloenzyme (Annamalai et al., 2013).

L'ajout d'EDTA n'a pas d'effet inhibiteur sur l'activité de l'endoglucane semi purifiée de la souche *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 (129,82%), ce qui indique que l'enzyme ne dépend pas des ions métalliques divalents pour son activité.

L'effet de l'EDTA sur l'activité de la CMC_{Case} selon Garg, et al. (1982) n'avait pas d'effet significatif sur l'activité de la CMC_{Case}, ce qui indique que les enzymes produites ne dépendaient pas d'un cofacteur métallique sur son site actif. Le même résultat a été obtenu par Elshafei, et al. (2009) dans une étude utilisant la souche *Aspergillus terreus* DSM 826.

III.6.3. Thermostabilité en présence du substrat

D'après la figure 28 l'endoglucanase semi purifiée a montré une thermostabilité pendant 270 min à 40 °C et pH 5 pour *Sarocladium kiliense*. BbV1 sp, les résultats de température sont similaires à celles de Gorems (2014), qui a montré que la température optimale de la cellulase est de 40°C pour l'isolat de *Trichoderma* AUT1.

En ce qui concerne les souches *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 et *Aspergillus foetidus*. BAS1, la figure 27 montre une thermostabilité pendant 165 min et 90 min respectivement à 60 °C et pH optimal de 4,8.

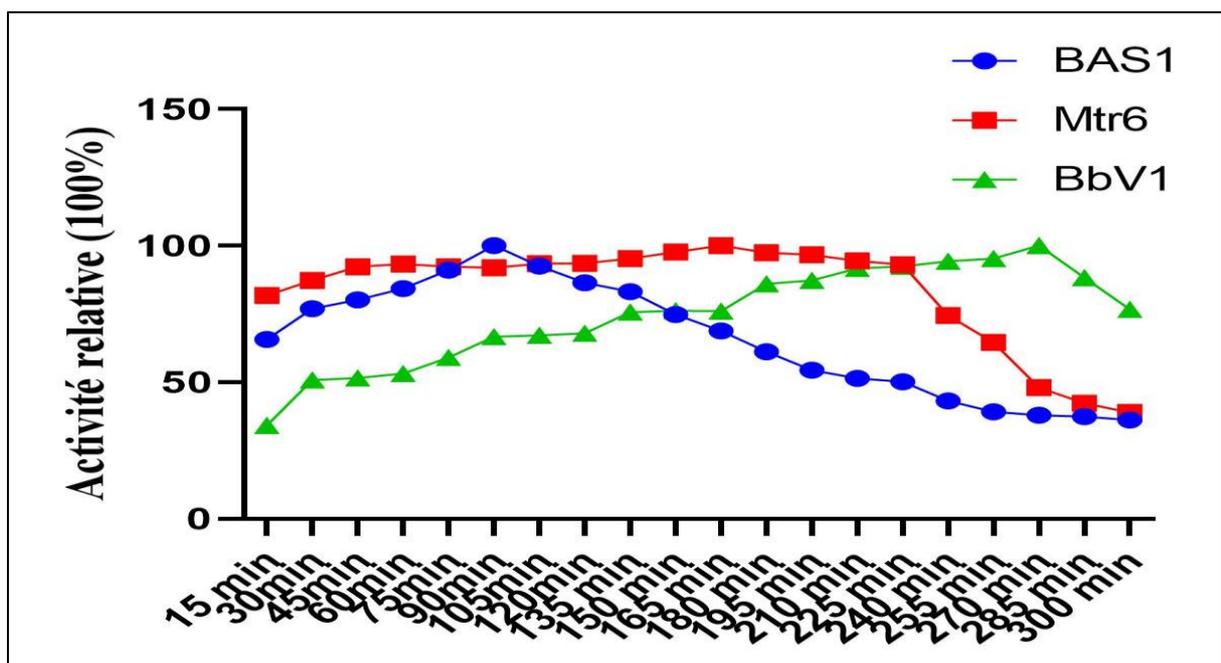


Figure 28. Thermostabilité de l'endoglucanase des trois souches *Trichoderma afroharzianum*.

Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1, *Sarocladium kiliense*. BbV1

Au-delà d'une certaine température, l'activité enzymatique diminue avec l'augmentation de la température en raison de la dénaturation des enzymes (**Rajesh et al., 2012**).

La température pourrait accélérer la réaction, mais l'activité de la cellulase s'estomperait avec l'augmentation de la température.

La structure spatiale de l'enzyme serait détruite dans un environnement acide ou basique, entraînant le changement de conformation et la perte de l'activité enzymatique (**Zeng et al., 2016**).

Elshafei et al. (2009) ont indiqué que l'endoglucane de *A. terreus* DSM826 pouvait supporter un chauffage jusqu'à 50 °C pendant 1 h sans perte apparente d'activité. Certaines enzymes cellulases commerciales ont également été signalées comme étant stables jusqu'à 60 °C (**Immanuel et al., 2007**). Pour toute une série d'applications industrielles, une thermostabilité relativement élevée est un avantage attrayant et caractéristique souhaitable d'une enzyme (**Haddar et al., 2009**).

III.6.4. Spécificité vis-à-vis du substrat

La spécificité de l'endoglucanase semi purifiée est testée vis-à-vis de différents substrats à une concentration de 2% (m/v) : CMC, cellulose, PNPG, et l'avicel

Les résultats (Figure 29) montrent que l'endoglucanase purifiée a plus d'affinité pour le CMC (activité relative de 100%). Pour les trois souches à savoir : *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 et *Sarocladium kiliense*. BbV1. Elle dégrade aussi la cellulose avec une activité relative de 32,80%, 24,77% et 74,02% pour *Trichoderma afroharzianum* Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 et *Sarocladium kiliense* BbV1 respectivement. Ces souches ont une activité relative de 40,55%, 17,40 % et 82,33 % pour l'avicel, concernant le PNPG, l'activité relative est de 14,40%, 6,52% et 40, 50% respectivement.

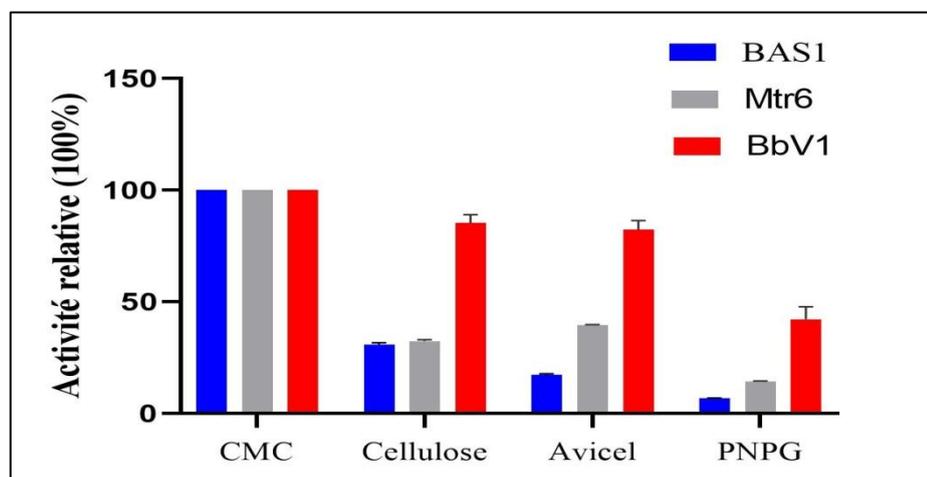


Figure 29. Spécificité des cellulases du surnageant semi purifié vis-à-vis de différents substrats.

Sur la base de la spécificité du substrat et du mode d'action, les cellulases sont classées comme endoglucanases, cellobiohydrolases ou β -Glucosidases (Saini et al., 2015 ; Baja et Mahajan, 2019). L'utilisation d'une variété de polysaccharides confirme que l'enzyme semi purifiée dans la présente étude est une endoglucanase. La nature « endo » de l'endoglucanase est confirmée par son activité élevée sur la carboxyméthyl cellulose et la diminution d'hydrolyse de la cellulose cristalline (Béguin et Aubert, 1994). L'endoglucanase de *Trichoderma reesei* a révélé également une activité hydrolytique sur une large gamme de substrats à savoir le β -glucane, carboxyméthyl cellulose, hydroxyéthylcellulose, xylane, méthylumbelliféryl- β -D-cellobioside et méthylumbelliféryl- β -D-lactoside (Takashima et al., 1998). Parmi plusieurs substrats utilisés, CMC s'est avéré être le meilleur inducteur qui a montré la plus haute activité pour l'endoglucanase de *Aspergillus.foetidus* TISTR 3159(Deejing et Dittamart 2015).

Dans la plupart des études, l'endoglucanase avait une forte activité d'hydrolyse de la CMC-Na (Karnchanatat et al., 2008 ; Iqbal et al., 2011 ; Pham et al., 2012).

D'après les résultats obtenus, la souche *Sarocladium kiliense*. BbV1 a la capacité de dégradée la cellulose, l'avicel et le PNPG, avec des activités superieur par rapport aux souches *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 et *Aspergillus foetidus*. BAS1.

Le substrat ne sert pas seulement de source de carbone mais produit également les composés inducteurs nécessaires à l'organisme (Haltrich et al., 1996). Il a été signalé que l'activité de l'endoglucanase était réprimée par le glucose et induite par le CMC (Ahmed et al., 2005). Lucas et al. (2001) ont démontré que la CMC était le substrat préféré pour la production d'endoglucanase.

Conclusion et perspectives

L'accumulation des déchets solides municipaux devient un problème grave pour l'environnement dans tous les pays en développement. La dépollution et la valorisation de ces déchets nécessite la transition vers l'exploitation des énergies renouvelables qui devenue un objectif indispensable pour le gouvernement Algérien.

La 1ère partie expérimentale a concerné l'isolement, l'identification et le criblage de souches fongiques isolées du sol Algérien riche en matière organique pour la production d'enzymes hydrolytiques. Quarante souches de champignons filamenteux sont isolées sur milieu PDA dans deux sites. Les souches ont été examinées pour la production d'enzymes extracellulaires telles que les cellulases, les xylanases, l'amylase, la protéase et la kératinase, qui ont poussé sur des milieux spécifiques (activité qualitative) et sous fermentation submergée (activité quantitative). L'ordre des activités enzymatiques trouvées dans cette étude avec le pourcentage pour les microorganismes isolés est : cellulolytique > xylanolytique > amylolytique > protéolytique > kératinytique. Pour les activités cellulase et xylanase, *Trichoderma* sp Mtr6 était la meilleure. *Aspergillus* sp. BAS2 est la souche la plus productrice d'amylase, tandis que les souches produisant le plus de protéase et de kératinase était *Penicillium* sp. Bpn3 et *Penicillium* sp. BAS3 respectivement. D'après ces résultats, les souches *Aspergillus* sp et *Penicillium* sp ont un rôle majeur dans la dégradation de la matière organique. Après le criblage, l'activité endoglucanase a été privilégiée pour compléter ce travail, et cela par les isolats les plus performants à savoir : Mtr6, BAS1 et BbV1.

L'identification de ces champignons filamenteux fait appel, généralement, aux caractères morphologiques. Quand ces caractères s'avèrent inefficaces, la chimiotaxonomie qui regroupe les méthodes chimiques et les méthodes moléculaires peut venir en aide. Il est certain que la technique de PCR est l'un des outils incontournables qui ont fait le succès de l'identification moléculaire des champignons filamenteux. Sur cette base les isolats Mtr6, BAS1 et BbV1 ont été identifiés comme *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 et *Sarocladium kiliense*. BbV1 respectivement.

La deuxième partie expérimentale de ce travail est consacrée sur l'effet des paramètres de fermentation solide (le temps d'incubation, la température, l'humidité et la taille de l'inoculum) sur la production d'endoglucanase (CMCase) en utilisant la méthode d'une variable à la fois (OFAT) avec l'utilisation de la paille de blé comme substrat. Les souches *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 et *Sarocladium kiliense*. BbV1 sont choisies pour leurs performances à produire cette enzyme, l'optimum de paramètres de fermentation

solide sont respectivement : (6 jours, 90%, 24°C et 10^7 spores/g), (7 jours, 90%, 28 °C et 10^7 spores/g), (8 jours, 90%, 26 °C et 10^5 spores/g) respectivement.

En outre, la méthode de surface de réponse (RSM) par la souche *Sarocladium kiliense*. BbV1 a été utilisé dans la troisième partie expérimentale de ce travail dont le but de maximisé le rendement d'endoglucanase et de réduire le nombre d'expérience à réaliser en optimisant les facteurs suivants : temps d'incubation, température, humidité initiale et taille de l'inoculum. Et en se basant sur la conception Box-Bencken, dans le cadre d'une fermentation à l'état solide (FMS) utilisant de la paille de blé comme substrat de fermentation. La validation du modèle a permis d'obtenir une activité endoglucanase maximale de 15,03U/gds avec les paramètres optimisés suivants : 10 jours d'incubation, 60% d'humidité initiale, 24°C de température d'incubation et $1,9 \cdot 10^5$ spores/g d'inoculum.

Enfin, dans la quatrième partie de ce travail de recherche, nous avons procédé à la semi purification et la caractérisation physicochimique de l'endoglucanase produite par les trois souches : *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 et *Sarocladium kiliense*. BbV1. Elle révèle un pH et une température optimale de 4,8 et 60 °C pour les deux souches : *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 et *Aspergillus foetidus*. BAS1 et un optimum d'activité de la souche *Sarocladium kiliense*. BbV1 à 5 et 40°C. Par ailleurs, à 5 mM, les ions FeSO_4 et Ag_2SO_4 augmentent l'activité endoglucanase de *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, avec des activités relatives qui sont respectivement 114,32% et 100,39% et l'ajout de l'EDTA n'a pas d'effet inhibiteur sur l'activité de l'endoglucanase semi purifiée (129,82%), ce qui indique que l'enzyme ne dépend pas des ions métalliques divalents pour son activité. La présence de l'ion FeSO_4 stimule l'activité endoglucanase de l'*Aspergillus foetidus*. BAS1 avec une activité relative de 111,57% et l'addition d' Ag_2SO_4 augmente l'activité relative d'endoglucanase de *Sarocladium kiliense*. BbV1 (107,11%), tandis que, l'effet de l'EDTA pour ces deux souches (65,09%) et (33,61%) respectivement inhibe la CMCCase. La thermostabilité révélée stable pendant 165 min et 90 min respectivement à 60 °C et pH optimal 4,8 pour *Trichoderma afroharzianum* Mtr6 et *Aspergillus foetidus*. BAS1 et 270 min à 40 °C et pH 5 pour *Sarocladium kiliense*. BbV1. Les propriétés de thermostabilité et d'activités à pH acide sont recherchées par les industriels. La thermostabilité est en effet un des critères de sélection des enzymes destinées à la biotechnologie. Ces enzymes peuvent remplacer des catalyseurs chimiques dans différents domaines industriels, pharmaceutiques, chimiques, textiles, agroalimentaires et papeteries. L'endoglucanase possède plus d'affinité pour le CMC avec une activité relative de 100% pour les trois souches. Elle dégrade aussi la cellulose avec une activité relative de 32,80%, 24,77% et 74,02% pour *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 et *Sarocladium*

kiliense. BbV1 respectivement. Ces souches ont une activité relative de 40,55%, 17,40 % et 82,33 % pour l'avicel, et pour le pNP, l'activité relative et de 14,40%, 6,52% et 40, 50%.

Afin de poursuivre ce travail et en se basant sur les résultats obtenus, il serait intéressant de fixer les points suivants comme perspectives :

- Rechercher chez les champignons sélectionnés d'autres enzymes d'intérêt, pouvant ouvrir à d'autres applications industrielles.
- D'une manière générale l'étude sera focalisée sur la valorisation des enzymes de sources locales, non seulement celles qui dégradent les polysaccharides mais aussi les polyphénol-oxydases et les peroxydases.
- Elargir l'étude sur d'autres sous-produits afin d'élaborer de nouveaux produits à valeur économique, vu que le CMC commercial est très coûteux.
- Pour une exploitation industrielle, il est nécessaire de réaliser des cinétiques en « Scall Up » (en fermenteur de 20 L, en fermenteur de 50 L: en fermenteur de 100 L) pour s'assurer de la stabilité de l'enzyme en conditions industrielles.
- Mettre en application industrielle la production du bioéthanol.
- Rechercher d'autres activités enzymatiques du complexe lignocellulosique (ligninases).
- Il serait intéressant de réaliser un clonage du gène d'endoglucanase dans *E. coli* pour obtenir des quantités et des activités plus élevées et de réduire ainsi la durée de fermentation.
- Déterminer les gènes potentiels responsables de la synthèse de ces protéines, puis exprimer ces gènes dans des vecteurs appropriés, afin de déterminer les principales propriétés enzymatiques.

Références

- Abdullah, A. L., Tengerdy, R. P., & Murphy, V. G. (1985). Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(1), 20-27.
- Abdullah, R., Akram, S., Iqtedar, M., Kaleem, A., Saleem, F., & Iftikhar, T. (2019). Application of synergistic phenomena for enhanced production of xylanase using fungal consortium under submerged fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(3), 1223-1232.
- Agrawal, M., Pradeep, S., Chandraraj, K., & Gummadi, S. N. (2005). Hydrolysis of starch by amylase from *Bacillus* sp. KCA102: a statistical approach. *Process Biochemistry*, 40(7), 2499-2507.
- Ahirwar, S., Soni, H., Prajapati, B. P., & Kango, N. (2017). Isolation and screening of thermophilic and thermotolerant fungi for production of hemicellulases from heated environments. *Mycology*, 8(3), 125-134.
- Ahrawat, O. P., Gupta, P., Dhar, B. L., Sagar, T. G., Rajendranath, R., & Rathnam, K. (2008). Profile of the extracellular lignocellulolytic enzymes activities as a tool to select the promising strains of *Volvariella volvacea* (Bull. ex Fr.) sing. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), 389-396.
- Ahmad, W., Tayyab, M., Aftab, M. N., Hashmi, A. S., Ahmad, M. D., Firyal, S., ... & Awan, A. R. (2020). Optimization of conditions for the higher-level production of protease: Characterization of protease from *Geobacillus* SBS-4S. *Waste and Biomass Valorization*, 1-11.
- Ahmad, Z., Butt, M. S., & Riaz, M. (2013). Partial Purification and Characterization of Xylanase produced from *Aspergillus niger* using Wheat Bran. *Pakistan Journal of Agriculture Science, Faisalabad*, 50(3), 433-437.
- Ahmed, S., Aslam, N., Latif, F., Rajoka, M. I., & Jamil, A. (2005). Molecular cloning of cellulase genes from *Trichoderma harzianum*. *Frontiers in Natural Product Chemistry*, 1(1), 73-75.
- Ajijolakewu, K. A., Leh, C. P., AbduLLah, W. N. W., & Lee, C. K. (2016). Assessment of the effect of easily-metabolised carbon supplements on xylanase production by newly isolated *Trichoderma asperellum* USM SD4 cultivated on oil palm empty fruit bunches. *BioResources*, 11(4), 9611-9627.
- Akbarzadeh, A., Norouzi, D., Schärer, J., & Young, M. (2006). Fungal glucoamylases. *Biotechnology Advances*, 24(1), 80-85.
- Akbi, A., Saber, M., Aziza, M., & Yassaa, N. (2017). An overview of sustainable bioenergy potential in Algeria. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72, 240-245.
- Akiba, S., Kimura, Y., Yamamoto, K., & Kumagai, H. (1995). Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79(2), 125-130.
- Akbarzadeh, A., Norouzi, D., Schärer, J., & Young, M. (2006). Fungal glucoamylases. *Biotechnology Advances*, 24(1), 80-85.
- Akkaya, B., Yenidunya, A. F., & Akkaya, R. (2012). Production and immobilization of a novel thermoalkalophilic extracellular amylase from bacilli isolate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(4), 991-995.
- Alemdar, A., & Sain, M. (2008). Biocomposites from wheat straw nanofibers: Morphology, thermal and mechanical properties. *Composites Science and Technology*, 68(2), 557-565.

- Al-Jazairi, M., Abou-Ghorra, S., Bakri, Y., & Mustafa, M. (2015).** Optimization of β -galactosidase production by response surface methodology using locally isolated *Kluyveromyces marxianus*. *International Food Research Journal*, 22(4).
- Al-Khatib, I. A., Kontogianni, S., Nabaa, H. A., & Al-Sari, M. I. (2015).** Public perception of hazardousness caused by current trends of municipal solid waste management. *Waste Management*, 36, 323-330.
- Al-Musallam, A. (1980).** Revision of the black *Aspergillus* species. Revision of the black *Aspergillus* species.
- Amirita, A., Sindhu, P., Swetha, J., Vasanthi, N. S., & Kannan, K. P. (2012).** Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. *World Journal of Sciences and Technology*, 2(2), 13-19.
- Anbu, P., Gopinath, S. C. B., Hilda, A., LakshmiPriya, T., & Annadurai, G. (2007).** Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresource Technology*, 98(6), 1298-1303.
- Ando, S., Ishia, H., Kosugi, Y., Ishikawa, K. (2002).** Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(1), 430-433.
- Andrade, J. P., Bispo, A. S. D. R., Marbach, P. A. S., & do Nascimento, R. P. (2011).** Production and partial characterization of cellulases from *Trichoderma* sp. IS-05 isolated from Sandy Coastal plains of Northeast Brazil. *Enzyme Research*, 2011.
- Ang, S. K., Yahya, A., Abd Aziz, S., & Md Salleh, M. (2015).** Isolation, screening, and identification of potential cellulolytic and xylanolytic producers for biodegradation of untreated oil palm trunk and its application in saccharification of lemongrass leaves. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(3), 279-305.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Elayaraja, S., & Balasubramanian, T. (2013).** Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 409-415.
- Anwar, Z., Gulfranz, M., & Irshad, M. (2014).** Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163-173.
- Archer, D. B., & Wood, D. A. (1995).** Fungal exoenzymes. In *the Growing Fungus* (pp. 137-162). Springer, Dordrecht.
- Arora, D. K., Elander, R. P., & Mukerji, K. G. (Eds.). (1992).** Fungal biotechnology. New York: Marcel Dekker.
- Assamoi, A. A., Destain, J., & Thonart, P. (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1, 4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(2), 281-294.
- Atanasova, L., Le Crom, S., Gruber, S., Culpier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2013).** Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma mycoparasitism*. *BioMed Central Genomics*, 14(1), 1-15.
- Awad, G. (2005).** Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production de nouveaux métabolites secondaires chez *Aspergillus ochraceus* non producteur de l'ochratoxine A (Doctoral dissertation).

- Azimova, N. S., Khamidov, D. M., Djumagulov, M. B., & Shakirov, Z. S. (2016).** Purification and Some Properties of Endo-1, 4- β -Glucanases of *Trichoderma harzianum* UzCF-28. *Open Journal of Applied Sciences*, 6(08), 514-523.
- Azimova, N. S., Khamidova, K. M., Turaeva, B. I., Karimov, H. K., & Shakirov, Z. S. (2020).** Properties of the cellulase and xylanase enzyme complexes of *Trichoderma harzianum* UzCF-28. *Eurasian Journal of Biosciences*, 14(2), 5803-5808.
- Azzouz, Z., Bettache, A., Boucherba, N., Amghar, Z., & Benallaoua, S. (2020a).** Optimization of xylanase production by newly isolated strain *Trichoderma afroharzianum* isolate az 12 in solid state fermentation using response surface methodology. *Cellulose Chemistry and Technology*, 54(5-6), 451-462.
- Azzouz, Z., Bettache, A., Djinni, I., Boucherba, N., & Benallaoua, S. (2020b).** Biotechnological production and statistical optimization of fungal xylanase by bioconversion of the lignocellulosic biomass residues in solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13.
- Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I., & Ninnekar, H. Z. (2018).** Optimization of endoglucanase production from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 by central composite design under response surface methodology. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 8(2), 305-316.
- Bagga, P. S., Sandhu, D. K., & Sharma, S. (1990).** Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(1), 61-68.
- Bai, H., Wang, H., Junde Sun, M. I., Han, M., Huang, Y., Han, X., & Yang, Q. (2013).** Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 12, 528.
- Bajaj, P., & Mahajan, R. (2019).** Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(21), 8711-8724.
- Baker, R. W. (2000).** Membrane Technology and Applications, McGraw-Hill, New York.
- Bakri, Y., Jacques, P., & Thonart, P. (2003).** Xylanase production by *Penicillium canescens* 10–10c in solid-state fermentation. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 737-748). Humana Press, Totowa, NJ.
- Bala, A., & Singh, B. (2019).** Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels. *Renewable Energy*, 136, 1231-1244.
- Balan, V., Jin, M., Culbertson, A., & Uppugundla, N. (2013).** The saccharification step: *Trichoderma reesei* cellulase hyper producer strains. In *Lignocellulose Conversion* (pp. 65-91). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Baldrian, P., Voříšková, J., Dobiášová, P., Merhautová, V., Lisá, L., & Valášková, V. (2011).** Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Soil*, 338(1), 111-125.
- Bano, A., Chen, X., Prasongsuk, S., Akbar, A., Lotrakul, P., Punnapayak, H., ... & Ali, I. (2019).** Purification and characterization of cellulase from obligate halophilic *Aspergillus flavus* (TISTR 3637) and its prospects for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189(4), 1327-1337.
- Bansal, N., Tewari, R., Soni, R., & Soni, S. K. (2012).** Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*, 32(7), 1341-1346.

- Barnabé, S., Sasseville, J. L., Valero, J., & Tyagi, R. (2003).** Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières ? *Vecteur Environnement*, 36(2), 50-62.
- Barnoud, F. (1980).** Les polymères végétaux ; Polymères pariétaux et alimentaires non azotés : La cellulose.
- Begoude, B. A. D., Lahlali, R., Friel, D., Tondje, P. R., & Jijakli, M. H. (2007).** Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and aw on the growth rate of *Trichoderma asperellum*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 845-854.
- Béguin, P., & Aubert, J. P. (1994).** The biological degradation of cellulose. *Societies Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews*, 13(1), 25-58.
- Behnam, S., Karimi, K., & Khanahmadi, M. (2019).** Cellulase production under solid-state fermentation by ethanolic Zygomycetes fungi: application of response surface methodology. *Nutrition and Food Sciences Research*, 6(1), 27-34.
- Belhamiche, N. A. B. I. L. A., Duchiron, F., & Benallaoua, S. (2011).** Screening of fungal strains producing cellulases by solid fermentation. In *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products* (pp. 4-7).
- Bellon-Maurel, V., Orliac, O., & Christen, P. (2003).** Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*, 38(6), 881-896.
- Bernfeld, P. (1955).** Amylase assays. *Methods in Enzymology*, 1, 149-58.
- Berry, D. R., & Paterson, A. (1990).** Enzymes in the food industry. *Enzyme Chemistry* (pp. 306-351). Springer, Dordrecht.
- Bettache, A., Messis, A., Duchiron, F., & Benallaoua, S. (2014).** Solide-state fermentation technology for bioconversion of lignocellulose. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 4,486-490.
- Bhat, M. (2000).** Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5), 355-383.
- Bhat, M. K., & Bhat, S. (1997).** Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15(3-4), 583-620.
- Bigirimana, V. D. P., Hua, G. K., Nyamangyoku, O. I., & Höfte, M. (2015).** Rice sheath rot: an emerging ubiquitous destructive disease complex. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1066.
- Bissett, J. (1991).** A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2357-2372.
- Bissett J. (2004).** Commentaires de l'adresse internet suivante : http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html.
- Biswas, R., Persad, A., & Bisaria, V. S. (2014).** Production of cellulolytic enzymes. *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*, 1, 105-132.
- Bleichrodt, R., Vinck, A., Krijgheld, P., van Leeuwen, M. R., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. B. (2013).** Cytosolic streaming in vegetative mycelium and aerial structures of *Aspergillus niger*. *Studies in Mycology*, 74, 31-46.
- Boiron, P., & Périlleux, E. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Nathan.
- Bornscheuer, U. T. (2002).** Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews*, 26(1), 73-81.

- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P. 12-426.
- Botton, B., Breton, A., Feve, M., Guy, P., Larpent, J. P., & Veau, P. (1985).** Moisissures nuisibles. Moisissures utiles et nuisibles-Importance industrielle.
- Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Guy, P. H., Larpent, J. P., & Veau, P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2^{ème} édition. Masson, Paris.
- Bouraiou, A., Necaibia, A., Boutasseta, N., Mekhilef, S., Dabou, R., Ziane, A., & Touaba, O. (2020).** Status of renewable energy potential and utilization in Algeria. *Journal of Cleaner Production*, 246, 119011.
- Box, G. E., & Behnken, D. W. (1960).** Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4), 455-475.
- Bozic, N., Ruiz, J., López-Santín, J., & Vujcic, Z. (2011).** Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochemical Engineering Journal*, 53, 203-209.
- Braaksma, M., van den Berg, R. A., van der Werf, M. J., & Punt, P. J. (2010).** A top- down systems biology approach for the identification of targets for fungal strain and process development. *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, 25-35.
- Brakhage, A. A., Jahn, B., & Schmidt, A. (Eds.). (1999).** *Aspergillus fumigatus*: biology, clinical aspects, and molecular approaches to pathogenicity (Vol. 2). Karger Medical and Scientific Publishers.
- Brandelli, A. (2008).** Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food and Bioprocess Technology*, 1(2), 105-116
- Brijwani, K., Oberoi, H. S., & Vadlani, P. V. (2010).** Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, 45(1), 120-128.
- Broda, P., Birch, P., Brooks, P., Sinnott, M. L., Tempelaars, C., Wang, Q., ... & Sims, P. (1994).** Phanerochaete chrysosporium and its natural substrate. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews*, 13(2-3), 189-195.
- Buchholz, K., Rapp P., Zadrazil F. (1983).** Methods of enzymatic analysis, 2, 178-180.
- Buee, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., & Martin, F. (2009).** 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 184(2), 449-456.
- Bugg, T. D., Williamson, J. J., & Rashid, G. M. (2020).** Bacterial enzymes for lignin depolymerisation: new biocatalysts for generation of renewable chemicals from biomass. *Current Opinion in Chemical Biology*, 55, 26-33.
- Buranov, A. U., & Mazza, G. (2008).** Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 237-259.
- Buswell, J. A., Cai, Y. J., & Chang, S. T. (1996).** Ligninolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi.
- Cahagnier, B., (1998).** Moisissures des aliments peu hydratés. *Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires*. pp53-75
- Cai, Y. J., Buswell, J. A., & Chang, S. T. (1994).** Production of cellulases and hemicellulases by the straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Mycological research*, 98(9), 1019-1024.

- Cai, C. G., Lou, B. G., & Zheng, X. D. (2008).** Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(1), 60-67.
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999).** A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.
- Carillon, T. (1987).** Valorisation d'hydrolysats de matière végétale : procédé de séparation du D-xylose et du D-mannose (Doctoral dissertation, Toulouse, INPT).
- Castro, P. M., Hayter, P. M., Ison, A. P., & Bull, A. T. (1992).** Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 84-90.
- Castro, A. M. D., Teixeira, M. M. P., Carvalho, D. F., Freire, D. M. G., & Castilho, L. D. R. (2011).** Multiresponse optimization of inoculum conditions for the production of amylases and proteases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake. *Enzyme Research*, 2011. 1-9.
- Cavaco-Paulo, A. (1998).** Processing textile fibers with enzymes: an overview.
- Chabasse, D., Bouchara, J. P., De Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., & Penn, P. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation*, (25).
- Chabasse, D., Guiguen, C., & Contet-Audonneau, N. (1999).** *Mycologie Médicale*. Elsevier Masson.
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., & Srivastava, A. K. (2016).** Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotechnology*, 6(2), 1-15.
- Chakraborty, S., Gupta, R., Jain, K. K., & Kuhad, R. C. (2016).** Cost-effective production of cellulose hydrolysing enzymes from *Trichoderma* sp. RCK65 under SSF and its evaluation in saccharification of cellulosic substrates. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39(11), 1659-1670.
- Chamekh, R., Deniel, F., Donot, C., Jany, J. L., Nodet, P., & Belabid, L. (2019).** Isolation, identification and enzymatic activity of halotolerant and halophilic fungi from the Great Sebkh of Oran in Northwestern of Algeria. *Mycobiology*, 47(2), 230-241.
- Chandel, A. K., Antunes, F. A., De Arruda, P. V., Milessi, T. S., Da Silva, S. S., & de Almeida Felipe, M. D. G. (2012a).** Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: state-of-the-art. *d-xylitol*, 39-61.
- Chandel, A. K., da Silva, S. S., Carvalho, W., & Singh, O. V. (2012b).** Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(1), 11-20.
- Chandra, M. S., Viswanath, B., & Reddy, B. R. (2007).** Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 323-328.
- Chandra, M., Kalra, A., Sharma, P. K., Kumar, H., & Sangwan, R. S. (2010).** Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. *Biomass and Bioenergy*, 34(5), 805-811.
- Chen, G., Du, J., Zhuang, L., & Gao, P. (2001).** Purification and properties of endoglucanases from *Aspergillus aculeatus* SM-L22. *Wei sheng wu xue bao = Acta Microbiologica Sinica*, 41(4), 469-474.
- Chen, J., Moinard, M., Xu, J., Wang, S., Foulongne-Oriol, M., Zhao, R., ... & Callac, P. (2016).** Genetic analyses of the internal transcribed spacer sequences suggest introgression and duplication in the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens*. *Public Library of Science One*, 11(5), e0156250.

- Chimata, N. K., Sasidhar, P., & Challa, S. (2010).** Production of extracellular amylase from agricultural residues by a newly isolated *Aspergillus species* in solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 9(32), 5162-5169.
- Chugh, P., Soni, R., & Soni, S. K. (2016).** Deoiled rice bran: a substrate for co-production of a consortium of hydrolytic enzymes by *Aspergillus niger* P-19. *Waste and Biomass Valorization*, 7(3), 513-525.
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005).** Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews*, 29(1), 3-23.
- Colwell, R. R., & Grigorova, R. (1989).** Methods in Microbiology: Current Methods for Classification and Identification of Microorganism. Vol. 19.
- Compaore, H., Sawadogo-Lingani, H., Ware, L. Y., Guira, F., Samandoulougou, S., Savadogo, A., & Traore, A. S. (2016).** Morphological and molecular characterization of three fungi strains isolated from locals foods in Burkina Faso. *Current Research in Microbiology and Biotechnology* 4 (4), 903-911.
- Converse, A. O., Matsuno, R., Tanaka, M., & Taniguchi, M. (1988).** A model of enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme. *Biotechnology and Bioengineering*, 32(1), 38-45.
- Coral, G., Arikan, B. U. R. H. A. N., Unaldi, M. N., & Guvenmez, H. A. T. İ. C. E. (2003).** Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of Microbiology*, 53(4), 491-498.
- Couto, S. R., & Sanromán, M. A. (2005).** Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22(3), 211-219.
- D'Halewyn, M. A., Leclerc, J. M., & King, N. (2004).** Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. Institut national de santé publique du Québec, 2004.
- Da Vinha, F. N. M., Gravina-Oliveira, M. P., Franco, M. N., Macrae, A., da Silva Bon, E. P., Nascimento, R. P., & Coelho, R. R. R. (2011).** Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(3), 256-267.
- Dagnelie, P. (2008).** Le plan d'expérience évolue. *Revue Modulad*, 13(38).
- 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* β -glucosidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 4973-4980.
- Das, A., & Mishra, S. (2017).** Removal of textile dye reactive green-19 using bacterial consortium: process optimization using response surface methodology and kinetics study. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(1), 612-627.
- Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009).** Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities & perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 5(6), 578.
- Davet, P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Editions Quae.
- Davet, P., & Rouxel, F. (1997).** Détection et isolement des champignons du sol. Editions Quae.
- De Almeida, M. N., Guimarães, V. M., Bischoff, K. M., Falkoski, D. L., Pereira, O. L., Gonçalves, D. S., & de Rezende, S. T. (2011).** Cellulases and hemicellulases from endophytic *Acremonium* species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(2), 594-610.

- De Almeida, M. N., Falkoski, D. L., Guimarães, V. M., Ramos, H. J. D. O., Visser, E. M., Maitan-Alfenas, G. P., & de Rezende, S. T. (2013).** Characteristics of free endoglucanase and glycosidases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. *Bioresource Technology*, *143*, 413-422.
- De Cassia Pereira, J., Paganini Marques, N., Rodrigues, A., Brito de Oliveira, T., Boscolo, M., Da Silva, R., ... & Bocchini Martins, D. A. (2015).** Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. *Journal of Applied Microbiology*, *118*(4), 928-939.
- Deeijing, S., & Dittamart, D. (2015).** Isolation and Screening of Cellulase-Producing Microorganisms and the Study of Some Characteristics of Enzymes. In *Biology Education and Research in a Changing Planet* (pp. 157-166). Springer, Singapore.
- Delabona, P. da-S., Pirota, R. D. P. B., Codima, C. A., Tremacoldi, C. R., Rodrigues, A., & Farinas, C. S. (2013).** Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. *Industrial Crops and Products*, *42*, 236-242.
- Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.
- Deepak, V., Kalishwaralal, K., Ramkumarpanidian, S., Babu, S. V., Senthilkumar, S. R., & Sangiliyandi, G. (2008).** Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. *Bioresource Technology*, *99*(17), 8170-8174.
- Dence, C. W. (1992).** The determination of lignin. In *Methods in lignin chemistry* (pp. 33-61). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Desai, D. I., & Iyer, B. D. (2017).** Utilization of corn cob waste for cellulase-free xylanase production by *Aspergillus niger* DX-23: medium optimization and strain improvement. *Waste and Biomass Valorization*, *8*(1), 103-113.
- Devi, M. K., Banu, A. R., Gnanaprabhal, G. R., Pradeep, B. V., & Palaniswamy, M. (2008).** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*, *1*(7), 1-6.
- Didderen, I., Destain, J., & Thonart, P. (2008).** Le bioéthanol de seconde génération : la production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. Presses agronomiques de Gembloux.
- Dobrev, G., Henry, C., and Zhekova, B. (2011).** Purification and characterization of carboxymethylcellulases from the cellulolytic complex of *Trichoderma longibrachiatum*. *Food Industry*, *1*, 48-52
- Domingues, F. C., Queiroz, J. A., Cabral, J. M. S., & Fonseca, L. P. (2000).** The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, *26*(5-6), 394-401.
- Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T. H. (1980).** Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press (London) Ltd..
- Dong, W. K., & Tae, S. K. (1994).** Purification of cellulase from *Trichoderma viride* and properties of its component enzymes. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, *15*(9), 719-724.
- D'Souza, J., & Volfová, O. (1982).** The effect of pH on the production of cellulases in *Aspergillus terreus*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, *16*(2), 123-125.

- Durand, A. (1983).** Les potentialités de la culture à l'état solide en vue de la production de microorganismes filamenteux.
- Durand, A. (1998).** La fermentation en milieu solide. *Biofutur*, 1998(181), 41-43.
- Durand, A. (2003).** Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 113-125.
- Dutt, D., Tyagi, C. H., Singh, R. P., Gautam, A., Agnohotri, S., & Kumar, A. (2013).** Isolation and biochemical characterization of crude xylanase from *Coprinus cinereus* AT-1 MTCC 9695 and its effectiveness in biodeinking of SOP. *Cellulose Chemistry and Technology*, 47, 203-217.
- Dutta, T., Sahoo, R., Sengupta, R., Ray, S. S., Bhattacharjee, A., & Ghosh, S. (2008).** Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(4), 275-282.
- El-Ghonemy, D. H., Ali, T. H., El-Bondkly, A. M., Moharam, M. E. S., & Talkhan, F. N. (2014).** Improvement of *Aspergillus oryzae* NRRL 3484 by mutagenesis and optimization of culture conditions in solid-state fermentation for the hyper-production of extracellular cellulase. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(5), 853-864.
- Elleuche, S., Schroeder, C., Sahm, K., & Antranikian, G. (2014).** Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 29, 116-123.
- Elms, J., Robinson, E., Mason, H., Iqbal, S., Garrod, A., & Evans, G. S. (2006).** Enzyme exposure in the British baking industry. *Annals of Occupational Hygiene*, 50(4), 379-384.
- Elshafei, A. M., Hassan, M. M., Haroun, B. M., Abdel- Fatah, O. M., Atta, H. M., & Othman, A. M. (2009).** Purification and properties of an endoglucanase of *Aspergillus terreus* DSM 826. *Journal of Basic Microbiology*, 49(5), 426-432.
- El-Shishtawy, R. M., Mohamed, S. A., Asiri, A. M., Abu-bakr, M. G., Ibrahim, I. H., & Al-Talhi, H. A. (2015).** Saccharification and hydrolytic enzyme production of alkali pre-treated wheat bran by *Trichoderma virens* under solid state fermentation. *BMC biotechnology*, 15(1), 1-13.
- El-Zawahry, Y. A., El-Mougith, A. A., El-Saadani, M. A., Hafez, E. E., & Soliman, S. A. (2010).** Partial purification and characterization of two endo- β -1, 4-glucanase from *Trichoderma* sp. (Shmosa tri). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(10), 4559-4568.
- Englard, S., & Seifter, S. (1990).** Precipitation techniques. *Methods in enzymology*, 182, 285-300.
- Fang, X. (2008).** Hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose by heterologously produced cellulases of *Melanocarpus albomyces*. *Journal of Biotechnology*, 136, 140-147.
- Fang, X., Yano, S., Inoue, H., & Sawayama, S. (2008).** Lactose enhances cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(2), 115-120.
- Farinas, C. S. (2015).** Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 179-188.
- Farr, D. F., & Rossman, A. Y. (2017).** Fungal databases, US national fungus collections. *Online publication. United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service.*
- Faucher, J. (2006).** Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue (Doctoral dissertation).
- Fawzi, E. M., & Hamdy, H. S. (2011).** Improvement of carboxymethyl cellulase production from *Chaetomium cellulolyticum* NRRL 18756 by mutation and optimization of solid state fermentation. *Bangladesh Journal of Botany*, 40(2), 139-147.

- Feder, J., Garrett, L. R., & Wildi, B. S. (1971).** Role of calcium in thermolysin. *Biochemistry*, 10(24), 4552-4556.
- Flannigan, B. (1970).** Degradation of carabinoxylan and carboxymethyl cellulose by fungi isolated from Barley kernels. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(2), 277-281.
- Forootanfar, H., Faramarzi, M. A., Shahverdi, A. R., & Yazdi, M. T. (2011).** Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Bioresource Technology*, 102(2), 1808-1814.
- Fossi, B. T., Tavea, F., & Ndouenkeu, R. (2005).** Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 14-18.
- Fridkin, S. K., Kremer, F. B., Bland, L. A., Padhye, A., McNeil, M. M., & Jarvis, W. R. (1996).** *Acromonium kiliense* endophthalmitis that occurred after cataract extraction in an ambulatory surgical center and was traced to an environmental reservoir. *Clinical Infectious Diseases*, 22(2), 222-227.
- Gama, D. D. S., Santos, Í. A. F. M., Abreu, L. M. D., Medeiros, F. H. V. D., Duarte, W. F., & Cardoso, P. G. (2020).** Endophytic fungi from *Brachiaria* grasses in Brazil and preliminary screening of *Sclerotinia sclerotiorum* antagonists. *Scientia Agricola*, 77(3).
- Gao, J., Weng, H., Xi, Y., Zhu, D., & Han, S. (2008).** Purification and characterization of a novel endo- β -1, 4-glucanase from the thermoacidophilic *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters*, 30(2), 323-327.
- Garai, D., & Kumar, V. (2013).** A Box–Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. *Industrial Crops and Products*, 44, 352-363.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993).** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113-118.
- Garg, S. K., & Neelakantan, S. (1982).** Studies on the properties of cellulase enzyme from *Aspergillus terreus* GN1. *Biotechnology and Bioengineering. (United States)*, 24(3).
- Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Khan, J., Awasthi, M. K., & Sarsaiya, S. (2011).** Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnology Research International*, 2011.
- Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2008).** Lignins: major sources, structure and properties. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, 201-224.
- Gervais, P., & Molin, P. (2003).** The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 85-101.
- Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B. A., & Mattiasson, B. O. (2003).** Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(5), 519-524.
- Ghose, T. K. (1987).** Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257-268.
- Ghoshal, G., Banerjee, U. C., Chisti, Y., & Shivhare, U. S. (2012).** Optimization of xylanase production from *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 26(1), 61-69.
- Giraldo, A., Gené, J., Sutton, D. A., Madrid, H., De Hoog, G. S., Cano, J., ... & Guarro, J. (2015).** Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales). *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34, 10.
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010).** Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775-4800.

- Glass, N. L., and Donaldson, G. C. (1995).** Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61(4), 1323–1330.
- Goesaert, H., Slade, L., Levine, H., & Delcour, J. A. (2009).** Amylases and bread firming—an integrated view. *Journal of Cereal Science*, 50(3), 345-352.
- Goldbeck, R., Andrade, C. C. P., Pereira, G. A. G., & Maugeri Filho, F. (2012).** Screening and identification of cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes. *African Journal of Biotechnology*, 11(53), 11595-11603.
- Gorems, W., & Alemu, T. (2014).** Production and optimization of cellulase from *Trichoderma* isolates under liquid state fermentation (LSF). *SINET : Ethiopian Journal of Science*, 37(2), 131-142.
- Goupy, J., & Creighton, L. (2006).** *Introduction aux plans d'expériences-3ème édition-Livre+ CD-Rom*. Hachette.
- Gousterova, A., Braikova, D., Goshev, I., Christov, P., Tishinov, K., Vasileva- Tonkova, E., ... & Nedkov, P. (2005).** Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology*, 40(5), 335-340.
- Guillaume, V. (2006).** Mycologie : auto-évaluation, manipulations. De Boeck Université-Bruxelles.
- Guiraud, J. P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris. P : 8-101.
- Guiraud, J. P. (2003).** Microbiologie alimentaire ; Application à l'étude des principaux groupes microbiens. *Food microbiology*.
- Gupta, A., & Khare, S. K. (2007).** Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(1), 11-16.
- Gupta, C., Jain, P., Kumar, D., Dixit, A. K., & Jain, R. K. (2015).** Production of cellulase enzyme from isolated fungus and its application as efficient refining aid for production of security paper. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 3(1), 11-19.
- Gupta, M., & Shrivastava, S. (2014).** Mycoremediation: A management tool for removal of pollutants from environment. *Environmental Sciences*, 4, 289-291.
- Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15-32.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003).** Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- Gupta, R., Sharma, R., & Beg, Q. K. (2013).** Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(2), 216-228.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013).** A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013.
- Gusakov, A. V., Salanovich, T. N., Antonov, A. I., Ustinov, B. B., Okunev, O. N., Burlingame, R., ... & Sinitsyn, A. P. (2007).** Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(5), 1028-1038.
- Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Markov, A. V., Skomarovsky, A. A., Sinitsyna, O. A., Berlin, A. G., & Ankudimova, N. V. (2000).** Indigo-binding domains in cellulase molecules. *Biocatalysis-2000: Fundamentals and Applications*, 41(6), 77-80.

- Hadda, M., Djamel, C., & Akila, O. (2015).** Screening of extracellular enzyme activities of *Ganoderma* and *Fomes* species collected from north east Algeria. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(4), 1455-1462.
- Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A., & Nasri, M. (2009).** Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavenensis* A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technology*, 100(13), 3366-3373.
- Hagihara, B. (1958).** The enzymes, vol. 4. NY: Academic press Inc.
- Hajji, M., Rebai, A., Gharsallah, N., & Nasri, M. (2008).** Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(6), 915-923.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W., & Župančič, S. (1996).** Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*, 58(2), 137-161.
- Hanif, A., Yasmeen, A., & Rajoka, M. I. (2004).** Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 94(3), 311-319.
- Hansen, G. H., Lübeck, M., Frisvad, J. C., Lübeck, P. S., & Andersen, B. (2015).** Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 50(9), 1327-1341.
- Hanson, J. R. (2008).** Chemistry of fungi. Royal Society of Chemistry.
- Harman, G. E. (2006).** Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190-194.
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. Y. (2011).** Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, 9(3), 177-192.
- Harmsen, P. F. H., Huijgen, W., Bermudez, L., & Bakker, R. (2010).** Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass.
- Harper, S. H., & Lynch, J. M. (1981).** The chemical components and decomposition of wheat straw leaves, internodes and nodes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32(11), 1057-1062.
- Harris, P. J., & Stone, B. A. (2009).** Chemistry and molecular organization of plant cell walls. *Biomass recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*, 61-93.
- Harris, S. A. D. (2016).** Partial purification and characterization of xylanase from *Bacillus weihenstephanensis* strain ANR1 using watermelon rind. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian Journal of Pharmaceutics*, 10(1).
- Hasper, A. A., Dekkers, E., van Mil, M., van de Vondervoort, P. J., & de Graaff, L. H. (2002).** EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1556-1560.
- Hassan, E. G., Alkareem, A. M. A., & Mustafa, A. M. I. (2008).** Effect of fermentation and particle size of wheat bran on the antinutritional factors and bread quality. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(4), 521-526.
- He, P. J. (2012).** Municipal solid waste in rural areas of developing country: do we need special treatment mode? *Waste Management (New York, NY)*, 32(7), 1289-1290.
- He, X. L., Song, C., Li, Y. Y., Wang, N., Xu, L., Han, X., & Wei, D. S. (2018).** Efficient degradation of azo dyes by a newly isolated fungus *Trichoderma tomentosum* under non-sterile conditions. *Ecotoxicology and environmental safety*, 150, 232-239.

- Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C., & Abecassis, J. (2007).** Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 327-347.
- Hmidet, N., Ali, N. E. H., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S. K., & Nasri, M. (2009).** Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1-3), 71-79.
- Horgan, K. A., & Murphy, R. A. (2011).** Pharmaceutical and chemical commodities from fungi. *Biology and Applications*, 147.
- Houfani, A. A., Větrovský, T., Navarrete, O. U., Štursová, M., Tláskal, V., Beiko, R. G., ... & Jorquera, M. A. (2019).** Cellulase– Hemicellulase activities and bacterial community composition of different soils from Algerian ecosystems. *Microbial Ecology*, 77(3), 713-725.
- Ibrahim, A. S., Al-Salamah, A. A., Elbadawi, Y. B., El-Tayeb, M. A., & Ibrahim, S. S. S. (2015).** Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 236-243.
- Immanuel, G., Bhagavath, C., & IYAPPA, R. P. (2007).** Production and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* fermented in coir waste and sawdust. *The Internet Journal of Microbiology* 3,1-20.
- Iqbal, H. M. N., Ahmed, I., Zia, MA; Irfan, M. 2011.** Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent Compatibility. *Advanced Biosciences and Biotechnology* 2, 149-56.
- Iqbal, H. M. N., Kyazze, G., & Keshavarz, T. (2013).** Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: an overview. *BioResources*, 8(2), 3157-3176.
- Iqbal, H. M., Asgher, M., Ahmed, I., & Hussain, S. (2010).** Media optimization for hyper-production of carboxymethyl cellulase using proximally analyzed agroindustrial residue with *Trichoderma harzianum* under SSF. *Development*, 25, 37.
- Jabbar, A., Rashid, M. H., Javed, M. R., Perveen, R., & Malana, M. A. (2008).** Kinetics and thermodynamics of a novel endoglucanase (CMCase) from *Gymnoascus citrina* produced under solid-state condition. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(6), 515-524.
- Jalgaonwala, R. E., & Mahajan, R. T. (2011).** Evaluation of hydrolytic enzyme activities of endophytes from some indigenous medicinal plants. *Journal of Agricultural Technology*, 7(6), 1733-1741.
- Jasani, H., Umretiya, N., Dharajiya, D., Kapuria, M., Shah, S., & Patel, J. (2016).** Isolation, optimization and production of cellulase by *Aspergillus niger* from agricultural waste. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(2), 1159-1167
- Javed, M. M., & Khan, T. S. (2006).** An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *Trichoderma viride* MSK-10. *African journal of Biotechnology*, 5(8), 609-614.
- Javed, U., Aman, A., & Qader, S. A. U. (2017).** Utilization of corncob xylan as a sole carbon source for the biosynthesis of endo-1, 4- β xylanase from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 1-7.
- Jecu, L. (2000).** Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Industrial Crops and Products*, 11(1), 1-5.

- Jeffries, T. W. (1991).** Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. In *Physiology of Biodegradative Microorganisms* (pp. 163-176). Springer, Dordrecht.
- Jo, W. S., Park, H. N., Cho, D. H., Yoo, Y. B., & Park, S. C. (2011).** Detection of extracellular enzyme activities in *Ganoderma neo-japonicum*. *Mycobiology*, 39(2), 118-120.
- Josefsson, P. (2006).** Biochemical modification of wood components (Doctoral dissertation, KTH).
- Jung, Y. R., Park, J. M., Heo, S. Y., Hong, W. K., Lee, S. M., Oh, B. R., ... & Kim, C. H. (2015).** Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. *Renewable Energy*, 76, 66-71.
- Kalyani, P., Geetha, S., & Hemalatha, K. P. J. (2016).** Optimization of cultural conditions for improved production and bioactive metabolites by *Aspergillus niger* (MTTC-961). *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3(10), 255-260.
- Kamm, B., & Kamm, M. J. A. M. (2004).** Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 137-145.
- Kammoun, R., Naili, B., & Bejar, S. (2008).** Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresource Technology*, 99(13), 5602-5609.
- Kamsani, N., Salleh, M. M., Yahya, A., & Chong, C. S. (2016).** Production of lignocellulolytic enzymes by microorganisms isolated from *Bulbitermes* sp. termite gut in solid-state fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, 7(2), 357-371.
- Kandasamy, S., Muthusamy, G., Balakrishnan, S., Duraisamy, S., Thangasamy, S., Seralathan, K. K., & Chinnappan, S. (2016).** Optimization of protease production from surface-modified coffee pulp waste and corncobs using *Bacillus* sp. by SSF. *3 Biotechnology*, 6(2), 1-11.
- 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. *Bioresource Technology*, 91(2), 153-156.
- Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A. B., Kongjan, P., & Angelidaki, I. (2009).** Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 100(9), 2562-2568.
- Kapilan, R., & Arasaratnam, V. (2017).** Industrial applications of bacterial xylanases: a review. *Middle East Journal of Sciences Research*, 25, 79-89.
- Kar, S., Gauri, S. S., Das, A., Jana, A., Maity, C., Mandal, A., ... & Mondal, K. C. (2013).** Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(1), 57-68.
- Karboune, S., Geraert, P. A., & Kermasha, S. (2008).** Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 903-909.
- Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piapukiew, J., Whalley, A. J., Reynolds, C. D., ... & Sihanonth, P. (2008).** A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.: Fr.) Rehm. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(5), 404-413.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008).** A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503-507.

- Khan, F. (2013).** New microbial proteases in leather and detergent industries. *innovations Research Chemistry*, 1(1),1-6.
- Khanahmadi, M., Arezi, I., Amiri, M. S., & Miranzadeh, M. (2018).** Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid-state fermentation in flask and tray bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 272-282.
- Khushal, B. (2003).** Solid state fermentation of soybean hulls for cellulolytic enzymes production: physico-chemical characteristics, and bioreactor design and modeling. Thèse de doctorat. University delhi. Inde. 185.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004).** Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), 169-188
- Kobakhidze, A., Asatiani, M., Kachlishvili, E., & Elisashvili, V. (2016).** Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes. *Annals of Agrarian Science*, 14(3), 169-176.
- Kolarova, N., & Farkaš, V. (1981).** Sensitivity of various yeasts to crude cellulolytic enzyme complexes from *Trichoderma reesei*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 13(3), 184-187.
- Kosikowski, F. V. (1988).** Enzyme behavior and utilization in dairy technology. *Journal of Dairy Science*, 71(3), 557-573.
- Kotchoni, O. D., Shonukan, O. O., & Gachomo, W. E. (2003).** *Bacillus pumilus* BpCRI 6, a promising candidate for cellulase production under conditions of catabolite repression. *African Journal of Biotechnology*, 2(6), 140-146.
- Kotchoni, S. O., Gachomo, E. W., Omafuvbe, B. O., & Shonukan, O. O. (2006).** Purification and biochemical characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from a catabolite repression insensitive mutant of *Bacillus pumilus*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8(2), 286-292.
- Kozakiewicz, Z., & Smith, D. (1994).** Physiology of aspergillus. In *Aspergillus* (pp. 23-40). Springer, Boston, MA.
- Krishna, C. (2005).** Solid-state fermentation systems—an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1-2), 1-30.
- Kristensen, J. B., Börjesson, J., Bruun, M. H., Tjerneld, F., & Jørgensen, H. (2007).** Use of surface-active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 888-895.
- Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., & Szakacs, G. (2003).** Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 38(3), 310-319.
- Kuhad, R. C., Deswal, D., Sharma, S., Bhattacharya, A., Jain, K. K., Kaur, A., ... & Karp, M. (2016).** Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 249-272.
- Kuila, A., Rao, P. V., Choudary, N. V., Gandham, S., & Velankar, H. R. (2015).** Novel natural supplement for the production of fungal cellulases and application for enzymatic saccharification of wheat straw. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 34(4), 1243-1248.
- Kulkarni, N., Shendye, A., & Rao, M. (1999).** Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews*, 23(4), 411-456.

- Kumar, D., & Murthy, G. S. (2013).** Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1-20.
- Kumar, D., Jain, V. K., Shanker, G., & Srivastava, A. (2003).** Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochemistry*, 38(12), 1731-1738.
- Kumar, D., Savitri, T. N., Verma, R., & Bhalla, T. C. (2008).** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Research Journal of Microbiol*, 3(12), 661-672.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009).** Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713-3729.
- Kumar, A., Dutt, D., & Gautam, A. (2016).** Production of crude enzyme from *Aspergillus nidulans* AKB-25 using black gram residue as the substrate and its industrial applications. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 107-118.
- Kuno, A., Kaneko, S., Ohtsuki, H., Ito, S., Fujimoto, Z., Mizuno, H., ... & Hayashi, K. (2000).** Novel sugar-binding specificity of the type XIII xylan-binding domain of a family F/10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 482(3), 231-236.
- Kuzmanova, S., Vandeska, E., & Dimitrovski, A. (1991).** Production of mycelial protein and cellulolytic enzymes from food wastes. *Journal of Industrial Microbiology*, 7(4), 257-261.
- Lakhtar, H. (2009).** Culture du *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide : Transformation des polyphénols des margines. *Université Paul, Aix Marseille III*.
- Lakshmi, G. S., Rao, C. S., Rao, R. S., Hobbs, P. J., & Prakasham, R. S. (2009).** Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. *Biochemical Engineering Journal*, 48(1), 51-57.
- Landreau, A. (2001).** Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii* oudemans isolée du milieu marin: étude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture (doctorat chimie biologique) (Doctoral dissertation, Nantes).
- Lee, C. K., Darah, I., & Ibrahim, C. O. (2011).** Production and optimization of cellulase enzyme using *Aspergillus niger* USM AI 1 and comparison with *Trichoderma reesei* via solid state fermentation system. *Biotechnology Research International*, 2011.
- Lee, S. M., & Koo, Y. M. (2001).** Pilot-scale production of cellulase using *Trichoderma reesei* rut C-30 fed-batch mode. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(2), 229-233.
- Lee, Y. J., Kim, B. K., Lee, B. H., Jo, K. I., Lee, N. K., Chung, C. H., ... & Lee, J. W. (2008).** Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*, 99(2), 378-386.
- Lemos, M. A., Teixeira, J. A., Domingues, M. R. M., Mota, M., & Gama, F. M. (2003).** The enhancement of the cellulolytic activity of cellobiohydrolase I and endoglucanase by the addition of cellulose binding domains derived from *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1), 35-40.
- Leveau, S. B., & Bouix, M., (1993).** Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier Apria. P. 110-163.
- Levin, L., Herrmann, C., & Papinutti, V. L. (2008).** Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 207-214.

- Liab, K., Azadi, P., Collins, R., Tolan, J., Kim, J. S., & Eriksson, K. E. L. (2000).** Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1-2), 89-94.
- Liao, H., Fan, X., Mei, X., Wei, Z., Raza, W., Shen, Q., & Xu, Y. (2015).** Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. *Biomass and Bioenergy*, 74, 122-134.
- Liming, X., & Xueliang, S. (2004).** High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresource Technology*, 91(3), 259-262.
- Limkar, M. B., Pawar, S. V., & Rathod, V. K. (2019).** Statistical optimization of xylanase and alkaline protease co-production by *Bacillus* spp using Box-Behnken Design under submerged fermentation using wheat bran as a substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 455-464.
- Liu, J. Z., Weng, L. P., Zhang, Q. L., Xu, H., & Ji, L. N. (2003).** Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 317-323.
- Liu, J., & Yang, J. (2007).** Cellulase production by *Trichoderma koningii* AS3. 4262 in solid-state fermentation using lignocellulosic waste from the vinegar industry. *Food Technology and Biotechnology*, 45(4), 420-425.
- Liu, X. B., Guo, Z. K., & Huang, G. X. (2017).** *Sarocladium brachiariae* sp. nov., an endophytic fungus isolated from *Brachiaria brizantha*. *Mycosphere*, 8(7), 827-834.
- Lo´pez-Monde´jar, R., Zu¨hlke, D., Becher, D., Riedel, K., Baldrian, P. (2016).** Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Scientific Report*, 6,25279.
- Lopes, F. C., Tichota, D. M., Daroit, D. J., Velho, R. V., Pereira, J. Q., Correa, A. P. F., & Brandelli, A. (2011).** Production of proteolytic enzymes by a keratin-degrading *Aspergillus niger*. *Enzyme Research*, 2011.
- Lucas, R., Robles, A., Garca, M. T., Alvarez de Cienfuegos, G., & Glvez, A. (2001).** Production, purification, and properties of an endoglucanase produced by the hyphomycete *Chalara (Syn. Thielaviopsis) paradoxa* CH32. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 79-85.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002).** Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577.
- Maan, P., Bharti, A. K., Gautam, S., & Dutt, D. (2016).** Screening of important factors for xylanase and cellulase production from the fungus *C. cinerea* RM-1 NFCCI-3086 through Plackett-Burman experimental design. *BioResources*, 11(4), 8269-8276
- Machida, M., & Gomi, K. (Eds.). (2010).** *Aspergillus: molecular biology and genomics*. Horizon Scientific Press.
- Magan, N. (1988).** Effects of water potential and temperature on spore germination and germ-tube growth in vitro and on straw leaf sheaths. *Transactions of the British Mycological Society*, 90(1), 97-107.
- Mahajan, C., Basotra, N., Singh, S., Di Falco, M., Tsang, A., & Chadha, B. S. (2016).** *Malbranchea cinnamomea*: a thermophilic fungal source of catalytically efficient lignocellulolytic glycosyl hydrolases and metal dependent enzymes. *Bioresource Technology*, 200, 55-63.
- Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Jones, E. G., McKenzie, E. H., Huang, S. K., Abdel-Wahab, M. A., ... & Xu, J. (2015).** Towards a natural classification and backbone tree for Sordariomycetes. *Fungal Diversity*, 72(1), 199-301.

- Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Jones, E. G., McKenzie, E. H. C., Bhat, J. D., Dayarathne, M. C., ... & Wijayawardene, N. N. (2016).** Families of sordariomycetes. *Fungal Diversity*, 79(1), 1-317.
- Mahdi, S., Mohd, N., Arbakariya, A., & Rosfarizan, M. (2011).** Screening, isolation and selection of cellulolytic fungi from oil palm empty fruit bunch fibre. *Biotechnology*, 10(1), 108-113.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., & Bhat, M. K. (2000).** Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 461-488.
- Maia, N. D. C., Souza, P. N. D. C., Godinho, B. T. V., Moreira, S. I., Abreu, L. M. D., Jank, L., & Cardoso, P. G. (2018).** Fungal endophytes of *Panicum maximum* and *Pennisetum purpureum*: isolation, identification, and determination of antifungal potential. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47.
- Makut, M. D., & Godiya, E. M. (2010).** A survey of cellulolytic mesophilic fungi in the soil environment of Keffi Metropolis, Nasarawa State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 4(21), 2191-2195.
- Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K. P., & Heese, K. (2013).** Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal*, 70, 106-114.
- Mandels, M., & Weber, J. (1969).** The production of cellulases.
- Mangalanayaki, R., & Madhavan, S. (2015).** Cellulase production by *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* under solid state fermentation. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 1822-1828.
- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., & Banerjee, U. C. (2005).** Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1), 1-9.
- Marcondes, N. R., Taira, C. L., Vandresen, D. C., Svidzinski, T. I. E., Kadowaki, M. K., & Peralta, R. M. (2008).** New feather-degrading filamentous fungi. *Microbial Ecology*, 56(1), 13-17.
- Marechal, P. (2001).** *Analyse des principaux facteurs impliqués dans le fractionnement combiné de pailles et de sons de blé en extrudeur bi-vis : obtention d'agro-matériaux* (Doctoral dissertation, Toulouse, INPT).
- Mark, K., Cornejo, C., Keller, C., Flück, D., & Scheidegger, C. (2016).** Barcoding lichen-forming fungi using 454 pyrosequencing is challenged by artifactual and biological sequence variation. *Genome*, 59(9), 685-704.
- Markessini, E., Roffael, E., & Rigal, L. (1997).** Panels from annual plant fibers bonded with urea-formaldehyde resins. In *Washington State University International Particleboard/Composite Materials Symposium (USA)*.
- Martínez, Á. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., ... & Río Andrade, J. C. D. (2005).** Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin.
- Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., ... & Brettin, T. S. (2008).** Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, 26(5), 553-560.
- Martins, D. A. B., do Prado, H. F. A., Leite, R. S. R., Ferreira, H., de Souza, M. M., Moretti, R. D. S., & Gomes, E. (2011).** Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. *Integrated waste management-volume II*. IntechOpen.

- Mathieu, D. (2005).** Étude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).
- Mathot, P. (1996).** Modelling of a simplified reactor for solid state fermentation of agricultural products or byproducts. Use of the fermented feed by pigs.
- Matkar, K., Chapla, D., Divecha, J., Nighojkar, A., & Madamwar, D. (2013).** Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 24-33.
- Maurer, K. H. (1997).** Development of new cellulases. *Surfactant science series*, 175-202.
- McDougall, B. M., & Seviour, R. J. (2002).** Factors affecting the synthesis of (1→3) and (1→6)-β-glucanases by the fungus *Acremonium sp.* IMI 383068 grown in batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(3), 289-299.
- Melo, I. R., Pimentel, M. F., Lopes, C. E., & Calazans, G. M. T. (2007).** Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 45-51.
- Menezes, B. D. S., Rossi, D. M., Antônio, M., & Ayub, Z. (2017).** Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 1.
- Menon, V., & Rao, M. (2012).** Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 522-550.
- Michelin, M., Silva, T. M., Benassi, V. M., Peixoto-Nogueira, S. C., Moraes, L. A. B., Leão, J. M., ... & Maria de Lourdes, T. M. (2010).** Purification and characterization of a thermostable α-amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydrate Research*, 345(16), 2348-2353.
- Miller, G. L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Minussi, R. C., Pastore, G. M., & Durán, N. (2002).** Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13(6-7), 205-216.
- Miron, J., Yosef, E., & Ben-Ghedalia, D. (2001).** Composition and in vitro digestibility of monosaccharide constituents of selected byproduct feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2322-2326.
- Mishra, R. S., & Maheshwari, R. (1996).** Amylases of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: Their purification, properties, action on starch and response to heat. *Journal of Biosciences*, 21(5), 653-672.
- Moloney, A. P., Hackett, T. J., Considine, P. J., & Coughlan, M. P. (1983).** Isolation of mutants of *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 with enhanced cellulase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 5(4), 260-264.
- Montoya, Q. V., Meirelles, L. A., Chaverri, P., & Rodrigues, A. (2016).** Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109(5), 633-651.
- Moore, D., Robson, G.D., Trinci, A.P.J. (2011).** 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press. New York.706.

- Moretti, M., Bocchini-Martins, D. A., Silva, R. D., Rodrigues, A., Sette, L. D., & Gomes, E. (2012). Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1062-1071.
- Mosier, N. S., Hall, P., Ladisch, C. M., & Ladisch, M. R. (1999). Reaction kinetics, molecular action, and mechanisms of cellulolytic proteins. *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*, 23-40.
- Mouria, B., Ouazzani-Touhami, A., & Douira, A. (2013). Isolement et identification de la mycoflore du compost des déchets urbains solides. *Nature & Technology*, (9), 13.
- Murphy, R. A., & Horgan, K. A. (2005). Antibiotics, Enzymes and. *Fungi: Biology and Applications*, 113.
- Mussatto, S. I., & Teixeira, J. A. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (Méndez-Vilas, A., Ed.), 2, 897-907.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2012). Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. *Industrial Waste*, 274.
- Nagai, T., Tomioka, K., Takeuchi, K., Iida, M., Kawada, M., & Sato, T. (2005). Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the MAFF Genebank. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 39(1), 19-27.
- Nam, G. W., Lee, D. W., Lee, H. S., Lee, N. J., Kim, B. C., Choe, E. A., ... & Pyun, Y. R. (2002). Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology*, 178(6), 538-547.
- Naveenkumar, K. J., & Thippeswamy, B. (2013). Isolation and screening of potential cellulolytic fungi from Areca nut husk waste. *International Journal of Current Science*, (8), 125-132.
- Navi, P., & Heger, F. (2005). Comportement thermo-hydrromécanique du bois : Applications technologiques et dans les structures. PPUR presses polytechniques.
- Nawel, B., Said, B., Estelle, C., Hakim, H., & Duchiron, F. (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process Biochemistry*, 46(2), 519-525.
- Nazir, A., Soni, R., Saini, H. S., Manhas, R. K., & Chadha, B. S. (2009). Purification and characterization of an endoglucanase from *Aspergillus terreus* highly active against barley β -glucan and xyloglucan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(7), 1189-1197.
- Nguyen, H. Q., & Quyen, D. T. (2010). Purification and properties of an endoglucanase from *Aspergillus oryzae* VTCC-F045. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(12), 6217-6222.
- Nkohla, A., Okaiyeto, K., Nwodo, U. U., Mabinya, L. V., & Okoh, A. I. (2017). Endoglucanase and Xylanase Production by *Chryseobacterium* Species Isolated from Decaying Biomass. *Polish Journal of Environmental Studies*, 26(6).
- Oberoi, H. S., Chavan, Y., Bansal, S., & Dhillon, G. S. (2010). Production of cellulases through solid state fermentation using kinnow pulp as a major substrate. *Food and Bioprocess Technology*, 3(4), 528-536.
- O'Donnell, K. 1993. Fusarium and its near relatives. In *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Edited by D.R. Reynolds and J.W. Taylor. CAB International, Washington, D.C. pp. 225-233.
- Odier E., & Rouau, X. (1985). Les cellulases et les enzymes de polymérisation de la lignine. Edition Gauthier- Villard. Paris. pp. 199-214.

- Onifade, A. A., Al-Sane, N. A., Al-Musallam, A. A., & Al-Zarban, S. (1998).** A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*, 66(1), 1-11.
- Onsori, H., Zamani, M. R., Motallebi, M., & Zarghami, N. (2005).** Identification of over producer strain of endo- β -1, 4-glucanase in *Aspergillus* Species: Characterization of crude carboxymethyl cellulase. *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 26-30.
- Oskouie, S. F. G., Tabandeh, F., Yakhchali, B., & Eftekhari, F. (2008).** Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 37-42.
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2011).** Cost analysis in laccase production. *Journal of Environmental Management*, 92(11), 2907-2912.
- Ouattara-Sourabie, P. B., Nikiema, P. A., & Traore, A. S. (2011).** Caractérisation de souches d'*Aspergillus* spp isolées des graines d'arachides cultivées au Burkina Faso, Afrique de l'Ouest. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(3), 1232-1249.
- Oyediji, O., Iluyomade, A., Egbewumi, I., & Odufuwa, A. (2018).** Isolation and screening of xylanolytic fungi from soil of botanical garden: Xylanase production from *Aspergillus flavus* and *Trichoderma viride*. *Journal of Microbiological Research*, 8, 9-18.
- Pachauri, P., Aranganathan, V., More, S., Sullia, S. B., & Deshmukh, S. (2017).** Purification and characterization of cellulase from a novel isolate of *Trichoderma longibrachiatum*. *Biofuels*, 1-7.
- Pal, S., Banik, S. P., Ghorai, S., Chowdhury, S., & Khowala, S. (2010).** Purification and characterization of a thermostable intra-cellular β -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. *Bioresource Technology*, 101(7), 2412-2420.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000).** Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31(2), 135-152.
- Pandey, A., Webb, C., Soccol, C. R., Larroche, C. (2005).** Enzyme Technology. New Delhi. *Asiatech publishers Inc.* p. 760
- Pandey, A., Sangeeta, N., Carlos, R. S. (2017).** Current Developments. *Biotechnology and Bioengineering*. Edition: Elsevier. 447-469.
- Panthapulakkal, S., Zereshkian, A., & Sain, M. (2006).** Preparation and characterization of wheat straw fibers for reinforcing application in injection molded thermoplastic composites. *Bioresource Technology*, 97(2), 265-272.
- Pasha, K. M., Anuradha, P., Rao, D. S., & Bio-marc, S. (2013).** Screening of a pectinolytic fungal strain; *Aspergillus foetidus* MTCC 10367 for the production of multiple enzymes of industrial importance. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2), B1205-1209.
- Pasqualotto, A. C. (Ed.). (2010).** Aspergillosis: from diagnosis to prevention (Vol. 422). Berlin, Germany: Springer.
- Patel, K., Patel, H., & Shah, G. (2014).** Production and optimization of cellulase enzymes from newly isolated fungi. *Journal of Pure Applied Microbiology*, 8(5), 4163-4169.

- Pathak, P., Bhardwaj, N. K., & Singh, A. K. (2014).** Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(8), 3776-3797.
- Pathania, S., Sharma, N., & Handa, S. (2017).** Optimization of culture conditions using response surface methodology for synergism production of cellulase, xylanase and pectinase by *Rhizopus delemar* F2 under solid state fermentation. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 1872-1878.
- Patidar, P., Agrawal, D., Banerjee, T., & Patil, S. (2005).** Optimisation of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, 40(9), 2962-2967.
- Paul, T., Das, A., Mandal, A., Jana, A., Maity, C., Adak, A., ... & Mondal, K. C. (2014).** Effective dehairing properties of keratinase from *Paenibacillus woosongensis* TKB2 obtained under solid state fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, 5(1), 97-107.
- Pečiulytė, D. (2007).** Isolation of cellulolytic fungi from waste paper gradual recycling materials. *Ekologija*, 53(4), 11-18.
- Pensupa, N., Jin, M., Kokolski, M., Archer, D. B., & Du, C. (2013).** A solid-state fungal fermentation-based strategy for the hydrolysis of wheat straw. *Bioresource Technology*, 149, 261-267.
- Pérez- Cantero, A., & Guarro, J. (2020).** *Sarocladium* and *Acremonium* infections: New faces of an old opportunistic fungus. *Mycoses*, 63(11), 1203-1214.
- Perez-Rodriguez, N., Oliveira, F., Pérez-Bibbins, B., Belo, I., Agrasar, A. T., & Domínguez, J. M. (2014).** Optimization of xylanase production by filamentous fungi in solid-state fermentation and scale-up to horizontal tube bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(3), 803-825.
- Peterson, R., & Nevalainen, H. (2012).** *Trichoderma reesei* RUT-C30—thirty years of strain improvement. *Microbiology*, 158(1), 58-68.
- Pham, T. H., Quyen, D. T., & Nghiem, N. M. (2012).** Purification and properties of an endoglucanase from *Aspergillus niger* VTCC-F021. *Turkish Journal of Biology*, 36(6), 694-701.
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., Papadopoulou, K., Lakhtar, H., Roussos, S., Parissopoulos, G., & Papanikolaou, S. (2011).** Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 285-297.
- Pillai, P., & Archana, G. (2008).** Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(4), 643-650.
- Pimentel, D., & Patzek, T. W. (2005).** Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. *Natural Resources Research*, 14(1), 65-76.
- Pirzadah, T., Garg, S., Singh, J., Vyas, A., Kumar, M., Gaur, N., ... & Kumar, M. (2014).** Characterization of Actinomycetes and *Trichoderma* spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. *SpringerPlus*, 3(1), 1-12.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009).** Fungi and food spoilage (Vol. 519, p. 388). New York: Springer.
- Pointing, S. B. (1999).** Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity* 2, 17-33.
- Pointing, S. B., Buswell, J. A., Jones, E. G., & Vrijmoed, L. L. P. (1999).** Extracellular cellulolytic enzyme profiles of five lignicolous mangrove fungi. *Mycological Research*, 103(6), 696-700.
- Polaina, J., & MacCabe, A. P. (2007).** Industrial enzymes (pp. 531-547). Netherlands: Springer.

- Poorna, C. A., & Prema, P. (2007).** Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Bioresource Technology*, 98(3), 485-490.
- Pothiraj, C., P. Balaji, and M. Eyini. (2006).** “Enhanced Production of Cellulases by Various Fungal Cultures in Solid State Fermentation of Cassava Waste.” *African Journal of Biotechnology*.5(20), 1882-1885
- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M., & Kapadnis, B. (2013).** Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. *BioMed Research International*, 2013.
- Prakash, R., & Jha, S. N. (2014).** Basics of the genus *Aspergillus*. *International Journal of Research in Botany*, 4(2), 26-30.
- Pramunadipta, S., Widiastuti, A., Wibowo, A., & Suga, H. (2020).** *Sarocladium oryzae* associated with sheath rot disease of rice in Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(3).
- Prathyusha, P., Sri, A. B. R., & Prasad, K. S. (2015).** Diversity and enzymatic activity of foliar endophytic fungi isolated from medicinal plants of Indian dry deciduous forest. *Der Pharmacia Lettre*, 7(8), 244-251.
- Qureshi, N., Saha, B. C., & Cotta, M. A. (2007).** Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30(6), 419-427.
- Raghavarao, K. S. M. S., Ranganathan, T. V., & Karanth, N. G. (2003).** Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 127-135.
- Rahardjo, Y. S., Tramper, J., & Rinzema, A. (2006).** Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnology Advances*, 24(2), 161-179.
- Rai, S. K., & Mukherjee, A. K. (2010).** Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemical Engineering Journal*, 48(2), 173-180.
- Raimbault, M., & Alazard, D. (1980).** Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 9(3), 199-209.
- Raimbault, M. (1983).** Fermentation en milieu solide, croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. p :1-42. O.R.S.T.O.M.-Paris.
- Raimbault, M. (1998).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 26-27.
- Rajesh, M. J., Rajesh, L., & Abachire, L. W. (2012).** Optimization of solid-state fermentation conditions for the production of cellulase by using *Trichoderma reesei*. *European Journal of Applied Engineering Sciences Research*, 1(4), 196-200.
- Rani, D. S., Thirumale, S., & Nand, K. (2004).** Production of cellulase by *Clostridium papyrosolvans* CFR-703. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(6), 629-632.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597-635.

- Ratanakhanokchai, K., Kaneko, J., Kamio, Y., & Izaki, K. (1992).** Purification and properties of a maltotetraose- and maltotriose-producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2490-2494.
- Ravel, H., & Banerjee, S. E. (2003).** Effect of enzyme and chemical pretreatments on the properties of silk. *Journal of Textile Association*, 64, 65-69.
- Reddy, G. P. K., Narasimha, G., Kumar, K. D., Ramanjaneyulu, G., Ramya, A., Kumari, B. S., & Reddy, B. R. (2015).** Cellulase production by *Aspergillus niger* on different natural lignocellulosic substrates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(4), 835-845.
- Reddy, L. V. A., Wee, Y. J., Yun, J. S., & Ryu, H. W. (2008).** Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology*, 99(7), 2242-2249
- Reddy, P. L. N., Babu, B. S., Radhaiah, A., & Sreeramulu, A. (2014).** Screening, identification and isolation of cellulolytic fungi from soils of Chittoor district, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(7), 761-771.
- Riccio, P., Rossano, R., Vinella, M., Domizio, P., Zito, F., Sansevrino, F., ... & Rosi, I. (1999).** Extraction and immobilization in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3-4), 123-129.
- Riffel, A., Lucas, F., Heeb, P., & Brandelli, A. (2003).** Characterization of a new *keratinolytic bacterium* that completely degrades native feather keratin. *Archives of Microbiology*, 179(4), 258-265.
- Riou, C., Salmon, J. M., Vallier, M. J., Günata, Z., & Barre, P. (1998).** Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3607-3614.
- Roberson, R. W., Abril, M., Blackwell, M., Letcher, P., McLaughlin, D. J., Mouriño- Pérez, R. R., ... & Uchida, M. (2010).** Hyphal structure. *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, 8-24.
- Rocky-Salimi, K., & Hamidi-Esfahani, Z. (2010).** Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 88(1), 61-66.
- Rodrigues, I. D. S. V., Barreto, J. T., Moutinho, B. L., Oliveira, M. M. G., da Silva, R. S., Fernandes, M. F., & Fernandes, R. P. M. (2020).** Production of xylanases by *Bacillus* sp. TC-DT13 in solid state fermentation using bran wheat. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(1), 91-97.
- Romsdahl, J., Blachowicz, A., Chiang, A. J., Singh, N., Stajich, J. E., Kalkum, M., ... & Wang, C. C. (2018).** Characterization of *Aspergillus niger* isolated from the International Space Station. *Msystems*, 3(5) .
- Rosli, S. N. A., Man, R. C., & Masngut, N. (2020).** Factorial experimental design for xylanase production by *Bacillus* sp. isolated from Malaysia landfill soil. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 736, No. 2, p. 022074). IOP Publishing.
- Roussos, S. (1981).** Etude de l'hydrolyse de la cellulose par des moisissures cultivées en milieu solide..
- Roussos, S. (1985).** Croissance de *Trichoderma harzianum* par FMS: physiologie, sporulation et production de cellulases. *This de Doctorat, universite Provence, Marseille Fr., Orstom Ed.*
- Roussos, S., & Raimbault, M. (1982).** Hydrolysis of cellulose by fungi. 1. Screening of cellulolytic strains. *Annales de Microbiologie* (Vol. 133, No. 3, pp. 455-464).

- Roussos, S., Hannibal, L., Durand, A., Diez, M., Saucedo, G., Montet, D., & Graille, J. (1994).** Enrichissement en protéines du tourteau de coprah : sélection de champignons filamenteux en FMS. *Oléagineux*, 49 (5), 235-247.
- Rubeena, M., Neethu, K., Sajith, S., Sreedevi, S., Priji, P., Unni, K. N., ... & Benjamin, S. (2013).** Lignocellulolytic activities of a novel strain of *Trichoderma harzianum*.
- Saha, S. (2009).** Exploration of Keratinolytic Actinobacteria for the Bioconversion of Poultry Feather Waste into Poultry Feed Supplement. Thèse de doctorat en microbiologie. Inde, Bharathiadasan University. 142p.
- Sahnoun, M., Kriaa, M., Elgharbi, F., Ayadi, D. Z., Bejar, S., & Kammoun, R. (2015).** *Aspergillus oryzae* S2 alpha-amylase production under solid state fermentation: optimization of culture conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 73-80.
- Sahoo, D. K., Das, A., Thatoi, H., Mondal, K. C., & Mohapatra, P. K. D. (2012).** Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated *bacterium* under submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5), 1040-1051.
- Saidane, s., Fattouch, s., Hajlaoui, m. r., & Limam, n. m. e. f. (2001).** Biochemical characterization of extracellular hydrolytic enzymes from the phytopathogenic *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biologia*, 1(1), 01-09.
- Saini, R., Saini, J. K., Adsul, M., Patel, A. K., Mathur, A., Tuli, D., & Singhania, R. R. (2015).** Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. *Bioresource Technology*, 188, 240-246.
- Samanta, S., Basu, A., Halder, U. C., & Sen, S. K. (2012).** Characterization of *Trichoderma reesei* endoglucanase II expressed heterologously in *Pichia pastoris* for better biofinishing and biostoning. *Journal of Microbiology*, 50(3), 518-525.
- Sandhu, S. K., Oberoi, H. S., Babbar, N., Miglani, K., Chadha, B. S., & Nanda, D. K. (2013).** Two-stage statistical medium optimization for augmented cellulase production via solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus niger* HN-1 and application of crude cellulase consortium in hydrolysis of rice straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(51), 12653-12661.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(8), 2689-2694.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Santos, T. C. D., Abreu Filho, G., BRITO, A. R. D., Pires, A. J. V., Bonomo, R. C. F., & Franco, M. (2016).** Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. *Revista Caatinga*, 29(1), 222-233.
- Santos, T. C. D., Cavalcanti, I. S., Bonomo, R. C. F., Santana, N. B., & Franco, M. (2011).** Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. *Ciência Rural*, 41(12), 2210-2216.
- Sanyal, A., Kundu, R. K., Dube, S., & Dube, D. K. (1988).** Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus*: Pt. 2. Purification and characterization of an inducible extracellular. beta.-glucosidase. *Enzyme and Microbial Technology* ;(United Kingdom), 10(2), 91-99.
- Saravanan, P., Muthuvelayudham, R., Kannan, R. R., & Viruthagiri, T. (2012).** Optimization of cellulase production using *Trichoderma reesei* by RSM and comparison with genetic algorithm. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 6(4), 443-452.

- Sarkar, N., & Aikat, K. (2014).** *Aspergillus fumigatus* NITDGPKA3 provides for increased cellulase production. *International Journal of Chemical Engineering*, 2014.
- Schamburg, D., & Salzmann, M.G.B.F. (1991).** Cellulase. In: Enzyme Hand book, Vol, IV66(3) : 506-5.9414: action on cello-oligosaccharides, *Carbohydr.Res.275*, 207-213.
- Schülein, M. (1997).** Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *Journal of Biotechnology*, 57(1-3), 71-81.
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010).** Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 787-799.
- Scriban, R. (1993).** Biotechnologie 4e. Technique et Documentation. *Lavoisier*.
- Scriban R. (1999).** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. *Lavoisier*.
- Selvam, K., & Vishnupriya, B. (2012).** Biochemical and molecular characterization of microbial keratinase and its remarkable applications. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(2), 267-275.
- Selvam, K., Govarthanan, M., Kamala-Kannan, S., Govindharaju, M., Senthilkumar, B., Selvankumar, T., & Sengottaiyan, A. (2014).** Process optimization of cellulase production from alkali-treated coffee pulp and pineapple waste using *Acinetobacter* sp. TSK-MASC. *The Royal Society of Chemistry Advances*, 4(25), 13045-13051.
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013).** Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Shahzadi, T., Mehmood, S., Irshad, M., Anwar, Z., Afroz, A., Zeeshan, N., ... & Sughra, K. (2014).** Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2014.
- Shanmughapriya, S., Kiran, G. S., Selvin, J., Thomas, T. A., & Rani, C. (2010).** Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated *Marinobacter* sp. MSI032. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(3), 625-640.
- Sharma, M., Saju, S. S., Chandra, S., Srivastava, M., & Sharma, P. (2014).** Comparative evaluation of cellulase activity in *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma reesei*. *African Journal of Microbiology Research*, 8(19), 1939-1947.
- Shrestha, P., Khanal, S. K., Pometto III, A. L., & van Leeuwen, J. H. (2010).** Ethanol production via in situ fungal saccharification and fermentation of mild alkali and steam pretreated corn fiber. *Bioresource Technology*, 101(22), 8698-8705.
- Shruthi, B. R., Achur, R. N. H., & Nayaka Boramuthi, T. (2020).** Optimized solid-state fermentation medium enhances the multienzymes production from *Penicillium citrinum* and *Aspergillus clavatus*. *Current Microbiology*, 77, 2192-2206.
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2017).** α -Amylases. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 3-24). Elsevier.
- Singh, A., Agrawal, A. K., Abidi, A. B., & Darmwal, N. S. (1990).** Properties of exoglucanase from *Aspergillus niger*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 36(4), 245-253.
- Singh, J., & Kaur, P. (2012).** Optimization of process parameters for cellulase production from *Bacillus* sp. JS14 in solid substrate fermentation using response surface methodology. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(4), 505-512.

- Singh, S., Singh, S., Bali, V., Sharma, L., & Mangla, J. (2014a).** Production of fungal amylases using cheap, readily available agriresidues, for potential application in textile industry. *BioMed Research International*, 2014.
- Singh, S., Moholkar, V. S., & Goyal, A. (2014b).** Optimization of carboxymethylcellulase production from *Bacillus amyloliquefaciens* SS35. *3 Biotechnology*, 4(4), 411-424.
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Pillai, A., Prema, P., Szakacs, G., & Pandey, A. (2006).** Solid-state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulase production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009).** Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13-18.
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2010).** Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), 541-549.
- Sinoy, S., Bhusaheb, T. C. P., & Rajendra, P. P. (2011).** Isolation and identification of feather degradable microorganism. *VSRD- Technical & Non-Technical Journal*, 2(3), 128-136.
- Smith, J. E. (1983).** The Filamentous Fungi: Vol. 4: *Fungal Technology*. E. Arnold.
- Soares, F. L., Melo, I. S., Dias, A. C. F., & Andreote, F. D. (2012).** Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 2195-2203.
- Sohail, M., Ahmad, A. Q. E. E. L., Shahzad, S. A. L. E. E. M., & Khan, S. A. (2005).** A survey of amylolytic bacteria and fungi from native environmental samples. *Pakistan Journal of Botany*, 37(1), 155-161.
- Sohail, M., Naseeb, S., Sherwani, S. K., Sultana, S., Aftab, S., Shahzad, S., ... & Khan, S. A. (2009).** Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: *Aspergillus* the pre-dominant genus of hydrolase producer. *Pakistan Journal of Botany*, 41(5), 2567-2582.
- Soni, R., Nazir, A., & Chadha, B. S. (2010).** Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 277-283.
- Sørensen, A., Andersen, J. J., Ahring, B. K., Teller, P. J., & Lübeck, M. (2014).** Screening of carbon sources for beta-glucosidase production by *Aspergillus saccharolyticus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93, 78-83.
- Sørensen, A., Lübeck, P. S., Lübeck, M., Teller, P. J., & Ahring, B. K. (2011).** β -Glucosidases from a new *Aspergillus* species can substitute commercial β -glucosidases for saccharification of lignocellulosic biomass. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(8), 638-650.
- Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P. K., Gupta, V. K., Molina, G., Rodriguez-Couto, S., ... & Ramteke, P. W. (2018).** Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 2379-2386.
- Stanley, D., Farnden, K. J., & MacRae, E. A. (2005).** Plant α -amylases: functions and roles in carbohydrate metabolism. *Biologia*, 60(16), 65-71.
- Stephen, A. C., Adeniyi, O. A., & Hadiza, J. (2020).** Effect of optimization conditions on submerged fermentation of corn bran for the production of xylanase enzyme. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 5(2), 019-025.
- Stevanovic, T., & Perrin, D. (2009).** Chimie du bois. Presses polytechniques et universitaires romandes. *CH-1015, Lausanne*, 198-201.

- Suh, H. J., & Lee, H. K. (2001).** Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *Journal of Protein Chemistry*, 20(2), 165-169.
- Sullivan, G. A., & Calkins, C. R. (2010).** Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science*, 85(4), 730-734.
- Sumantha, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 211-220.
- Summerbell, R. C., Gueidan, C., Schroers, H. J., De Hoog, G. S., Starink, M., Rosete, Y. A., ... & Scott, J. A. (2011).** *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology*, 68, 139-162.
- Sun, H., Zhao, P., Ge, X., Xia, Y., Hao, Z., Liu, J., & Peng, M. (2010).** Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(4), 988-1003.
- Sun, H. Y., Li, J., Zhao, P., & Peng, M. (2011).** Banana peel: A novel substrate for cellulase production under solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 10(77), 17887-17890.
- Suto, M., & Tomita, F. (2001).** Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(4), 305-311.
- Szabo, I., Benedek, A., Szabó, I. M., & Barabas, G. Y. (2000).** Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 253-255.
- Takahashi, J. A., de Castro, M. M., Souza, G. G., Lucas, E. M., Bracarense, A. A., Abreu, L. M., ... & Oliveira, T. S. (2008).** Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *Journal de Mycologie Médicale*, 18(4), 198-204.
- Takashima, S., Ikura, H., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H., & Uozumi, T. (1998).** Isolation of the gene and characterization of the enzymatic properties of a major exoglucanase of *Humicola grisea* without a cellulose-binding domain. *The Journal of Biochemistry*, 124(4), 717-725.
- Tallapragada, P., & Venkatesh, K. (2011).** Isolation, identification and optimization of xylanase enzyme produced by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1(4), 137-147.
- Tamamura, N., Saburi, W., Mukai, A., Morimoto, N., Takehana, T., Koike, S., ... & Mori, H. (2014).** Enhancement of hydrolytic activity of thermophilic alkalophilic α -amylase from *Bacillus* sp. AAH-31 through optimization of amino acid residues surrounding the substrate binding site. *Biochemical Engineering Journal*, 86, 8-15.
- Tangarone, B., Royer, J. C., & Nakas, J. P. (1989).** Purification and characterization of an endo-(1, 3)- β -D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 177-184.
- Tao, Y. M., Zhu, X. Z., Huang, J. Z., Ma, S. J., Wu, X. B., Long, M. N., & Chen, Q. X. (2010).** Purification and properties of endoglucanase from a sugar cane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6126-6130.
- Tarayre, C., Bauwens, J., Brasseur, C., Mattéotti, C., Millet, C., Guiot, P. A., ... & Thonart, P. (2015).** Isolation and cultivation of xylanolytic and cellulolytic *Sarocladium kiliense* and *Trichoderma virens* from the gut of the termite *Reticulitermes santonensis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4369-4382.

- Tari, C., Genckal, H., & Tokath, F. (2006).** Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry*, 41(3), 659-665.
- Tasia, W., & Melliawati, R. (2017).** Cellulase and xylanase production from three isolates of indigenous endophytic fungi. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 101, No. 1, p. 012035). IOP Publishing.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., & Fisher, M. C. (1999).** The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology*, 37(1), 197-246.
- Teeri, T. T. (1997).** Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15(5), 160-167.
- Teeri, T., & Koivula, A. (1995).** Cellulose degradation by native and engineered fungal cellulases. *Carbohydrates in Europe*, (12), 28-33.
- Thapa, S., Mishra, J., Arora, N., Mishra, P., Li, H., O' Hair, J., ... & Zhou, S. (2020).** Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19, 621-648.
- Thomas, L., Parameswaran, B., & Pandey, A. (2016).** Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus* sp. for bioethanol production. *Renewable Energy*, 98, 9-15.
- Thys, R. C. S., Lucas, F. S., Riffel, A., Heeb, P., & Brandelli, A. (2004).** Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. *Letters in Applied Microbiology*, 39(2), 181-186.
- Tournas, V. H., & Katsoudas, E. (2005).** Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 105(1), 11-17.
- Vaishnav, N., Singh, A., Adsul, M., Dixit, P., Sandhu, S. K., Mathur, A., ... & Singhania, R. R. (2018).** *Penicillium*: the next emerging champion for cellulase production. *Bioresource Technology Reports*, 2, 131-140.
- Vaithanomsat, P., Apiwatanapiwat, W., Petchoy, O., & Chedchant, J. (2010).** Production of ligninolytic enzymes by white-rot fungus *Datronia* sp. KAPI0039 and their application for reactive dye removal. *International Journal of Chemical Engineering*, 2010.
- Verma, N., Bansal, M. C., & Kumar, V. (2011).** Pea peel waste: a lignocellulosic waste and its utility in cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state cultivation. *Bioresources*, 6(2), 1505-1519.
- Vishwanatha, K. S., Rao, A. A., & Singh, S. A. (2009).** Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114(2), 402-407.
- Vivier, S. (2002).** Stratégies d'optimisation par la méthode des Plans d'Expériences, et Application aux dispositifs électrotechniques modélisés par Eléments Finis (Doctoral dissertation, Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille I).
- Vu, V. H., Pham, T. A., & Kim, K. (2011).** Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid-state fermentation. *Mycobiology*, 39(1), 20-25.
- Wang, J., & Wan, W. (2009).** Experimental design methods for fermentative hydrogen production: a review. *International Journal of Hydrogen Rnergy*, 34(1), 235-244.
- Wang, S. L., Liang, Y. C., & Liang, T. W. (2011a).** Purification and characterization of a novel alkali-stable α -amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. *Process Biochemistry*, 46(3), 745-750.

- Wang, Y., Fang, X., An, F., Wang, G., & Zhang, X. (2011b). Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 1-15.
- Ward, O. P., Qin, W. M., Dhanjoon, J., Ye, J., & Singh, A. (2005). Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*, 58, 1-75.
- Wase, D. A., & Vaid, A. K. (1983). Isolation and mutation of a highly cellulolytic strain of *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochem. ;(United Kingdom)*, 18(5).
- Watanabe, H., & Tokuda, G. (2001). Animal cellulases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(9), 1167-1178.
- Wawrzekiewicz, K., Wolski, T., & Lobarzewski, J. (1991). Screening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. *Mycopathologia*, 114(1), 1-8.
- Webster, J., & Weber, R. (2007). Introduction to fungi. Cambridge university press.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc. Guide Methods Appl.* 18, 315–322.
- Wicklow, D. T., Roth, S., Deyrup, S. T., & Gloer, J. B. (2005). A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, 109(5), 610-618.
- Wilkesman, J., & Kurz, L. (2009). Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnology*, 3(3), 175-184.
- Wilson, D. B. (2009). Cellulases and biofuels. *Current opinion in biotechnology*, 20(3), 295-299.
- Wilson, D. B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 259-263.
- Withers, S. G. (2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate Polymers*, 44(4), 325-337.
- Wladyka, B., & Pustelny, K. (2008). Regulation of bacterial protease activity. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 13(2), 212-229.
- Wongpaisal, P., Aundre, K. N., & Seephueak, P. (2016). Effect of fungi for decomposition rate and nutrient content in oil palm leaf litter (*Elaeis guineensis* Jacq.) Songklanakarin. *Journal of Plant Science*, 3, 9-14.
- Xu, Z. H., & Tao, W. Y. (2005). Identification and mode of action of a xylanase A purified from the culture filtrate of *Bacillus pumilus* WL-11. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese Journal of Biotechnology*, 21(3), 407-413.
- Xu, J. K., Sun, Y. C., Xu, F., & Sun, R. C. (2013). Characterization of hemicelluloses obtained from partially delignified Eucalyptus using ionic liquid pretreatment. *BioResources*, 8(2), 1946-1962.
- Xu, J. (2016). *Fungal DNA barcoding. Genome*, 59(11), 913–932.
- Yang, S., Jiang, Z., Yan, Q., & Zhu, H. (2008). Characterization of a thermostable extracellular β -glucosidase with activities of exoglucanase and transglycosylation from *Paecilomyces thermophila*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 602-608.
- Yasmeen, Q., Asgher, M., Sheikh, M. A., & Nawaz, H. (2013). Optimization of ligninolytic enzymes production through response surface methodology. *Bioresources*, 8(1), 944-968.

Yatish, K. V., H. S. Lalithamba, R. Suresh, S. B. Arun, and P. Vinay Kumar. (2016). Optimization of Scum Oil Biodiesel Production by Using Response Surface Methodology. *Process Safety and Environmental Protection*, 102, 667-672.

Yeh, Y. H., & Kirschner, R. (2014). *Sarocladium spinificis*, a new endophytic species from the coastal grass *Spinifex littoreus* in Taiwan. *Botanical Studies*, 55(1), 1-6.

Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. C., & Chua, A. S. M. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*, 67, 319-338.

Zafar, M., Ahmed, S., Khan, M. I. M., & Jamil, A. (2014). Recombinant expression and characterization of a novel endoglucanase from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*. *Molecular Biology Reports*, 41(5), 3295-3302.

Zakzeski, J., Bruijninx, P. C., Jongerius, A. L., & Weckhuysen, B. M. (2010). The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical Reviews*, 110(6), 3552-3599.

Zeng, R., Yin, X. Y., Ruan, T., Hu, Q., Hou, Y. L., Zuo, Z. Y., ... & Yang, Z. H. (2016). A novel cellulase produced by a newly isolated *Trichoderma virens*. *Bioengineering*, 3(2), 13.

Zhao, X., Zhang, L., & Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(4), 465-482

Zheng, J., & Rehm, L. (2014). Extrusion pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *International journal of molecular Sciences*, 15(10), 18967-18984.

Zhu, Q., Yao, Q., Sun, J., Chen, H., Xu, W., Liu, J., & Wang, Q. (2020). Stimuli induced cellulose nanomaterials alignment and its emerging applications: A review. *Carbohydrate Polymers*, 230, 115609.

Annexe I : Milieux de culture

1. Le bouillon aux pommes de terre (Potato Dextrose Broth ; PDB)

- Pomme de terre 200 g ;
- Glucose 20 g ;
- Bouillir la pomme de terre dans de l'eau distillée pendant 15-20 min,
- Après filtration, compléter le volume du filtrat à 1 litre,
- Ajouter le glucose, agiter puis stériliser à 121°C pendant 15 min.

2. Le milieu de culture PDA

- Pomme de terre 200 g ;
- Glucose 20 g ;
- Agar 15 g ;
- Bouillir la pomme de terre dans de l'eau distillée pendant 15-20 min.
- Après filtration, compléter le volume du filtrat à 1 litre,
- Stériliser à 121°C pendant 15 min.

3. Milieu de fermentation Mandel et Weber (MW)

Milieu Mandels et Weber (Mandels et Weber, 1969)

K ₂ HPO ₄	2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4g
Urée.....	0.3g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.3g
CaCl ₂	0.3 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O.....	5.0mg
MnSO ₄ . H ₂ O.....	1.56mg
ZnSO ₄ .7 H ₂ O.....	1.4mg
CoCl ₂	2.0mg
Peptone.....	0,75g
Extrait de levure.....	0,25g
Eau distillée (qsp.) ...	1 litre.
pH5

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

4. Milieu de fermentation de protéase

Glucose	10g
Kcl	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01g
K ₂ HPO ₄	1g
Caséine.....	10g
Eau distillée (qsp.).....	1 litre.

-Stériliser par autoclave à 110°C pendant 10 minutes.

5. Milieu de farine de plume de poulet

Na ₂ HPO ₄	0,4g
Na ₂ HPO ₄	0,3g
NaCl.....	05g
Farine de plume.....	10g
Agar.....	15g
Eau distillée (qsp.).....	1 litre.
pH.....	5

6. Milieu de fermentation à base de farine plume

MgSO ₄	0,5g
K ₂ HPO ₄	1,0g
KH ₂ PO ₄	0,46g
Farine de plume.....	10g
Eau distillée (qsp.)	1 litre.
pH	5

Annexe II : Réactifs et tampons

1. Bleu coton au lactophénol :

Phénol en cristaux	20 g
Acide lactique (commercial concentré)	20 g
Glycérine	40 g
Eau bidistillée	20 g
Bleu de méthyle	0,5 g

Les produits doivent être dissous dans l'ordre indiqué et en agitant modérément à l'aide d'une baguette de verre. La dissolution du bleu de méthyle peut prendre un certain temps (laisser reposer 24 h puis agiter à nouveau).

2. Réactif DNS (Ghose, 1987)

DNS.....	10g
NaOH.....	16g
Tartrate double de sodium et de potassium.....	300g
Eau distillée (qsp.).....	1 litre

Le tartrate est ajouté par petites quantités avec un Léger chauffage (50°C) si nécessaire pour éviter la formation des grumeaux insolubles. La solution est préparée dans l'obscurité puis filtrée et conservée à l'abri de la lumière dans un flacon couvert d'aluminium.

3. Solution de Lugol bactériologique (Iodo-iodure de potassium)

I ₂	1g
KI.....	2g
Eau distillée (qsp.).....	300 ml

4. Tampon citrate de sodium (50 mM ; pH 4.8) (Zhang et al., 2009)

Tampon citrate (1 M, pH 4.5)

Acide citrique monohydraté.....	21g
NaOH (pour ajuster le pH à 4,5).....	5 à 6g
Eau distillée (qsp.)	100 ml

Tampon citrate (50 mM, pH 4.8)

Diluer le premier tampon (1 M, pH 4.5) par l'ajout de 19 fois le volume en eau distillé, ajuster le pH à 4,8 avec la soude si nécessaire.

5. Solution tampon tris HCl (0,05 M)

Trishydroxyméthylaminométhane (tris) présente une masse molaire de 121,14 g/mol, servi pour la préparation de 250 ml du tampon tris HCl à 0,05 M, par le mélange de 1,5 g de tris dans 250 ml d'eau distillé et ajusté avec l'acide chlorhydrique HCl jusqu'à l'obtention d'un pH de 8.

6. Solution hydroxyde de sodium NaOH à (0,05 M)

Pour la préparation de 200 ml d'hydroxyde de sodium qui présent une masse molaire de 40 g/mol, 0,4 g du NaOH sont dissouts dans 200 ml d'eau distillé suivi d'une agitation vigoureuse. Le pH est de 12.

7. Solution hydroxyde de sodium NaOH à (1N)

- 4g de NaOH (40g /mol)
- Placer dans un Erlenmeyer contenant 50 ml de l'eau distillée, mélanger puis remplir jusqu'à 100 ml.

8. Solution acide chlorhydrique à (1N)

- 8.28 ml du HCl (37%), diluer avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un volume de 100 ml de la solution acide à 1N.

9. Solution d'acide trichloracétique TCA (0,4 M)

L'acide trichloracétique (TCA) avec une mass molaire de 163,39 g/mol, 16,338 g sont dissouts dans 250 ml d'eau distillé et mélangés vigoureusement.

Annexe III : Les dosages et les courbes d'étalonnages

1. Dosage d'amylase par la méthode de Benfeld (1955)

Préparation de la courbe d'étalonnage de maltose.

Concentration en maltose (mg/ml)	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2
Solution mère de maltose (2mg /ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillée (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
DNS (ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6

Protocole de dosage

	Gamme	Témoin enzyme	Enzyme
Substrat (µl), solution d'amidon soluble à 2% (p/v) dans la solution tampon citrate de sodium (0.05M, pH 5,9)	200	200	200
Equilibrer à 50°C pendant 10 min			
Enzyme (µl)	/	/	200
Incuber pendant 30 min à 25 °C			
Arrêter la réaction en ajoutant 0,6 ml de DNS			
Tampon (µl)	/	/	/
Glucose (µl)	200	/	/
Enzyme (µL)	/	200	/
Placer 5 min à 100 °C			
Refroidir dans un bain d'eau glacée			
Ajouter 1ml de l'eau distillée dans chaque tube, avec agitation			
Mesurer l'absorbance à 540 nm contre l'eau déminéralisée (en triplicata)			

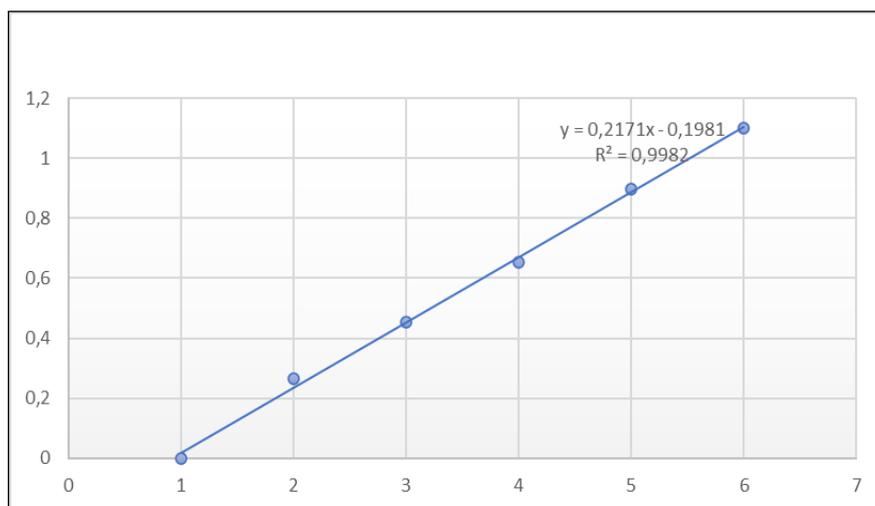


Figure 1. Courbe d'étalonnage du dosage de maltose 2mg /ml

2.Méthode de dosage de l'activité protéolytique

Préparation de la courbe d'étalonnage de tyrosine 10 mg tyrosine /100 ml

Concentration en tyrosine ($\mu\text{g/ml}$)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de tyrosine (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
TCA (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Na ₂ CO ₃ (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

Agitation et incubation pendant 10 min à température ambiante.

Folin-Ciocalteu dilué à 1/4 ^{ème} (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
---	------	------	------	------	------	------

Après une agitation, laisser reposer 20 min à température ambiante et à l'obscurité pendant 20 min. Lire l'absorbance à 750 nm et tracer la courbe d'étalonnage.

Protocole de dosage

L'activité protéolytique est déterminée par l'utilisation de la caséine comme substrat. Le mélange réactionnel est préparé comme suit:

- 1 ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage dilué au 1/10^{ème}.
 - 1 ml de substrat (solution de caséine à 2 % dans le citrate de sodium (0,02 M) à pH 7,0.
- Après agitation, et incubation pendant 30 min au bain marie à 40°C, la réaction a été arrêtée par addition de 2 ml de TCA froid à 4%. Le mélange a été agité et laissé reposer pendant 15 min à 4°C, ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées. Le produit obtenu a été ensuite filtré sur papier Whatman N°01.
- 1 ml du filtrat.
 - 5 ml de Na₂CO₃ (0.4M).
 - 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 10%. Les mélanges ont été bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 20 min. L'absorbance de la coloration bleue développée a été lue à 750 nm.

L'activité a été calculée par référence à une courbe étalon de la tyrosine comme standard. Une unité (UI) de protéase est l'équivalent de 1µg de tyrosine libérée pendant 1h de temps par 1 ml de la solution d'enzyme. Le blanc a été préparé de la manière suivante, 1 ml de caséine a été ajouté à 2 ml TCA est rajouté avant le substrat.

Chaque dosage est effectué en trois répétitions.

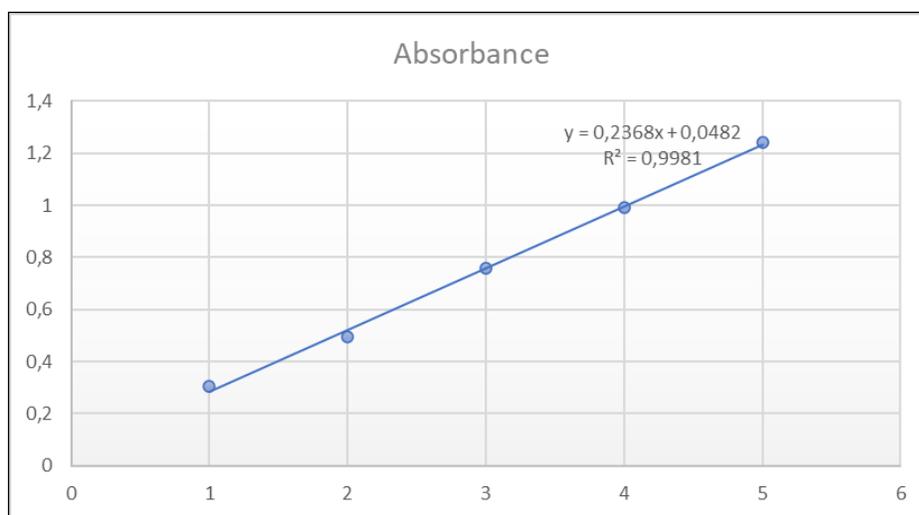


Figure2. Courbe d'étalonnage du dosage de tyrosine (10 mg /100 ml)

3. Méthode de dosage de l'activité kératinolytique

3.1. Préparation de la farine de plume

Les plumes utilisées dans ce travail sont celles qui recouvrent les poulets et délimitent leurs contours. Elles sont de couleur blanche, issues d'un poulailler local. Le processus de préparation de la farine de plumes passe par les étapes suivantes :

- Nettoyage des plumes par élimination des saletés et lavage successifs à l'eau du robinet, (la dernière étape de lavage se fait à l'eau distillée)
- Séchage des plumes dans un four à 150°C pendant 5min
- Broyage des plumes séchées au moyen d'une moulinette
- Tamisage de la poudre obtenue à l'aide d'un tamis avec des maille de port de 1mm a fin d'obtenir une farine homogène.

Ce processus conduit à l'obtention de plumes finement broyées, homogènes et insolubles appelées farine de plumes.

3.2. Solubilisation de la kératine

La kératine de plume soluble est préparée à partir de la farine de plumes (5 g) qui est dissoute dans 250 ml de diméthyle sulfoxyde (DMSO), ensuite le mélange est chauffé dans un rotavapeur ((Buchi Rotavapor R-114) à 80 °C pendant 4 h. La kératine soluble est ensuite précipitée pendant 2 h par l'addition de 500 ml d'acétone déjà refroidis à (-80 °C).

Le précipité est récupéré par centrifugation à 5000 ×g pendant 20 min, ensuite lavé deux fois à l'eau distillée et séché à 50 °C jusqu'à l'obtention d'une poudre .

1 g de ce précipité est dissout dans 20 ml de NaOH (0,05 M). Le pH est ajusté à 8 par une solution de HCl (1N), puis la solution est diluée avec 200 ml avec du tampon Tris-HCl (0,05 M) à pH 8.

3.3. Test d'activité de kératinase

Le mélange réactionnel est composé de 1 ml du surnageant de culture avec 1 ml de la solution de kératine soluble. L'incubation du mélange se fait au bain-Marie à 50 °C pendant 10 min; les témoins sont préparés parallèlement dans les mêmes conditions sans surnageant de culture. Les réactions sont arrêtées par l'addition de 2 ml de TCA (0,4 M).

Le mélange est refroidi 5 min dans un bain de glace et en même temps le surnageant de culture est ajouté aux temoins, les tubes sont centrifugés pendant 20 min à une vitesse de 5000 ×g. L'activité enzymatique est détectée par mesure de l'absorbance à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Selon Cai et al (2008), une unité de l'activité kératinolytique (U/ml) est définie comme étant l'augmentation de la DO 280 par rapport au blanc, de 0,01 par min dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus. L'activité est calculée selon la formule ci- dessous :

$$\frac{4 \times n \times A_{280}}{(0,01 \times 10)}$$

$$(0,01 \times 10)$$

✓ n : Taux de dilution

- ✓ 4 : Volume réactionnel final (ml)
- ✓ 10 : Temps d'incubation (min)

4. Activité CMCase (endoglucanases)

- Substrat : carboxyméthylcellulose à 2%, préparée dans du tampon citrate de sodium 50 mM pH=4,8

- Température : 50°C

- pH = 4,8 (tampon citrate de sodium 50 mM)

- Durée : 30 minutes

- Répétabilité : triplicate

Gamme étalon : Solution mère de glucose à 2g/L

Les différentes étapes du dosage de l'activité CMCase selon **Ghose (1987)**

	Gamme	Témoin enzyme	Enzyme
Substrat (µl), Solution de CMC à 2% (p/v) dans le tampon citrate (0,05 M - pH 4,8)	250	250	250
Equilibrer à 50°C pendant 10 min			
Enzyme (µl)	/	/	250
Incuber pendant 30 min à 50 °C			
Arrêter la réaction en ajoutant 1.5 ml de DNS			
Tampon (µl)	/	/	/
Glucose (µl)	250	/	/
Enzyme (µL)	/	250	/
Placer 5 min à 100 °C			
Refroidir dans un bain d'eau glacée			
Mesurer l'absorbance à 540 nm contre l'eau déminéralisée (en triplicate)			

Calcul de l'activité :

Absorbance = Absorbance de l'enzyme – Absorbance témoin enzyme

Les absorbances des échantillons sont converties en concentration de glucose libéré à partir de la courbe d'étalonnage

CMCase = (mg de glucose libéré / 0.18016 mg/µmol) / (0.25 ml* 30 min)

= µmol min⁻¹ ml⁻¹

= U / ml

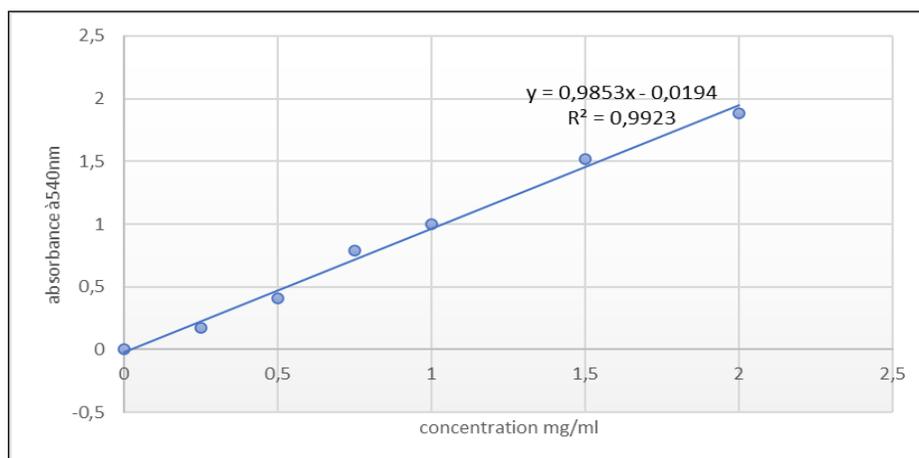


Figure 3. Courbe d'étalonnage du dosage de glucose (2g/l)

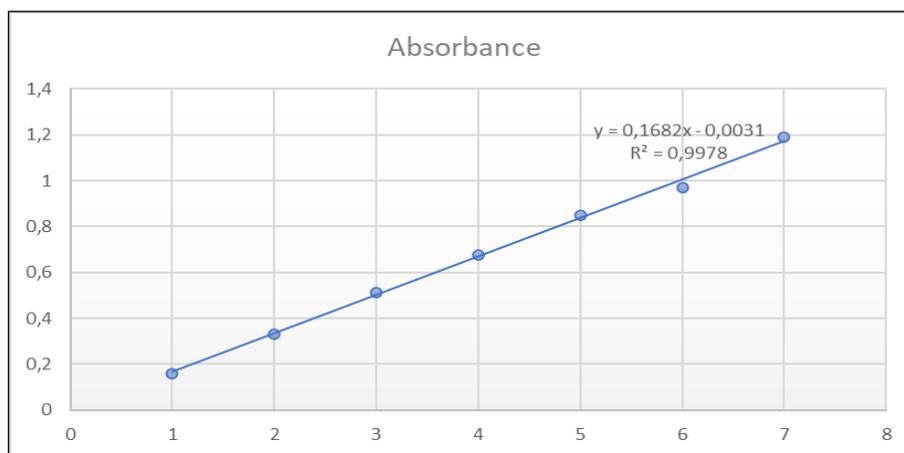


Figure 4. Courbe d'étalonnage du dosage de Xylose (2g/l)

5. Activité papier filtre ou APF ou FPases (cellulases totales)

- Substrat : papier filtre Whatman n°1 (bandelette 1,0 * 3,0 cm soit ≈ 25 mg)
- Température : 50°C.
- pH = 4,8 (tampon citrate de sodium 50 mM)
- Durée : 60 minutes
- Répétabilité : triplicate

Gamme étalon : Solution mère de glucose anhydre 10g/l.

	1/5	1/3	1/2	1/1,5
[Glucose] en (mg/ml)	2,0	3,3	5,0	6,7
Quantité de glucose (µg/250µl)	500	825	1250	1675

Les étapes du dosage de l'activité papier filtre (**Ghose, 1987**)

	Gamme	Témoin enzyme	Enzyme
Papier filter Papier Whatman N° 1 de 1cm x 3 cm ,25 mg	/	/	1
Tampon (µl) tampon citrate (50 mM; pH 4,8)	500	500	500
Equilibrer à 50°C pendant 10min			
Glucose (µl)	250	/	/
Enzyme (µl)	/	250	250
Incuber pendant 60 min à 50 °C			
Arrêter la réaction en ajoutant 1.5 ml de DNS			
Placer 5 min à 100 °C			
Refroidir dans un bain d'eau glacée			
Attendre 20 min ou centrifuger afin d'éliminer les débris du papier filtre déchiqueté			
Prélever 500 µl de milieu réactionnel et ajouter 10 ml d'eau distillée.			
Mesurer l'absorbance à 540 nm contre de l'eau distillée (en triplicata).			

Calcul de l'activité :

Absorbance = Abs enzyme – Abs témoin enzyme. Construire une droite d'étalonnage en utilisant les quantités absolues de glucose libéré.

Convertir les absorbances des échantillons en quantité absolue de glucose libéré.

Activité enzymatique (AE).

$$= ((\text{mg de glucose libéré} / 0,18016 \text{ mg}/\mu\text{mol}) / (0,25 \text{ mL} \times 60 \text{ min}))$$

$$= \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$$

$$= \text{U/MI}$$

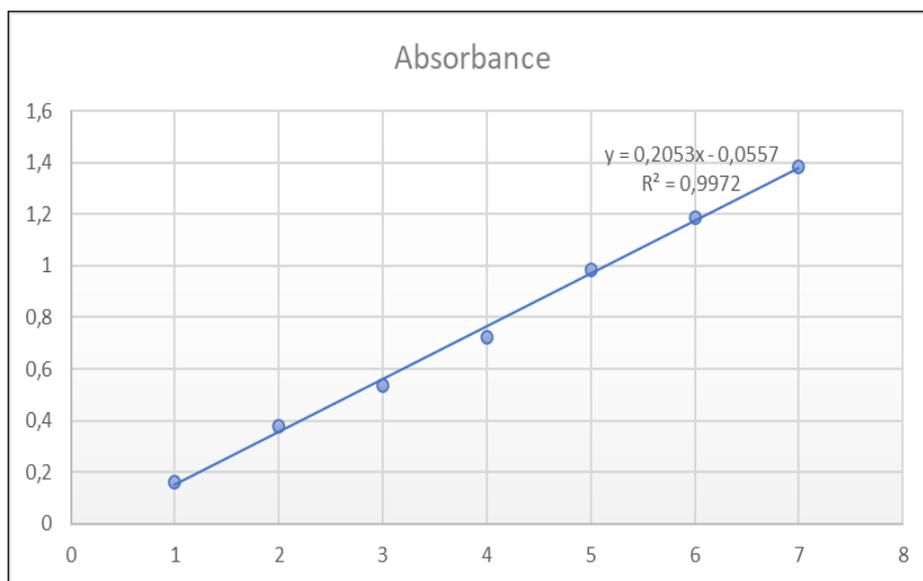


Figure 5. Courbe d'étalonnage du glucose (10g/L)

Annexe IV : Mesure de la matière sèche et de l'humidité

2g d'échantillons de matière fraîche sont pesés (P0) dans des creusets en porcelaine préalablement tarés, à l'aide d'une balance de précision.

L'échantillon est mis à sécher à 105°C jusqu'à poids constant (P sec). Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche.

La veille du lancement de la fermentation, le taux d'humidité des substrats sont déterminées.

$$H (\%) = [(P0 - P \text{ sec}) / P0] \times 100$$

P0 : Poids frais

P sec : Poids sec

Le poids sec est déterminé après séchage des substrats au four Pasteur à 105°C pendant 24 heures.

Exemple

Hinitial10%

M total.....100%

M sèche (10g).....100% - 60% } M sèche = 40%

10g.....40%

M(MW).....60% $M(MW) = (60.10)/40 = 15g$

Ce qui correspond à un volume de 15 ml du milieu (MW) pour ajuster à 70% d'humidité final.

Annexe V : Les séquences obtenues pour l'identification moléculaire des souches

>A-332836_E11 séquence exportée de Souche Mtr6 -ITS2

AAAGGAAAAAATTCACCTCCCAAGGCCAAGGCGCAACGTTACCAAACCTGTTGTTTCGGAGTGTCTCTGCCCCG
 GATGCATCACTGCCCGTGCCATTGAGCCCGCCGATAGGACCAACCAAACCTCTTATTGTATACCCCTCGCGGG
 TTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGAT
 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCACAATTCAGTGAATAA
 TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCG
 AACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTC
 TCGCCGCAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACAC
 CCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
 CCTTACCGAGTTTACAACCTCCATAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCTGCGGGATCTCTGCCCGTG
 GTGCGTCGCAGCCCCGTACCAAGGCGACCGCCGGAGGACAACCAAACCTCTTATTGTTATACCCCTCGCGGGTA
 TTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAGATGAATCAGAACCTTTCACAACGGATCTCT
 TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATTAAGTAATGTGGAATTGTCAGAATTCGTGGAATCAT
 CGAATCTTTGAATGCACATGGGGGCCGAGTAATTCTGGTGGGGATGACTGTTCTAAGCGTATTTTACCCCAAAC
 CCTCCGGGGGG

>A-332730_C19 séquence exportée de Souche Mtr6 -EF - P2EF

CCCAATGATTTTCGTCTCGATTCTTCCTCCTCCACATTCAATTGTGCCCGACAATTCTGCAGAGAATTTTCGTGTGC
 ACAATTTTTCATCACCCCGCTTCCATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAATTTTTTTTGCTGTCTGTTGGTTTTT
 AGTGGGGTTCTCTGTGCAACCCCACTAGCTCCCTGCTTTTTCTGCTTCACTTCACTTCCCTCGTCATCATTCAAC
 GTGCTCTGCGTCTTTGGTCATTCAGCGACGCTAACCACTTTTACATCAATAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCAAGGG
 TTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGACATTGCTCT
 GTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTAAGTCTTCACTAAGTTCATGCTGCAATTGCGG
 ACCAGTGCTAACAGGCAATTCACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCC
 CAGGCCGATTGCGCTATCCTCATCATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCCAAAGGGAGATGGA
 AAAA

>A-333458_B12 séquence exportée de Souche BbV1- LSU

CCAAAGGGATGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCGCAAGGTCCGAG
 TTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGTGCCTTCCGAGTTCCTTGAACGGGACGCCATAGAGGGTGAGA
 GCCCCGTACGGTAGGACCACCAAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTA
 AATGGGAGGTGTACGTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAG
 ATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCATTTCATGACCAGACTT
 GGGCTTGGTTGAACATCCGGCGTTCTCGCCGGTGCCTCTGCCAGTCCAGGCCAGCATCAGTTTGCCTCCGGGGGA

TAAAGGCGGCGGGAATGTGGCTCCCTTCGGGGAGTGTTATAGCCCCTCGTGTAATGCCCTGGGGCGGACTGAGG
AACGCGCTTCGGCACGGATGCTGGCGTAATGGTCATCAATGACCCGTCTAACAACCGCGGGACCAA

>A-331749_J11 séquence exportée de Souche BbV1- P1 Primer ITS

AAATAACAGATTAAATCCAAACCCCTGTGAACATACCTTATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAA
AAGGGACGGCCCCGCCAGGAACCCCTAAACTCTGTTTTAGTGAACTTCTGAGTATAAAAAACAAATAAATCA
AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCTGA
GCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGAGCTGCAGTCTGCTGCACTCCCCAAATACATTGGCGG
TCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACACATCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCA
ACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGGCCGGAGGAA

>A-331749_I11 séquence exportée de Souche BbV1 - P2 Primer EF

CCCCCAGTCCGGCGCGATAATGAGAATAGCGCAGTCAGCCTGGGAAGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAAT
CACGGTGACCGGGAGCGTCTGAAGTCTGGTTAGTGACTGCTGATGAGGGTGGTACATGGGAGGGGTGAACATAC
CGATGACGGTGACATAGTACTTGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGGGCAATGTCGATAGTGATAACCACGCTCACGC
TCAGCCTTCAGCTTGTCAAGGACCCAAGCGTACTTGAAGGAACCCCTTGCCGAGCTCGGCGGCTTCTGTTGATCA
AAAAGTCAGTCACAGTTCAGGCGGTCATCATTCTCGTGCCTTCGCGCCCCGTGGTCCAAACGCATTGCA
GTGGCGGGGTAAATTTGCAGCCCCACCAACAGATAAGCGCCGTGAAAAATTGTGCGACTTCAGTGAGGGGTCTG
AACAAAGATTTCGAGCAGACGGCGGGCACAAACGCAGCAGCTAGGAAATTGAGGCGAGAATCGCGGGACTGTAC
GAACCTTCTCGAACTTTCCTCAATGAAA

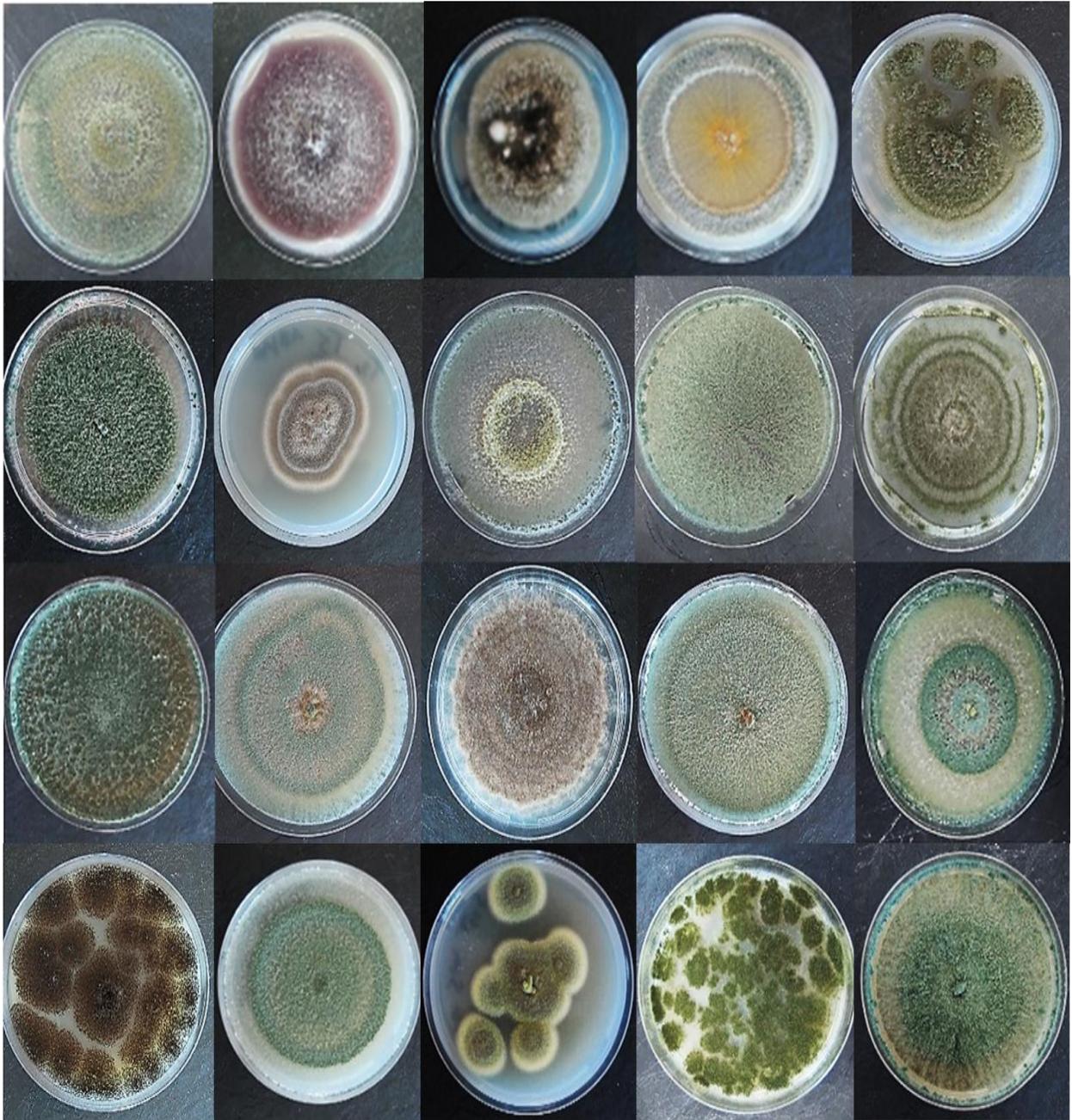
Séquence exportée de Souche BAS1 β -tubuline

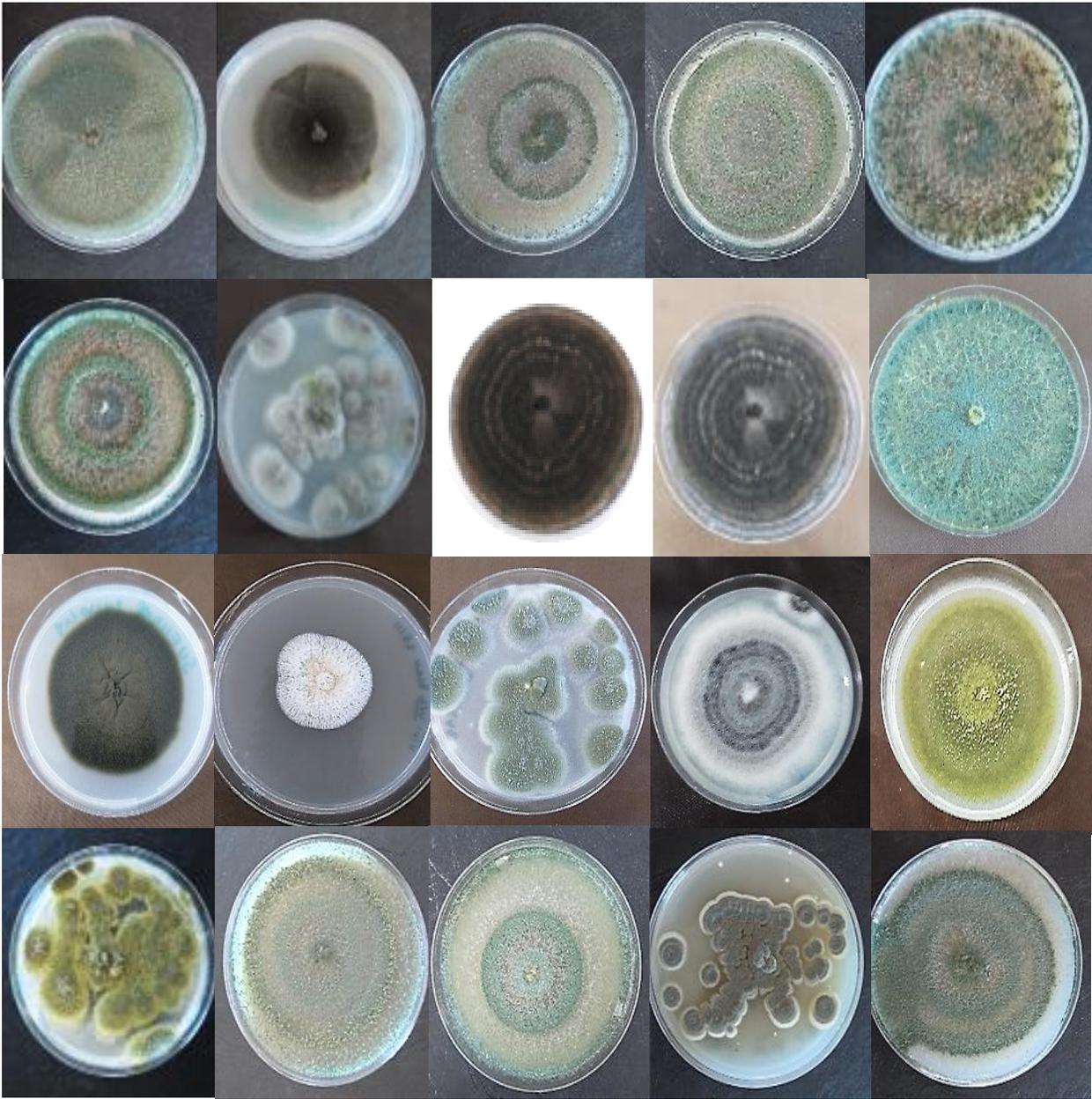
CAGTGTTACTGCGATTGGATGAGGATGGGCTCGTCTCTTAAGCAATCGCAGCTTGAGTTCGGATGTTGT
CCATTACGTGCATGCTATCTCTGACAACAAGTCCAACACTTCAAGGACTAGCATCCCTGGGCCTGAT
GAACTGGTTAGGACATTGATGAAATTGCCACGTTATCACACCTGTCCAATGGACCTCACCGCGCTAAAG
GATAGGTCCTCGGACTCCCACTAGAGGTCCGATGGGCCCCTGTACCTCTCCTGGGAGCCCAAGAACCCC
TACCTTTGCCAATTGATAACCATCTGACATTTGCTTTTAACTACACTTACACCCCGGACCTAATCAGGTC
GTGCTCGCCAGAGATGGTCTGCCTGTCTTGGCCATCCTCGTCCATATCCAGACCGGAAGCATGTAATG
CACCCGTGCCGAACCTTTCCTGAAATTTCAACACACAATGTTTCATCCTCAATCCAATGGGTGTTGTAT
ACATCTGGGACAGCGGTACCAATGGGATGGTTGGTCTGTTTTGTGGACTTGATTTGTCTCGGAGGTCC
CTTCGTTACCCAGTTTTGCGGTGGCACTCCTAACGGAGGAAGGTTGATTTCTAGTTTCCGGTGGAACTTT
TTTAACCCCCCTATTAATTAGTTTTCTCATGGGTGGGGAGGACAAGGGCGGTTAACTCATTGTTGGCT
CAGAGCTTAGCCTTTGCACCCCAAGGATGTGGTCCCACAAAAAAGGCGCCCTTCCGTTGGGTGATG
CGCCCAATCACTTGAGGATACCCCGCTACGGAGGGCTTCTCTTTCCCGACGGTGTACTTCTGTG
AAGATTCTACAGCAGGCTCCACTACTCGACGCACTAACTATCACAGCGAGCTGGGGAGAATGCCCGC

Séquence exportée de Souche BAS1 ITS P2 Primer ITS4

CCAATGGTCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGGAAAGAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGC
CAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTC
GGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGAC
GCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCCT
GAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCAT
TGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGGG
GTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGCAGAGGGCGCCCCCGGGCGCCGACAAGCGGCGGGCCCCGC
CGAAGCAACAGGGTACAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATC
CTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAATGGGAACCAGGAA

Photos des champignons isolés





Publications

Résumé

L'objectif visé lors de cette étude, cible l'isolement, l'identification, l'optimisation, et la caractérisation des champignons producteurs d'enzymes hydrolytiques. Les quarante champignons isolés d'un sol riche en matière organique ont été criblés pour la production d'enzymes extracellulaires. Ils ont été sélectionnés sur la base de leur potentiel hydrolytique de la cellulose, du xylane, de l'amidon, de la caséine et des plumes de poulet. Les souches isolées présentaient une activité enzymatique classée comme suit: cellulolytique (35%), xylanolytique (28%), amilolytique (16%), protéolytique (12%) et kératinytique avec 9%. Les souches qui produisent des niveaux élevés d'enzymes (cellulase, xylanase, amylase, protéase et kératinase) ont été cultivées en fermentation submergée (SmF) et ont été évaluées quantitativement. Les activités les plus élevées de CMCCase (5,10 UI/ml) et de xylanase (98,25 UI/ml) ont été obtenues à partir de la souche de *Trichoderma* sp. Mtr6. Pour l'amylase, l'activité enzymatique maximale (44,67 UI/ml) a été enregistrée par la souche d'*Aspergillus* sp. BAS2. *Penicillium* sp. Bpn3 a montré une activité protéasique de 3,80 UI/ml. *Penicillium* sp. BAS3 est la souche la plus productrice de kératinase avec (2,18 UI/ml). Après le criblage, l'activité CMCCase (endoglucanase) a été choisie pour approfondir le travail, et cela par les isolats Mtr6, BAS1 et BbV1 qui ont montré une production de CMCCase élevée. Sur la base de l'identification morphologique et moléculaire ces isolats ont été identifiés comme *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 et *Sarocladium kiliense*. BbV1 respectivement. Les résultats de l'étude OFAT ont révélé que le temps d'incubation, l'humidité, la température et la taille de l'inoculum ont significativement influencé la production d'endoglucanase, l'optimum de ces paramètres sont respectivement : (6 jours, 90%, 24°C, 10⁷ spores/g), (7 jours, 90%, 28°C et 10⁷ spores/g), (8 jours, 90%, 26°C et 10⁵ spores/g). Le plan de Box Benckhen a été utilisé pour améliorer la production d'endoglucanase de la souche *Sarocladium kiliense*. BbV1 en étudiant l'effet d'interaction entre les paramètres sélectionnés (temps d'incubation, humidité, température, et taille de l'inoculum). L'activité d'endoglucanase optimale de 15,03 U/gds a été obtenue dans les conditions suivantes : 10 jours de fermentation, une humidité de 60 %, une température d'incubation de 24 °C et une taille d'inoculum de 1,9 x 10⁵ spores/g. L'endoglucanase des souches *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 et *Sarocladium kiliense*. BbV1 ont été partiellement purifiées en utilisant l'ultrafiltration. L'optimum de l'activité enzymatique de l'endoglucanase semi purifiée est observé à 60°C et pH 4,8 pour les deux souches : *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 et *Aspergillus foetidus*. BAS1 et un optimum d'activité de la souche *Sarocladium kiliense* BbV1 à 40°C et pH 5. Pour la souche *Trichoderma afroharzianum*, les ions FeSO₄ et Ag₂SO₄ augmentent l'activité endoglucanase, avec des activités relatives qui sont respectivement 114,32% et 100,39%. La présence de l'ion FeSO₄ stimule l'activité endoglucanase avec une activité relative de 111,57% par *Aspergillus foetidus*. BAS1 et l'addition d'AgSO₄ augmente l'activité relative d'endoglucanase (107,11%) par la souche *Sarocladium kiliense* BbV1, tandis que l'effet de l'EDTA pour ces deux souches (65,09%) et (33,61%) respectivement inhibe la CMCCase. La thermostabilité révélée stable pendant 165 min et 90 min respectivement à 60 °C et pH optimal 4,8 pour *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 et *Aspergillus foetidus*. BAS1 et 270 min à 40 °C et pH 5 pour *Sarocladium kiliense*. BbV1. L'endoglucanase possède plus d'affinité pour le CMC avec une activité relative de 100% pour les trois souches. Elle dégrade aussi la cellulose avec une activité relative de 32,80%, 24,77% et 74,02% pour *Trichoderma afroharzianum* Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 et *Sarocladium kiliense* BbV1 respectivement. Ces souches ont une activité relative de 40,55%, 17,40 % et 82,33 % pour l'avicel et pour le PNPg l'activité relative et avec 14,40%, 6,52% et 40, 50%.

Mots clés : Enzymes hydrolytiques, criblage, *Sarocladium kiliense*, fermentation solide, Box Benckhen, caractérisation.

Abstract

The objective of this study was to isolate, identify, optimise and characterise hydrolytic enzyme producing fungi. The forty fungi isolated from a soil rich in organic matter were screened for the production of extracellular enzymes. They were selected on the basis of their hydrolytic potential of cellulose, xylan, starch, casein and chicken feathers. The isolated strains showed enzymatic activity classified as follows: cellulolytic (35%), xylanolytic (28%), amilolytic (16%), proteolytic (12%) and keratinolytic with 9%. Strains producing high levels of enzymes (cellulase, xylanase, amylase, protease and keratinase) were grown in submerged fermentation (SmF) and quantitatively evaluated. The highest activities of CMCCase (5.10 IU/ml) and xylanase (98.25 IU/ml) were obtained from the *Trichoderma* sp. strain Mtr6. For amylase, the maximum enzymatic activity (44.67 IU/ml) was recorded by the *Aspergillus* sp. BAS2 strain. *Penicillium* sp. Bpn3 showed a protease activity of 3.80 IU/ml. *Penicillium* sp. BAS3 was the most keratinase producing strain with (2.18 IU/ml). After screening, CMCCase (endoglucanase) activity was selected for further work by isolates Mtr6, BAS1 and BbV1 which showed high CMCCase production. On the basis of morphological and molecular identification these isolates were identified as *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 and *Sarocladium kiliense*. BbV1 respectively. The results of the OFAT study revealed that incubation time, humidity, temperature and inoculum size significantly influenced endoglucanase production, the optimum of these parameters are respectively: (6 days, 90%, 24°C, 10⁷ spores/g), (7 days, 90%, 28°C and 10⁷ spores/g), (8 days, 90%, 26°C and 10⁵ spores/g). The Box Benckhen design was used to improve endoglucanase production of the *Sarocladium kiliense*. BbV1 by studying the interaction effect between the selected parameters (incubation time, humidity, temperature, and inoculum size). The optimum endoglucanase activity of 15.03 U/gds was obtained under the following conditions: 10 days of fermentation, 60% humidity, 24°C incubation temperature and an inoculum size of 1.9 x 10⁵ spores/g. The endoglucanase of the strains *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 and *Sarocladium kiliense*. BbV1 were partially purified using ultrafiltration. The optimum enzymatic activity of the semi-purified endoglucanase is observed at 60°C and pH 4.8 for both strains: *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 and *Aspergillus foetidus*. BAS1 and an optimum activity of the *Sarocladium kiliense*. BbV1 strain at 40°C and pH 5. For the *Trichoderma afroharzianum* strain, FeSO₄ and Ag₂SO₄ ions increase endoglucanase activity, with relative activities of 114.32% and 100.39% respectively. The presence of FeSO₄ ion stimulates endoglucanase activity with a relative activity of 111.57% by *Aspergillus foetidus*. BAS1 and the addition of AgSO₄ increases the relative endoglucanase activity (107.11%) by *Sarocladium kiliense* strain. BbV1, while the effect of EDTA for these two strains (65.09%) and (33.61%) respectively inhibits CMCCase. Thermostability was found to be stable for 165 min and 90 min respectively at 60°C and optimum pH 4.8 for *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 and *Aspergillus foetidus*. BAS1 and 270 min at 40 °C and pH 5 for *Sarocladium kiliense*. BbV1. Endoglucanase has more affinity for CMC with a relative activity of 100% for the three strains. It also degrades cellulose with a relative activity of 32.80%, 24.77% and 74.02% for *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6, *Aspergillus foetidus*. BAS1 and *Sarocladium kiliense*. BbV1 respectively. These strains have a relative activity of 40.55%, 17.40% and 82.33% for avicel and for PNPg the relative activity and with 14.40%, 6.52% and 40, 50%.

Keywords: Hydrolytic enzymes, screening, *Sarocladium kiliense*, solid state fermentation, Box Benckhen, characterisation.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو عزل الفطريات المنتجة للإنزيم المائي وتحديدها وتحسينها وتوصيفها. تم فحص أربعين فطرًا معزولة من تربة غنية بالمواد العضوية لإنتاج إنزيمات خارج الخلية. تم اختيارهم على أساس إمكانات التحلل المائي لديهم من السليلوز، الكزيبوز، النشاء، الكازين وريش الدجاج. أظهرت السلالات المعزولة فعالية إنزيمية مصنفة كالتالي: السليلولاز (35%)، الكزيبولاز (28%)، الأميلاز (16%)، البروتياز (12%)، الكيراتيناز بنسبة (9%). نمت سلالات تنتج مستويات عالية من هذه الإنزيمات في التخمر المغمر (SmF) وبتقييمها كمياً. تم الحصول على أعلى نشاط إندوجلوكاناز بقيمة (5.10 وحدة دولية / مل) والكزيبولاز ب (98.25 وحدة دولية / مل) من سلالة *Trichoderma* sp. Mtr6، بالنسبة للأميلاز تم تسجيل أقصى نشاط إنزيم (44.67 وحدة دولية / مل) بواسطة *Aspergillus* sp. BAS2 و *Penicillium* sp. Bpn3 أظهر نشاط بروتياز (3.80 وحدة دولية / مل) أما BAS3. *Penicillium* sp. BAS3 هي الأكثر إنتاجاً للكيراتيناز ب (2.18 وحدة دولية / مل). بعد الفحص، تم اختيار نشاط إندوجلوكاناز (CMCase) لمزيد من العمل بواسطة العزلات Mtr6 و BAS1 و BbV1 والتي أظهرت إنتاج CMCCase عالي. على أساس التعريف المورفولوجي والجزيئي، تم تحديد هذه العزلات على أنها *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6، *Aspergillus foetidus*. BAS1 و *Sarocladium kiliense*. BbV1 على التوالي. أظهرت نتائج دراسة OFAT أن مدة الحضارة والرطوبة ودرجة الحرارة وحجم اللقاح أثرت بشكل كبير على إنتاج إندوجلوكاناز، وأفضل هذه المعلمات هي على التوالي: (6 أيام، 90%، 24 درجة مئوية، 10⁷ جراثيم / جم)، (7 أيام، 90%، 28 درجة مئوية، 10⁷ جراثيم / جم)، (8 أيام، 90%، 26 درجة مئوية، 10⁵ جراثيم / جم). تم استخدام تصميم Box Benckhen لتحسين إنتاج إندوجلوكاناز للسلالة *Sarocladium kiliense*. BbV1 من خلال دراسة تأثير التفاعل بين المعلمات المحددة (وقت الحضارة، والرطوبة، ودرجة الحرارة، وحجم اللقاح). تم الحصول على الفعالية المثلى للإندوجلوكاناز البالغة 15.03 وحدة / جرام تحت الظروف التالية: 10 أيام من التخمر، 60% رطوبة، 24 درجة مئوية، و 1.9 x 10⁵ جراثيم / جم. تمثت تنقية الإندوجلوكاناز من *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 و *Aspergillus foetidus*. BAS1 و *Sarocladium kiliense*. BbV1 جزئياً باستخدام الترشيح الفائق، النشاط الأنزيمي الأمثل للإندوجلوكاناز شبه المنقى عند 60 درجة مئوية ودرجة الحموضة 4.8 لكلا السلالتين: Mtr6 و *Trichoderma afroharzianum*. BAS1 و *Aspergillus foetidus*. BAS1 والنشاط الأمثل لسلالة *Sarocladium kiliense*. BbV1 عند 40 درجة مئوية ودرجة الحموضة 5. بالنسبة للسلالة *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6، تزايد أيونات FeSO₄ و Ag₂SO₄ من نشاط إندوجلوكاناز، حيث تبلغ الأنشطة النسبية 114.32% و 100.39% على التوالي. يحفز وجود FeSO₄ نشاط إندوجلوكاناز مع نشاط نسبي يبلغ 111.57% بواسطة BAS1. *Aspergillus foetidus*. BAS1 وإضافة AgSO₄ يزيد من نشاط إندوجلوكاناز النسبي (107.11%) بواسطة سلالة *Sarocladium kiliense*. BbV1، بينما يثبط EDTA نشاط CMCCase أو إندوجلوكاناز لهاتين السلالتين (65.09%) و (33.61%) على التوالي. وجد أن الثبات الحراري ثابت لمدة 165 دقيقة و 90 دقيقة على التوالي عند 60 درجة مئوية ودرجة الحموضة المثلى 4.8. *Trichoderma afroharzianum*. Mtr6 و BAS1 و *Aspergillus foetidus*. BAS1 و 270 دقيقة عند 40 درجة مئوية ودرجة الحموضة 5. يمتلك إندوجلوكاناز تقارباً أكبر مع CMC مع نشاط نسبي بنسبة 100% للسلالات الثلاثة كما أنه يحلل السليلوز بنسبة نشاط نسبي تبلغ 32.80% و 24.77% و 74.02% لكل من *Trichoderma afroharzianum* Mtr6 و *Aspergillus foetidus*. BAS1 و *Sarocladium kiliense*. BbV1 و *Aspergillus foetidus*. BAS1 و *Sarocladium kiliense*. BbV1 على التوالي. نفس هذه السلالات لها نشاط نسبي بنسبة 40.55%، 17.40% و 82.33% للافييسل أما بالنسبة لل PNPg فالنشاط النسبي لها كان بنسبة 14.40%، 6.52% و 40، 50%.

الكلمات المفتاحية: الإنزيمات المتحللة بالماء، الفرز، *Sarocladium kiliense*، التخمر الصلب، Box Benckhen، التوصيف.