

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée



Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle LMD en
Biotechnologie Microbienne et Bioprocédés

N° d'ordre : 54/D3C/23

N° de série : 01/BAPL/23

Intitulé

Recherche de micro-organismes producteurs d'hémi-cellulases à partir de la biomasse lignocellulosique ; valorisation des hémicelluloses dans les domaines des bio-polymères et les fermentations non agro-alimentaires

Présentée par : **GARES Maroua**

Le : **17/07/2023**

Devant le jury :

Président: **M.A HAMIDECHI**

Directeurs: **N. KACEM CHAOUCHE**

Examineur : **B. HARZALLAH**

Examineurs : **M. BERKANI**

Pr. Université Frère Mentouri Constantine 1

Pr. Université Frère Mentouri Constantine 1

MCA. Université Frère Mentouri Constantine 1

MCA. Ecole Nationale Supérieure de
Biotechnologie

Remerciements

Avant de débiter la présentation d'un travail de plusieurs années de recherche, il convient inévitablement de remercier toutes les personnes ayant soutenu et pris part, tant moralement que financièrement, de près comme de loin, à l'aboutissement de ce périple qu'est la thèse de doctorat.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Monsieur Noredine Kacem Chaouche, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1 et Directeur du LaMyBAM, de m'avoir accueillie dans son équipe et d'avoir supervisé ce travail tout en me conseillant, aussi bien humainement que techniquement, et de m'avoir fait partager son expérience, ses compétences et sa passion pour la recherche pendant les années précédentes. Je tiens à lui exprimer ici ma considération pour ses qualités humaines et mon respect le plus sincère. Monsieur le Professeur, merci pour votre entière disponibilité, votre patience et aussi d'avoir cru en moi jusqu'au bout et d'avoir fait tout ce qui était en votre pouvoir pour que ce travail soit un succès.

Je remercie profondément le professeur Serge Hilligsmann, de m'avoir accueillie et supervisé durant mon stage à l'unité de biotechnologie et bioprocédés, service 3BIO-BioModelling, Bioinformatic and Bioprocess-Université libre de Bruxelles, et de mettre à ma disposition tout le matériel nécessaire à la réalisation d'une grande partie de ce travail. Qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance.

Je voudrais exprimer ma gratitude à l'ensemble des membres du jury de cette thèse qu'ils m'ont fait l'honneur en acceptant d'examiner ce travail. Monsieur Hamidchi Mohamed Abdelhafid Professeur à l'Université Frères Mentouri Constantine 1, Monsieur Berkani Mohamed Maître de conférences à l'Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie, Madame Harzallah Besma Maître de conférences à l'Université Frères Mentouri Constantine 1, qui me font l'honneur d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Kacem Chaouche Akila, Maître de conférences à la faculté de génie des procédés, Université Salah Bounider - Constantine 3, de m'avoir orientée et aidée dans la réalisation de mon article de recherche avec beaucoup de compétence et d'enthousiasme. Je lui dois ma reconnaissance la plus sincère.

Je remercie également l'agence Wallonie-Bruxelles International (WBI) qui m'a accordé une bourse de recherche, me permettant de réaliser une partie de mon travail.

Enfin, que tous ceux qui, de loin ou de près, ont participé à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.

Dédicaces

Cette thèse est dédiée à

Mes chers parents, mes premiers supporteurs et ma plus grande force
*Merci pour votre amour et soutien inconditionnel au cours de toutes ces années, merci d'être
mon pilier lorsque je vacille*

Ma sœur Sarah, mes amies et soeurs Narimène et Nardjess,
Merci d'avoir toujours été là pour m'écouter, m'encourager et me soutenir.

Mon frère Fethi, mes sœurs Amel et Asma, ma belle-sœur et mes beaux-frères,
Mes adorables nièces et neveux,

Mes chères amies d'enfance, Soror, Loubna et Rayane,

Et à mon cher fiancé,
Merci d'avoir toujours été présent pour moi dans les moments difficiles.

Table des matières

Introduction	1
1 Revue bibliographique	4
1.1 Biomasse lignocellulosique, état de l'art.....	4
1.1.1 Généralité	4
1.1.2 Source d'énergie renouvelable	4
1.1.3 Composition	6
1.1.3.1 Cellulose	6
1.1.3.2 Hémicellulose	8
1.1.3.3 Lignine.....	9
1.2 Champignons lignocellulolytiques	10
1.2.1 Les biocatalyseurs lignocellulolytiques fongiques	10
1.2.2 L'espèce <i>Aspergillus fumigatus</i>	11
1.2.2.1 Caractéristiques et taxonomie	11
1.2.2.2 Toxicité et ingénierie génétique.....	12
1.2.3 Métabolisme fongique et sécrétion des enzymes	13
1.2.4 Aspect génétique de la production des hémicellulases	15
1.3 Les hémicellulases et leur mode d'action	16
1.3.1 Les xylanases	17
1.3.2 Les β -xylosidases	18
1.3.3 Les enzymes débranchantes	18
1.4 Production des enzymes en bioprocédés	18
1.4.1 Généralité	18
1.4.2 La fermentation liquide	19
1.4.2.1 Définition.....	19
1.4.2.2 Procédés de la fermentation liquide.....	20
1.4.2.3 Post-fermentation.....	21
1.4.3 La fermentation solide.....	21
1.4.3.1 Définition.....	21
1.4.3.2 Conduite de fermentations	22
1.4.4 Comparaison des procédés de fermentation en milieu liquide et solide	23

1.4.5	Paramètres influençant l'activité des hémicellulases	25
1.5	L'Alfa « <i>Stipa tenacissima</i> », comme matière première pour la production d'enzymes par voie microbienne	25
1.5.1	Caractéristique et taxonomie	25
1.5.2	Distribution et habitat en Algérie	26
1.5.3	Application biotechnologique : utilisation de l'Alfa comme matière première	26
1.6	Optimisation du procédé	27
1.6.1	Généralité :	27
1.6.2	Placket Burmann Design (PBD).....	28
1.6.3	Box Behnken Design (BBD).....	28
1.6.4	Central Composite Design (CCD).....	30
2	Matériel et méthodes	30
2.1	Echantillonnage	30
2.2	Isolement et criblage des isolats microbiens producteurs d'hémicellulase	31
2.3	Conservation.....	31
2.4	Identification de l'isolat fongique sélectionné	32
2.4.1	Observation macroscopique	32
2.4.2	Observation microscopique.....	32
2.4.3	Identification moléculaire	32
2.5	Conduite de fermentation sur milieu liquide standard	32
2.5.1	Scale-up de 250 mL à des bioréacteurs de 2 et 20 L ; fermentation avec substrat simple « xylose »	33
2.5.1.1	Fermentation en fioles	33
2.5.1.2	Fermentation en bioréacteurs 2 et 20 L.....	33
2.5.1.3	Suivi de la biomasse, le pH et la consommation du xylose	34
2.5.2	Impact de la vitesse d'agitation sur le changement morphologique d' <i>A. fumigatus</i>	34
2.5.3	Production de l'hémicellulase dans un bioréacteur de 2 L ; fermentation avec substrat complexe « xylane de maïs »	34
2.6	Conduite de fermentation en milieu solide à base d'Alfa	35
2.6.1	Composition biochimique d'Alfa	35
2.6.2	Production d'hémicellulase et de cellulase sur l'Alfa comme seule source de carbone et d'énergie	36
2.6.3	Hydrolyse enzymatique.....	36

2.7	Optimisation des facteurs physico-chimiques pour la production de xylanase et de cellulase	37
2.7.1	Effet de l'aspect du substrat sur la production d'enzyme.....	37
2.7.2	Optimisation du pH, la température, le taux d'humidité et le temps d'incubation pour la production d'enzyme à l'aide de Box Behnken Design	37
2.7.3	Élaboration des modèles.....	40
2.7.4	Validation des modèles	41
2.7.5	Cinétique de production d'hémicellulase et de cellulase dans les conditions optimales	41
2.8	Optimisation des composants du milieu pour la production de xylanase	41
2.8.1	Étude de l'effet des composants du milieu sur la production de xylanase par la conception Plackett-Burman	41
2.8.2	Optimisation des sources de nutriments sélectionnées pour la production de xylanase par la conception Central Composite.....	42
2.9	Saccharification enzymatique de résidus lignocellulosiques par le filtrat de culture ; comparaison avec les enzymes commerciales	44
2.10	Optimisation de l'activité xylanolytique	45
2.10.1	Effet du pH, la température et la concentration du substrat	45
2.10.2	Optimisation de l'activité xylanase par BBD.....	46
2.11	Résistance à la chaleur des conidies d' <i>A. fumigatus</i> et thermo-stabilité de l'enzyme xylanase	46
2.11.1	Thermo-stabilité de l'enzyme xylanase.....	46
2.11.2	Thermorésistante des conidies.....	46
2.12	Analyse coût-efficacité.....	47
3	Résultats	49
3.1	Isolement et criblage des isolats producteurs d'hémicellulases et de cellulases.....	49
3.2	Identification de l'isolat fongique sélectionné	49
3.2.1	Observation macroscopique	49
3.2.2	Observation microscopique.....	50
3.2.3	Identification moléculaire	51
3.3	Conduite de fermentation sur milieu liquide standard	52
3.3.1	Scale-up de 250 mL à des bioréacteurs de 2 et 20 L avec le xylose.....	52
3.3.1.1	Fermentation en fioles	52

3.3.1.2	Fermentation en bioréacteurs de 2 et 20 L.....	53
3.3.2	Impact de la vitesse d'agitation sur le processus de fermentation et le changement morphologique d' <i>A. fumigatus</i>	54
3.3.3	Production de l'hémicellulase dans un bioréacteur de 2 L	55
3.3.3.1	Profile de la fermentation sur milieu liquide à base de xylane de maïs dans un bioréacteur de 2L	55
3.3.3.2	L'activité xylanase dans le milieu de culture.....	56
3.4	Conduite de fermentation sur substrat solide	57
3.4.1	Composition biochimique d'Alfa	57
3.4.2	Cinétique de production d'hémicellulase et de cellulase (FSS)	58
3.5	Optimisation des facteurs physico-chimiques pour la production d'enzymes	58
3.5.1	Effet de l'aspect du substrat sur la production de xylanase et de cellulase	58
3.5.2	L'optimisation de la production de xylanase et de cellulase sur l'Alfa par BBD	59
3.5.2.1	Détermination des facteurs d'influence et ajustement du modèle.....	60
3.5.2.1.1	<i>ANOVA pour la production de xylanase</i>	61
3.5.2.1.2	<i>ANOVA pour la production de CMC</i>	62
3.5.2.1.3	<i>Etude des effets principaux (main effects plot)</i>	64
3.5.2.1.4	<i>Etudes des interactions</i>	64
3.5.2.1.5	<i>Analyse du modèle</i>	66
3.5.2.2	Procédure d'optimisation.....	67
3.5.3	Cinétique de production d'hémicellulase et de cellulase dans les conditions optimales	68
3.6	Optimisation du milieu de culture pour la production de xylanase.....	69
3.6.1	Etude et sélection des composants du milieu sur la production de xylanase par Plackett-Burman	69
3.6.2	Optimisation des sources de nutriments sélectionnées pour la production de xylanase par Central Composite Design	71
3.6.2.1	Analyse de la surface de réponse et interaction des variables.....	74
3.6.2.2	Optimisation	78
3.7	Saccharification enzymatique de substrats lignocellulosique	78
3.8	Optimisation de l'activité xylanolytique	79
3.9	Thermo-stabilité des conidies d' <i>Aspergillus fumigatus</i> et l'enzyme xylanase	82
3.9.1	Thermo-stabilité de l'enzyme xylanase.....	82
3.9.2	Thermorésistante des conidies.....	82

3.10	Analyse coût-efficacité de la production de xylanase	83
4	Discussion	83
5	Conclusion et perspectives	98
6	Abstract	101
7	ملخص	102
8	Références bibliographiques	103
9	Annexe	I
9.1	Milieus de culture	I
9.2	Réactifs et colorant	II
9.3	Méthode de détermination de l'activité enzymatique « dosage au DNS »	IV

Liste des figures

Figure 1 Structure de la biomasse lignocellulosique (Aavos, 2017).	6
Figure 2 Schéma d'une molécule de cellulose.	7
Figure 3 Organisation de la structure fibrillaire de la cellulose (Afrazmanech et al., 2022; GFP, 2000).	8
Figure 4 Quelques monomères importants entrant dans la composition des hémicelluloses (Kpogbemabou, 2011).	9
Figure 5 Structure de l'hémicellulose (xylane) constituée d'un squelette xylopyranose, avec des branches latérales acide glucuronique (1 → 2) et arabinofuranose (1 → 3) (Benaimeche et al., 2020).	9
Figure 6 Alcools phénoliques précurseurs de la lignine (Nordmann, 2013).	10
Figure 7 Diverses enzymes lignocellulolytiques regroupées selon leurs systèmes enzymatiques (Chukwuma et al., 2020).	11
Figure 8 Reproduction sexuée et asexuée chez <i>A. fumigatus</i> (Usher, 2019).	12
Figure 9 Expression et sécrétion de protéines fongique (Lübeck & Lübeck, 2022).	15
Figure 10 Modèle schématique de la dégradation enzymatique de l'hémicellulose (Bhardwaj et al., 2019).	17
Figure 11 Produits et sous-produits de la fermentation solide.	23
Figure 12 Localisation et délimitation des régions steppiques algériennes (indiqués par des traits verts)(A)((Dalila & Slimane, 2008) et les hauts plateaux algériens (désignés par la zone colorée) (B).	26
Figure 13 Conception d'un Box-Behnken à trois facteurs (Develve, 2020).	29
Figure 14 Génération d'un plan composite central à trois facteurs	30
Figure 15 Conception d'un plan composite central à trois facteurs (Boonpuang et al., 2020).	30
Figure 16 Localisation géographique des régions d'échantillonnage.	30
Figure 17 Activité CMC _{case} sur milieu gélosé : CMC (A) et Xylane de maïs (B) indiquée par la zone de lyse entourant les colonies de l'isolat sélectionné.	49
Figure 18 Observation macroscopique de l'isolat selectionné ensemencé sur milieu PDA (A) et 863 (B) après 3 jours d'incubation.	50

Figure 19 Observation microscopique de l'isolat sélectionné ; A : vésicule, B : formation des phialides, C et D : tête aspergillaire avant et après coloration avec le bleu de méthylène.....	51
Figure 20 L'arbre phylogénétique de l'ARN ribosomal 18S d' <i>Aspergillus fumigatus</i> MGA et d'autres espèces d' <i>Aspergillus</i>	52
Figure 21 Profil de la culture liquide en batch d' <i>Aspergillus fumigatus</i> avec le xylose dans un Erlenmeyer de 250 mL (A), un bioréacteur de 2 L (B) et un bioréacteur de 20 L (C)	53
Figure 22 Impact de la vitesse d'agitation sur le profil de fermentation d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	54
Figure 23 Morphologie microscopique des pellettes d' <i>Aspergillus fumigatus</i> dans un bioréacteur agité sous 200 rpm (A) et "effet de cisaillement" à 650 rpm (B).....	54
Figure 24 Morphologie macroscopique des pellettes d' <i>A. fumigatus</i> dans un bioréacteur (2L) agité sous 200 rpm (A), 350 rpm (B) et 650 rpm (C).....	55
Figure 25 Profile de la culture liquide en batch d' <i>Aspergillus fumigatus</i> avec le xylane de maïs dans un bioréacteur de 2 L.	56
Figure 26 Analyse HPLC du xylose libéré depuis le xylane beechwood et le xylane de maïs à partir du surnageant du bioréacteur.....	56
Figure 27 Evolution de la production de xylanase et de cellulase par <i>Aspergillus fumigatus</i> à 35°C et pH 4 en utilisant l'Alfa comme substrat humidifié à 70%.....	58
Figure 28 Taille des particules d'Alfa (a) ; > 500 µm, (b) ; le mélange des deux aspects fibre et poudre, (c) ; < 60-500 µm avant et après humidification, et son effet sur la production de xylanase et de CMCCase par <i>Aspergillus fumigatus</i>	59
Figure 29 Effet de la température d'incubation, le pH, la teneur en humidité et le temps d'incubation sur la production de xylanase (a) et de CMCCase (b) représenté par le graphique des effets principaux.....	64
Figure 30 Graphiques des interactions des facteurs expérimentaux sur la production de xylanase par <i>Aspergillus fumigatus</i> sur l'Alfa.	65
Figure 31 Graphiques des interactions des facteurs expérimentaux sur la production de CMCCase par <i>Aspergillus fumigatus</i> sur l'Alfa.	65
Figure 32 Iso-réponse (graphique de contour) de la production de xylanase par <i>Aspergillus fumigatus</i> en fonction de la température et du temps.....	66
Figure 33 Iso-réponse (graphique de contour) de la production de CMCCase par <i>Aspergillus fumigatus</i> en fonction de la température par rapport au temps d'incubation (a), de l'humidité par rapport à la température (b) et le temps d'incubation par rapport au niveau d'humidité (c) sous fermentation à l'état solide sur l'Alfa.	66

Figure 34 Analyse de régression orthogonale de : (a) la xylanase réelle par rapport à la xylanase prédite, (b) de la CMCCase réelle par rapport à la CMCCase prédite.	67
Figure 35 Diagramme d'optimisation pour la réponse xylanase (a), et la réponse CMCCase (b) et les deux réponses simultanément (c).	67
Figure 36 Evolution de la production de xylanase et de CMCCase en fonction du temps par <i>Aspergillus fumigatus</i> dans les conditions initiales (35 °C, pH 4 et substrat Alfa humidifié à 70%) et dans les conditions optimisées pour la production des deux enzymes (30 °C, pH 6 et substrat Alfa humidifié à 90%).	69
Figure 37 Graphiques de Pareto pour la production de xylanase par <i>A. fumigatus</i> . Les barres qui dépassent la ligne verticale représentent des effets statistiquement significatifs à un niveau de confiance de 95 %.	70
Figure 38 Production de xylanase liée aux essais PBD (U/gds).	71
Figure 39 Corrélation entre les valeurs expérimentales et prédites de l'activité xylanase (U/gds)	74
Figure 40 Effet de MgSO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , extrait de malt et NaNO ₃ sur l'activité enzymatique moyenne de la xylanase.....	74
Figure 41 Graphiques de la surface de réponse et des effets combinés de : (A) MgSO ₄ et (NH ₄) ₂ SO ₄ , (B) MgSO ₄ et extrait de malt, (C) MgSO ₄ et NaNO ₃ , (D) (NH ₄) ₂ SO ₄ et extrait de malt (E) (NH ₄) ₂ SO ₄ et NaNO ₃ , (F) extrait de malt et NaNO ₃ sur la production de xylanase par <i>Aspergillus fumigatus</i>	77
Figure 42 Comparaison de l'activité enzymatique de l'enzyme brute d' <i>A. fumigatus</i> , de l'hémicellulase et de la xylanase commerciales.	78
Figure 43 Processus de saccharification sur les substrats non traités Alfa (A), paille d'avoine (B), paille de blé (C) et son de blé (D) par le complexe enzymatique d' <i>A. fumigatus</i> et l'enzyme commerciale.	79
Figure 44 Effet du pH, de la température et de la concentration du substrat sur l'hydrolyse de la xylanase représenté par le graphique des effets principaux.	81
Figure 45 Effet de la température sur l'activité xylanase d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	83
Figure 46 La survie des conidies d' <i>Aspergillus fumigatus</i> LOG10 N de conidies VS la durée d'inactivation (minute) à différentes températures (60 °C, 65 °C et 70 °C).	82

Liste des tableaux

Tableau 1 Les hémicellulases typiques leurs substrats principaux et produits finals (adapté de Wertz, (2011)):	17
Tableau 2 Comparaison des technologies de fermentation en milieu liquide et en milieu solide (Antoine Assamoi et al., 2009; Aro, 2009; Prevot, 2013; Samanthi, 2019).	23
Tableau 3 Conditions optimales pour la production de xylanase et de CMCCase par <i>Aspergillus spp.</i> sur milieu solide.	37
Tableau 4 Niveau et code des variables indépendantes pour l'optimisation de la production de xylanase et de cellulase par le Box-Behnken design.	38
Tableau 5 Matrice de Box-Behnken avec les variables codées.	39
Tableau 6 Matrice de conception expérimentale de Plackett-Burman à onze variables avec valeurs codées et expérimentales entre parenthèses (g/L) pour cribler les conditions de culture des nutriments pour la production de xylanase par <i>A. fumigatus</i> .	42
Tableau 7 Niveau et code des variables indépendantes utilisées pour le Box-Behnken design (BBD) pour l'optimisation de l'activité xylanase.	45
Tableau 8 Teneur en sucre de l'Alfa	57
Tableau 9 Les variables et les réponses correspondantes pour l'activité xylanase et CMCCase dans la conception de BBD.	59
Tableau 10 Analyses de Variance pour la production de xylanase (* DF degré de liberté (freedom degree)).	61
Tableau 11 Analyses de Variance pour la production de CMCCase.	63
Tableau 12 Valeurs prédites et expérimentales de la production de xylanase et de CMCCase dans des conditions optimales.	68
Tableau 13 Analyse de la variance (ANOVA) pour la régression du modèle PBD.	69
Tableau 14 La conception Central-Composite montrant la production expérimentale et prédite de xylanase par <i>Aspergillus fumigatus</i> sous FSS.	72
Tableau 15 Analyse de la variance pour la production de xylanase par la conception Central-Composite (* degré de liberté).	73
Tableau 16 Valeurs prédites et expérimentales de la production de xylanase dans les conditions optimales du CCD.	78

Tableau 17 Les variables de la conception BBD et les réponses correspondantes pour l'activité xylanase.	80
Tableau 18 Analyse de variance pour l'activité xylanase (* Freedom Degree (degré de liberté)).	80
Tableau 19 Valeur prédite et expérimentale de l'activité xylanase dans les conditions optimales.	82
Tableau 20 Thermorésistance des conidies d' <i>Aspergillus fumigatus</i> exprimée par réduction décimale (Dt) à différentes températures (T).	82
Tableau 21 Comparaison coût-efficacité du milieu optimisé Alfa par rapport au milieu commercial à base de xylane.	83

Introduction

Introduction

La biomasse lignocellulosique est composée, essentiellement, de trois polymères ; la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Les teneurs de différents constituants sont variables d'une espèce végétale à une autre (Ferdeş et al., 2020). La valorisation optimale de cette biomasse passe par l'exploitation de tous ses composants dans une approche intégrée de type bio-raffinerie. Les hémicelluloses sont, en effet, présentes dans toutes les plantes vertes, représentant de 20 jusqu'à 40 % de la biomasse lignocellulosique en poids (Carpita & McCann, 2020). Les hémicelluloses sont définies structurellement comme des polysaccharides dont le squelette est composé de résidus β -(1,4)-D-pyranose, où l'O4 est en position équatoriale (Pfeifer & Classen, 2020). Contrairement à la cellulose, qui est constituée d'une chaîne linéaire de molécules de D-glucose, les hémicelluloses contiennent plusieurs sucres à cinq atomes de carbone (sucres C5) tels que le xylose et l'arabinose, des sucres C6 tels que le glucose, le mannose, le galactose, l'acide galacturonique et l'acide glucuronique, et de sucre C7 ; l'acide 4-O-méthyl glucuronique (Flórez-Pardo et al., 2019).

Il existe principalement trois catégories d'enzymes nécessaires à la dégradation de la matière lignocellulosique ; les cellulases, les hémicellulases et les enzymes accessoires (glycosides hydrolases de débranchement et carbohydrates estérases), et les éventuelles enzymes dégradant ou modifiant la lignine (Prevot, 2013). L'hydrolyse enzymatique des polymères cellulosiques et hémicellulosique pour obtenir des monomères offre une alternative intéressante pour générer des sucres afin de produire divers produits commercialement intéressants. Bien que l'utilité du traitement enzymatique soit de plus en plus approuvée, le procédé de production tel qu'habituellement utilisé, fermentation en milieu liquide, reste très coûteux à cause du prix élevé de la matière première et de la faible stabilité des enzymes produites. Le coût exorbitant de la production des enzymes est dû au coût élevé du milieu de culture utilisé pour leur production (40-60 % du coût de production). Il est désormais, admis que l'utilisation des matières organiques résiduelles comme substrats de croissance des microorganismes, tout particulièrement, les champignons filamenteux (Farinas, 2015; Lodha et al., 2020), via la fermentation en substrat solide (FSS), est le processus le plus économique pour la production d'enzymes ligno-cellulolytiques (Siqueira et al., 2020). En effet, plusieurs agro-résidus peuvent être utilisés comme substrats pour ce type de fermentation, comme la bagasse de canne à sucre, la paille de riz, le son de céréales, la pulpe et les cosses de café, les pelures de fruits, les rafles

de maïs, les pailles et cosses de différentes origine. Ces résidus fournissent un support solide et une source de carbone et de nutriments pour la croissance fongique.

Parmi les ressources lignocellulosiques d'intérêt, il est très envisageable d'utiliser l'Alfa (*Stipa tenacissima*). Cette plante est largement distribuée dans les pays de la Méditerranée occidentale, elle couvre une surface d'environ 4 millions d'hectares en Algérie (Akchiche & Messaoud, 2007). L'Alfa est composée d'une forte concentration de polysaccharides en l'occurrence ; la cellulose, l'hémicellulose, et la lignine, ce qui lui confère un réel potentiel pour son intégration en tant que matière première (Gares et al., 2020).

Le marché mondial de la xylanase a été considérablement robuste en 2020. Les principaux facteurs responsables de cette croissance sont l'utilisation grandissante de l'enzyme dans différentes industries. L'enzyme xylanase d'origine microbienne, est utilisée comme additif dans l'alimentation animale, le conditionnement des produits de boulangerie, la production d'amidon de maïs et la fermentation alcoolique. De plus, cette enzyme est utilisée dans le traitement et transformation dans l'industrie du papier et de sa pâte (Reports and Data, 2021).

Pour faire face à la demande croissante de cette enzyme, plusieurs études ont été menées afin d'optimiser sa production en milieu solide par des champignons filamenteux, notamment, le genre *Aspergillus* (Ang, 2015; Azzouz et al., 2021; Morán-Aguilar et al., 2021; Namnuch et al., 2021). Des études sur *Aspergillus fumigatus* ont montré que ce champignon possède une capacité énorme en exploitant pleinement les matériaux lignocellulosiques (Abdulmajeed et al., 2021; Ang, 2015; Oliveira et al., 2018).

Aussi, l'objectif de ce projet de thèse est recherche et caractérisation d'isolats microbiens dans le but de produire de l'hemicellulase sur un substrat naturel lignocellulosique. Pour ce faire, une synthèse des principales informations (étude bibliographique) qui cadre le sujet a été effectuée, suivie d'une partie expérimentale scindée en quatre parties :

- La première partie repose sur l'isolement, purification et criblage des isolats microbiens à activité xylanase.
- La deuxième partie est consacrée à l'étude de l'aptitude de la souche sélectionnée à produire de la xylanase en *scaling-up*.
- La troisième partie repose sur la production de xylanase et de cellulase sur un milieu à base de fibres d'Alfa (*Stipa tenacissima*) comme seule source de carbone et d'énergie et

optimisation des conditions physico-chimique pour une production optimales d'enzymes à l'aide de Box Behnken Design.

- La dernière partie se focalise sur l'étude et la sélection des nutriments qui influencent la production de xylanase (sources d'azote de carbone. etc.) par la méthode Plackett Burmann. Et l'optimisation de ces facteurs pour une production maximale de xylanase à l'aide de Central Composite Design.

*Revue
bibliographique*

1 Revue bibliographique

1.1 Biomasse lignocellulosique, état de l'art

1.1.1 Généralité

Les différentes exploitations industrielles des végétaux entraînent souvent la formation de quantités considérables de déchets lignocellulosiques, nommés déchets de biomasse. La biomasse lignocellulosique qui comprend les déchets agricoles tels que la paille de céréales, les déchets organiques des fermes et des industries agro-alimentaires, etc. Ainsi que les cultures dédiées cultivées dans des champs de cultures énergétiques, tels que le miscanthus, le panic raide et le peuplier, reçoit beaucoup d'attention, car elle représente une des ressources renouvelables la plus abondante sur terre et certainement une des moins coûteuses (Devi et al., 2021; Haq et al., 2021).

1.1.2 Source d'énergie renouvelable

La valorisation de la biomasse lignocellulosique implique sa bioconversion en énergie comme l'électricité et/ou l'hydrogène (Liu et al., 2020), ainsi que d'autres produits pharmaceutiques et chimiques (Namnuch et al., 2021), et bioproduits tel que les enzymes et les biocarburants, qui remplacent, de plus en plus, les produits à base de combustibles fossiles (Chandel et al., 2018; Chukwuma et al., 2020). Cette biomasse lignocellulosique semble être une matière première intéressante pour trois raisons majeures. Premièrement, elle constitue une ressource renouvelable de manière durable dans le futur. Deuxièmement, elle semble avoir d'excellentes propriétés environnementales puisque sa transformation ne génère pas de rejet important de dioxyde de carbone ou de soufre. Troisièmement, elle pourrait avoir un potentiel économique important à condition que les prix des combustibles fossiles augmentent (Alio, 2021). Actuellement, plus de 50 pays ont développé des stratégies de bio-économie (Mantas et al., 2019). En effet, 14 % de la consommation énergétique mondiale provient de l'utilisation de la biomasse (Popp et al., 2021). La contribution énergétique de la biomasse pourrait tripler, voire quintupler, d'ici 2050 (Jones et al., 2012).

La biomasse est reconnue comme une ressource renouvelable pouvant diminuer les émissions de gaz à effet de serre (GES), en effet, une tonne de biomasse représente une tonne de CO₂ évitée dans l'atmosphère (Saidur et al., 2011). Dans le but de diminuer les émissions de CO₂, la plupart des pays se sont dotés de cibles de réduction pour 2020 allant, par exemple, de 20 % pour l'Union européenne, à 25 % pour le Québec par rapport aux niveaux de 1990 (Anonymous,

2016). Certains pays comme le Danemark l'Irlande, la Lituanie, le Luxembourg et l'Espagne ont même des objectifs fort ambitieux, alors que leur politique énergétique suggère que 100 % de l'énergie consommée proviendrait de sources renouvelables d'ici 2050 (Simon, 2020).

Les besoins énergétiques de l'Algérie sont couverts presque exclusivement par les hydrocarbures. La croissance économique depuis 2001 repose sur la demande publique tirée principalement par les revenus des hydrocarbures. Néanmoins, le pétrole et le gaz sont deux ressources naturelles, non-renouvelables et qu'on ne peut pas puiser à l'infini. La croissance illimitée de leur demande est incompatible avec leur disponibilité limitée (Cherfi, 2011). Comme indiqué par le Ministère Algérien de l'Énergie, la consommation nationale d'énergie est passée de 62,3 M Tep en 2020 à 67,2 M Tep en 2021 (Ministère de l'Énergie, 2021). Les études menées par CHERFI sur l'avenir énergétique en Algérie à l'horizon 2020-2030, ont supposé que le marché algérien nécessiterait 61,5 Mtep d'énergie primaire en 2020 et environ 91 Mtep en 2030 (Cherfi, 2011). D'autre part, l'Algérie est aussi confrontée à des problèmes majeurs concernant la pollution et à la prolifération de toutes sortes de déchets tels que les résidus forestiers, les déchets agricoles, industriels et urbains. Selon le dernier rapport de l'Organisation mondiale de la santé (WHO, 2016), la qualité de l'air en Algérie est caractérisée par un taux de pollution élevé dépassant celui des pays hautement industrialisés tels que l'Allemagne, la France et même les États-Unis. Alger, comme beaucoup d'autres métropoles, est confrontée à une grave pollution atmosphérique due aux niveaux extrêmement élevés de pollution par les particules, l'ozone, le benzène et le plomb. Cette pollution est très élevée par rapport aux normes de l'OMS et, par conséquent, la population urbaine est principalement exposée à ses effets négatifs (Kerbachi et al., 2009). En effet, les deux principales sources de pollution de l'air en Algérie sont la circulation des véhicules et la combustion des déchets. En effet, la plupart des déchets lignocellulosiques sont éliminés par brûlage (Houfani et al., 2017), alors qu'ils représentent une ressource renouvelable et abondante pour la bioconversion en énergie. En fait, les sources lignocellulosiques telles que l'Alfa, les grignons d'olive et la paille de céréales pourraient fournir jusqu'à 0,67 million de tonnes équivalent pétrole (Mtep) (Gares et al., 2020), ce qui représente 4,62 % de la consommation énergétique du secteur des transports en Algérie. Une autre recherche menée par le Centre de recherche des Energies Renouvelables(CDER) a évalué le potentiel bioénergétique à plus de 0,5 M Tep (APS, 2021). Par conséquent, ces considérations justifient la nécessité d'une forte intégration des énergies renouvelables dans la stratégie d'approvisionnement énergétique à long terme à partir d'aujourd'hui.

1.1.3 Composition

La biomasse lignocellulosique est majoritairement composée de trois grandes familles de macromolécules (polymères) ; la cellulose, les hémicelluloses, et les lignines (figure 1). Les polymères caractérisant les parois végétales synthétisés par les plantes se regroupent en deux grandes catégories : les polysaccharides et les polyphénols.

Les polysaccharides sont les composés principaux des glucides dans la biomasse lignocellulosique. Ils résultent de la condensation entre elles d'un grand nombre de molécules de sucres simples (Kpogbemabou, 2011). La complexité de leur structure, leur adsorption sur des composés minéraux et leur liaison avec des substances humiques peuvent conférer aux polysaccharides une certaine résistance aux attaques enzymatiques et à leur biodégradation (Stevenson, 1994). Les polysaccharides d'origine végétale les plus abondants dans la biomasse lignocellulosique sont la cellulose et l'hémicellulose. Ils représentent de 60 à 80 % de la masse des biomasses lignocellulosique (Liu, 2016).

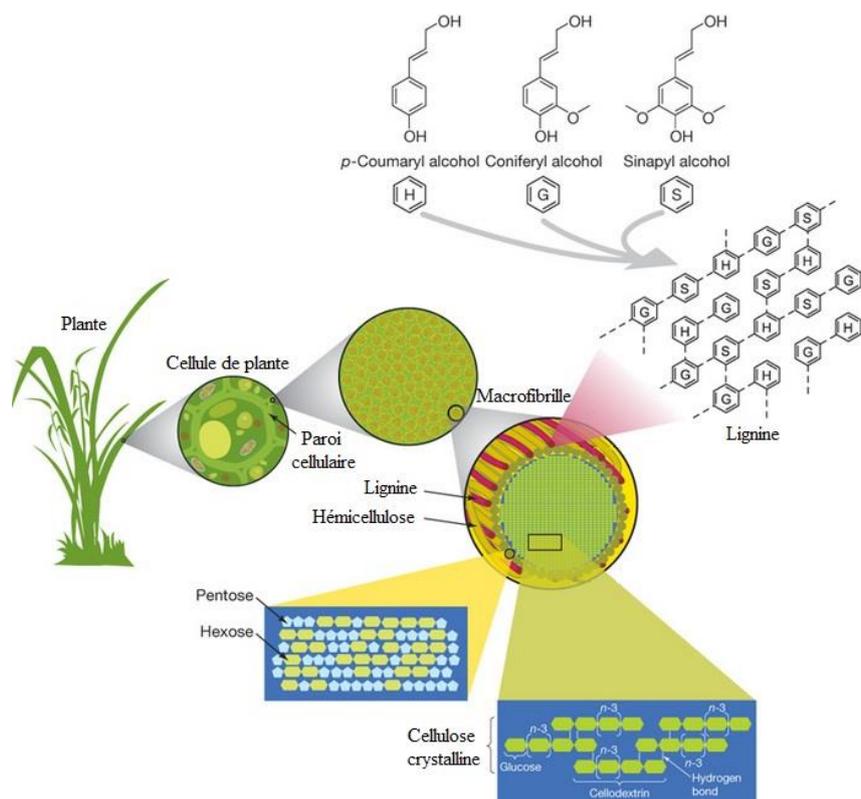


Figure 1 Structure de la biomasse lignocellulosique (Aavos, 2017).

1.1.3.1 Cellulose

La cellulose est la matière organique la plus abondante sur terre, c'est le principal constituant de la paroi des cellules végétales. Elle représente plus de 50 % de la biomasse. Chaque année la nature produit plus de 10^{10} tonnes de cellulose (Sun, 2010).

Ce polymère est dégradé par des microorganismes aérobies et anaérobies tels que les champignons et les bactéries (Duchaufour & Blum, 1997). Les molécules de cellulose sont liées entre elles latéralement par des liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyle et forment ainsi des fibrilles (Elamin et al., 1992).

La cellulose a un caractère cristallin dont le degré de polymérisation dépend de la matière végétale (Sun, 2010). Elle présente un degré de polymérisation de 10 000 à 14 000 monomères, mais certaines chaînes peuvent dépasser les 15 000 unités de glucose (Xu, 2010). Cependant, la longueur du polymère n'est pas le seul facteur jouant sur la stabilité du polymère.

Elle existe sous deux formes, amorphe ou cristalline plus résistante à la dégradation enzymatique et microbienne (Newman et al., 1994; Stevenson, 1994).

La phase amorphe dispose d'un grand nombre de groupements hydroxyles capable de former des liaisons hydrogène avec d'autres molécules comme l'eau (Park et al., 2007). D'autre part, dans les régions cristallines, la formation d'un nombre important de liaisons hydrogène intra et intermoléculaires confère à la cellulose une résistance aux solvants et une stabilité à des hautes températures qui empêche la fusion (Cuissinat & Navard, 2006).

Aspect chimique

Ce bio-polymère glucidique est constitué d'une chaîne linéaire d'unités de cellobiose. Cette dernière est l'association de deux glucoses de formule moléculaire $(C_6H_{10}O_5)_n$ en conformation chaise du glucose, liés en β_{1-4} par une liaison covalente et tournés de 180° l'un par rapport à l'autre (figure 2). Cette conformation favorise la formation de nombreuses liaisons hydrogène intra et intermoléculaires. Ces interactions au sein de la molécule (liaison intra) et entre les différentes molécules de cellulose (liaisons inter) conduisent à une grande stabilité du polymère (Roig, 2011).

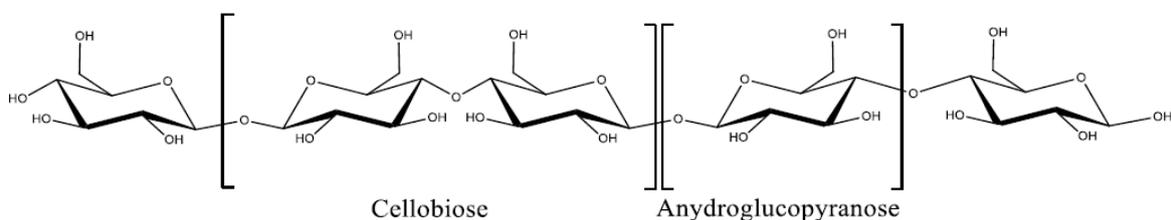


Figure 2 Schéma d'une molécule de cellulose.

Les liaisons hydrogène intra et intermoléculaires sont responsables de la formation de structures dites supramoléculaires ; la cellulose s'agence naturellement en un réseau fibrique, l'association de 30 à 40 chaînes de cellulose forme une micro-fibrille (environ 1500 molécules), dont

l'agrégation forme des macro-fibrilles, et plusieurs macro-fibrilles forment une fibre de cellulose (figure 3).

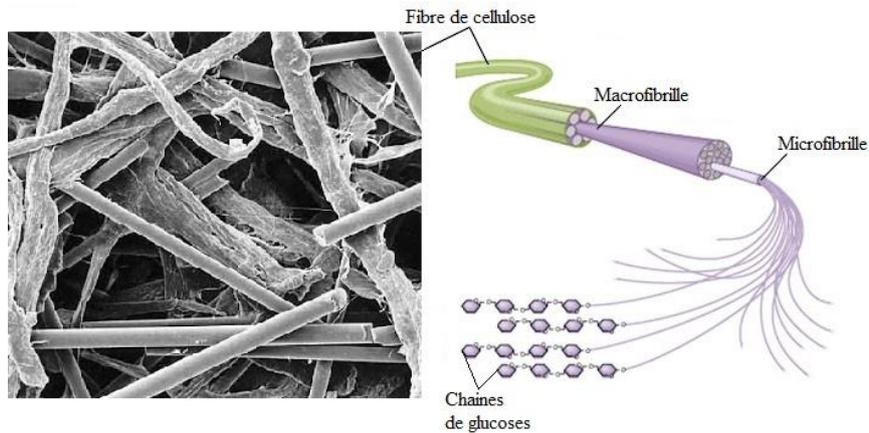


Figure 3 Organisation de la structure fibrillaire de la cellulose (Afrazmanech et al., 2022; GFP, 2000).

1.1.3.2 Hémicellulose

Les polysaccharides non-cellulosiques sont souvent nommés hémicelluloses. Les hémicelluloses sont un des composants majeurs de la paroi cellulaire, ils se lient fortement aux micro-fibrilles de cellulose par des liaisons hydrogène et la force de Van der Waals (Liu et al., 2021). Les hémicelluloses représentent ~20 - 40 % de la biomasse en poids (Wertz, 2011).

Ces polymères sont des hydrates de carbone semblables à la cellulose facilement hydrolysables du fait de leurs structures amorphes (Kpogbemabou, 2011). Elles jouent un rôle structural dans la matière lignocellulosique en tant que lien entre les différentes micro-fibrilles de la paroi pecto-cellulosique et lignocellulosique. Enfin, elles permettent de faire la liaison entre la cellulose et la lignine. Pour cela, les hémicelluloses sont capables de développer des liaisons hydrogène avec la cellulose et peuvent être liées de manière covalente à la lignine (liaisons α benzyle éther) (Nordmann, 2013).

Aspect chimique

La dénomination « hémicelluloses » réunit les polymères constitués d'unités monomériques de sucres liés entre eux par multiples types de liaisons glycosidiques (Roig, 2011). Elles peuvent être composées de polysaccharides alcalino-solubles et comportent différentes unités monomères incluant : les pentoses C5 (xylose, rhamnose et arabinose), les hexoses C6 (glucose, mannose et galactose) et les acides uroniques (tels que l'acide 4-O-méthyl-glucuronique, l'acide D-glucuronique et l'acide D-galacturonique) (figure 4). Les xyloses et les mannoses sont les monomères les plus abondants (Liu, 2016). Il s'agit donc d'hétéropolymères constitués

de chaînes principales particulièrement d'anhydro β -(1-4)-D-xylopyranose, mannopyranose, glucopyranose et galactopyranose (figure 5), avec de nombreuses substitutions et ramifications. Les xylanes, polymères de xyloses, auraient d'ailleurs un rôle majeur dans l'interface entre la lignine et les polysaccharides (Liu, 2016).

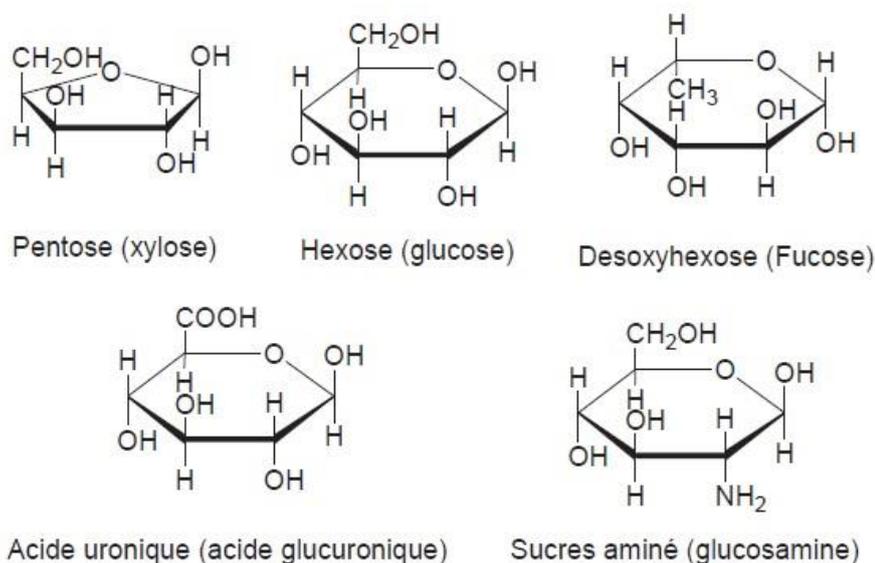


Figure 4 Quelques monomères importants entrant dans la composition des hémicelluloses (Kpogbemabou, 2011).

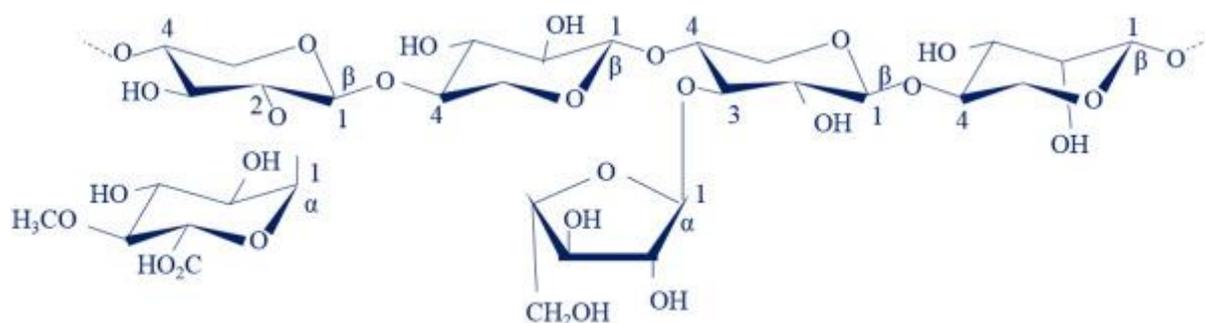


Figure 5 Structure de l'hémicellulose (xylane) constituée d'un squelette xylopyranose, avec des branches latérales acide glucuronique (1 \rightarrow 2) et arabinofuranose (1 \rightarrow 3) (Benaimche et al., 2020).

1.1.3.3 Lignine

La lignine est un polymère aromatique naturel, tridimensionnel, non-glucidique et difficilement biodégradable de manière encore plus marquée que pour les hémicelluloses. Ce polymère joue un rôle essentiel dans le développement des plantes (Sun, 2020). La composition de la lignine peut différer d'une espèce végétale à une autre et aussi selon les conditions climatiques.

La lignine est un composé hydrophobe qui protège les plantes contre les attaques microbiennes (Mahmood et al., 2018). En effet, ce polymère est relativement résistant à la biodégradation. Et

certaines de ses structures phénoliques sont des inhibiteurs de l'activité microbienne (Alzagameem et al., 2019). Seul un groupe limité de champignons (champignons de la pourriture blanche) est capable de le dégrader complètement en CO₂, alors que les champignons de la pourriture brune entraînent plutôt des changements structuraux.

Aspect chimique

La lignine est composée des trois unités phénoliques 4-hydroxyphénylpropanoïdes typiques appelés monolignols ; unités hydroxyphényle (H), gäiacyl (G) et syringyle (S) (figure 6). Dérivées de l'alcool cinnamique, assemblées par couplage radicalaire catalysé par des enzymes comme les laccases ou les peroxydases (Sun, 2020).

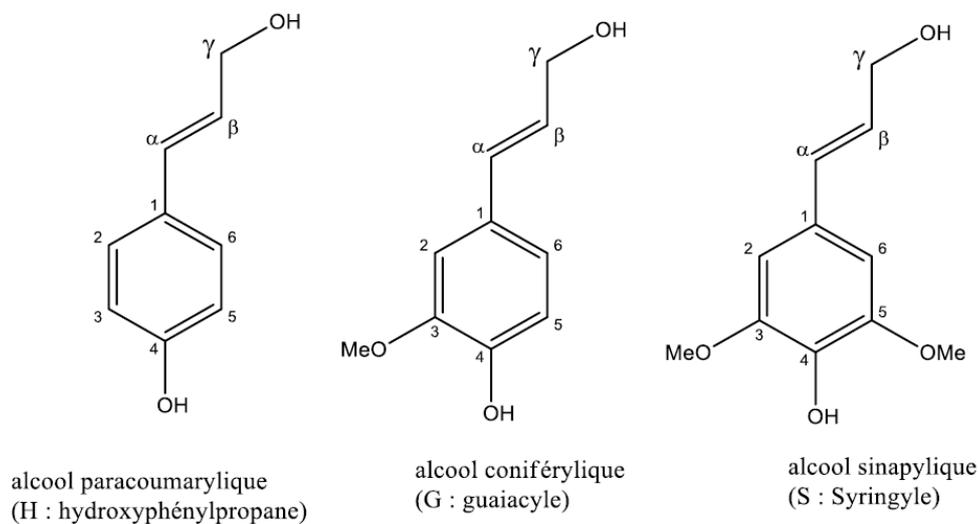


Figure 6 Alcools phénoliques précurseurs de la lignine (Nordmann, 2013).

1.2 Champignons lignocellulolytiques

1.2.1 Les biocatalyseurs lignocellulolytiques fongiques

Les champignons sont les micro-organismes les plus connus pour décomposer la matière lignocellulosique en ses trois polymères importants. Cependant, comme les substrats sont insolubles, la dégradation bactérienne et fongique doit se produire de manière extracellulaire (Xie et al., 2016). Les champignons lignocellulolytiques tels que les *Aspergillus*, *Penicillium*, *Schizophyllum Trichoderma*, *Phanerochaete* et *Sclerotium* sont connus pour leurs capacités de produire des enzymes extracellulaires en grande quantité (Andlar et al., 2018).

Les micro-organismes sont généralement connus pour avoir deux types de systèmes enzymatiques extracellulaires, comme le montre la figure 7. Le système hydrolytique, responsable de la dégradation de l'hémicellulose et de la cellulose via la production d'hydrolases. Et le système ligninolytique oxydatif et extracellulaire unique, qui dépolymérise

la lignine. Sur cette prémisse, les enzymes lignocellulolytiques, sur la base de leurs systèmes enzymatiques, sont soit ligninolytiques, soit hydrolytiques (Chukwuma et al., 2020).

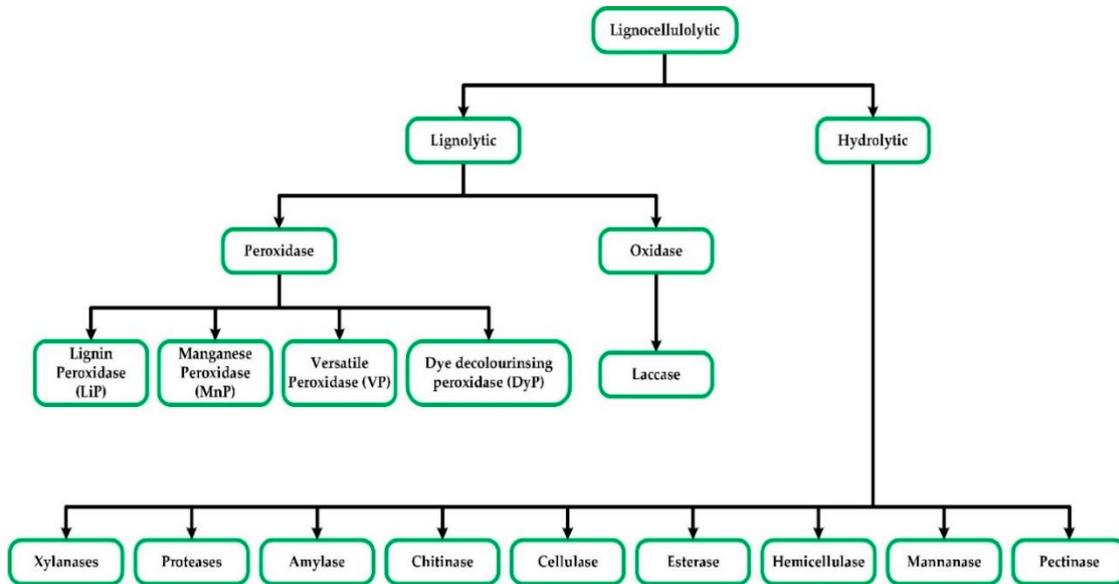


Figure 7 Diverses enzymes lignocellulolytiques regroupées selon leurs systèmes enzymatiques (Chukwuma et al., 2020).

1.2.2 L'espèce *Aspergillus fumigatus*

1.2.2.1 Caractéristiques et taxonomie

A. fumigatus est un champignon filamenteux ubiquiste appartenant au groupe phylogénétique des Ascomycètes. Au sein du genre *Aspergillus*, qui comprend plus de 300 espèces (Vong, 2020), ce champignon saprophyte se trouve généralement dans le sol et la matière organique en décomposition, comme les tas de compost, où il joue un rôle essentiel dans le recyclage du carbone et de l'azote (Fang & Latgé, 2018).

A. fumigatus est reconnaissable à ses têtes aspergillaires unisériées, en colonne compacte. La vésicule hémisphérique, située à l'extrémité d'un conidiophore court, lisse et hyalin, et s'évasant progressivement à son sommet, porte une rangée unique de phialides, qui produisent par bourgeonnement à leur sommet toute une série de conidies rondes, lisses et de petite taille (2-3 µm), disposées en chaînes (Vong, 2020).

C'est une espèce psychro-tolérante, plus ou moins osmo-tolérante selon les souches, thermophile, pouvant se développer à des températures allant jusqu'à 50 °C, quant à ses conidies, elles sont résistantes même à une température de 70 °C (Dhingra & Cramer, 2017).

Pendant de nombreuses années, on a pensé que *A. fumigatus* ne se reproduisait que de manière asexuée, car ni la reproduction ni la méiose n'avaient jamais été observées. En 2008, il a été démontré que *A. fumigatus* possède un cycle de reproduction sexuelle entièrement fonctionnel, 145 ans après sa description originale par Fresenius (O’Gorman et al., 2009). La reproduction asexuée se fait par division mitotique de cellules haploïdes (1N) ou par formation de conidiospores asexuées. La reproduction sexuée est hétérothallique entre les types d'accouplement MAT1-1 et MAT1-2. Les produits d'accouplement sont des cléistothèce contenant de multiples ascospores (figure 8).

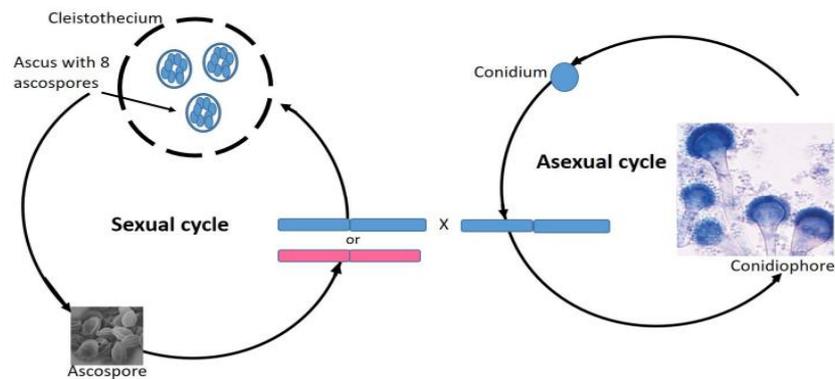


Figure 8 Reproduction sexuée et asexuée chez *A. fumigatus* (Usher, 2019).

1.2.2.2 Toxicité et ingénierie génétique

Les espèces du genre *Aspergillus* ont divers effets sur l'homme. Plus de 300 espèces ont été identifiées à ce jour, dont plusieurs souches ont également des effets néfastes ou bénéfiques pour l'homme (de Vries et al., 2017). *A. fumigatus* est l'agent principal de l'aspergillose pulmonaire chez les patients présentant une altération de l'immunité naturelle. Cependant, chez les hôtes immunocompétents, les conidies inhalées sont rapidement éliminées (GU et al., 2021). Selon (O’Gorman et al., 2009), il y a moins de risques attaché à l'organisme qu'on ne le pensait initialement, surtout après avoir achevé son séquençage génomique, décodant le cycle de reproduction sexuel et le mode endophytique (Kusari et al., 2009; Li et al., 2004). Cette espèce a fait l’objet d’un très grand nombre de travaux fondamentaux avec l’identification des facteurs de virulence du champignon (Vong, 2020).

En effet, une édition extrêmement efficace du génome médiée par CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) a été étudiée sur *A. fumigatus* (Al Abdallah et al., 2017; Fuller et al., 2015; Jin et al., 2022; Son & Park, 2021; van Rhijn et al., 2020; Zhang et al., 2016). De plus, la suppression de gènes codant pour des enzymes de la biosynthèse de la mélanine, et/ou d’autres codant pour des facteurs de transcription déclenchant la production de

métabolites secondaires, comme la gliotoxine, ou codant pour des protéases extracellulaires et des enzymes synthétisant les sidérophores, pourrait parvenir à créer des souches non-pathogènes (Nieland et al., 2021).

D'autre part, les espèces du genre *Aspergillus* sont aussi considérées comme des usines cellulaires industrielles en raison de leur capacité importante à produire des protéines hétérologues, des métabolites secondaires et des acides organiques (Son & Park, 2021). De ce fait, les scientifiques tentent d'améliorer les souches fongiques et de reconcevoir les processus métaboliques grâce à des techniques avancées de manipulation génétique et des systèmes de délivrance de gènes pour améliorer leur efficacité et leur utilité industrielles (Son & Park, 2021).

Des souches indigènes ou des souches modifiées sont utilisées pour la production de protéines chez des hôtes fongiques hautement spécialisés. Les champignons filamenteux présentent des avantages distincts par rapport aux autres systèmes d'expression de protéines recombinantes (Nevalainen, 2020; Nevalainen & Peterson, 2014). En raison de leurs puissantes voies de sécrétion et de leur capacité à effectuer correctement divers traitements post-translationnels des protéines eucaryotes, les champignons filamenteux sont préférés aux hôtes bactériens ou levures (Bergquist et al., 2002). La procédure CRISPR/Cas9 a été appliquée avec succès à l'ingénierie métabolique de souches de fermentation industrielle telles qu'*A. nidulans*, *A. niger* et *A. oryzae* (Jin et al., 2022). Par exemple, l'optimisation de la production de xylanase à l'aide d'un *Aspergillus nidulans* modifié par intégration d'un gène AFUMN-GH10 d'*A. fumigatus var. niveus*, ce qui a entraîné une sécrétion à haut rendement et une accumulation de protéines (Abdella et al., 2019).

1.2.3 Métabolisme fongique et sécrétion des enzymes

Les champignons filamenteux, y compris les *Aspergillus*, absorbent naturellement les nutriments de l'environnement qui, selon leur mode de vie, peuvent être des débris végétaux et d'autres déchets organiques. Puisqu'ils sont hétérotrophes, ils dépendent de sources de carbone externes, mais beaucoup d'entre eux sont tout à fait capables d'absorber de l'azote inorganique et d'autres nutriments pour leur croissance et leur métabolisme. Ils peuvent synthétiser tous les différents acides aminés nécessaires à partir de l'azote inorganique (Lübeck & Lübeck, 2022).

Les champignons peuvent bio-synthétiser un grand nombre de composés utiles dans l'industrie. Le métabolisme fongique est généralement divisé en métabolisme primaire et secondaire ; en effet, dans la nature, un bon nombre de ces composés sont soit utilisés pour la récupération des nutriments, soit utilisés dans la compétition de l'organisme avec d'autres organismes (les

antibiotiques). Des composés tels que les acides organiques et les enzymes peuvent, en plus d'être utilisés pour la récupération des nutriments, participer à la lutte pour les nutriments avec d'autres organismes. En effet, la libération d'acide organique abaisse le pH ambiant à un niveau où de nombreux autres organismes ne peuvent pas prospérer, et certaines enzymes aident à attaquer et à dégrader les hôtes vivants, y compris d'autres champignons (mycoparasites) (Lübeck & Lübeck, 2022).

En présence de sources de carbone simple (facilement métabolisées) comme le glucose, la production d'enzymes extracellulaires pour la dégradation de matériel biologique complexe est inhibée, alors que la production de ces enzymes est déclenchée soit par le besoin, soit par la présence de glucides complexes, par exemple, la paroi cellulaire des plantes (Carle-Urioste et al., 1997).

Cependant, la dégradation des polymères complexes des végétaux nécessite un système de régulation complexe pour contrôler l'expression de ces enzymes afin de dégrader la paroi cellulaire. La production d'enzymes extracellulaires est régulée au niveau transcriptionnel ; plusieurs voies de transduction du signal qui contrôlent l'expression d'enzymes telles que les cellulases et les xylanases ont été identifiées. Une analyse approfondie de l'expression des enzymes et de leurs promoteurs menée par (Wang et al., 2020), a fourni de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la transcription des gènes de la cellulase et de la xylanase. Néanmoins, de nombreux détails dans la transduction précise du signal de la détection à la régulation restent encore largement flous.

La production et la sécrétion de protéines représentent un processus complexe et hautement régulé chez les champignons (Sakekar et al., 2021; Sun & Su, 2019) (figure 9). Les gènes codant pour les protéines extracellulaires abritent une partie peptide signal (de 15 à 36 acides aminés de long) à l'extrémité N-terminale. Après la transcription du gène, l'ARNm est traduit en un polypeptide au niveau des ribosomes dans le cytosol. Au cours du processus de traduction, les ribosomes se fixent à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) à l'aide d'une particule de reconnaissance de signal (SRP), et le polypeptide en croissance est transloqué dans le lumen du RE. Le fragment peptide signal est clivé du polypeptide par une peptidase signal lors de son entrée dans le RE, et le polypeptide résultant est prêt pour le repliement et la maturation. Le polypeptide subit certaines modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation suivie d'un transport vers les corps de Golgi, où une modification supplémentaire (O-mannosylation ou hyperglycosylation) et un repliement ont lieu. Les protéines presque finales sont escortées par des vésicules cytoplasmiques, transportées vers la membrane externe puis

sécrétées par fusion avec la membrane cytoplasmique. Les protéines hautement sécrétées contiennent des peptides signal efficace, par exemple la cellobiohydrolase de *T. reesei* et la glucoamylase d'*A. niger*, et même de petites différences entre les peptides signal peuvent affecter la sécrétion des protéines (Sakekar et al., 2021; Sun & Su, 2019).

Sommairement, l'expression et la sécrétion de protéines dans les champignons filamenteux impliquent un ensemble d'étapes importantes, à commencer par la transcription du gène codant pour la protéine dans le cytoplasme, le transfert de polypeptide des ribosomes vers le réticulum endoplasmique (RE), repliement et modification des protéines dans le RE, et transfert ultérieur des protéines repliées dans les vésicules vers l'appareil de Golgi, où elles sont davantage glycosylées et de là transférées à travers la membrane externe vers l'extérieur. Les peptides sont produits par des enzymes spécifiques (synthèses de peptides non-ribosomiques) dans le cytoplasme et transférés vers l'extérieur avec la même voie de sécrétion de protéines que les protéines produites par les ribosomes (Lübeck & Lübeck, 2022).

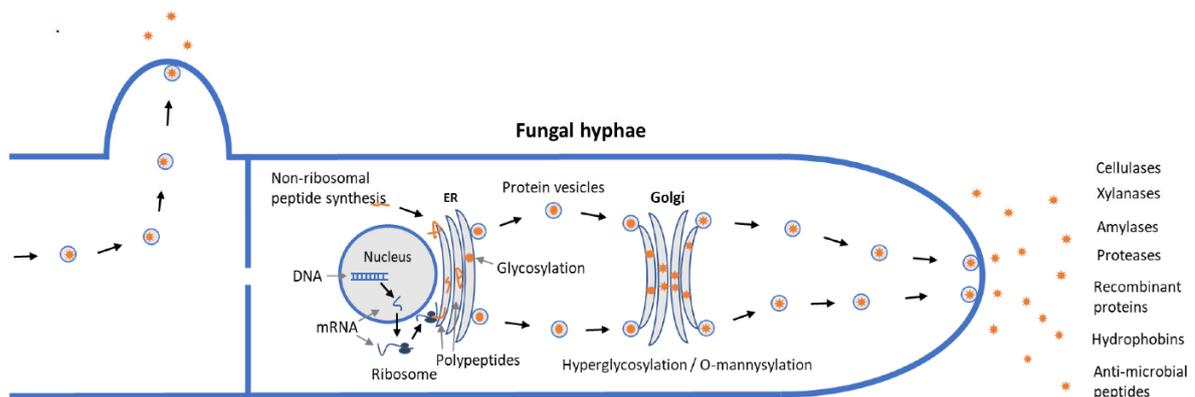


Figure 9 Expression et sécrétion de protéines fongique (Lübeck & Lübeck, 2022).

1.2.4 Aspect génétique de la production des hémicellulases

Les recherches sur la régulation de l'expression des gènes des hémicellulases peuvent être très utiles pour augmenter la production de ces enzymes. Les mécanismes de régulation génique de l'expression de l'hémicellulase chez les champignons filamenteux ont été étudiés, principalement chez *Aspergillus* et *Trichoderma*. La production de ces enzymes extracellulaires est un processus consommateur d'énergie, de sorte que les enzymes ne soient produites que dans des conditions dans lesquelles le champignon a besoin d'utiliser des polymères végétaux comme source de carbone et d'énergie. En effet, la production d'un grand nombre de ces enzymes est régulée de manière coordonnée et induite en présence des polymères de substrats lignocellulosiques (mono et oligo-saccharides) (Amore et al., 2013).

Les génomes de *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. niger* et *A. fumigatus*, ont été récemment séquencés (Anonyme, 2022; Kjærboelling et al., 2020; Puértolas-Balint et al., 2019), et contiennent environ 200 gènes (sur 14 600) impliqués dans la dégradation des polysaccharides. De nombreux gènes codant pour la cellulase, les endoxylanases, les β -xylosidases et les pectinases ont été clonés et caractérisés à partir d'*Aspergillus spp.* (Amore et al., 2013).

D'une manière générale, la présence du xylane, d'arabinane et de mannane induit l'expression de ces gènes. En effet, les gènes codant pour des enzymes xylanolytiques chez *Aspergillus sp.*, sont induits par la xylose. De plus, le xylobiose et la xylose induisent l'expression d'une variété d'autres gènes en plus de ceux codant pour les xylanases chez *A. niger* par exemple, incluant les gènes codant pour les glucuronidases et l'acétylxylane estérase. L'arabinose et l'arabitol induisent cependant l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de l'arabinoxylane (gènes codant l'arabino-furanosidase et l'arabinoxylane-arabinofuranohydrolase), le galactose et le mannose sont impliqués dans l'induction de gènes de galactosidase et mannosidase chez le même champignon (Lekounougou, 2018).

1.3 Les hémicellulases et leur mode d'action

Le groupe des enzymes hémicellulosiques est un groupe varié d'enzymes hydrolysant de façon synergique les différentes structures composant l'hémicellulose en des constituants plus simples (monomères, dimères ou oligomères), telles que les xylanes, les xyloglucanes, les arabinoxylanes et les glucomannanes (figure 10). Les hémicellulases sont des protéines modulaires avec un module catalytique et d'autres modules fonctionnels. Les modules non-catalytiques les plus importants sont les modules de liaison aux glucides CBM (*Carbohydrate Binding Module*), facilitant l'accrochage des enzymes aux polysaccharides insolubles et le module dockerine qui assure la liaison des modules catalytiques via des interactions cohésine-dockerine, soit à la surface des cellules microbiennes, soit à de grands complexes enzymatiques, comme le cellulosome (Yang & Lü, 2021). Les modules catalytiques des hémicellulases peuvent être de deux types : sont soit des glycosides hydrolases (GHs), hydrolysant les liaisons glycosidiques, soit des carbohydrates esterases (CEs), hydrolysant les liaisons esters des groupes latéraux acétate ou acide férulique (Prevot, 2013; Wertz, 2011).

La compréhension de la relation structure/fonction des hémicellulases a progressé considérablement à partir des structures cristallines à haute résolution et l'analyse catalytique.

Ces relations sont soulignées dans le tableau suivant :

Tableau 1 Les hémicellulases typiques leurs substrats principaux et produits finals (adapté de Wertz, (2011)):

Enzymes	Substrat	Produit	Famille
Endo- β -1,4-xylanase	β -1,4-Xylanes	xylooligomères.	GH 5, 8, 10, 11, 43
Exo- β -1,4-xylosidase	β -1,4- Xylooligomère	xylose simple	GH 3, 39, 43, 52, 54
Endo- β -1,4-mannanase	β -1,4-Mannanes	mannooligomères	GH 5,26
Exo- β -1,4-mannosidase	β -1,4-Mannooligomères	Mannose	GH 1, 2, 5
α -Arabinofuranosidase	Hémicelluloses contenant des groupes α -arabinofuranosyles	α -L-arabinosides	GH 3, 43, 51, 54, 62
Endo- α -1,5-arabinanase	α -1,5-arabinanes	L-arabinose	GH 43
α -Glucuronidase	Xylooligomères liés en α -1,2 avec l'acide 4-O-méthyl glucuronique	D-glucuronate	GH 67
Acetyl xylane estérase	O-acetyl xylanes	Acetyl groupes	CE 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

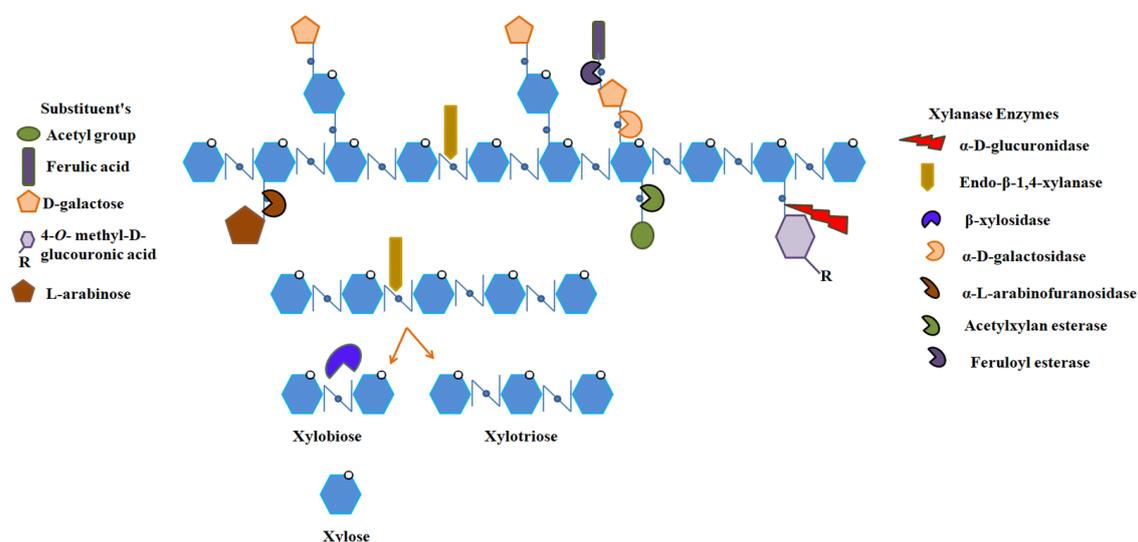


Figure 10 Modèle schématique de la dégradation enzymatique de l'hémicellulose (Bhardwaj et al., 2019).

1.3.1 Les xylanases

Les xylanases sont des glycosidases qui catalysent les liaisons 1,4-D-xylosidiques dans les régions non-substituées des chaînes de xylanes pour aboutir aux xyloses (Basit et al., 2018). On peut distinguer les endo et les exoxyanases ;

Les endo-D-xylanases, β -D-(1,4) xylane xylanohydrolase (EC 3.2.1.8), dégradent leurs substrats par une attaque intramolécule (figure 10). Les exo-D-xylanases, β -D-(1,4) xylane xylanohydrolase, (EC 3.2.1.37) hydrolysent les polymères de xylose par récurrence à partir de leur extrémité non-réductrice.

Les xylanases sont classés selon leur mode d'action et le produit d'hydrolyse généré en trois groupes (Haberra, 2014) :

- Les endo-xylanases ne libèrent pas d'arabinose et hydrolysent les xylooligosaccharides principalement en xylose, en xylobiose et en oligomères de xylose de degrés de polymérisation supérieure à 2.
- Les endo-xylanases qui libèrent du L-arabinose et hydrolysent les xylooligosaccharides principalement en xylose et en xylobiose et excessivement en oligomères de xylose.
- Les exo-xylanases dégradent les xylooligosaccharides et les xylo-oligosaccharides de faible degré de polymérisation en libérant principalement du D-xylose. Ils provoquent aussi une inversion de configuration du D-xylose libéré comme les β -xylosidases.

1.3.2 Les β -xylosidases

La bêta-xylosidase est une catégorie d'enzymes exoglycosidases dotée d'une capacité unique à hydrolyser les extrémités non-réductrices des xylo-oligosaccharides de faible degré de polymérisation (DP) libérés par les endoxylanases à partir de leur extrémité réductrice et libèrent des monomères de xylose (figure 10) (Naraian & Gautam, 2018). La majorité des enzymes de la famille GH43 sont des β -xylosidases (nom systématique : 1,4- β -D-xylanxylohydrolase). Il n'est pas facile de distinguer entre les β -xylosidases et les exo-xylanases agissant à l'extrémité de la chaîne polysaccharidique puisqu'elles libèrent le même produit (xylose).

1.3.3 Les enzymes débranchantes

L'hydrolyse complète du xylane en monomères de xylose requiert l'intervention d'autres enzymes débranchantes, qui s'attaquent aux branchements greffés sur la chaîne principale. Parmi ces enzymes, nous trouvons l' α -glucuronidase, l' α -arabinofuranosidase, l'acétyl-xylan estérase et les feruloyl/coumaryl estérases (Haberra, 2014).

1.4 Production des enzymes en bioprocédés

1.4.1 Généralité

La culture des micro-organismes y compris les champignons filamenteux est une pratique courante qui a donné lieu à des applications industrielles importantes comme la production de métabolites biologiquement actifs. Tels que les antibiotiques, les enzymes, les acides organiques et les produits pharmaceutiques (Kumar et al., 2018). L'utilisation des outils

modernes de biotechnologie et d'une physiologie de fermentation pratique est nécessaire pour réussir une production à grande échelle (Goyal et al., 2017).

Les hémicellulases sont produites par un large rang d'organismes, notamment, les archées, les bactéries, les protozoaires, les gastéropodes et arthropodes, les plantes supérieures et les champignons. Ces derniers, semblent être les producteurs eucaryotes les plus efficaces pour produire ce type d'enzymes lytiques extracellulaires (Jayasekara & Ratnayake, 2019). Les hémicellulases fongiques sont parmi les enzymes microbiennes les plus exploitées pour de nombreuses applications industrielles et environnementales. Cependant, le coût des enzymes est un obstacle majeur au développement d'une technologie performante. Jusqu'à présent, la production industrielle des hémicellulases est principalement réalisée par une technique de fermentation immergée ou liquide (FL). Mais la fermentation à l'état solide (FSS) est la technologie alternative à faible coût et moins énergivore qui peut conduire à une réduction du coût de ces enzymes (Shah et al., 2016).

1.4.2 La fermentation liquide

1.4.2.1 Définition

La fermentation liquide ou submergée est une méthode qui implique la culture de micro-organismes dans des milieux nutritifs liquides afin de produire la biomasse ou des molécules d'intérêt, c'est la technique la plus utilisée dans l'industrie commerciale du fait qu'elle permet d'atteindre une formation de biomasse importante et donc une production de métabolite plus élevée (Musoni et al., 2015). La production industrielle à grand-échelle consiste à inoculer le micro-organisme dans des bioréacteurs de grand volume. La conception du système pour les bioréacteurs permet l'approvisionnement en oxygène pour les micro-organismes et la capacité de surveiller et de contrôler différents paramètres tels que le pH, la température, la viscosité, l'oxygène dissous, la formation de mousse, la formation de biomasse, l'utilisation du substrat et la formation du produit souhaité (Hua et al., 2020). La possibilité de contrôler les paramètres en ligne a facilité ce processus de fermentation. Par exemple, 90 % des xylanases commerciales sont produites par les fermentations liquides (Polizeli et al., 2005).

La fermentation fongique submergée est souvent associée à une viscosité élevée du bouillon de culture, ce qui limite le transfert d'oxygène, l'agitation et l'homogénéisation peut affecter la production d'enzymes. Cependant, cette limitation peut être réduite ou supprimée avec la mise en œuvre de différents procédés de fermentation liquide (Ouedraogo & Tsang, 2021).

1.4.2.2 Procédés de la fermentation liquide

Il existe quatre types de FL : la culture discontinue (en batch), la culture discontinue alimentée (fed-batch), la culture continue et la culture par perfusion (Allman, 2020; Magar, 2021; Ouedraogo & Tsang, 2021).

- La culture en batch : c'est le mode de fonctionnement le plus simple, il consiste à inoculer les cellules et le milieu de culture complet pour la durée totale de la production, la biomasse augmente rapidement, puis atteint un plateau, et décline au fur et à mesure que les nutriments disparaissent du milieu, à la fin le bouillon est collecté pour un traitement en aval.
- La culture en fed-batch : les nutriments concentrés sont progressivement ajoutés à la culture de manière aseptique ; c'est un système semi-ouvert, et le volume de culture liquide dans le bioréacteur augmente au fur et à mesure que la culture est systématiquement ajoutée.
- La culture continue : le milieu frais est ajouté en continu dans les bioréacteurs et le bouillon du bioréacteur est retiré en continu. Cela permet de faire fonctionner le processus de fermentation pendant de longues périodes. Ils sont particulièrement adaptés lorsqu'un excès de nutriments entraînerait une inhibition due, par ex. accumulation de toxines ou échauffement excessif
- La culture par perfusion ; c'est une méthode de culture continue dans laquelle les cellules sont retenues dans le bioréacteur ou renvoyées dans le bioréacteur. Le milieu retiré ne contient donc pas de cellules. Une concentration cellulaire et un rendement en produits plus élevés peuvent être atteints dans le bioréacteur pour un volume de travail réduit.

Chaque type du processus de FL présente des avantages et des inconvénients, et leur utilisation dépend du produit final et du type de micro-organisme utilisé. Par exemple, les réacteurs continus peuvent être plus productifs que les réacteurs discontinus et peuvent réduire la viscosité pour la culture fongique ; cependant, la longue durée de fermentation dans le processus continu augmente le risque de contamination. La fermentation submergée est plus couramment utilisée dans la fermentation industrielle que la fermentation à l'état solide pour la production d'enzymes en raison de sa capacité à contrôler les paramètres de fermentation à l'aide de substrats définis. Cependant, la FL n'est pas pratique pour les substrats complexes tels que les résidus et déchets agricoles, forestiers et de transformation des aliments. Ces substrats

complexes doivent d'abord être traités avant d'être utilisés par le micro-organisme dans les bioréacteurs (Ouedraogo & Tsang, 2021).

1.4.2.3 Post-fermentation

Les microorganismes produisent les enzymes intracellulaires ou extracellulaires en décomposant la source du carbone présente dans le substrat, ces enzymes seront ensuite récupérées par centrifugation (enzymes extracellulaires) et par la lyse des cellules (enzymes intracellulaires).

Comme la plupart des enzymes industrielles sont extracellulaires, elles restent dans le bouillon fermenté après élimination de la biomasse. La biomasse peut être traitée à la chaux pour inactiver les micro-organismes et recyclée comme engrais. Les enzymes restant dans le bouillon sont ensuite concentrées par évaporation, filtration sur membrane ou cristallisation en fonction de leur application envisagée. Si des préparations enzymatiques pures sont nécessaires, elles sont généralement isolées par chromatographie sur gel ou échange d'ions (Renge et al., 2012).

1.4.3 La fermentation solide

1.4.3.1 Définition

La fermentation solide ou fermentation en substrat solide (FSS), comme son nom l'indique, est une technique qui implique la culture de micro-organismes sur un substrat solide, comme les céréales, le riz, la pailles et les sous-produits agricoles appelés biomasse lignocellulosique. Cette technique présente des avantages par rapport à la FL; la productivité volumétrique et la concentration de produit sont relativement élevées, moins d'effluents générés et un équipement de fermentation simple et qui ne demande pas des investissements importants (Costa et al., 2018). L'avantage de la FSS, lorsque l'on valorise les sous-produits agricoles, repose essentiellement sur des critères économiques. En effet, les procédés FS offrent une alternative à ces résidus souvent inexploités. Bien qu'il reste encore d'importants défis à relever, y compris une description complète de la dynamique des bioprocédés, les avantages de cette technologie par rapport aux fermentations submergées conventionnelles pourraient pousser le développement et la mise en œuvre de la FSS dans le contexte d'une future bio-économie (Kosseva & Webb, 2020).

La FSS a démontré un énorme potentiel pour la synthèse de produits microbiens tels que les enzymes, les carburants, les aliments, les produits chimiques industriels et les produits pharmaceutiques. En effet, les premières applications non-alimentaires de la FSS ont été pour

la production d'enzymes, principalement pour la production des enzymes hydrolysant les polymères végétaux. Ces derniers ne sont produits que par un système inductible où l'inducteur naturel est le polymère naturel. Ces polymères sont très peu solubles en phase aqueuse, ce qui implique de très grands volumes pour pouvoir les utiliser en fermentation liquide. Cependant, dans la FSS, le substrat de base est lui-même l'inducteur, ce qui entraîne des réacteurs beaucoup moins volumineux pour obtenir les mêmes niveaux de production (Duchiron , & Copinet, 2011).

1.4.3.2 Conduite de fermentations

La FSS est un procédé technologique qui reproduit l'habitat naturel des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique afin de produire des substrat d'intérêt comme les enzymes (Steudler et al., 2019). C'est une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou presque d'eau libre et diffère de la FL, où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau.

La principale différence entre ces procédés réside dans l'équilibre des phases solides, liquides et gazeuses. La FSS est donc constituée de trois phases : une matrice solide, une phase liquide absorbée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. La capacité de rétention en eau des supports solides est variable et peut aller de 12 à 90 %, soit une activité de l'eau (A_w) comprise entre 0,65 et 0,98. Ces supports doivent posséder une activité de l'eau suffisante pour permettre la croissance et l'expression du métabolisme des souches. Les champignons filamenteux sont particulièrement bien adaptés à ces cultures du fait de leur résistance à une faible A_w et à une pression osmotique élevée (Duchiron , & Copinet, 2011).

Après l'inoculation d'un substrat solide par des spores. Le développement des champignons filamenteux en FSS s'effectue par extension et ramification des filaments formant le mycélium, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. Depuis ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules ou dans les espaces inter particulaires à la recherche de composés nutritifs, notamment dans les pores remplis de liquide. À des taux normaux d'humidité, les espaces entre les filaments aériens sont remplis de gaz tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d'eau. Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments

aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (figure 11) (Benallaoua & Azzouz, 2015; Steudler et al., 2019).

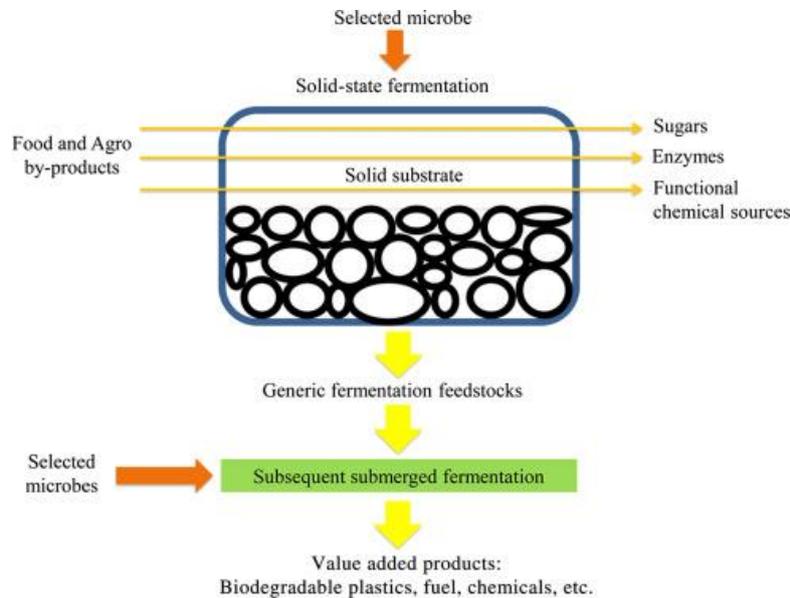


Figure 11 Produits et sous-produits de la fermentation solide.

1.4.4 Comparaison des procédés de fermentation en milieu liquide et solide

L'une des différences majeures entre la FSS et la FL est la teneur en humidité du substrat, mais ces deux procédés divergent sur plusieurs aspects ; le tableau comparatif suivant présente les différences, les avantages et les inconvénients de chaque technologie de fermentation

Tableau 2 Comparaison des technologies de fermentation en milieu liquide et en milieu solide (Antoine et al., 2009; Aro, 2009; Prevot, 2013; Samantha, 2019).

	Fermentation en milieu liquide	Fermentation en milieu solide
	Conduite de procédé	
Substrats	<ul style="list-style-type: none"> - Homogène - Matière première coûteuse - Soluble ou sous forme de fines particules en suspension - Prétraitement parfois nécessaire - Quantité de substrat limitée (faible concentration) - Quantité d'eau non-limitante - Quantité d'air limitante 	<ul style="list-style-type: none"> - Hétérogène - Matière première abondante et bon marché - Polymères solides insolubles - Prétraitement limité ou inexistant (déchets agricoles) - Quantité de substrat importante (concentration élevée, mais problème de diffusion des nutriments ; risque d'une concentration élevée en inhibiteurs) - Quantité d'eau limitante - Quantité d'air non-limitante
Microorganismes	<ul style="list-style-type: none"> - Favorable aux organismes unicellulaires (bactéries, levures) - Favorable aux souches mutées ou modifiées génétiquement - Cultures pures, peu favorable aux cultures mixtes - Culture homogène 	<ul style="list-style-type: none"> - Favorable aux organismes pluricellulaires et/ou aux organismes adaptés à une faible Aw et une forte pression osmotique (champignons filamenteux, supérieurs) - Favorable aux souches sauvages - Culture pure et possibilité de cultures mixtes avec synergie des métabolismes

	- Inoculation en cellules ou en volume de culture	- Culture hétérogène - Inoculation en conidies ou en mycélium
Température	- Contrôle aisé - Température homogène	- Contrôle compliqué - Risque de formation de gradients dans le milieu
pH	- Contrôle aisé (régulation par l'ajout de solutions acides ou basiques)	- Contrôle compliqué (régulation par l'ajout de solutions acides ou basiques, utilisation de systèmes tampon : solutions, supports au pouvoir tampon)
Teneur en humidité	- Faible	- Plus de 95 %
Aération (O ₂)	- Nécessaire - Compliquée (contrainte d'oxygénation élevée, liée à la solubilité/au transfert de l'oxygène (fonction de la température) et à la rhéologie des milieux (viscosité))	- Passive (de surface) ou active (forcée) - Pas ou peu de contrainte d'oxygénation - Transfert d'oxygène élevé
Agitation mécanique	- Nécessaire (homogénéisation du milieu avec aération pour les cultures aérobies) - Contrainte de cisaillement importante donc limitation des souches cultivables (moisissures) - Problème lié à la rhéologie des milieux (nature du substrat + culture de moisissures)	- Absente, discontinue ou continue - Contrainte de cisaillement limitée - Peut limiter l'hétérogénéité du milieu
Antimousse	- Obligatoire	- Pas obligatoire
Conditions aseptique	- Nécessaire - Risque de contamination très élevé	- Possibilité de travailler en condition non-stérile ou semi-stérile (faible Aw limitant les contaminants et de leur développement) - Risque de contamination limitée principalement pour les souches à croissance lente et surtout par d'autres champignons - Prétraitement par cuisson ou traitement à la vapeur pour éliminer les principaux contaminants (flore autochtone)
Procédé de fermentation		
Type de culture	- Cultures en batch, en fed-batch ou en continues	- Culture principalement en Batch
Scale-up	- Equipements industriels disponibles	- Besoin d'ingénierie et de conception de fermenteurs au niveau de l'échelle industrielle due à une faible standardisation, à l'hétérogénéité du système (gradients de T, pH,...), à une reproductibilité limitée (nécessité de robustesse), et à des problèmes de compaction - Problème d'extrapolation (en Occident surtout, réacteur de 20 T disponible au Japon)
OPEX	- Consommation d'eau et d'énergie (stérilisation, agitation, aération) importante - Durée importante des opérations unitaires	- Faibles coûts opérationnels du fait d'une consommation d'énergie pour l'aération et l'agitation - Consommation d'eau limitée
CAPEX	- CAPEX important (taille des fermenteurs)	- CAPEX faible (coût des équipements et volume de réacteur limités du fait d'une quantité d'eau moins importante et d'une limitation dans les contraintes de stérilité)
Post- fermentation Downstream processing		
Extraction	-Traitements importants (volume important à traiter) - Impureté modérée	-Absence d'extraction (en fonction de l'application) ou faible volume de solvant utilisé - Haute impureté
Concentration du produit	- Produit très dilué	- Productivité élevée (rendement similaire ou supérieur et/ou temps de culture plus court que pour la fermentation liquide)

		<ul style="list-style-type: none"> - Performances accrues : stabilité plus élevée (T, pH même extrême), optimum plus large (T, pH), résistance à l'inhibition, affinité pour le substrat - Expression de molécules inédites (profil protéique riche) - Produit fermenté concentré si utilisation directe et donc pas de nécessité de concentration (liquide)
--	--	---

1.4.5 Paramètres influençant l'activité des hémicellulases

L'activité xylanolytique est influencée essentiellement par des facteurs physicochimiques y compris ; le pH, la température et certains agents inhibiteurs classiques comme le Hg²⁺ et le Cu²⁺ (Gebruers et al., 2010), et aussi les produits de la réaction tels que le xylose, l'arabinose et le xylotriose qui peuvent aussi inhiber partiellement l'activité xylanase (Haberra, 2014).

Les xylanases de quelques mycètes et levures présentent généralement une activité xylanolytique maximal à un pH optimum de 4 à 5 alors que les enzymes bactériennes ont une activité maximale à des pH proches de la neutralité (6 à 7) et ils sont généralement plus thermostables que les enzymes fongiques (Haberra, 2014). Mais ce n'est pas toujours le cas ; La xylanase de *Beauveria bassiana* par exemple a démontré après sa purification une activité optimale à un de pH 6,0 (Amobonye et al., 2021). Une autre étude qui a été réalisée pour comparer l'activité des deux enzymes, le premier d'origine bactérienne et le deuxième d'origine fongique ; la xylanase d'origine bactérienne a atteint un niveau d'activité optimal à 50 °C avec un pH de 5,0. Quant à l'enzyme d'origine fongique (*Trichoderma*), il a atteint à une activité optimale à 70 °C avec un pH d'environ 6,0. L'enzyme *Trichoderma*-xylanase a subi très peu de perte d'activité avec à une température de 80 °C à 90 °C. Quant à l'enzyme bactérien, il a subi une forte baisse du niveau d'activité à haute température d'environ 80 °C à 90 °C, et il a même été complètement inactivée à 90 °C (Chen et al., 2016).

1.5 L'Alfa « *Stipa tenacissima* », comme matière première pour la production d'enzymes par voie microbienne

1.5.1 Caractéristique et taxonomie

Stipa tenacissima est une espèce de plantes monocotylédones originaire de l'ouest du bassin méditerranéen. C'est une herbe cespiteuse qui pousse en touffes aux tiges dressées de 60 à 150 (voire 200) cm de long (Clayton et al., 2006). Elle est utilisée dans le domaine artisanal, dans l'agriculture (pâturage pour les chevaux et les dromadaires), et dans l'industrie papetière (Dallel, 2012; Marrakchi et al., 2011).

Classification selon Catalogue of life, (2021)

Règne: *Plantae*

Phylum: *Tracheophyta*

Classe: *Liliopsida*

Ordre: *Poales*

Famille : *Poaceae*

Genre : *Stipa*

Espèce : *Stipa Tenacissima L.*

1.5.2 Distribution et habitat en Algérie

L'Alfa *Stipa tenacissima* également appelée halfah, est une herbe vivace, typiquement méditerranéenne, c'est l'une des espèces xérophiles qui caractérise les milieux arides méditerranéens à l'exclusion des secteurs désertiques. Sa terre d'élection est l'Afrique du Nord, et tout particulièrement les hauts plateaux du Maroc et de l'Algérie (Dallel, 2012; Rhanem, 2009), elle s'étend aussi en Europe du Sud (Chypre, Espagne, Baléares, Portugal, îles Canaries) (Catalogue of life, 2021). En Algérie, cette herbe pousse spontanément dans les régions steppiques (figure 12) et couvre une superficie d'environ 4 millions d'hectares (El-abbassi et al., 2015). Cette plante présente également un intérêt écologique pour lutter contre l'érosion dans les régions de steppes arides.

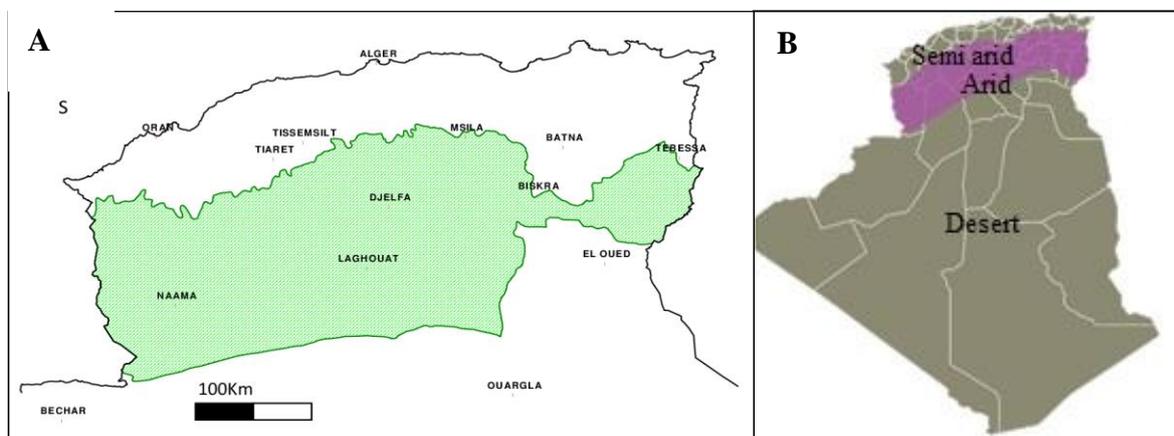


Figure 12 Localisation et délimitation des régions steppiques algériennes (indiqués par des traits verts)(A)((Dalila & Slimane, 2008) et les hauts plateaux algériens (désignés par la zone colorée) (B).

1.5.3 Application biotechnologique : utilisation de l'Alfa comme matière première

L'Alfa comporte une forte concentration en polysaccharides, ce qui lui confère un réel potentiel pour son intégration comme matière première. Cette plante est composée de cellulose, d'hémicellulose, de lignine et de cendres. Cependant, sa composition biochimique peut

légèrement différer selon les conditions climatiques et pédologiques (Baya & Moussa, 2010; Semhaoui et al., 2017).

De nombreuses recherches ont suggéré que l'adoption de cultures énergétiques tolérantes à la sécheresse devrait être le choix le plus pertinent en termes d'adaptation et de durabilité environnementale (Dalla et al., 2014). Récemment, des études ont été menées pour optimiser le prétraitement des fibres d'Alfa pour la production de bioéthanol (Semhaoui et al., 2017; Zaafour et al., 2016). L'intérêt de cette culture comme source potentielle de bioconversion réside aussi dans son adaptation aux climats arides et semi-arides ; L'Alfa pousse dans presque toutes les unités géomorphologiques.

En fait, plus d'un million d'hectares de territoires d'Alfa n'a pas été exploitée et utilisée dans l'industrie artisanale et papetière. Théoriquement, et comme détaillé dans une étude précédente, plus de 62.500 tonnes d'Alfa inexploitées pourraient être récupérées et utilisées pour la bio-raffinerie (Gares et al., 2020). La même recherche a rapporté que la culture de cette herbe dans les hauts plateaux Algériens est possible et pourrait générer jusqu'à 7 millions de tonnes de biomasse sèche. Du coup, la plantation d'Alfa comme culture énergétique a deux avantages primordiaux ; une matière première potentielle pour le concept de bio-raffinerie et une plante modèle pour la restauration des écosystèmes face à la désertification (Gares, 2023).

1.6 Optimisation du procédé

1.6.1 Généralité :

L'optimisation en biologie, c'est faire appel aux outils mathématiques afin de modéliser, analyser et résoudre analytiquement ou numériquement les problèmes qui consistent à minimiser ou à maximiser une fonction sur un ensemble. En effet, c'est un processus, par le biais duquel, on cherche à déterminer des conditions opératoires variables qui tendent à améliorer une performance en se rapprochant d'une solution optimale. Le mot Optimum, vient du latin Optimus, qui veut dire « Meilleur » (Foulds, 2011).

De ce fait, l'optimisation implique le changement de certaines conditions appelées variables de décision ou variables du problème (le degré de liberté du procédé), afin de maximiser ou de minimiser un critère bien défini (la productivité ou le rendement, etc.), appelé fonction objective. Parmi les solutions possibles, sont acceptables celles qui répondent à certaines exigences, appelées contraintes (Makhlouf, 2018).

1.6.2 Plackett Burmann Design (PBD)

Les conceptions Plackett-Burman sont des conceptions expérimentales présentées en 1946 par Robin L. Plackett et JP. Burman alors qu'ils travaillaient au ministère britannique de l'approvisionnement (Plackett & Burman, 1946).

En bioprocédé, les conceptions statistico-mathématiques telles que PBD présentent une alternative plus équilibrée pour l'amélioration de la fermentation comparé à l'approche d'un facteur à la fois (one factor at a time approach) OFAT, qui consiste à faire varier successivement chacun des facteurs en maintenant les autres constants, et ne peut aboutir à des optima (les interactions entre les variables indépendantes ne sont pas prises en compte)(Pasma et al., 2013). Cependant, avec PBD, par exemple, au lieu de tester les sources de carbone et d'azote dans deux expériences ; on peut tester simultanément toutes les combinaisons de carbone et d'azote.

PBD comprennent un type de conceptions de dépistage à deux niveaux. Ces plans permettent d'étudier jusqu'à (n-1) facteurs avec (n) essais. Les paramètres de facteur bas et haut sont codés comme -1 et +1, respectivement. L'application des modèles expérimentaux statistiques est devenue un outil très efficace pour l'optimisation du processus de production d'enzymes et rapporté dans de nombreux articles (Cui & Zhao, 2012; Ghorri et al., 2022; Karlapudi et al., 2018). Globalement, Le PBD est un type de plan de dépistage qui aide les chercheurs à déterminer les facteurs influençant dans une expérience. Cette conception élimine les facteurs sans importance (bruit), ce qui va permettre d'éviter de collecter de grandes quantités de données sur des facteurs relativement sans importance.

1.6.3 Box Behnken Design (BBD)

En statistique, le BBD est un type de plan de méthodologie de surface de réponse RSM conçu par George EP Box et Donald Behnken en 1960. Cette méthode analytique a pour but d'explorer les relations entre les variables dépendantes et indépendantes impliquées dans une expérience afin d'atteindre les objectifs suivants :

- Chaque facteur, ou variable indépendante, est placé à l'une des trois valeurs équidistantes, généralement codées sous la forme -1, 0, +1.
- La conception doit être suffisante pour ajuster un modèle quadratique, c'est-à-dire un modèle contenant des termes au carré, des produits de deux facteurs, des termes linéaires et une interception.

- Le rapport du nombre de points expérimentaux au nombre de coefficients dans le modèle quadratique devrait être raisonnable.
- La variance d'estimation doit plus ou moins dépendre uniquement de la distance au centre (ceci est obtenu exactement pour les plans à 4 et 7 facteurs), et ne doit pas trop varier à l'intérieur du plus petit cube contenant les points expérimentaux (figure 13).

Les plans de Box-Behnken possèdent des combinaisons de traitement qui sont situées aux points centraux des bords de l'espace expérimental et qui requièrent au moins trois facteurs continus. L'illustration suivante montre un plan de Box-Behnken à trois facteurs. Les points sur le diagramme représentent les essais expérimentaux effectués :

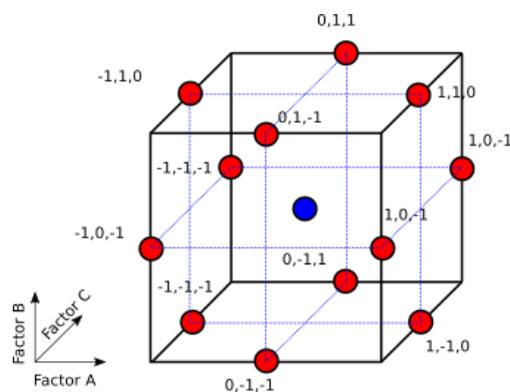


Figure 13 Conception d'un Box-Behnken à trois facteurs (Develve, 2020).

Diverses approches de la RSM sont utilisées pour le criblage et l'optimisation de différents paramètres du processus de fermentation (Verma & Kumar, 2019). En bioprocédés, la RSM est un ensemble d'outils statistiques utilisés pour concevoir et modéliser le développement d'expériences, évaluer les effets de différents facteurs et rechercher les conditions optimales pour obtenir des réponses souhaitables tout en permettant la prédiction des interactions (Silva et al., 2021). Exemple ; l'optimisation des conditions de fermentation pour obtenir un rendement enzymatique maximal.

En effet, le BBD est considéré comme un outil fiable, rapide, reproductible, économique qui remplace avec efficacité l'approche traditionnelle OFAT. Le BBD permet d'étudier plusieurs facteurs à la fois tout en réduisant le nombre d'expériences et d'exprimer la production selon un modèle mathématique. Cette méthode a été utilisée dans l'optimisation de la production de différentes enzymes, comme la cellulase par *Pestalotiopsis microspora* et *A.niger* (Goukanapalle et al., 2020; Verma & Kumar, 2019), la xylanase par *A.niger* et *Penicillium roqueforti* (Azzouz, Bettache, & Boucherba, 2020; Ferraz et al., 2019) et la chitinase par *Bacillus cereus* (Garima & Kumar, 2021) etc.

Le BBD est aussi utilisé afin d'optimiser les facteurs influençant l'activité enzymatique, notamment ; le pH et la température, etc. Ces facteurs sont étudiés par la RSM en accord avec la matrice de BBD afin de déterminer les conditions optimales pour une conversion maximale (Bouzaouit, 2016).

1.6.4 Central Composite Design (CCD)

Un plan composite central de Box-Wilson, communément appelé « plan composite central », contient un plan complet, factoriel ou fractionnaire intégré avec des points centraux. Le CCD est renforcé d'un groupe de «points en étoile» qui permettent d'estimer la courbure (figure 14). Les niveaux des points du plan factoriel sont ± 1 et ceux du plan « en étoile » sont $\pm \alpha$ où $|\alpha| \geq 1$. La valeur précise de α dépend de certaines propriétés souhaitées pour la conception et du nombre de facteurs impliqués (Ait-Amir et al., 2015).

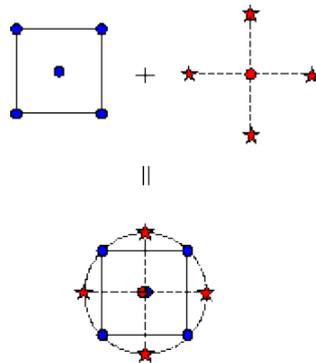


Figure 14 Génération d'un plan composite central à trois facteurs

La figure 15, montre l'espace expérimental pour un plan CCD à trois facteurs. Selon la conception, les points étoiles ou les points centraux de chaque face peuvent s'étendre au-delà de la face, comme illustré à la figure.

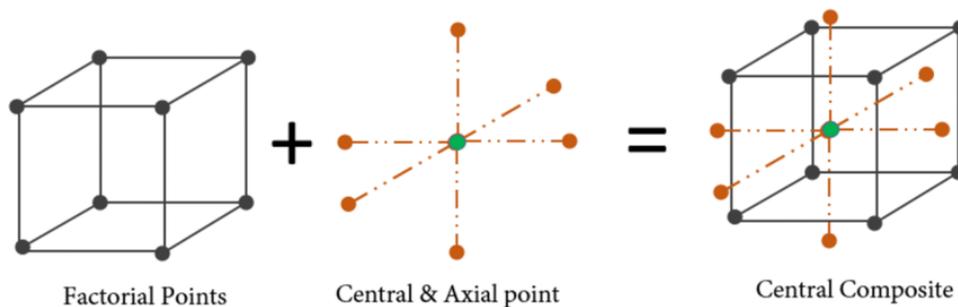


Figure 15 Conception d'un plan composite central à trois facteurs (Boonpuang et al., 2020).

Matériel et méthodes

2 Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'isolement de souches microbiennes à partir du sol et la sélection de l'isolat le plus performant pour la production de l'hémicellulase. Pour ce faire, une optimisation de la production de cet enzyme sur une matière lignocellulosique renouvelable, en l'occurrence l'Alfa, a été réalisée.

2.1 Echantillonnage

Des échantillons du sol ont été collectés stérilement à partir de différents sites (figure 16) :

- Forêt de Djebel el Ouahche à l'Est de la ville de Constantine, située à une longitude de 36°24'01,3 Nord et une latitude de 6°38'0,82 Est.
- Forêt de Chettabah à Aïn Smara Constantine, située à une longitude de 36°19'42,3 Nord et une latitude de 6°27' 03,5 Est.
- L'ancienne décharge d'Aïn Smara, située entre une longitude de 36°18'13,8 Nord et 6°34'15,9 de latitude Est.

Les échantillons ont été conservés à 4°C et analysés dans les 24h suivant leur prélèvement.



Figure 16 Localisation géographique des régions d'échantillonnage.

MATERIEL ET METHODES

2.2 Isolement et criblage des isolats microbiens producteurs d'hémicellulase

Pour la détection de l'activité enzymatique des isolats, deux étapes ont été empruntées à savoir ; la détection des isolats producteurs de la cellulase suivie par la détection chez les isolats cellulase positive, ceux, susceptibles de produire de l'hémicellulase.

En effet, l'isolement a été réalisé directement sur un milieu minimal gélosé à base de carboxyméthylcellulose CMC (Annexe 1). La CMC pure constitue un substrat approprié pour les mesures quantitatives et semi-quantitatives de l'activité cellulase. Pour ce faire, 1 g du sol est ajouté à 9 mL d'eau physiologique stérile, la préparation est laissée reposer pendant 10 min puis vortexée pendant 5 min. La solution obtenue a servi à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1mL de la solution mère à 9 mL d'eau physiologique stérile.

Un volume de 0,1 mL de chacune des dilutions est déposé dans des boîtes de Pétri contenant le milieu CMC, puis étalé sur toute la surface (Gerhardt, 1994). Après 5 jours d'incubation à 30 °C, les colonies obtenues ont été purifiées par l'inoculation au centre de nouvelles boîtes de Pétri contenant un milieu frais de CMC, et incubée pendant 5 jours à 30 °C.

Les boîtes précédentes ont été inondées par le rouge de Congo (annexe 2) et la réaction a duré 30 min. les boîtes ont été ensuite décolorées par lavage avec NaCl (1 M) pour rendre la zone visible et claire (Ahirwar et al., 2017). Les zones hydrolytiques transparentes entourant les colonies représentent la cellulose dégradée, le diamètre de la zone a été mesuré à l'aide d'une règle (Andro et al., 1984). Les isolats positifs ont été à, nouveau, testés pour confirmation. L'indice enzymatique (EI) a été calculé en utilisant l'équation suivante (Teather & Wood, 1982).

$$\text{Indice enzymatique} = \frac{\text{Diamètre de la zone d'hydrolyse (en cm)}}{\text{Diamètre de la colonie (en cm)}}$$

Les isolats présentant une activité cellulosique importante, ont été testés à nouveau pour leur capacité de dégrader le xylane en utilisant la même méthode précédente sauf que le CMC a été remplacé par le xylane de maïs (XM), étant le substrat de xylanase (annexe 1). Après incubation à 30 °C pendant 5 jours, les mêmes étapes précédentes ont été empruntées.

2.3 Conservation

Deux méthodes de conservation ont été utilisées afin d'entretenir l'isolat sélectionné. La première méthode consistait à ensemercer l'isolat sur un milieu 863 gélosé (annexe 1). Après incubation à 30 °C pendant 48 heures, les colonies obtenues ont été, ensuite, ensemençées sur

MATERIEL ET METHODES

gélose inclinée (même milieu) et conservées à une température de 4 °C (Ul-Haq et al., 2002). Des repiquages réguliers ont été effectués chaque 4 à 6 semaine.

La deuxième méthode reposait sur la congélation de l'isolat ; pour ce faire, un volume de 1 mL d'une culture liquide de 2 jours (milieu 863 liquide), a été prélevé dans un Eppendorf stérile, additionné d'un volume de 0.5 mL d'une solution de 20 % de glycérol et conservé à une température de -20 °C. Des repiquages réguliers ont été procédés à 6 mois d'intervalle (Perrin, 2020).

2.4 Identification de l'isolat fongique sélectionné

2.4.1 Observation macroscopique

Pour l'identification macroscopique de l'isolat un repiquage a été effectué sur milieu gélosé suivi d'une observation à l'œil nu de la taille et de la forme de la colonie, de l'aspect de la surface, de l'opacité, de la consistance, de la pigmentation et du rêver de la colonie.

2.4.2 Observation microscopique

L'isolat sélectionné a été identifié ensuite par observation microscopique. La méthode consistait à déposer une goutte de bleu de méthylène ou d'eau distillée sur une lame, ensuite apporter un prélèvement d'un fragment mycélien avec une anse en platine stérile et couvrir avec une lamelle. L'observation a été faite à des grossissements de 10 et 40 (Abdoulahi et al., 2019).

2.4.3 Identification moléculaire

L'identification moléculaire de l'isolat fongique sélectionné a été réalisée par l'extraction de l'ADN génomique et l'amplification de l'ARN ribosomique 18S. Cette analyse a été effectuée au BCCM/MUCL (Agro) Industrial Fungi and Yeasts Collection, Belgique. Les produits du PCR ont été analysés par BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) et soumis à la base de données de nucléotides NCBI. Les différents alignements et l'arbre phylogénétique ont été construits par le logiciel MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis 11).

2.5 Conduite de fermentation sur milieu liquide standard

Dans cette partie, des fermentations ont été effectuées afin de tester la capacité de ce champignon à se développer dans un milieu liquide à base de sucres hémicellulosiques simples et complexes dans des Erlenmeyers de 250 mL, des bioréacteurs de 2 et de 20 L.

MATERIEL ET METHODES

2.5.1 Scale-up de 250 mL à des bioréacteurs de 2 et 20 L ; fermentation avec substrat simple « xylose »

2.5.1.1 Fermentation en fioles

Une suspension sporale a été préparée à partir d'une culture âgée de cinq jours sur un milieu PDA (annexe) à 30 °C. Les spores ont été récoltées en ajoutant 10 mL d'eau distillée stérile contenant 1 % (v/v) de tween 80, puis recueillies dans des flacons stériles pour être utilisées comme inoculum. La concentration en spores a été ajustée à 1×10^6 spores/mL à l'aide d'une chambre de comptage (Thomas REF 06 106 10 MARIENFELD, Allemagne) (Ang, 2015). Ensuite, les fioles de 250 mL avec un volume de culture de 100 mL ont été préparées comme suit (g/L) : 10 xylose, 10 peptone, 10 extrait de levure. Le pH est amené à 6.5. Ensuite, le milieu de culture a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes.

Les flacons préparés précédemment ont été inoculés par un volume de 1 mL de la suspension sporale précédente suivie par incubation à 30 °C dans un incubateur avec une vitesse d'agitation de 200 rpm (Ecotron, INFORS HT, Suisse).

2.5.1.2 Fermentation en bioréacteurs 2 et 20 L

Afin de préparer les pré-cultures pour le scaling-up en 2 et 20 L, un volume de 1.5 mL et 15 mL de l'inoculum a été transmis dans des flacons Erlenmeyer Corning appropriés avec un volume de travail de 150 mL et 1.5 L, respectivement. Les bouchons de ces flacons sont pourvus de deux orifices ; la première sortie se termine par un filtre de 0.2 µm, et l'autre est reliée à un tube plongeur qui atteint le fond du flacon pour un transfert aseptique facile de la pré-culture. Les pré-cultures ont été incubées à 30 °C pendant 24 h à 120 rpm.

Un volume de 1.5 L et 15 L du milieu de culture a été préparé (comme décrit dans la partie précédente) et transmis dans les deux bioréacteurs de 2 et 20 L, respectivement. La stérilisation du bioréacteur de 2 L (DCI-Biolafitte, US) a été effectuée dans un autoclave de laboratoire approprié. Le bioréacteur de 20 L (Sartorius Bbraun, US) est procuré d'un système de stérilisation en place (sterilize-in-place bioreactor SIP).

Après la stérilisation et le refroidissement des bioréacteurs, les sondes pO₂ et pH ont été étalonnées. Ensuite, les pré-cultures ont été transférées avec une pompe péristaltique dans les fermenteurs. L'agitation, l'aération et la température ont été fixées à 300 rpm, 1 v/v/m et 30 °C, respectivement. Une solution anti-mousse a été utilisée si nécessaire.

MATERIEL ET METHODES

2.5.1.3 Suivi de la biomasse, le pH et la consommation du xylose

Durant la fermentation, des échantillons de 50 mL sont prélevés chaque 24h aseptiquement. Le milieu de culture a été séparé du mycélium par filtration à l'aide d'une pompe à vide et d'un papier filtre (Whatman N° .1). Le mycélium a servi pour mesurer la biomasse, quant au filtrat, il a été utilisé pour déterminer la concentration du xylose dans le milieu de culture. L'estimation de la biomasse a été obtenue par la méthode du poids sec ; le mycélium a été séché dans une étuve à 105 °C jusqu'à survenir à un poids constant. En ce qui concerne la consommation du xylose, un volume de 5 mL du filtrat collecté a été centrifugé à 14 000 rpm pendant 15 min à 4 °C. La concentration du xylose a été déterminée par HPLC-RID et exprimée en g/L.

D'autre part, le pH des échantillons a été mesuré avec un pH-mètre pour les cultures en fioles et un capteur de pH pour les fermentations en bioréacteurs comme décrit dans la section précédente.

2.5.2 Impact de la vitesse d'agitation sur le changement morphologique d'*A. fumigatus*

Une fermentation similaire que la précédente a été réalisée avec un bioréacteur de 2 L à une vitesse d'agitation de 200 rpm, après 24 heures d'incubation, la vitesse d'agitation a été augmentée (350, 500 et 650 rpm) et ce, pour étudier l'effet de cisaillement. Des échantillons du mycélium ont été récoltés pour chaque vitesse. Un volume de 1 mL de ces échantillons a été, ensuite, inoculé dans des flacons de culture agités de 100 mL, contenant 2 g/L du xylose, et incubé pendant 5 jours. La consommation de substrat a été analysée et le changement morphologique des échantillons a été visualisé au microscope optique.

2.5.3 Production de l'hémicellulase dans un bioréacteur de 2 L ; fermentation avec substrat complexe « xylane de maïs »

Une fermentation dans un bioréacteur de 2 L a été menée pour tester la capacité de la souche à dégrader le substrat complexe « xylane de maïs (XM) » et à produire de l'hémicellulase. La consommation de substrat et la libération de xylose ont été mesurées. La vitesse d'agitation a été fixée en fonction des résultats de l'expérience précédente. La production de biomasse et le changement du pH ont été suivis comme décrit précédemment. Pour la préparation de la préculture, une concentration de conidies (1×10^8) a été utilisée, incubée à 30 °C pendant seulement 12 h à 120 rpm (Musoni et al., 2015).

MATERIEL ET METHODES

En fin de fermentation, l'activité enzymatique a été testée dans le bouillon de culture. Pour ce faire, un volume de 8 mL du filtrat est transmis dans des tubes de 15 mL, chacun contenant 1 mL de tampon phosphate 0,1 M à pH 5.5 (Annexe 2), avec 0.1 g de substrats de xylane beech wood (XBW) et le XM en triple exemplaire. Des tubes témoins (surnageant + tampon et substrat + eau) ont été inclus dans le test. Pour inhiber la croissance microbienne, 1 mL d'azoture de sodium à 0.5 % (NaN_3) a été ajouté dans chaque tube.

Les tubes ont été placés dans un bain-marie à 40 °C pendant 3 jours sous agitation à 60 rpm. Les tubes étaient hermétiquement fermés et placés dans le sens du mouvement de l'incubateur (Grant, OLS 200). Après incubation, les tubes ont été centrifugés à 8000 rpm pendant 10 minutes (Universal 32, HETTICH Zentrifugen, Germany). La dégradation du substrat et la libération de sucre a été analysée par HPLC.

2.6 Conduite de fermentation en milieu solide à base d'Alfa

2.6.1 Composition biochimique d'Alfa

La teneur en cellulose et en hémicellulose de l'Alfa a été déterminée par une série d'hydrolyses acides concentrées et diluées. Un kilogramme de tige d'Alfa a été séché pendant 24 heures à 40 °C, coupé en morceaux de 5 à 7 cm de long, broyé une fois avec un broyeur (échantillon 1), puis broyé une deuxième fois et tamisé en poudre avec un tamis de 500 μm (échantillon 2).

Pour déterminer la concentration de cellulose, une hydrolyse acide concentrée a été réalisée. Brièvement, 1 mL d'acide sulfurique 0,2 M à 72 % a été ajouté dans des tubes Falcon de 50 mL contenant 100 mg de chaque échantillon. Les tubes ont été agités manuellement et ensuite incubés dans un bain-marie à 30 °C pendant une heure. Environ 29 mL d'eau distillée ont été ajoutés aux échantillons après la période d'incubation. Ensuite, les tubes ont été autoclavés à 121 °C pendant une heure. Les hydrolysats ont été neutralisés avec l'ajout de 1 g d'hydroxyde de baryum $8\text{H}_2\text{O}$ ($\text{BaOH}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), centrifugés à 8000 rpm pendant 8 min et conservés à 4 °C.

D'autre part, la concentration en hémicellulose a été déterminée avec de l'acide dilué. Un volume de 30 mL d'acide sulfurique à 2,5 % a été ajouté dans des tubes Falcon de 50 mL contenant 100 mg de chaque échantillon d'Alfa. Les échantillons ont été autoclavés à 121 °C pendant 1 heure. Les hydrolysats ont été récupérés et neutralisés, comme expliqué précédemment (Shahbazi & Zhang, 2010; Świątek et al., 2020).

Enfin, la concentration des monomères de sucres dans les hydrolysats a été analysée et déterminée par HPLC-RID.

MATERIEL ET METHODES

2.6.2 Production d'hémicellulase et de cellulase sur l'Alfa comme seule source de carbone et d'énergie

L'Alfa a été utilisé comme substrat pour la fermentation solide (FSS) sans aucun prétraitement. Dans des flacons Erlenmeyer de 500 mL, 10 g d'Alfa ont été ajoutés. Le pourcentage d'humidité et le pH ont été ajustés à 70 % et 4, respectivement. Le milieu minimal modifié a été utilisé pour cet objectif (annexe 1). Le milieu solide préparé, après un autoclavage à 121 °C pendant 20 min, a été inoculé avec une suspension de spores de 10^7 spores/g de matière sèche (la même concentration est utilisée dans toutes les expériences)(Azzouz, Bettache, & Boucherba, 2020). Enfin, les flacons ont été incubés à 35 °C pendant huit jours. Des prélèvements ont été effectués chaque 24 heures en sacrifiant une culture afin de mesurer l'activité enzymatique (section 2.6.3).

Pour ce faire, 100 mL d'eau distillée stérile a été ajouté dans le contenu de chaque flacon. Le tout a été soigneusement mélangé avec une spatule et maintenu sur une agitation orbitale à 250 rpm pendant 30 min à une température ambiante (Azzouz, Bettache, & Boucherba, 2020). Le mélange a été centrifugé à 8 000 rpm pendant 15 min à 4 °C. Enfin, le surnageant a été récupéré et conservé à 4 °C, et par la suite, utilisé comme enzyme extracellulaire brute pour le dosage enzymatique (Singh et al., 2009).

2.6.3 Hydrolyse enzymatique

Les activités xylanase et cellulase ont été mesurées quantitativement en déterminant la quantité de sucres réducteurs libérés du xylane beech wood (XBW) et de la CMC respectivement, en utilisant la méthode du réactif à l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) (annexe 2) (Miller, 1959). Un volume de 100 µL du surnageant de culture ont été ajoutés à 900 µL de substrat de XBW et de CMC à 1 % (annexe 2) et incubés à 50 °C pendant 5 min. Ensuite, 1.5 mL du réactif DNS a été ajouté pour arrêter la réaction (Bailey et al., 1992). Les échantillons traités ont été chauffés dans un bain bouillant à 100 °C pendant 5 min. Des contrôles d'enzymes et de substrats appropriés ont également été inclus dans l'essai.

La quantité de sucres réducteurs libérés de la réaction est estimée en mesurant l'absorbance à 540 nm et ensuite déterminée sur une droite d'étalonnage préparée avec des solutions de xylose et glucose de différentes concentrations (0 à 0.01 µmol/mL).

Une unité d'activité enzymatique (U) est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une micromole de sucres réducteurs en une minute (Annexe 3).

MATERIEL ET METHODES

2.7 Optimisation des facteurs physico-chimiques pour la production de xylanase et de cellulase

2.7.1 Effet de l'aspect du substrat sur la production d'enzyme

Des fermentations ont été réalisées dans des flacons Erlenmeyer de 500 mL avec 10 g d'Alfa, pour analyser l'effet de l'aspect du substrat d'Alfa ; fibre (> 500 μm), poudre (< 60-500 μm) et mélange des deux aspects (50:50), sur la production de xylanase et de cellulase par la souche sélectionnée. Le milieu a été préparé et stérilisé comme décrit dans la section 2.6.2.

L'aspect idéal du substrat d'Alfa, pour une production maximale de ces deux enzymes, a été sélectionné et utilisé pour les expériences qui suivent.

2.7.2 Optimisation du pH, la température, le taux d'humidité et le temps d'incubation pour la production d'enzyme à l'aide de Box Behnken Design

L'optimisation des conditions physico-chimiques pour la production de xylanase et de cellulase par la souche sélectionnée, s'est principalement concentrée sur des études d'optimisations antérieures afin de sélectionner et d'optimiser les facteurs d'influence et leurs niveaux, notamment : temps de fermentation, pH initial, taux d'humidité et température d'incubation (tableau 3).

Tableau 3 Conditions optimales pour la production de xylanase et de CMC_{Case} par *Aspergillus spp.* sur milieu solide

Espèces	Source de carbone	Enzyme	Temperature (°C)	pH	Humidité (%)	Temps d'incubation (h)	Références
<i>A. niger</i>	Déchets d'épis de maïs	Xylanase	30	5.5	/	144	(Desai & Iyer, 2020)
<i>A. niger</i>	Fronde de palmier à huile	Xylanase et cellulase	30	4.5	75%	120	(Tai et al., 2019)
<i>A. niger</i>	Son de blé	Xylanase	37	5.5	84%	66	(Azzouz, Bettache, & Boucherba, 2020)
<i>A. foetidus</i>	Résidu de soja	Xylanase	28	7	/	168	(Cunha et al., 2018)
<i>A. niger</i>	Résidu de palmier à huile	Xylanase	30	4.5	60%	72	(Prasertsan et al., 1997)
		Cellulase	35	5	50%	216	

MATERIEL ET METHODES

<i>A. fumigatus</i>	Tronc de palmier à huile	Xylanase et cellulase	Temperature ambiante	5	80%	168	(Ang et al., 2013)
<i>A. fumigatus</i>	Paille de riz et son de blé	Xylanase et cellulase	40	5-6	75%	96	(Sherief et al., 2010)
<i>A. terreus</i>	Pelures de manioc	Xylanase et cellulase	40	6-8	40%	120	(Olanbiwoninu & Odunfa, 2016)
<i>A. tubingensis</i>	Canne de maïs	Cellulase	40	4.5	60%	72	(Khan et al., 2020)

Afin d'ajuster le modèle polynomial basé sur Box-Behnken design (BBD), 27 expériences avec le point central triplé ont été réalisées pour optimiser les deux réponses. Le logiciel statistique Minitab® 19 a été utilisé pour cet objectif. Les séries expérimentales ont été entièrement randomisées et les facteurs montrant des effets qui influencent la production de xylanase et de cellulase ont été identifiés sur la base de la valeur p ($p < 0.05$).

Pour chaque analyse de dosage, 10 g d'Alfa ont été répartis dans des Erlenmeyer de 500 mL. Le pH initial (B) et le degré d'humidité (C) ont été ajustés selon les niveaux présentés dans le Tableau 4. Les flacons ont été stérilisés à l'autoclave à 121 °C pendant 20 min à 15 psi. Une suspension de 10^7 spores/g a été inoculée uniformément et incubée à différents niveaux de température (A) pendant une période de temps déterminée (D).

Les facteurs A, B, C et D ont été considérés comme des variables indépendantes et l'activité enzymatique (R) représente les réponses. Les niveaux minimum, moyen et maximum de chaque variable ont été codés respectivement comme -1, 0 et +1 (tableau 4), la matrice du plan BBD est présentée dans le tableau 5.

Tableau 4 Niveau et code des variables indépendantes pour l'optimisation de la production de xylanase et de cellulase par le Box-Behnken design.

Codes	Facteurs (unité)	Minimum (-1)	Moyen (0)	Maximum (+1)
A	Température (°C)	30	35	40
B	pH	2	4	6
C	Humidité (%)	50	70	90
D	Temps (h)	48	96	144

MATERIEL ET METHODES

Réponses		Unités
R1	Xylanase	U/gds
R2	Cellulase	U/gds

Tableau 5 Matrice de Box-Behnken avec les variables codées.

R	Facteurs			
	Temperature	pH	Humidité	Temps d'incubation
1	-1	-1	0	0
2	1	-1	0	0
3	-1	1	0	0
4	1	1	0	0
5	0	0	-1	-1
6	0	0	1	-1
7	0	0	-1	1
8	0	0	1	1
9	0	0	0	0
10	-1	0	0	-1
11	1	0	0	-1
12	-1	0	0	1
13	1	0	0	1
14	0	-1	-1	0
15	0	1	-1	0
16	0	-1	1	0
17	0	1	1	0
18	0	0	0	0
19	0	-1	0	-1
20	0	1	0	-1
21	0	-1	0	1
22	0	1	0	1
23	-1	0	-1	0
24	1	0	-1	0

MATERIEL ET METHODES

25	-1	0	1	0
26	1	0	1	0
27	0	0	0	0

2.7.3 Élaboration des modèles

Dans le but de prédire les conditions optimales pour la production d'enzymes, un modèle quadratique a été adopté afin de détecter les effets des variables indépendantes sur les réponses (équation (1)).

$$R = \beta_0 + \beta_A A + \beta_B B + \beta_C C + \beta_D D + \beta_{AA} A^2 + \beta_{AB} AB + \beta_{AC} AC + \beta_{AD} AD + \beta_{BB} B^2 + \beta_{BC} B + \beta_{BD} BD + \beta_{CC} C^2 + \beta_{CD} CD + \beta_{DD} CD^2 \dots\dots\dots \text{Eq (1)}$$

R : la surface de réponse pour les deux activités.

β : le coefficient de régression.

β_0 : le terme constant (à l'origine).

$\beta_A, \beta_B, \beta_C$ et β_D : les coefficients des termes linéaires.

A, B, C et D : les niveaux codés des variables indépendantes.

$\beta_{AA}, \beta_{BB}, \beta_{CC}$ et β_{DD} : les coefficients des termes quadratiques.

$\beta_{AB}, \beta_{AC}, \beta_{AD}, \beta_{BC}, \beta_{BD}$ et β_{CD} : les coefficients des paramètres croisés.

L'analyse du modèle et de R^2 est faite afin de vérifier l'efficacité des deux modèles ; la valeur F est inspectée afin de déterminer la signification de toutes les équations ajustées. Les graphiques de surface de réponse ont été réalisés par Minitab 19 notamment ; le diagramme des interactions, le graphique des effets principaux, la droite de régression orthogonale, le graphique de contour, etc. Les valeurs optimales des variables ont été obtenues en résolvant l'équation de régression et également en analysant les graphiques de surface de réponse.

La qualité de l'ajustement est également validée en calculant l'écart moyen absolu (Absolute Average Deviation) (équation (2)), qui est défini comme suit :

$$AAD = \frac{\sum_{i=1}^p \left(\frac{|y_{i,e} - y_{i,p}|}{y_{i,e}} \right)}{p} \times 100 \dots\dots\dots \text{Eq(2)}$$

MATERIEL ET METHODES

Où, $y_{i,e}$ et $y_{i,p}$ représentent les réponses expérimentales et prédites, respectivement, et p représente le nombre d'expériences (27).

2.7.4 Validation des modèles

Afin de valider les modèles proposés dans le but d'optimiser la production de xylanase (modèle 1) et de CMC_{Case} (modèle 2) et les deux enzymes à la fois (modèle 3). Une série de fermentations a été réalisée dans les conditions optimales proposées par le modèle pour les deux réponses. Dans des flacons Erlenmeyer de 500 mL contenant 10 g d'Alfa en triple.

2.7.5 Cinétique de production d'hémicellulase et de cellulase dans les conditions optimales

La cinétique de production de xylanase et de cellulase par la souche sélectionnée en utilisant l'Alfa comme substrat pour la FSS a été réalisé pendant 8 jours de fermentation dans des conditions optimales. Des échantillons ont été collectés à intervalles de temps réguliers (24 heures) et l'activité enzymatique dans le surnageant de culture a été déterminée.

2.8 Optimisation des composants du milieu pour la production de xylanase

2.8.1 Étude de l'effet des composants du milieu sur la production de xylanase par la conception Plackett-Burman

Une étude détaillée a été faite afin d'étudier l'effet de certains nutriments sur la production de xylanase. Les variables choisies dans cette étude ont été sélectionnées dans la littérature comme des facteurs affectant la production de cette enzyme (Cui & Zhao, 2012; Singh et al., 2012; Sun et al., 2020). Par conséquent, la source d'azote organiques et inorganiques, la source de carbone et la source de phosphore sélectionnées et criblées dans cette recherche sont : la peptone, l'extrait de levure, l'extrait de bœuf, l'extrait de malt, le sulfate d'ammonium, le nitrate de sodium, l'urée, le xylose, l'amidon, le KH_2PO_4 et le K_2HPO_4 . La conception expérimentale de Plackett-Burman a été utilisée pour cribler les variables indépendantes et déterminer les composants du milieu qui ont le plus d'effet sur la production de xylanase.

Chaque variable indépendante a été évaluée à deux intervalles largement espacés, exprimés en valeurs positives (niveau élevé, +1) et en valeurs négatives (niveau bas, -1). Le niveau codé de chaque variable et la conception expérimentale avec les 24 expériences pour le criblage des variables sont présentées dans le tableau 6. Chaque ligne représente un essai et la production de xylanase représente la valeur de réponse.

MATERIEL ET METHODES

Le pH, la température, et le degré d'humidité ont été ajustés selon les conditions optimales proposées par le modèle 1. Des échantillons ont été prélevés dans des conditions stériles après 144 h de fermentation (d'après le modèle 1).

Afin d'évaluer l'effet des onze facteurs sur l'activité de la xylanase. Le logiciel Minitab-19 a été utilisé pour générer le tableau de conception et analyser les données (tableau 6). Toutes les expériences ont été réalisées en triple. Les variables avec la valeur t la plus élevée et un niveau de confiance supérieur à 95 % ont été considérées comme élément significatives.

L'effet de chaque source d'azote, source de carbone et source de phosphore sur l'activité xylanase a été calculé selon la formule suivante (équation (3)) : où Y représente la réponse ; β_0 l'ordonnée à l'origine du modèle, β_i le coefficient de régression et x_i représente la variable indépendante.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \dots\dots\dots \text{Eq (3)}$$

Tableau 6 Matrice de conception expérimentale de Plackett-Burman à onze variables avec valeurs codées et expérimentales entre parenthèses (g/L) pour cribler les conditions de culture des nutriments pour la production de xylanase par *A. fumigatus*.

2.8.2 Optimisation des sources de nutriments sélectionnées pour la production de xylanase par la conception Central Composite

L'optimisation des nutriments sélectionnés a été réalisée à l'aide de Central Composite Design (CCD), afin de maximiser la production de xylanase par la souche MGA. 31 expériences avec le point central sextuplé ont été menées pour optimiser la production de xylanase. Minitab® 19 est utilisé pour cet objectif (Box & Wilson, 1951). Chaque facteur a été évalué à cinq niveaux ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ et $+\alpha$) pour optimiser la réponse. Tableau 14 représente les facteurs, leurs valeurs et la conception expérimentale. Minitab® 19 est utilisé pour cet objectif.

Tous les 31 flacons ont été préparés, stérilisés et inoculés avec la même concentration de spores utilisée précédemment, puis incubés à 30 °C pendant 4 jours. Une régression multiple utilisant la méthode des moindres carrés a été utilisée pour ajuster la formule (4) afin d'optimiser la production de xylanase :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ii} x_i^2 + \sum a_{ij} x_i x_j \dots\dots\dots \text{Eq (4)}$$

MATERIEL ET METHODES

Où y représente la réponse prédite (l'activité xylanase U g⁻¹) ; a₀, a_i, a_{ii}, a_{ij} sont des coefficients de régression constants du modèle ; x_i, x_j représentent les niveaux codés des variables X_i et X_j où ; X_i est codé x_i selon la formule de transformation suivante (5):

essaie	Peptone	Extrait de Malt	Extrait de levure	MgSO ₄	NaNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	Urée	Xylose	Amidon
1	1 (5)	-1 (2)	1 (5)	1 (2)	1 (3)	1 (3)	1 (15)	-1 (5)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (1)
2	-1 (1)	1 (5)	1 (5)	1 (2)	1 (3)	1 (3)	-1 (5)	-1 (5)	-1 (1)	-1 (1)	1 (5)
3	1 (5)	1 (5)	-1 (2)	-1 (0.8)	1 (3)	1 (3)	-1 (5)	1 (15)	-1 (1)	1 (5)	1 (5)
4	-1 (1)	-1 (2)	1 (5)	1 (2)	-1 (1)	-1 (1)	1 (15)	1 (15)	-1 (1)	1 (5)	-1 (1)
5	-1 (1)	1 (5)	-1 (2)	1 (2)	1 (3)	1 (3)	1 (15)	1 (15)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (1)
6	1 (5)	-1 (2)	-1 (2)	1 (2)	1 (3)	-1 (1)	-1 (5)	1 (15)	1 (3)	-1 (1)	1 (5)
7	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (2)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (5)	-1 (5)	1 (3)	-1 (1)	1 (5)
8	-1 (1)	-1 (2)	-1 (2)	1 (2)	-1 (1)	1 (3)	-1 (5)	-1 (5)	1 (3)	1 (5)	-1 (1)
9	-1 (1)	1 (5)	1 (5)	-1 (0.8)	1 (3)	-1 (1)	1 (15)	1 (15)	1 (3)	1 (5)	1 (5)
10	-1 (1)	1 (5)	1 (5)	-1 (0.8)	-1 (1)	1 (3)	1 (15)	-1 (5)	1 (3)	-1 (1)	1 (5)
11	-1 (1)	-1 (2)	-1 (2)	-1 (0.8)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (5)	-1 (5)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (1)
12	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (2)	1 (3)	-1 (1)	-1 (5)	-1 (5)	-1 (1)	1 (5)	-1 (1)
13	-1 (1)	1 (5)	-1 (2)	1 (2)	-1 (1)	-1 (1)	1 (15)	1 (15)	-1 (1)	-1 (1)	1 (5)
14	1 (5)	1 (5)	-1 (2)	1 (2)	-1 (1)	1 (3)	1 (15)	1 (15)	1 (3)	1 (5)	-1 (1)
15	1 (5)	-1 (2)	1 (5)	-1 (0.8)	-1 (1)	1 (3)	1 (15)	-1 (5)	-1 (1)	1 (5)	1 (5)
16	1 (5)	1 (5)	1 (5)	-1 (0.8)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (5)	1 (15)	-1 (1)	1 (5)	-1 (1)
17	-1 (1)	-1 (2)	-1 (2)	-1 (0.8)	1 (3)	-1 (1)	1 (15)	-1 (5)	-1 (1)	1 (5)	1 (5)
18	1 (5)	-1 (2)	1 (5)	-1 (0.8)	1 (3)	1 (3)	1 (15)	1 (15)	1 (3)	-1 (1)	-1 (1)
19	-1 (1)	-1 (2)	1 (5)	1 (2)	-1 (1)	1 (3)	-1 (5)	1 (15)	1 (3)	1 (5)	1 (5)
20	-1 (1)	1 (5)	-1 (2)	-1 (0.8)	1 (3)	1 (3)	-1 (5)	-1 (5)	1 (3)	1 (5)	-1 (1)
21	1 (5)	-1 (2)	-1 (2)	1 (2)	1 (3)	-1 (1)	1 (15)	-1 (5)	1 (3)	1 (5)	1 (5)
22	1 (5)	-1 (2)	-1 (2)	-1 (0.8)	-1 (1)	1 (3)	-1 (5)	1 (15)	-1 (1)	-1 (1)	1 (5)
23	-1 (1)	-1 (2)	1 (5)	-1 (0.8)	1 (3)	-1 (1)	-1 (5)	1 (15)	1 (3)	-1 (1)	-1 (1)
24	1 (5)	1 (5)	-1 (2)	-1 (0.8)	-1 (1)	-1 (1)	1 (15)	-1 (5)	1 (3)	-1 (1)	-1 (1)

$$x_i = \frac{x_i - X^0}{\Delta X} \dots\dots\dots \text{Eq (5)}$$

Où x_i représente la valeur codée sans dimension de la variable X_i, X₀ est la valeur de X_i au point central et ΔX est le changement progressif de la variable.

MATERIEL ET METHODES

Pour déterminer la signification de l'équation ajustée, les valeurs P et F sont examinées. Minitab 19 est utilisé pour générer des coefficients variables, des variables d'interaction et des graphiques de surface de réponse. L'efficacité du modèle polynomial est examinée en évaluant le coefficient de détermination R^2 par une analyse de variance (ANOVA).

Une fermentation a été réalisée en triple dans des flacons Erlenmeyer de 500 mL contenant 10 g d'Alfa, afin de valider les conditions de cultures proposés par le modèle

2.9 Saccharification enzymatique de résidus lignocellulosiques par le filtrat de culture ; comparaison avec les enzymes commerciales

L'hydrolyse enzymatique ou la saccharification est une voie prometteuse pour la bioconversion de la biomasse lignocellulosique en sucres fermentescibles. En général, des cocktails enzymatiques comportant différentes familles d'activités, caractérisées par des modes d'action distincts, sont utilisés comme biocatalyseurs.

Lors de ce test, les sucres réducteurs libérés ont été mesurés lors de la saccharification de plusieurs substrats lignocellulosiques : Alfa, son de blé, paille de blé et paille d'avoine, et ensuite comparés à la saccharification de ces mêmes substrats par des enzymes commerciales. Le complexe enzymatique produit dans les conditions optimales a d'abord été comparée aux xylanases et hémicellulases commerciales (xylanase recombinant expressed in *A. oryzae* sigma, hemicellulase from *A. niger* sigma). L'activité enzymatique d'*A. fumigatus* a ensuite été utilisé pour la saccharification. Pour ce faire, de nouvelles fermentations ont été réalisées dans des flacons Erlenmeyer de 500 mL avec 10 g d'Alfa inoculés avec 10^7 spores/ g. Les expériences ont été incubées à 30 °C pendant 144 h (Gares, 2023).

Les expériences de saccharification ont été réalisées pendant 24 h à 60 °C sans agitation. Dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL contenant 5 g de chaque substrat, un volume de 75 mL de tampon citrate (0.05 mol/L, pH 5) a été rajouté (Sartori et al., 2015). Les flacons ont été stérilisés, et ensuite, 5 g du bouillon fermenté contenant le complexe enzymatique et 5 mL d'hémicellulase commerciale (10 : 100 (v/v)) ont été ajoutés aux flacons aseptiquement. Des contrôles d'enzymes (5 mL du tampon de citrate à la place du bouillon de culture), ont également été inclus dans l'essai.

MATERIEL ET METHODES

2.10 Optimisation de l'activité xylanolytique

2.10.1 Effet du pH, la température et la concentration du substrat

L'enzyme brute a été caractérisée et optimisée en étudiant l'effet du pH, la température et la concentration du substrat sur l'activité xylanase ainsi que la stabilité de l'enzyme. Pour ce faire, la BBD est utilisée afin de prédire les conditions optimales pour l'activité xylanase de cette souche (tableau 18).

15 expériences avec le point central triplé ont été menées afin d'optimiser l'activité xylanase, un modèle basé sur Box-Behnken design BBD a été proposé. Le même logiciel statistique Minitab® 19 a été utilisé pour cet objectif. Les séries expérimentales ont été randomisées et les facteurs montrant des effets qui influencent l'activité xylanase ont été identifiés sur la base de la valeur p ($p < 0.05$).

La production de xylanase par la souche élue a été réalisée dans les mêmes conditions décrites dans l'expérience précédente ; pour chaque analyse de dosage, une série de tampon avec un pH acide, neutre et basique (A) a été préparée (Annexe 2), la concentration de substrat (C) a été ajustée selon les niveaux présentés dans le tableau 7. L'hydrolyse enzymatique de ces échantillons a été réalisée à différentes températures d'incubation (B).

Les facteurs A, B, C ont été considérés comme des variables indépendantes et le (R) représente la réponse de l'activité xylanase. Les niveaux minimum, moyen et maximum de chaque variable sont codés respectivement -1, 0 et +1 (tableau 7).

Tableau 7 Niveau et code des variables indépendantes utilisées pour le Box-Behnken design (BBD) pour l'optimisation de l'activité xylanase.

Codes	Facteurs (unité)	Minimum (-1)	Moyen (0)	Maximum (+1)
A	pH	4	7	10
B	Température (°C)	35	50	65
C	Concentration de substrat (mg/mL)	0.5	1.5	2.5
Réponses		Unités		
R	Xylanase	U/gds		

2.10.2 Optimisation de l'activité xylanase par BBD

Dans le but de prédire les conditions optimales pour l'activité enzymatique, un modèle quadratique a été adopté afin de détecter les effets des variables indépendantes sur les réponses, l'équation de régression en unités non-codées (formule (5)) est présentée comme suit ;

$$R = \beta_0 + \beta_A A + \beta_B B + \beta_C C + \beta_{AA} A^2 + \beta_{AB} AB + \beta_{AC} AC + \beta_{BB} B^2 + \beta_{BC} B + \beta_{CC} C^2 \text{ Eq (5)}$$

Où : R représente la surface de réponse, β : le coefficient de régression, β_0 : le terme constant (à l'origine), β_A , β_B et β_C : les coefficients des termes linéaires, A, B, C : les niveaux codés des variables indépendantes, β_{AA} , β_{BB} et β_{CC} : les coefficients des termes quadratiques, β_{AB} , β_{AC} et β_{BC} : les coefficients des paramètres du produit croisé.

Une série d'analyses été réalisé dans les conditions optimales, pH, température et concentration de substrat. Dans l'objectif de valider le modèle proposé afin d'optimiser l'hydrolyse de xylanase.

2.11 Résistance à la chaleur des conidies d'*A. fumigatus* et thermo-stabilité de l'enzyme xylanase

2.11.1 Thermo-stabilité de l'enzyme xylanase

La stabilité de l'enzyme xylanase produit par *A. fumigatus* a été testée à différentes températures, allant de 40 °C à 90 °C, avec des intervalles de 10 °C. L'enzyme xylanase utilisée dans cette étude a été obtenue à partir d'un bouillon de culture de quatre jours en utilisant le même milieu liquide à base de XBW.

2.11.2 Thermorésistante des conidies

Les spores ont un cycle de vie distinct des cellules végétatives, ce qui leur permet de résister à une variété de conditions environnementales défavorables telles que les températures extrêmes. Dans cette étude, nous avons analysé la thermos-résistance des conidies d'*Aspergillus fumigatus*.

Pour ce faire, nous avons modifié le protocole proposé par (Van den brule et al., 2020) ; premièrement, les conidies ont été collectées à partir d'une culture de 7 jours sur gélose pomme de terre (PDA), puis placées dans du tampon phosphate M/15 (4,7g/L phosphate disodique, 4,5g/L phosphate monopotassique) (pH 7.0) contenant 0.005 % de Tween 80 (Belbahi et al., 2017; Tsukahara, 1977). Une concentration de 2×10^8 conidies mL⁻¹ a été préparée à l'aide d'une chambre de comptage (Thomas REF 06 106 10 MARIENFELD, Allemagne). 9.5 mL de

MATERIEL ET METHODES

tampon phosphate ont été préparés dans 8 tubes à essai puis préchauffés au bain-marie à 60 °C. A $t = 0$, un volume de 0.5 mL de la suspension sporales préparée a été ajouté aux tubes de tampon préchauffés pour atteindre une concentration finale de 10^7 conidies mL^{-1} . Toutes les 2, 5, 10, 15, 20, 30 et 60 min d'incubation, 1 tube a été retiré du bain et directement refroidi sur de la glace pour stopper le processus d'inactivation. Les échantillons de tubes traités et les conidies non traitées ont été dilués à 10^3 spores mL^{-1} . Un volume de 100 μL de chaque dilution a été inoculé à la surface d'une plaque PDA et incubé à 30 °C pendant 2 jours. Enfin, les UFC/ mL ont été comptées après la période d'incubation. Tous les tests ont été réalisés en triple.

A. fumigatus est connu comme une moisissure thermophile. En conséquence, le même test a été reproduit à des températures plus extrêmes de 65 et 70 °C.

L'inactivation a été décrite par une courbe de régression linéaire du log UFC mL^{-1} Vs le temps. Les valeurs D_{60} , D_{65} et D_{70} , qui représentent le temps de réduction décimal (le temps nécessaire pour provoquer une réduction de 1 log à 60, 65 et 70 °C), ont été déterminées par $\frac{-1}{\text{pente}}$ de la courbe d'inactivation (Van den brule et al., 2020).

2.12 Analyse coût-efficacité

L'analyse coût-efficacité de la production de l'enzyme xylanase par la souche MGA en FSS en utilisant l'Alfa a été déterminé par une étude de rentabilité ; une comparaison des activités xylanases a été effectuée entre les enzymes obtenues avec Alfa après optimisation du milieu et celles obtenues avec un milieu contenant 10 g/L de xylane commercial (Díaz et al., 2019).

Résultats

3 Résultats

Le présent travail porte sur la recherche de micro-organismes producteurs de l'hémicellulase et la sélection de l'isolat le plus performant. Une étude de la capacité de la souche sélectionnée et identifiée, à croître et à produire de l'hémicellulase à grande échelle en milieu liquide, a été premièrement investiguée, ensuite, une optimisation de la production de cet enzyme sur l'Alfa comme seule source de carbone a été réalisée par des approches mathématiques, notamment, la conception Plackett-Burman pour le screening et la sélection des facteurs d'influences, et les conceptions Box Behnken et Centrale Composite pour l'optimisation de la production de xylanase.

3.1 Isolement et criblage des isolats producteurs d'hémicellulases et de cellulases

Le criblage réalisé directement sur le milieu gélosé CMC, a conduit à la sélection de 16 isolats microbiens. Tous les isolats ont montré des activités cellulosiques distinctes. Ces derniers ont été testés à nouveau pour leurs capacités à dégrader le xylane. L'isolat le plus performant, nommée MGA, développant un indice xylanase moyen de : $IE = 1.07$ et un indice de cellulase (CMCase) de : $IE = 1.09$ (figure 17), a été sélectionné.

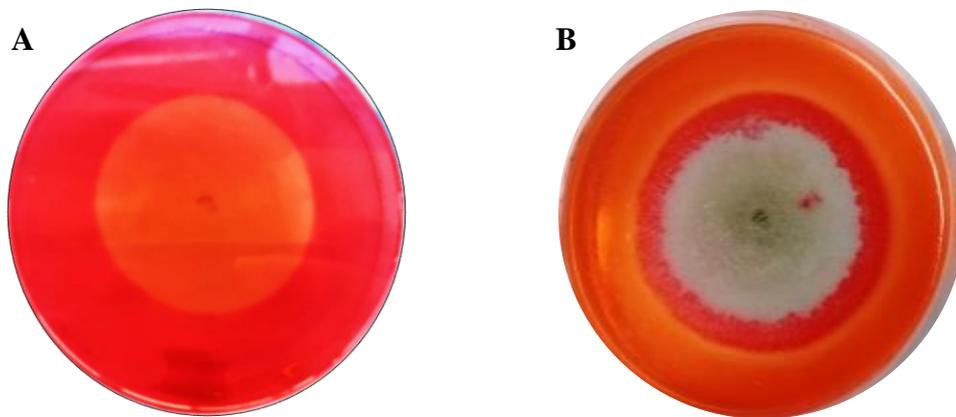


Figure 17 Activité CMCase sur milieu gélosé : CMC (A) et Xylane de maïs (B) indiquée par la zone de lyse entourant les colonies de l'isolat sélectionné.

3.2 Identification de l'isolat fongique sélectionné

3.2.1 Observation macroscopique

Les caractères macroscopiques de l'isolat sélectionné ont été étudiés sur le milieu 863 et le milieu PDA (figure 18) ;

- Aspect : colonie plate, veloutée, formée de courts filaments aériens blancs.
- Recto : colonie blanche puis bleu-vert virant ensuite au vert foncé à gris noirâtre.

- Verso : beige jaunâtre.

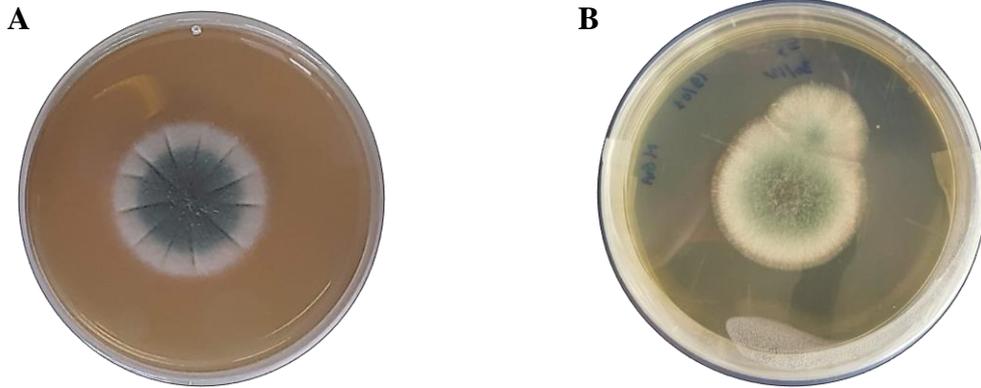


Figure 18 Observation macroscopique de l'isolat selectionné ensemençé sur milieu PDA (A) et 863 (B) après 3 jours d'incubation.

3.2.2 Observation microscopique

L'observation microscopique effectuée sous un microscope optique aux grossissements G x 40 et G x 100, a permis de faire les observations suivantes (figure 19);

- Hyphe : de diamètre fin et régulier, septé et ramifié ;
- Conidiospore : court, non cloisonné, lisse et incolore avec évasement progressif au sommet ;
- Vésicule : hémisphérique ;
- Phialide : directement portée par la vésicule, dressée et densément groupée ;
- Conidies : globuleuses et petites ;
- Tête aspergillaire : unisériée en colonne compacte assez grande.

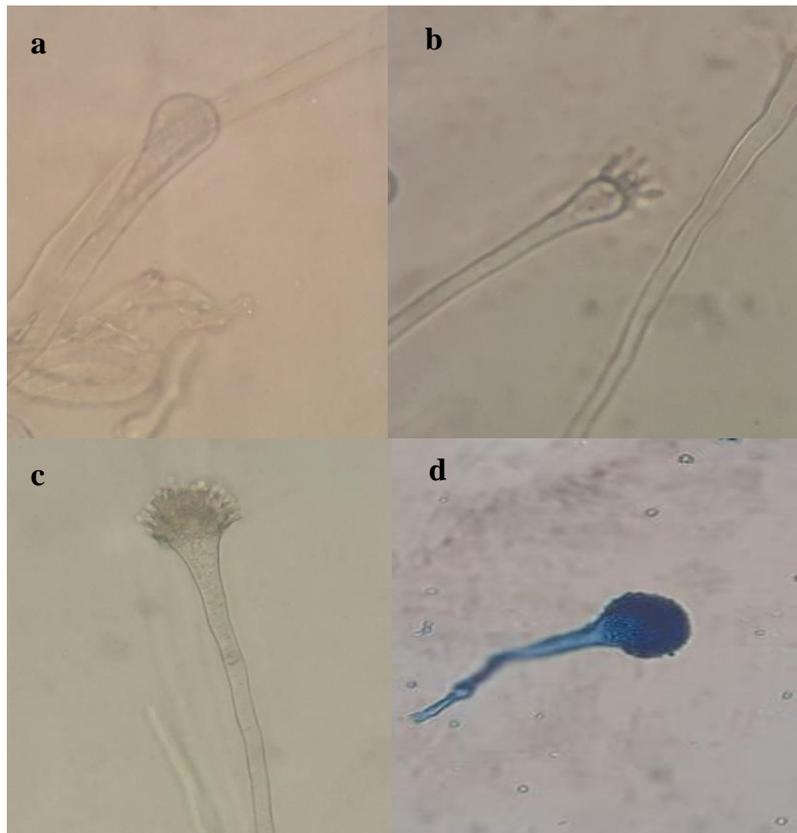


Figure 19 Observation microscopique de l'isolat sélectionné ; A : vésicule, B : formation des phialides, C et D : tête aspergillaire avant et après coloration avec le bleu de méthylène.

3.2.3 Identification moléculaire

L'identification moléculaire de l'isolat fongique sélectionné a été réalisée par extraction de l'ADN génomique et amplification de l'ARN ribosomique 18S. La séquence a été ensuite, déposée dans la NCBI GenBank avec le numéro d'accèsion ON226990 et comparée par analyse BLAST. Les séquences étroitement apparentées ont été sélectionnées et analysées avec le logiciel d'évolution moléculaire MEGA X. L'arbre phylogénétique a été construit, confirmant que la souche MGA présentait une similitude de 100 % avec *Aspergillus fumigatus* (figure 20).

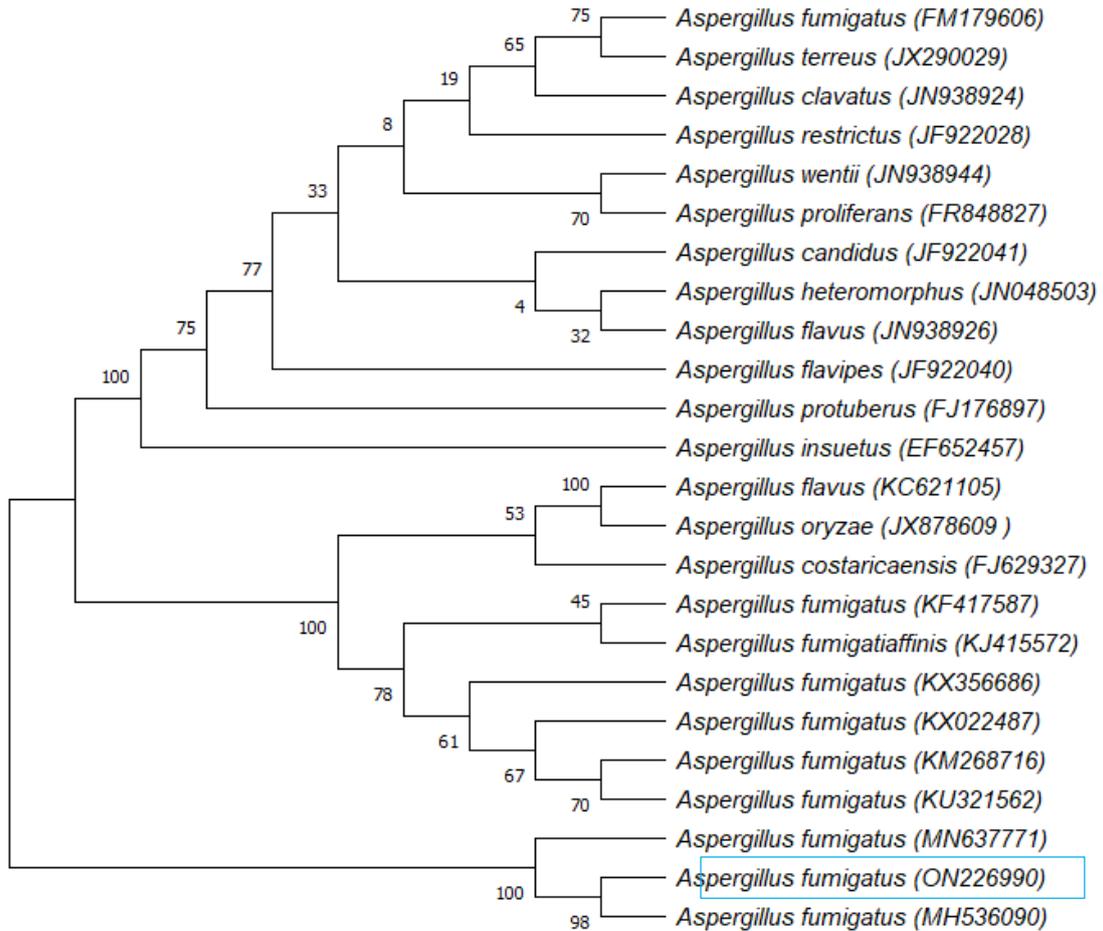


Figure 20 L'arbre phylogénétique de l'ARN ribosomal 18S d'*Aspergillus fumigatus* MGA et d'autres espèces d'*Aspergillus*.

3.3 Conduite de fermentation sur milieu liquide standard

3.3.1 Scale-up de 250 mL à des bioréacteurs de 2 et 20 L avec le xylose

3.3.1.1 Fermentation en fioles

Le suivi de la production de biomasse sèche et la consommation du substrat ont été présentés dans (figure 21 A). Le xylose a été presque entièrement consommé après 96 heures de fermentation accompagné d'une production maximale de biomasse (11.81 g/L). La phase exponentielle a été enregistrée entre 24 et 48 heures de fermentation et la phase stationnaire entre 48 h et 96 h. Quant au pH, il est passé de 6.6 à 5.9 lorsque la moisissure a atteint sa production maximale de biomasse et a consommé la quasi-totalité du substrat.

3.3.1.2 Fermentation en bioréacteurs de 2 et 20 L

Dans la présente étude, un système de contrôle-commande a permis une surveillance et un suivi continu du pH et de la PO₂ toutes les 05 et 04 min pour les fermenteurs de 2L et 20L, respectivement.

Selon la courbe PO₂ (%) (figure 21 B et C), la phase logarithmique des bioréacteurs 2 L et 20 L a été enregistrée entre 10 et 24 h. Le profil de croissance de biomasse sèche et la concentration du substrat ont également été présentés dans la figure 21. Le substrat a été complètement consommé après 72 heures de fermentation dans le bioréacteur 2 L et seulement 30 heures dans le bioréacteur 20 L. La production maximale de biomasse de 16,22 g/L et 12,9 g/L a été atteinte après 72 et 30 heures de fermentation pour le bioréacteur de 2 L et 20 L, respectivement.

Le pH du milieu de culture a suivi la même trajectoire que celui de la culture en fiole. En effet, il a diminué dans les deux bioréacteurs à près de 5.7 lorsque la production maximale de biomasse a été atteinte. Ensuite, une augmentation du pH a été enregistrée à la fin de la fermentation.

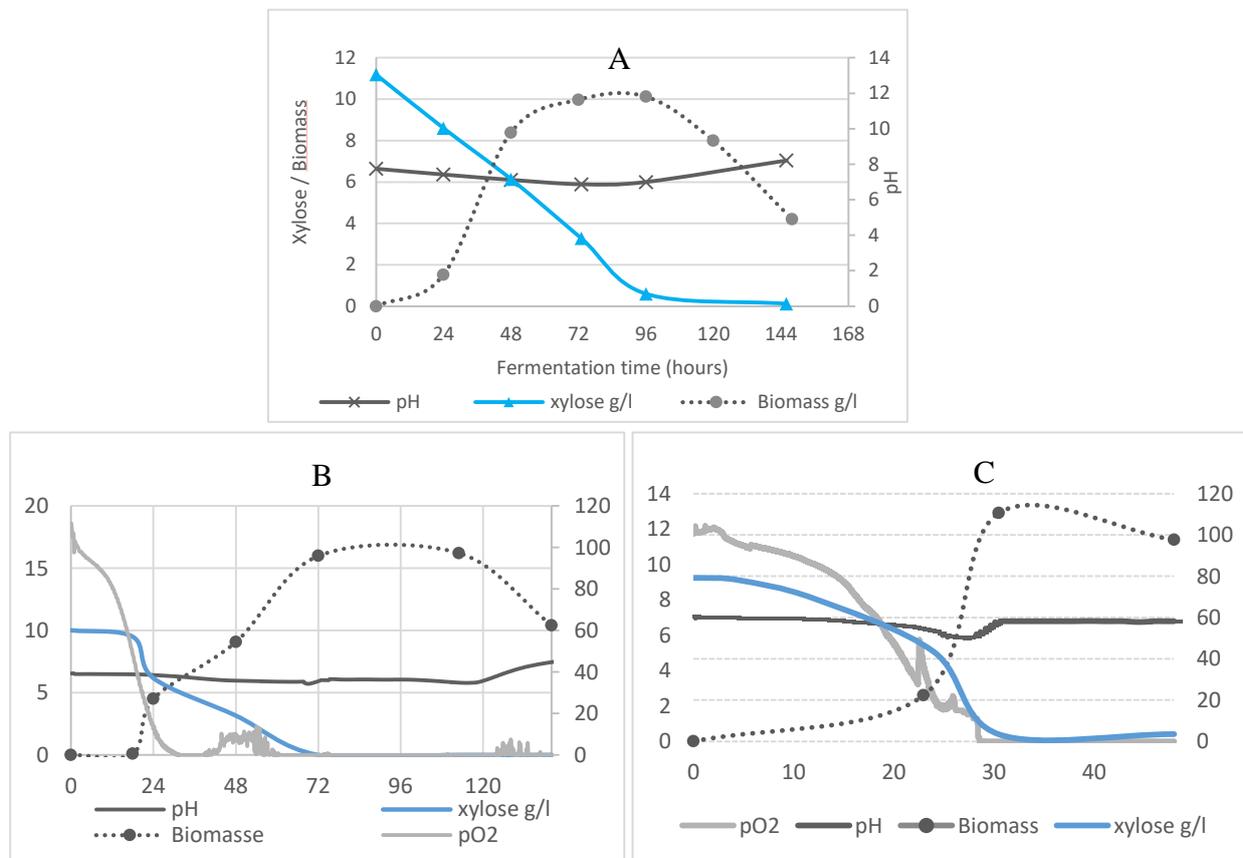


Figure 21 Profil de la culture liquide en batch d'*Aspergillus fumigatus* avec le xylose dans un Erlenmeyer de 250 mL (A), un bioréacteur de 2 L (B) et un bioréacteur de 20 L (C)

3.3.2 Impact de la vitesse d'agitation sur le processus de fermentation et le changement morphologique d'*A. fumigatus*

L'impact du cisaillement sur la consommation du substrat a été étudié en mode continu, en employant trois vitesses d'agitations. L'ensemble de ces expériences a permis de démontrer une certaine « robustesse » du champignon face au cisaillement susceptible d'apparaître à l'échelle industrielle. En effet, il a été constaté que la vitesse d'agitation a un impact sur le métabolisme d'*A. fumigatus* (figure 22) ; une consommation de substrat plus rapide a été observée avec les fermentations menées avec les échantillons mycéliens récoltés à des vitesses d'agitations plus élevées. Cependant, le processus de fermentation est légèrement réduit avec les échantillons sous une agitation de 650 rpm (figure 22).

A des vitesses d'agitation inférieures à 350 rpm, les filaments mycéliens ont développé une forme de macro-pellettes (figure 23 A) attachées au fermenteur (figure 24 A). En augmentant la vitesse d'agitation à 500, la moisissure formait des micros-pellettes libres (figure 24 C) assurant une bonne homogénéité dans le milieu de culture.

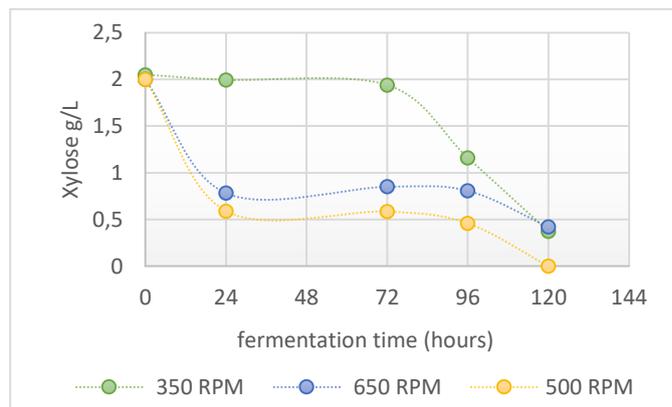


Figure 22 Impact de la vitesse d'agitation sur le profil de fermentation d'*Aspergillus fumigatus*.

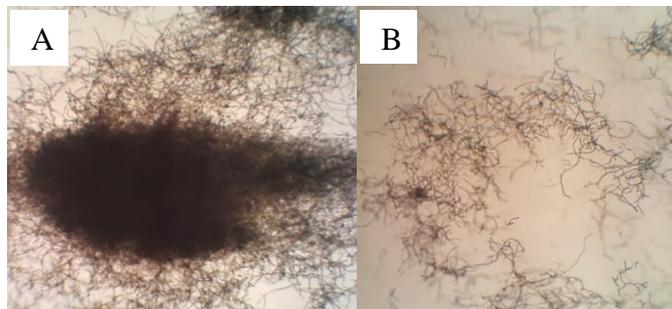


Figure 23 Morphologie microscopique des pellettes d'*Aspergillus fumigatus* dans un bioréacteur agité sous 200 rpm (A) et "effet de cisaillement" à 650 rpm (B).

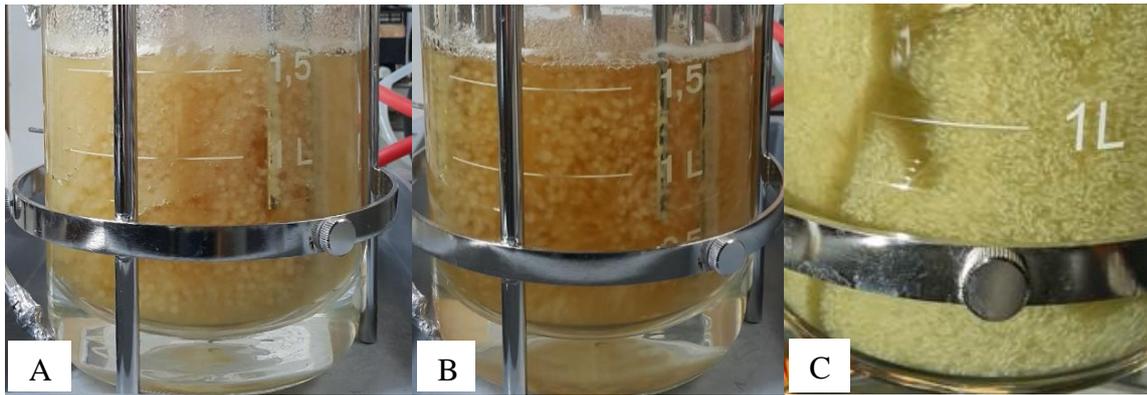


Figure 24 Morphologie macroscopique des pelletes d'*A. fumigatus* dans un bioréacteur (2L) agité sous 200 rpm (A), 350 rpm (B) et 650 rpm (C).

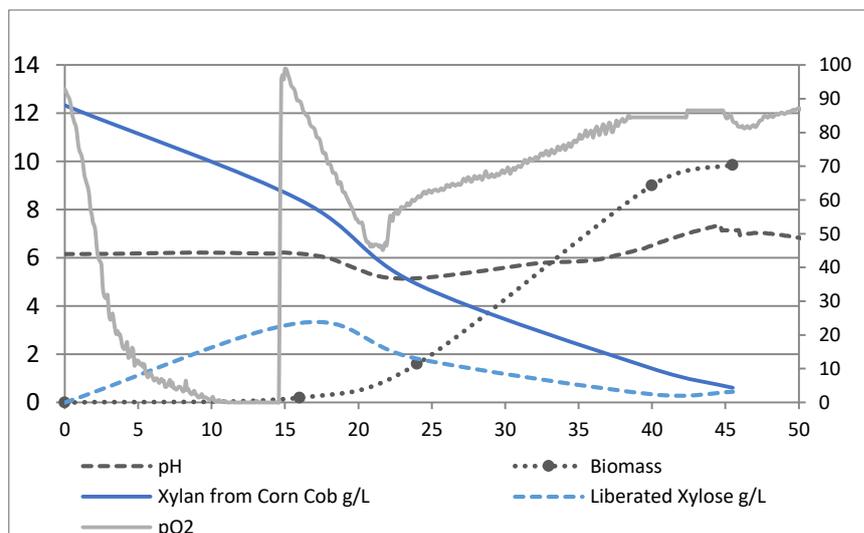
3.3.3 Production de l'hémicellulase dans un bioréacteur de 2 L

3.3.3.1 Profile de la fermentation sur milieu liquide à base de xylane de maïs dans un bioréacteur de 2L

La croissance de biomasse sèche, la concentration de xylane de maïs et la libération des monomères de xylose ont été présentées dans la figure 25.

Dans cette expérience, une concentration plus élevée de conidies et un temps de fermentation court de la pré-culture, ont empêché la formation de macros-pelletes. Ensuite, et pour prévenir davantage la croissance de ces pelletes et empêcher une production de biomasse en excès, la vitesse d'agitation a été relevée à 500 rpm après environ 14 heures de fermentation.

Durant seulement les premières 45 heures de fermentation, le substrat a été complètement consommé avec une production de biomasse de 9.86 g/L. Le pH du milieu de culture a diminué à près de 5.1 après 24 heures et a commencé à augmenter en fin de fermentation pour atteindre 7.3 (figure 25).



RESULTATS

Figure 25 Profile de la culture liquide en batch d'*Aspergillus fumigatus* avec le xylane de maïs dans un bioréacteur de 2 L.

3.3.3.2 L'activité xylanase dans le milieu de culture

Le potentiel hydrolytique d'*A. fumigatus* a été testé en utilisant le surnageant aseptique du bioréacteur précédent pour l'hydrolyse de XBW et XM. Les produits formés lors de l'hydrolyse du substrat ont été analysés par HPLC (figure 26). En effet, 5.88 ± 0.34 g et 6.20 ± 0.08 g de xylose ont été libérés à partir de 10 g/L de BWX et XC respectivement.

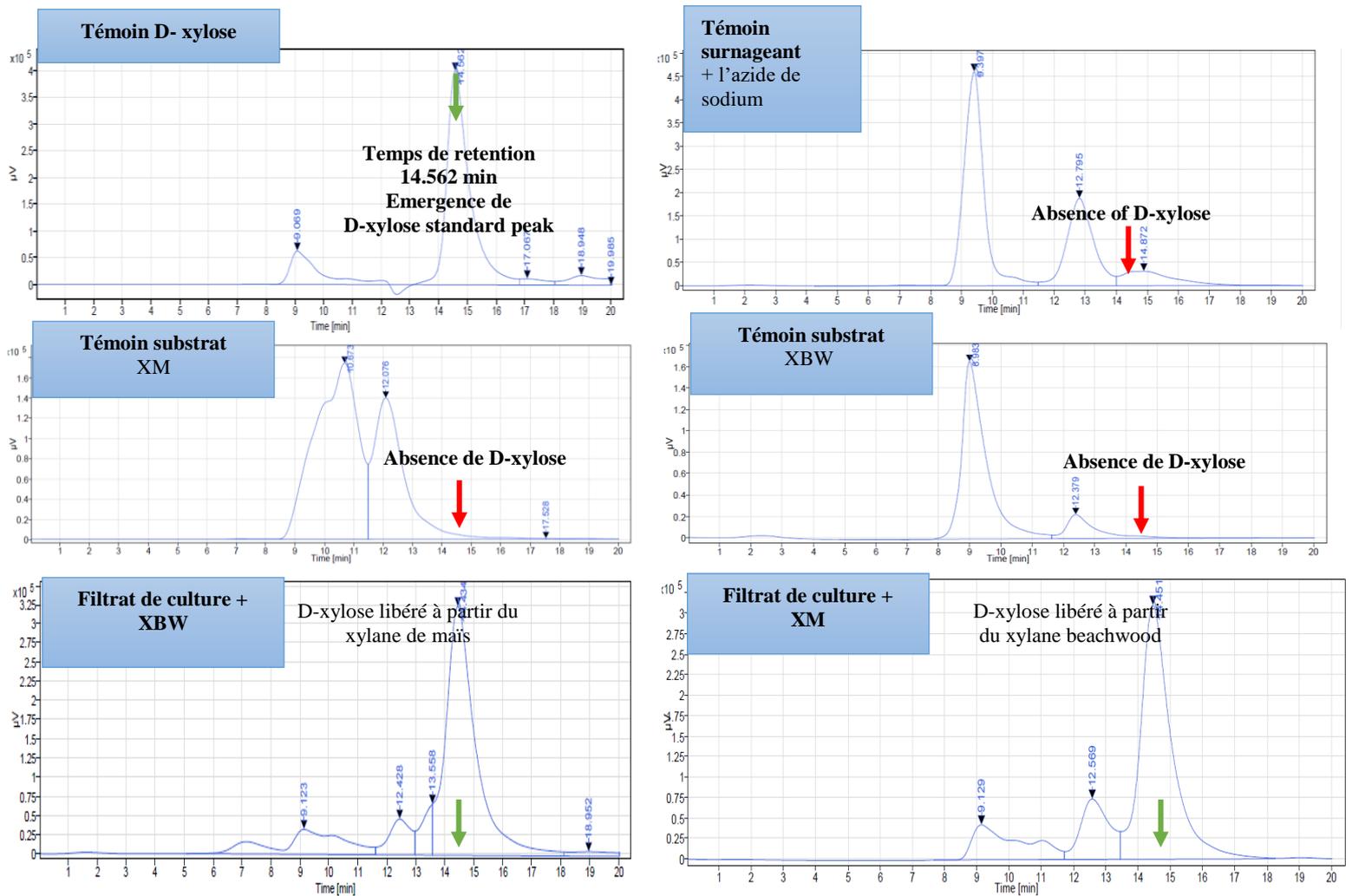


Figure 26 Analyse HPLC du xylose libéré depuis le xylane beechwood et le xylane de maïs à partir du surnageant du bioréacteur.

3.4 Conduite de fermentation sur substrat solide**3.4.1 Composition biochimique d'Alfa**

L'hydrolyse chimique d'Alfa a confirmé sa forte teneur en sucre. Les résultats de l'analyse HPLC sont présentés et comparés avec d'autres études dans le tableau suivant (tableau 8).

Tableau 8 Teneur en sucre de l'Alfa

		Glucose	Xylose	Références
Nos résultats	Alfa fibre	46% ± 0,029	12.5% ± 0.021	/
	Alfa poudre	44% ± 0.011	13.33% ± 0.018	/
Autres études	Alfa	49.09% ± 0.015	18.20% ± 0.3	(Zaafouri et al., 2016)
		63.38% ± 1.58	9.29% ± 0.50	(Semhaoui et al., 2017)
		47.63%	22.15%	(Bouiri & Amrani, 2010)

3.4.2 Cinétique de production d'hémicellulase et de cellulase (FSS)

Le suivi de la production enzymatique en Erlen par *A. fumigatus* sur l'Alfa comme seule source de carbone pendant 8 jours d'incubation (figure 27), a montré que l'activité xylanase du champignon était détectable dès les premières 24 heures, puis a augmenté rapidement et a atteint son maximum après 120 h de fermentation (684.64 ± 11.39 U/gds). D'autre part, l'augmentation de l'activité cellulase n'était pas aussi importante que celle de l'enzyme xylanase. Le rendement maximal de 48.26 ± 5.34 U/gds, a été atteint après 168 heures accompagné d'une activité xylanase de 470.30 ± 5.98 U/gds.

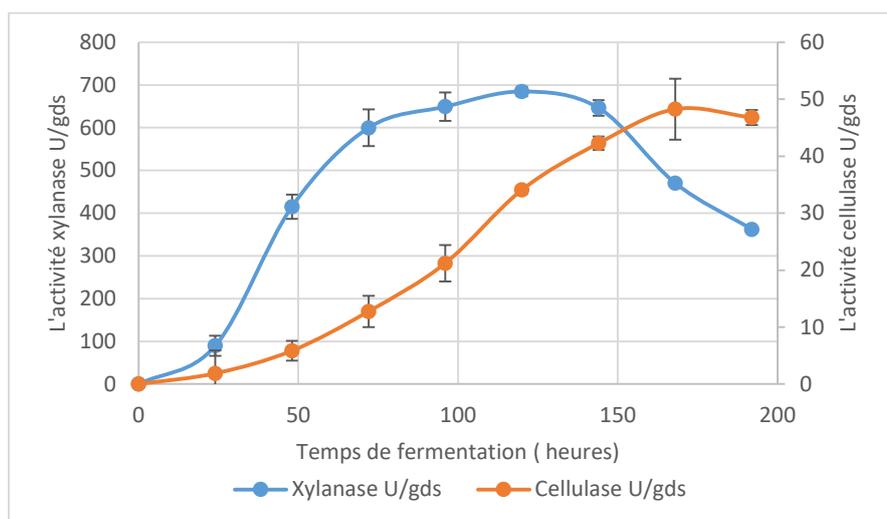


Figure 27 Evolution de la production de xylanase et de cellulase par *Aspergillus fumigatus* à 35°C et pH 4 en utilisant l'Alfa comme substrat humidifié à 70%

3.5 Optimisation des facteurs physico-chimiques pour la production d'enzymes

3.5.1 Effet de l'aspect du substrat sur la production de xylanase et de cellulase

Après 120h de fermentation, la production optimale de xylanase 640.94 ± 2.25 U/gds et de cellulase 49.98 ± 0.46 U/gds a été enregistrée avec le substrat d'Alfa mixte (poudre et fibre). Cependant, une légère diminution de la production enzymatique a été enregistrée avec le substrat d'Alfa en fibre ; 620.08 ± 1.82 U/gds et 40.31 ± 0.74 U/gds pour les deux enzymes respectivement. D'autre part, la production de ces deux enzymes en utilisant la poudre d'Alfa a enregistré un rendement moins important 460.95 ± 0.54 U/gds et 9.60 ± 0.23 U/gds, respectivement (figure 28).

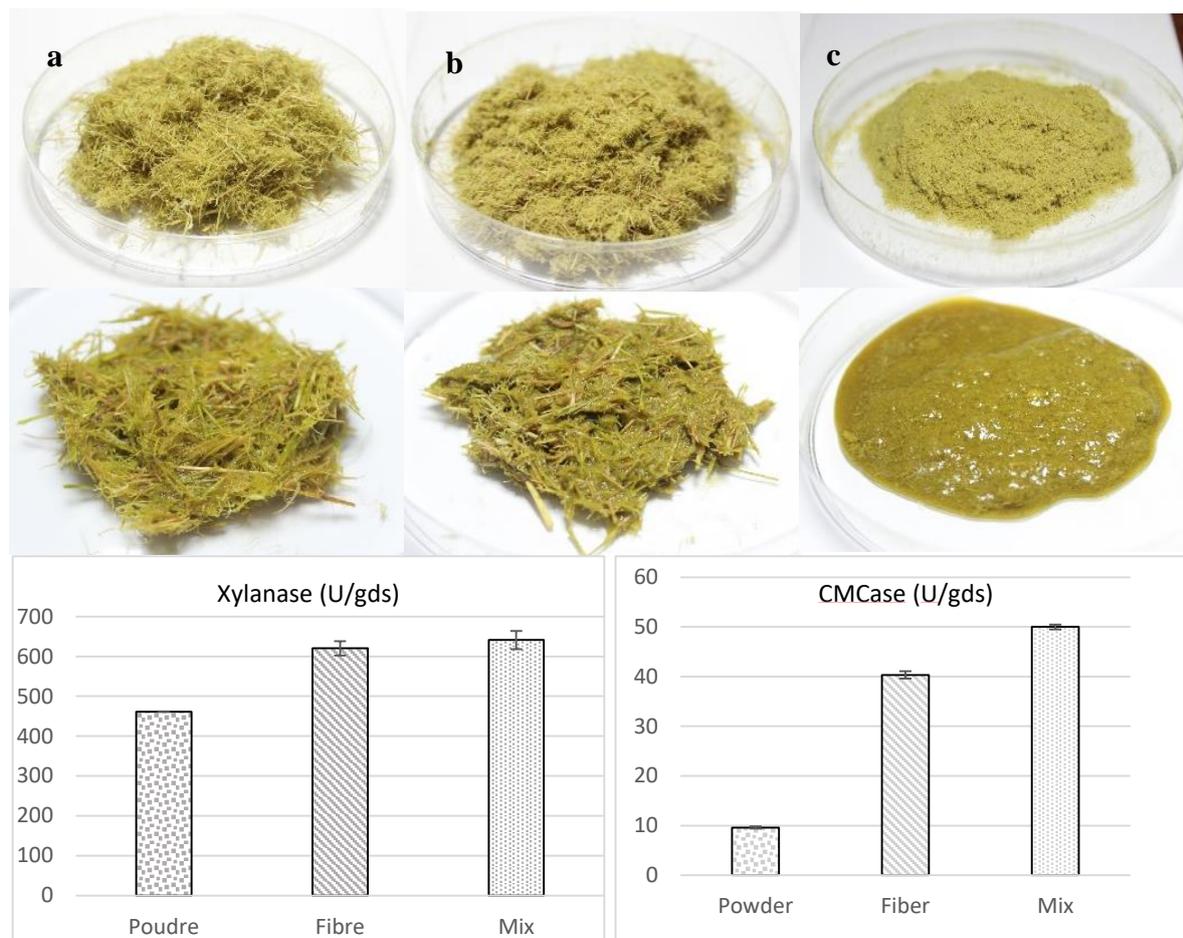


Figure 28 Taille des particules d'Alfa (a) ; > 500 μm, (b) ; le mélange des deux aspects fibre et poudre, (c) ; < 60-500 μm avant et après humidification, et son effet sur la production de xylanase et de CMCase par *Aspergillus fumigatus*

3.5.2 L'optimisation de la production de xylanase et de cellulase sur l'Alfa par BBD

L'exploration des facteurs influençant la production de xylanase et de CMCase a été réalisée à l'aide de la matrice BBD. Les résultats correspondants des expériences RSM sont présentés dans le tableau suivant (tableau 9).

Tableau 9 Les variables et les réponses correspondantes pour l'activité xylanase et CMCase dans la conception de BBD.

Facteurs					Réponses	
R	A:	B:	C:	D:	R1:	R2:
	Temperature	pH	Humidité %	Temps (h)	xylanase (U/gds)	CMCase (U/gds)
1	30	2	70	96	713.54	20.84
2	40	2	70	96	0.00	0.00

RESULTATS

3	30	6	70	96	618.11	30.85
4	40	6	70	96	0.00	0.00
5	35	4	50	48	16.41	39.64
6	35	4	90	48	0.00	18.80
7	35	4	50	144	0.00	4.90
8	35	4	90	144	106.53	48.64
9	35	4	70	96	141.96	36.85
10	30	4	70	48	390.92	16.76
11	40	4	70	48	0.00	0.00
12	30	4	70	144	717.28	42.37
13	40	4	70	144	21.98	0.00
14	35	2	50	96	59.58	13.90
15	35	6	50	96	23.06	14.78
16	35	2	90	96	3.27	32.76
17	35	6	90	96	100.05	40.53
18	35	4	70	96	140.53	29.53
19	35	2	70	48	13.44	11.04
20	35	6	70	48	0.00	0.00
21	35	2	70	144	166.61	52.18
22	35	6	70	144	184.42	50.68
23	30	4	50	96	656.79	14.17
24	40	4	50	96	0.00	0.00
25	30	4	90	96	765.08	22.55
26	40	4	90	96	0.00	0.00
27	35	4	70	96	142.7	28.47

3.5.2.1 Détermination des facteurs d'influence et ajustement du modèle

L'effet de la température d'incubation (A), du pH (B), de la teneur en humidité (C) et du temps d'incubation (D) sur la production de xylanase et de CMCCase a été analysé à l'aide du logiciel Minitab. Le BBD a été appliqué afin d'étudier l'interaction et d'optimiser le niveau de ces quatre facteurs pour une production maximale d'enzyme. Les valeurs du test F et P ont été utilisées pour identifier l'effet de chaque facteur sur la production de xylanase et de CMCCase (analyse de la variance ANOVA) (tableaux 10 et 11). Ce qui a démontré que les deux modèles sont hautement significatifs (au niveau de 5 %) ; en effet, la valeur F est supérieure à la valeur

RESULTATS

critique F (de la table de Fisher); Modèle F (33.87) > valeur critique F (2.62) et modèle F (3.47) > valeur critique F (2.62) pour la production de xylanase et de CMCcase respectivement.

3.5.2.1.1 ANOVA pour la production de xylanase

L'analyse de variance pour la production de xylanase a indiqué que le modèle de régression est hautement significatif avec une valeur de probabilité très faible (0.0001). L'efficacité du modèle est prouvée avec la détermination de la valeur du coefficient de détermination $R^2 = 0.97$, ce qui indique que 97.53 % de la variation totale pourrait être expliquée par ce modèle. L'équation du modèle de régression en unités codées est représentée comme suit :

Activité xylanase

$$= 11410 - 653.4A - 100B + 19.5C + 14.76D + 8.99 A^2 - 6.37B^2 - 0.1110 C^2 - 0.0254 D^2 + 2.39 A * B - 0.271 A * C - 0.317 A * D + 0.833 B * C + 0.081 B * D + 0.0320C * D$$

Les valeurs de P inférieures à 0.05 désignent que les termes du modèle sont significatifs et dans ce cas, et selon le tableau 10, A, D, AA, DD et AD représentent les facteurs d'influence sur la production de xylanase (tableau 10). Par conséquent, le modèle peut être réduit comme suit :

$$\text{Activité xylanase} = 12843 - 711.7 A + 15.87 D + 9.688 A^2 - 0.0178 D^2 - 0.317 AD$$

Tableau 10 Analyses de Variance pour la production de xylanase (* DF degré de liberté (freedom degree)).

Source	DF*	Sum of squares	Mean of squares	F-Value	P-Value
Model	14	1759757	125697	33.87	0.000
Linear	4	1282907	320727	86.43	0.000
Temperature	1	1228640	1228640	331.08	0.000
pH	1	79	79	0.02	0.886
Moisture level %	1	4000	4000	1.08	0.320
Incubation time (h)	1	50188	50188	13.52	0.003
Square	4	440017	110004	29.64	0.000
Temperature*Temperature	1	269328	269328	72.57	0.000
pH*pH	1	3464	3464	0.93	0.353
Moisture level %*Moisture level %	1	10513	10513	2.83	0.118

RESULTATS

Incubation time (h)*Incubation time (h)	1	18281	18281	4.93	0.046
2-Way Interaction	6	36834	6139	1.65	0.216
Temperature*pH	1	2277	2277	0.61	0.449
Temperature*Moisture level %	1	2932	2932	0.79	0.392
Temperature*Incubation time (h)	1	23161	23161	6.24	0.028
pH*Moisture level %	1	4442	4442	1.20	0.295
pH*Incubation time (h)	1	244	244	0.07	0.802
Moisture level %*Incubation time (h)	1	3778	3778	1.02	0.333
Error	12	44532	3711		
Lack-of-Fit	10	44530	4453	3667.94	0.000
Pure Error	2	2	1		
Total	26	1804290			

3.5.2.1.2 ANOVA pour la production de CMCase

D'autre part, la valeur p pour la production de CMCase est de 0.018, ce qui montre que le modèle de régression est autant significatif. L'efficacité du deuxième modèle est également démontrée avec la détermination de $R^2 = 0.8021$, ce qui indique que 80.21 % de la variation totale pourrait être expliquée par ce modèle. Le modèle est représenté comme suit :

CMCase activity

$$\begin{aligned}
 &= -868 + 50.7A + 8.0B + 0.76C - 0.15D - 0.687A^2 - 0.54B^2 \\
 &- 0.0107C^2 + 0.00D^2 - 0.250A * B - 0.0209A * C - 0.0267A * D \\
 &+ 0.043B * C + 0.0248B * D + 0.01682C * D
 \end{aligned}$$

Selon ANOVA; A, AA, D et CD sont les seuls facteurs d'influence (tableau 11), par suite, le modèle peut être réduit comme suit :

CMCase activity

$$= -592 + 42A - 1.298C - 0.982D - 0.635A^2 + 0.01682C * D$$

RESULTATS

Tableau 11 Analyses de Variance pour la production de CMCase.

Source	DF	Sum of squares	Mean of squares	F-Value	P-Value
Model	14	6436.26	459.73	3.47	0.018
Linear	4	3352.34	838.09	6.33	0.006
Temperature	1	1814.09	1814.09	13.71	0.003
pH	1	3.13	3.13	0.02	0.880
Moisture level %	1	479.86	479.86	3.63	0.081
Incubation time (h)	1	1055.27	1055.27	7.98	0.015
Square	4	1800.23	450.06	3.40	0.044
Temperature*Temperature	1	1573.09	1573.09	11.89	0.005
pH*pH	1	25.14	25.14	0.19	0.671
Moisture level %*Moisture level %	1	97.83	97.83	0.74	0.407
Incubation time (h)*Incubation time (h)	1	0.00	0.00	0.00	0.999
2-Way Interaction	6	1283.69	213.95	1.62	0.225
Temperature*pH	1	25.07	25.07	0.19	0.671
Temperature*Moisture level %	1	17.55	17.55	0.13	0.722
Temperature*Incubation time (h)	1	164.00	164.00	1.24	0.287
pH*Moisture level %	1	11.83	11.83	0.09	0.770
pH*Incubation time (h)	1	22.74	22.74	0.17	0.686
Moisture level %*Incubation time (h)	1	1042.51	1042.51	7.88	0.016
Error	12	1587.66	132.30		
Lack-of-Fit	10	1546.01	154.60	7.42	0.124
Pure Error	2	41.65	20.82		
Total	26	8023.92			

3.5.2.1.3 Etude des effets principaux (main effects plot)

La figure 29 montre l'influence des quatre facteurs sur la production de xylanase et de CMCCase. Selon le graphique, la température affecte négativement la production de xylanase. Cependant, une température de 35 °C était associée à la valeur optimale de production de CMCCase. D'autre part, un pH de 4, une humidité de 70 % et un temps d'incubation de 96 h ont été associés au point le plus élevé de production de xylanase dans le graphique. De plus, l'humidité et le temps d'incubation affectent positivement la production de CMCCase. Cependant, l'effet du pH n'était pas statistiquement significatif.

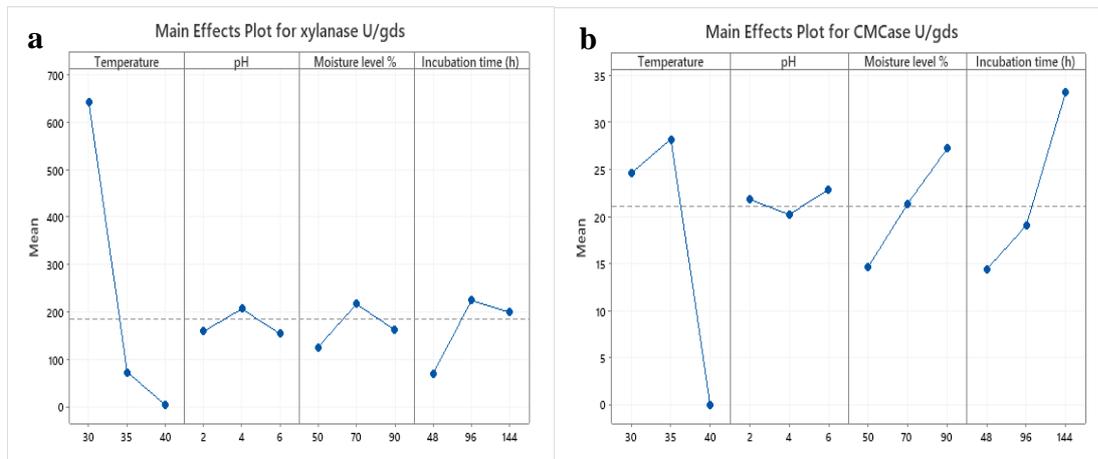


Figure 29 Effet de la température d'incubation, le pH, la teneur en humidité et le temps d'incubation sur la production de xylanase (a) et de CMCCase (b) représenté par le graphique des effets principaux.

3.5.2.1.4 Etudes des interactions

Le graphique des interactions A, B, C et D (figure 30), présente l'influence des facteurs étudiés sur l'activité xylanase. En effet, aucune interaction significative entre les facteurs étudiés n'a été marquée, sauf entre le facteur A et D ($p=0.028$). D'autre part, la figure 31 révèle une interaction significative entre les facteurs C et D ($p=0.016$) sur l'activité CMCCase. Cependant, aucune interaction significative n'est observée entre les autres facteurs.

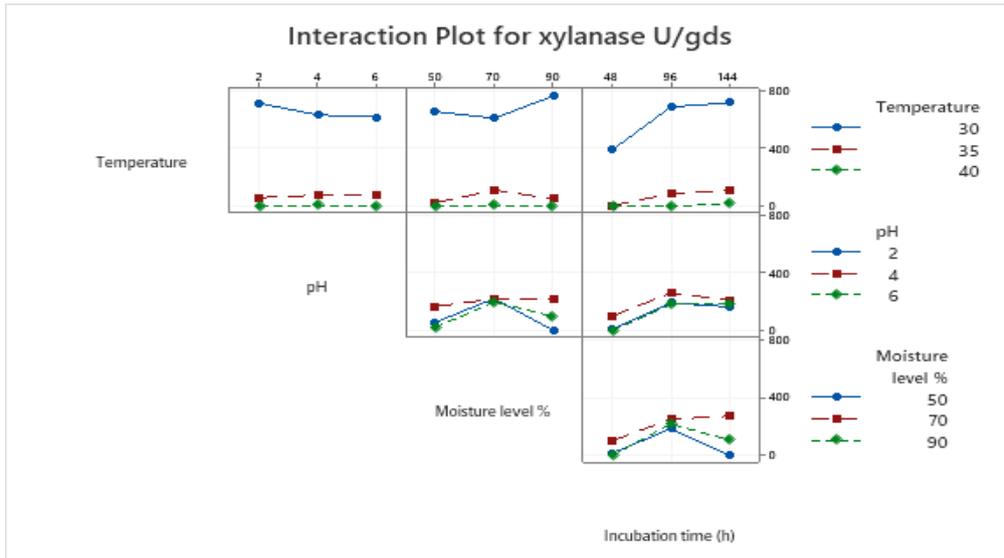


Figure 30 Graphiques des interactions des facteurs expérimentaux sur la production de xylanase par *Aspergillus fumigatus* sur l'Alfa.

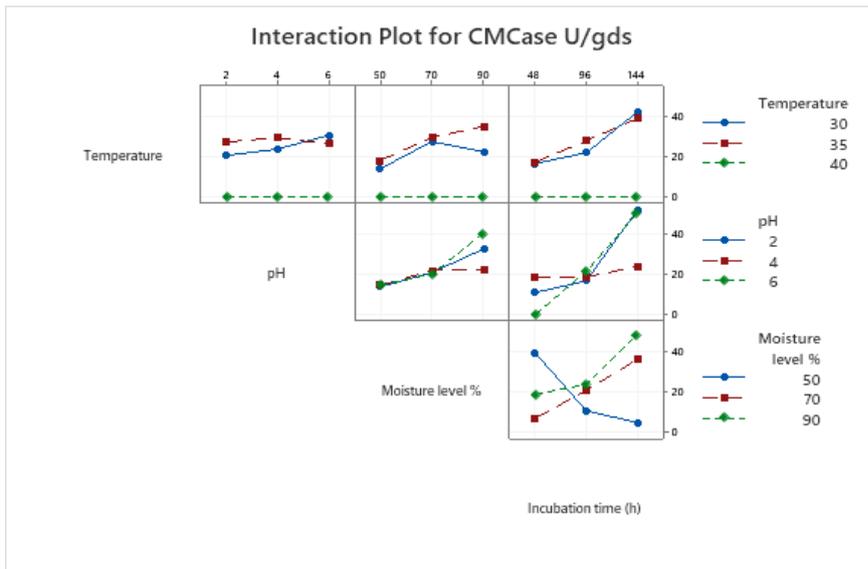


Figure 31 Graphiques des interactions des facteurs expérimentaux sur la production de CMCase par *Aspergillus fumigatus* sur l'Alfa.

L'effet de l'interaction entre les facteurs d'influences sélectionnés par le modèle a été aussi étudié avec le graphique de surface de réponse (contour plot). En effet, l'effet de l'interaction entre la température et le temps d'incubation sur la production de xylanase est présenté sur la figure 32; la diminution de la température (jusqu'à 30 °C) et l'augmentation du temps d'incubation (jusqu'à 70 h) ont entraîné une production maximale de xylanase supérieure à 600 U/gds. Cependant, en dessous de ces valeurs, une réduction progressive de la production de xylanase a été enregistrée.

RESULTATS

Par ailleurs, l'interaction entre la température par rapport au temps d'incubation et la température par rapport au niveau d'humidité sur l'activité de la CMCCase est illustrée sur la figure 34 a-b. Ces interactions n'ont pas été significativement influencées par la réponse. Cependant, l'effet du niveau d'humidité par rapport au temps d'incubation sur l'activité CMCCase, comme illustré sur la figure 34-c, était très significatif ; en effet, un temps d'incubation de 130 h et un niveau d'humidité supérieur à 85 % ont entraîné une production maximale de CMCCase supérieure à 60 U/gds. En dessous de ces valeurs, il y a eu une baisse progressive de la production de CMCCase.

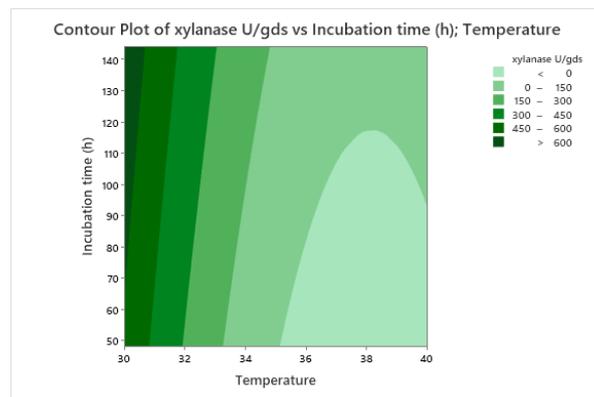


Figure 32 Iso-réponse (graphique de contour) de la production de xylanase par *Aspergillus fumigatus* en fonction de la température et du temps.

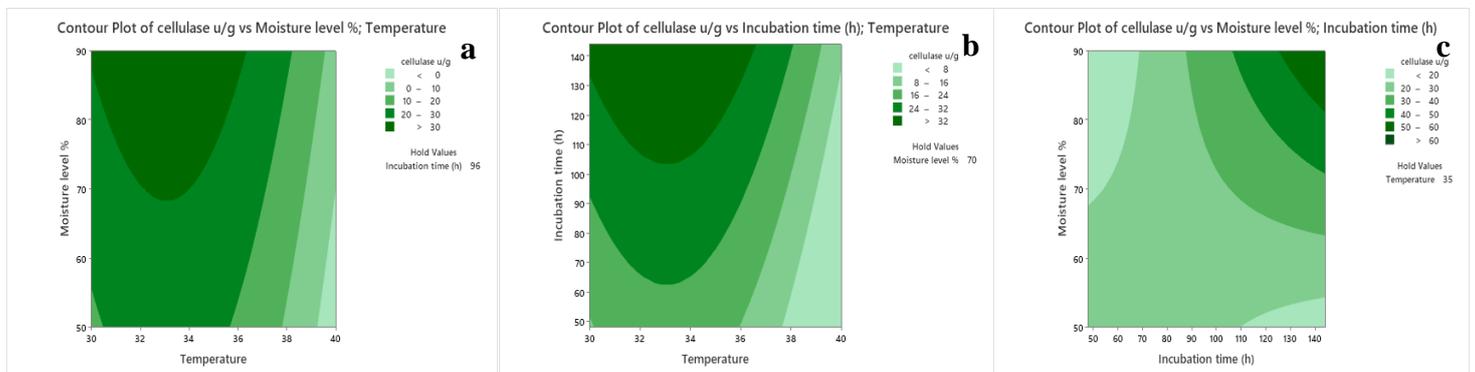


Figure 33 Iso-réponse (graphique de contour) de la production de CMCCase par *Aspergillus fumigatus* en fonction de la température par rapport au temps d'incubation (a), de l'humidité par rapport à la température (b) et le temps d'incubation par rapport au niveau d'humidité (c) sous fermentation à l'état solide sur l'Alfa.

Le graphique de régression orthogonale est un outil très pratique dans la construction, l'analyse et la critique d'un modèle. Cette analyse a été réalisée pour les deux réponses. La figure 34 montre une forte corrélation entre la production réelle et prédite de xylanase et de CMCCase; la distribution linéaire indique un modèle bien ajusté.

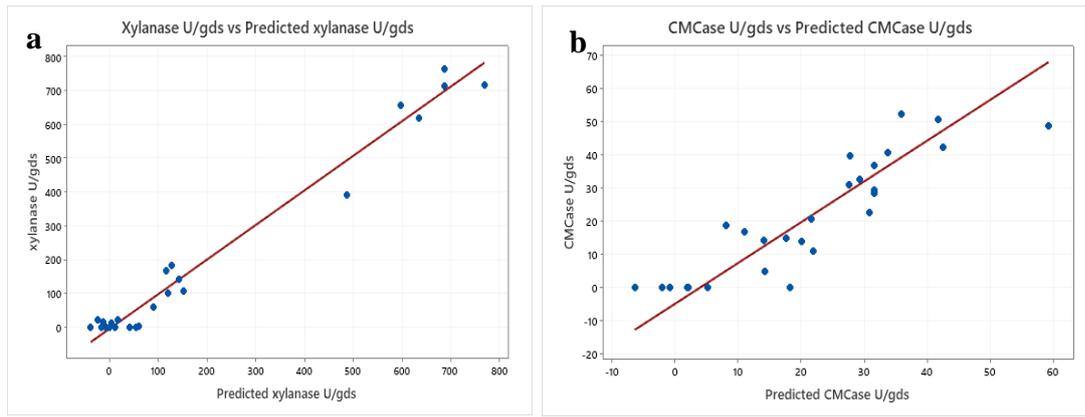


Figure 34 Analyse de régression orthogonale de : (a) la xylanase réelle par rapport à la xylanase prédite, (b) de la CMCase réelle par rapport à la CMCase prédite.

3.5.2.2 Procédure d'optimisation

Le diagramme d'optimisation, une analyse de l'optimiseur de réponse de Minitab, a été utilisé pour montrer comment les différents paramètres expérimentaux affectent les réponses. La figure 35 montre l'effet de chaque facteur sur les réponses séparément et les deux réponses ensemble. Les lignes rouges verticales sur les graphiques représentent les paramètres de facteurs actuels. Les nombres disposés en rouge en haut de la colonne représentent le point optimal. Les lignes bleues horizontales et les nombres représentent les réponses pour le niveau de facteur actuel.

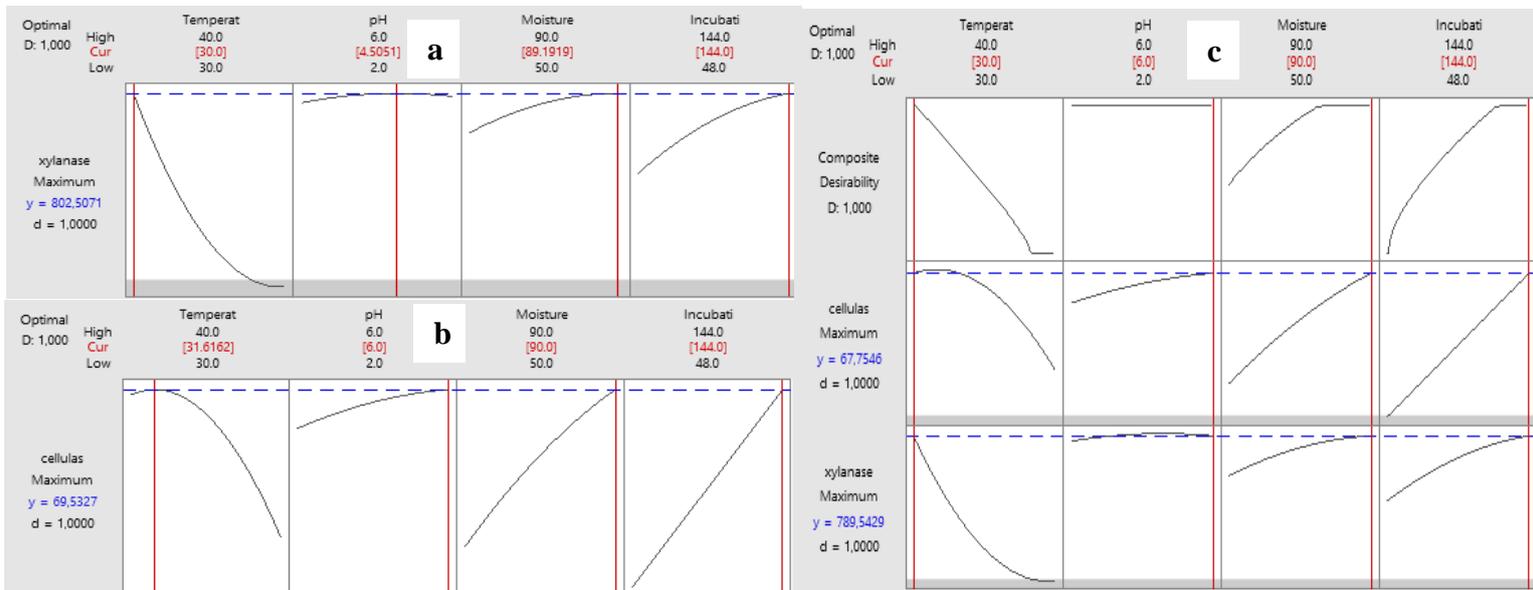


Figure 35 Diagramme d'optimisation pour la réponse xylanase (a), et la réponse CMCase (b) et les deux réponses simultanément (c).

RESULTATS

L'adéquation des modèles a été validée par la distinction entre les valeurs estimées (prédite) donnée par le modèle, et les valeurs expérimentales qui ont été réalisées dans les conditions optimales proposées par les trois modèles. Les niveaux de ces variables, les valeurs prédites et expérimentales de la production de xylanase et de CMCCase sous les conditions optimales sont présentées dans le tableau 12.

Tableau 12 Valeurs prédites et expérimentales de la production de xylanase et de CMCCase dans des conditions optimales.

Optimisation	Réponse	Objectif	Température	pH	Humidité (%)	Temps d'incubation (h)	Réponse prédite	Réponse expérimentale
Option 1	Xylanase	Maximum	30	4.5	89.19	144	802.50	841.78 ± 1.41
	CMCase	Ne pas optimiser	/	/	/	/	/	/
Option 2	Xylanase	Ne pas optimiser	/	/	/	/	/	/
	CMCase	Maximum	31.61	6	90	144	69.53	74.41 ± 1.05
Option 3	Xylanase	Maximum	30	6	90	144	789.54	829.81 ± 0.88
	CMCase	Maximum	30	6	90	144	67.75	66.10 ± 0.49

3.5.3 Cinétique de production d'hémicellulase et de cellulase dans les conditions optimales

Les profils de production de xylanase et de CMCCase par *A. fumigatus* en fonction du temps avant optimisation (35 °C, pH 4 et substrat humidifié à 70%) et dans les conditions optimisées (option 03 : 30 °C, pH 6 et substrat humidifié à 90%) (Tableau 12), pendant 192 h d'observation continue, ont été significativement différents, comme le montre la figure 36. La production de xylanase a été plus importante durant les premières 24 heures d'incubation (517,19 ± 0,10 U/gds) que celle observée après 48 heures avant l'optimisation (415,22 U/gds). La production a augmenté rapidement, atteignant une activité xylanase maximale de 857,07 ± 4,56 U/gds après 120 h d'incubation. D'autre part, la production optimale de CMCCase (61,17 ± 4,64 U/gds) a été atteinte après 144 h. Les activités maximales xylanase et CMCCase ont augmenté de 25% et 26%, respectivement, après l'optimisation par rapport à celles avant l'optimisation.

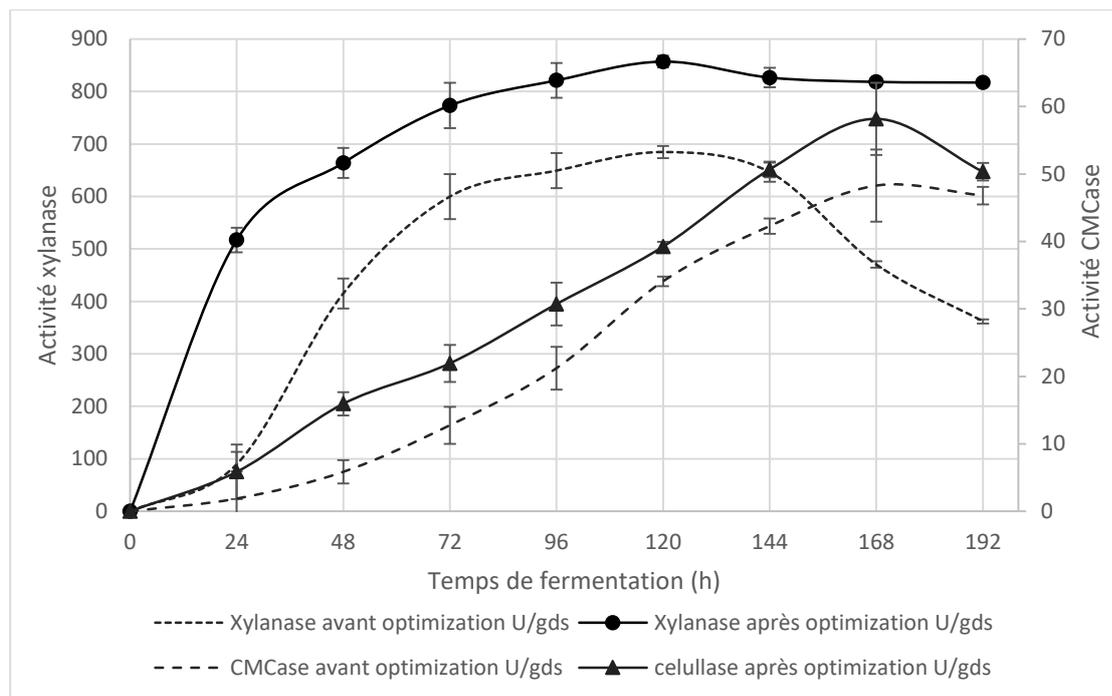


Figure 36 Evolution de la production de xylanase et de CMCase en fonction du temps par *Aspergillus fumigatus* dans les conditions initiales (35 °C, pH 4 et substrat Alfa humidifié à 70%) et dans les conditions optimisées pour la production des deux enzymes (30 °C, pH 6 et substrat Alfa humidifié à 90%).

3.6 Optimisation du milieu de culture pour la production de xylanase

3.6.1 Etude et sélection des composants du milieu sur la production de xylanase par Plackett-Burman

Le plan de Plackett-Burman (PBD) a été utilisé pour étudier l'effet des constituants du milieu de fermentation sur la production de xylanase par la souche *A. fumigatus* sous FSS. Le tableau 13 suggère que les niveaux de confiance de l'extrait de malt, du $MgSO_4$, du $NaNO_3$ et du $(NH_4)_2SO_4$ sont respectivement de 97 %, 99 %, 95 % et 98 %, ce qui est considéré comme un effet significatif sur la production de xylanase. Les autres variables indépendantes dont le niveau de confiance était inférieur à 95 % ont été jugées non significatives. Le diagramme de Pareto (figure 37) résume les facteurs les plus significatifs qui influencent la production de xylanase.

Tableau 13 Analyse de la variance (ANOVA) pour la régression du modèle PBD.

Composants du milieu	Valeur T	Valeur P	Niveau de confiance (%)
Peptone	-1.56	0.145	86
Extrait de malt	2.41	0.033	97
Extrait de levure	-0.45	0.658	34
$MgSO_4$	5.49	0.000	99

RESULTATS

NaNO ₃	2.17	0.051	95
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.7	0.019	98
KH ₂ PO ₄	0.2	0.848	15
K ₂ HPO ₄	0.57	0.582	42
Urea	0.27	0.789	21
Xylose	0.21	0.84	16
Starch	1.49	0.161	85

Model	R ²	Adj
	81.62 %	64.76%

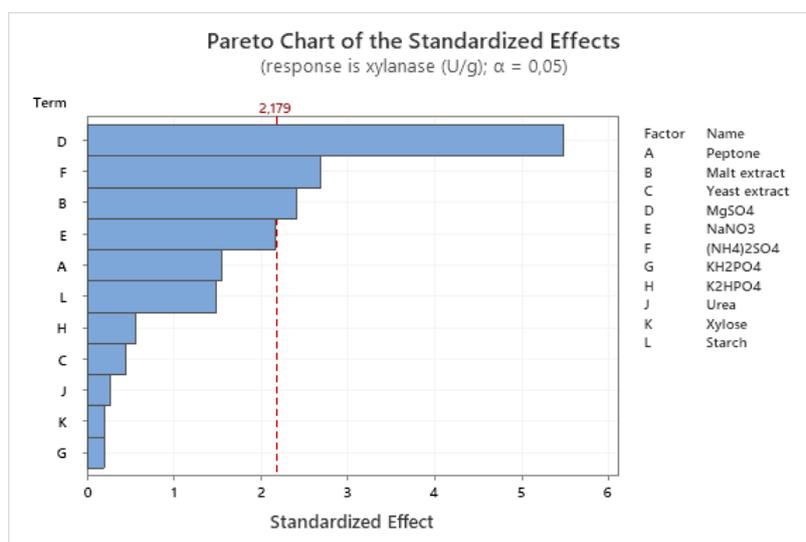


Figure 37 Graphiques de Pareto pour la production de xylanase par *A. fumigatus*. Les barres qui dépassent la ligne verticale représentent des effets statistiquement significatifs à un niveau de confiance de 95 %.

La production maximale de xylanase a été de 1443.70 ± 50 U/gds dans l'essai numéro 5 et la production minimale de 400.60 ± 7.77 a été enregistrée dans l'essai numéro 24 (figure 38).

L'équation du modèle ajusté pour l'activité de la xylanase est la suivante :

$$\begin{aligned} \text{xylanase (U/gds)} = & 831,9 - 47,9 \text{ Peptone} + 74,3 \text{ extrait de malt} - 14,0 \text{ extrait de levure} \\ & + 168,8 \text{ extrait de boeuf} + 66,8 \text{ NaNO}_3 + 82,9 \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 + 6,0 \text{ KH}_2\text{PO}_4 \\ & + 17,4 \text{ K}_2\text{HPO}_4 + 8,4 \text{ Urée} + 6,4 \text{ Xylose} + 45,9 \text{ amidon} \end{aligned}$$

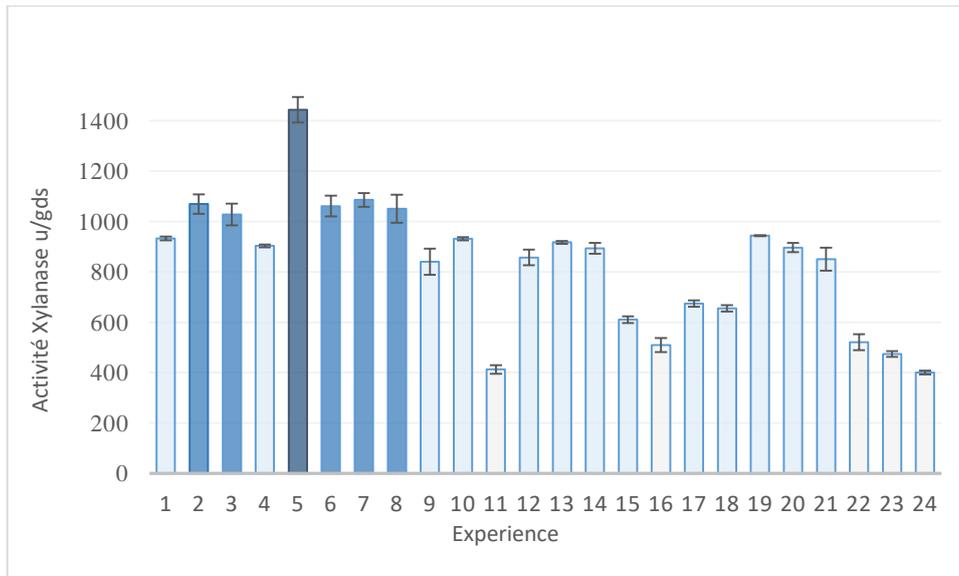


Figure 38 Production de xylanase liée aux essais PBD (U/gds).

3.6.2 Optimisation des sources de nutriments sélectionnées pour la production de xylanase par Central Composite Design

Après le criblage avec PB, le plan Central Composite a été réalisé pour vérifier la concentration optimale des facteurs critiques et leur interaction mutuelle. Dans ce processus et sur la base des résultats du plan PB, l'extrait de malt, $MgSO_4$, $NaNO_3$ et $(NH_4)_2SO_4$ ont été sélectionnés pour une optimisation plus poussée en utilisant le plan CC avec 31 expérimentations.

Le test F et les valeurs *P* ont été utilisés afin d'identifier l'effet de chaque composant sur la production de xylanase (ANOVA) (tableau 15). Cette dernière a démontré que le modèle est significatif au niveau de 5 % ($F_{\text{modèle}} 19.98 > F_{\text{critique}} 2.62$ (du tableau de Fisher)).

Le tableau 14 et la figure 39, indiquent un accord étroit entre les valeurs observées et prédites de la production de xylanase, démontrant la précision du RSM dans l'optimisation des paramètres pour une production optimale d'enzymes. La réponse de la conception CCD a été ajustée dans une équation polynomiale du second ordre comme indiqué ci-dessous :

$$\begin{aligned}
 \text{Xylanase} &= 751 + 535 \text{ MgSO}_4 - 571 \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 + 508 \text{ extrait de malt} - 225 \text{ NaNO}_3 \\
 \text{U/gds} &- 360,8 \text{ MgSO}_4 * \text{MgSO}_4 + 52,2 \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 * \text{(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 - 94,9 \text{ extrait de} \\
 &\text{malt} * \text{extrait de malt} + 57,4 \text{ NaNO}_3 * \text{NaNO}_3 + 321,0 \text{ MgSO}_4 * \text{(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 \\
 &+ 214,6 \text{ MgSO}_4 * \text{extrait de malt} - 456,9 \text{ MgSO}_4 * \text{NaNO}_3 \\
 &- 126,6 \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 * \text{extrait de malt} + 222,3 \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 * \text{NaNO}_3 + 66,2 \text{ extrait de} \\
 &\text{malt} * \text{NaNO}_3
 \end{aligned}$$

Comme le montre le tableau 14, une variation considérable de la production de xylanase en fonction des niveaux des quatre variables a été constatée. La production maximale de xylanase

RESULTATS

1556.55 ± 28.41 U/gds a été enregistrée dans l'essai numéro 18 et la minimale 1026.80 ± 11.87 U/gds dans l'essai numéro 22.

Tableau 14 La conception Central-Composite montrant la production expérimentale et prédite de xylanase par *Aspergillus fumigatus* sous FSS.

Run	Variables				Xylanase U/gds	
	MgSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	Malt extract	NaNO ₃	Experimental Values	Predicted Values
1	1.7	1.5	2.75	2.5	1049.46	999.72
2	1.4	2	2	2	1142.79	1142.41
3	1.7	2.5	2.75	1.5	1375.46	1424.34
4	1.4	2	3.5	2	1382.85	1390.58
5	1.7	2.5	4.25	2.5	1506.92	1476.06
6	1.4	2	3.5	2	1386.95	1390.58
7	1.7	1.5	4.25	2.5	1247.98	1275.58
8	1.4	2	3.5	2	1406.95	1390.58
9	1.1	2.5	4.25	2.5	1441.11	1418.12
10	1.4	2	3.5	2	1403.35	1390.58
11	1.1	1.5	2.75	2.5	1356.95	1327.49
12	1.7	2.5	2.75	2.5	1406.58	1390.18
13	1.4	2	5	2	1189.72	1211.76
14	1.1	1.5	4.25	1.5	1300.85	1293.25
15	1.7	2.5	4.25	1.5	1405.51	1410.97
16	1.4	2	3.5	1	1435.72	1406.61
17	1.1	2.5	2.75	2.5	1480.13	1525.36
18	1.4	3	3.5	2	1556.55	1530.82
19	0.8	2	3.5	2	1255.54	1258.54
20	1.1	1.5	4.25	2.5	1456.75	1410.21
21	1.7	1.5	4.25	1.5	1475.64	1432.75
22	1.1	2.5	4.25	1.5	1026.81	1078.89
23	1.1	1.5	2.75	1.5	1276.58	1309.78
24	1.1	2.5	2.75	1.5	1336.99	1285.40
25	1.4	1	3.5	2	1307.32	1354.72
26	1.4	2	3.5	3	1438.65	1489.41
27	1.4	2	3.5	2	1425.47	1390.58

RESULTATS

28	1.4	2	3.5	2	1371.52	1390.58
29	1.7	1.5	2.75	1.5	1257.15	1256.15
30	1.4	2	3.5	2	1356.95	1390.58
31	2	2	3.5	2	1244.21	1262.86

Tableau 15 Analyse de la variance pour la production de xylanase par la conception Central-Composite (* degré de liberté).

Source	DF *	Sum of squares	Mean of squares	F-Value	P-Value
Model	14	437049	31217.8	15.98	0.000
Linear	4	64043	16010.9	8.20	0.001
MgSO4	1	28	27.9	0.01	0.906
(NH4)2SO4	1	46517	46516.8	23.82	0.000
Malt extract	1	7215	7214.9	3.69	0.073
NaNO3	1	10284	10283.8	5.27	0.036
Square	4	128128	32032.0	16.40	0.000
MgSO4*MgSO4	1	30147	30147.5	15.43	0.001
(NH4)2SO4*(NH4)2SO4	1	4868	4868.0	2.49	0.134
Malt extract*Malt extract	1	81461	81461.5	41.71	0.000
NaNO3*NaNO3	1	5896	5895.6	3.02	0.102
2-Way Interaction	6	244877	40812.8	20.89	0.000
MgSO4*(NH4)2SO4	1	37088	37087.8	18.99	0.000
MgSO4*Malt extract	1	37300	37299.7	19.10	0.000
MgSO4*NaNO3	1	75147	75147.3	38.47	0.000
(NH4)2SO4*Malt extract	1	36090	36090.3	18.48	0.001
(NH4)2SO4*NaNO3	1	49400	49400.4	25.29	0.000
Malt extract*NaNO3	1	9852	9851.7	5.04	0.039
Error	16	31252	1953.2		
Lack-of-Fit	10	28037	2803.7	5.23	0.028
Pure Error	6	3215	535.8		
Total	30	468301			

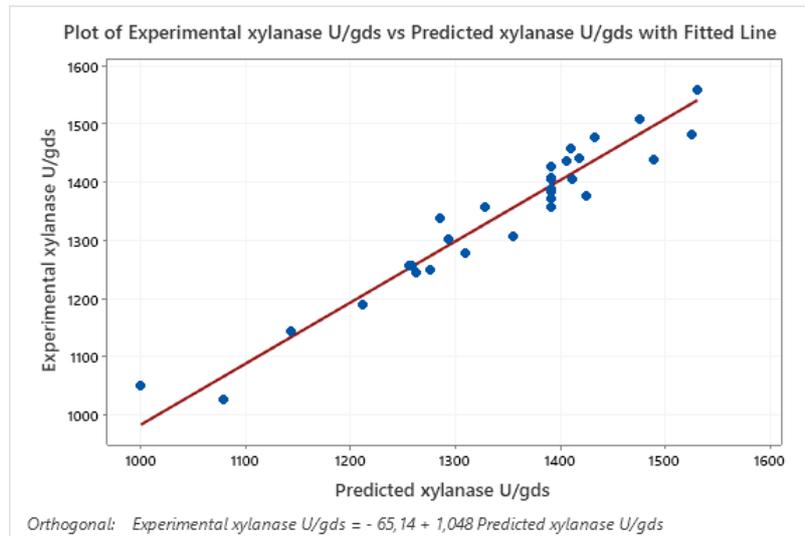


Figure 39 Corrélation entre les valeurs expérimentales et prédites de l'activité xylanase (U/gds)

La figure 40 montre les effets principaux des quatre facteurs sur la production de xylanase. Les résultats du diagramme des effets principaux montrent qu'une concentration plus élevée de $(NH_4)_2SO_4$ avait un effet positif sur la production de xylanase. Des concentrations de 1.4 g/L de $MgSO_4$ et 3.5 g/L d'extrait de malt ont été associées au point le plus élevé de production de xylanase dans le graphique. En revanche, des concentrations entre 1.5 g/L et 2.5 g/L de $NaNO_3$ ont été associées aux points faibles de la production de cet enzyme.

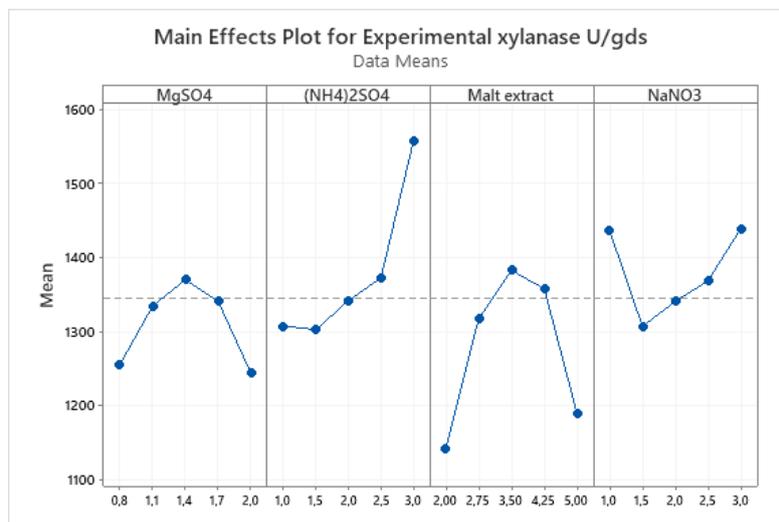


Figure 40 Effet de $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, extrait de malt et $NaNO_3$ sur l'activité enzymatique moyenne de la xylanase

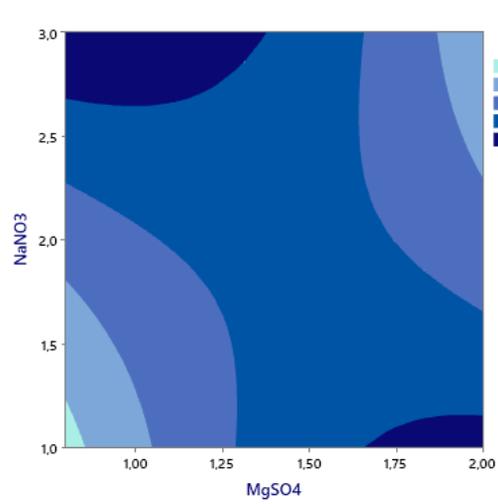
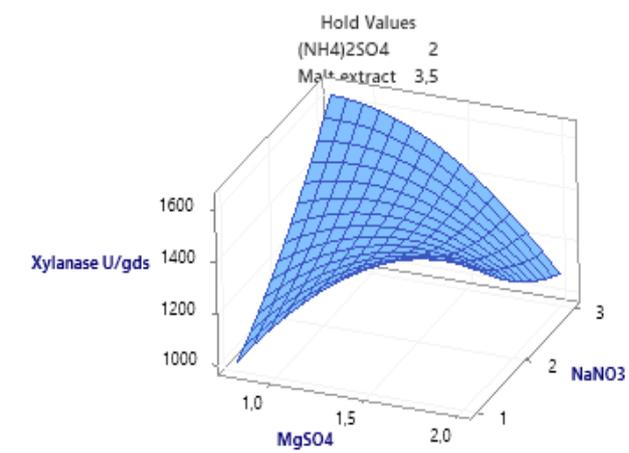
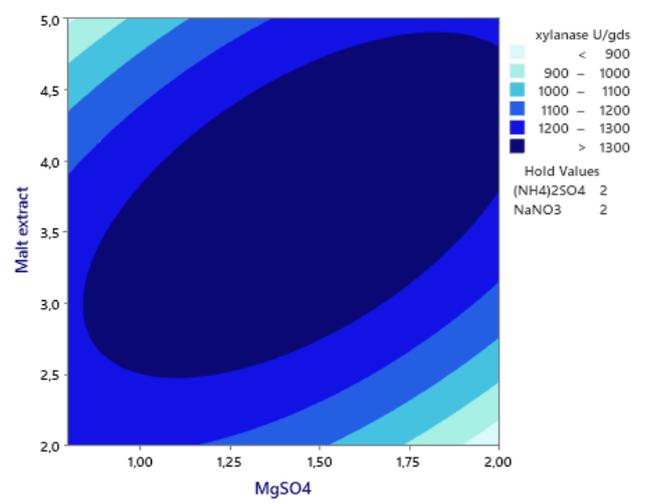
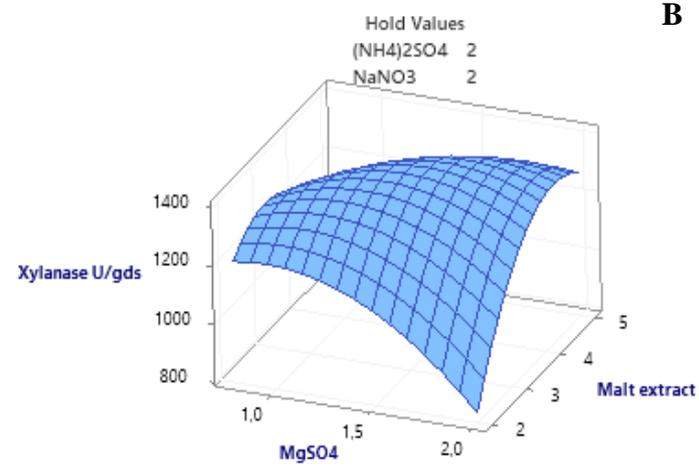
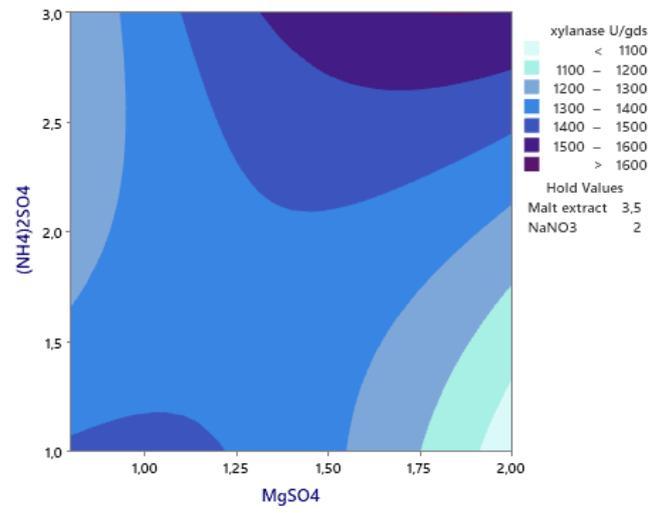
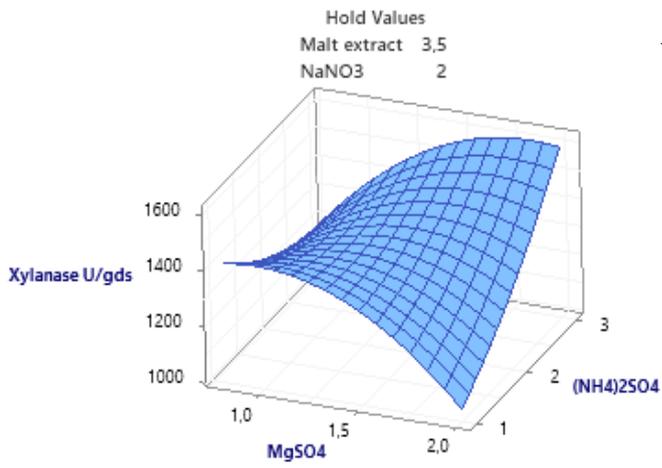
3.6.2.1 Analyse de la surface de réponse et interaction des variables

La relation entre les facteurs et les réponses peut être expliquée en étudiant les tracés de surface et les tracés de contour. Ces analyses sont utilisées pour observer la relation entre les valeurs

de réponse ajustées et les deux variables continues, basées sur des équations modèles. Un tracé de surface et un tracé de contour (figure 41), présentent respectivement une vue en trois et deux dimensions. La forme circulaire de la courbe dans un graphique de surface en 3D dénote l'absence d'interaction, tandis que la forme elliptique dénote une bonne variation de deux variables. Dans le graphique de contour 2D, les points qui ont la même réponse sont reliés pour former des lignes de contour avec des réponses constantes. Ces graphiques ont été utilisés pour déterminer le niveau optimal de la réponse. L'interaction entre les variables indépendantes telles que la concentration de MgSO_4 et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 et extrait de malt, MgSO_4 et NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et extrait de malt, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et NaNO_3 , extrait de malt et NaNO_3 a montré un effet significatif sur l'activité xylanase par *Aspergillus fumigatus* (figure 41 A-E).

À partir du tracé de la surface de réponse (figure 41), l'augmentation de la concentration de MgSO_4 à 2 g/L et de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 3 g/L, respectivement, a entraîné une production de xylanase supérieure à 1600 U/gds. D'autre part, lorsque les concentrations de MgSO_4 et d'extrait de malt étaient comprises entre 0.3 à 2 g/L, et de 2.5 à 4.8 g/L, respectivement, l'activité xylanase était supérieure à 1300 U/gds (figure 41 B). La figure 41 C montre les effets de MgSO_4 et NaNO_3 sur la production de xylanase. En effet, lorsque les concentrations de MgSO_4 et de NaNO_3 étaient respectivement comprises entre 0 et > 1.5 g/L, et > 2.5 g/L, l'activité xylanase était supérieure à 1500 U/gds. La figure 41 D montre l'effet de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de l'extrait de malt sur la production de xylanase. L'activité de la xylanase dépassait 1500 U/gds lorsque les concentrations de ces composants étaient respectivement de 2.5 à 3 g/L et de 2 à 3.5 g/L. La figure 41 E montre l'effet de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de NaNO_3 sur la production de xylanase ; des concentrations élevés des deux composants dans le milieu ont assuré une production de xylanase au-dessus de 1300 U/gds. En dessous de ces niveaux, cependant, la production de xylanase a progressivement diminué. Enfin, l'effet de l'extrait de malt et le NaNO_3 sur la production de xylanase est illustré dans la figure 41 F. L'activité de la xylanase dépassait 1400 U/gds lorsque les concentrations de ces composants variaient de 3 à 5 g/L et > 2 à 3 g/L, respectivement.

RESULTATS



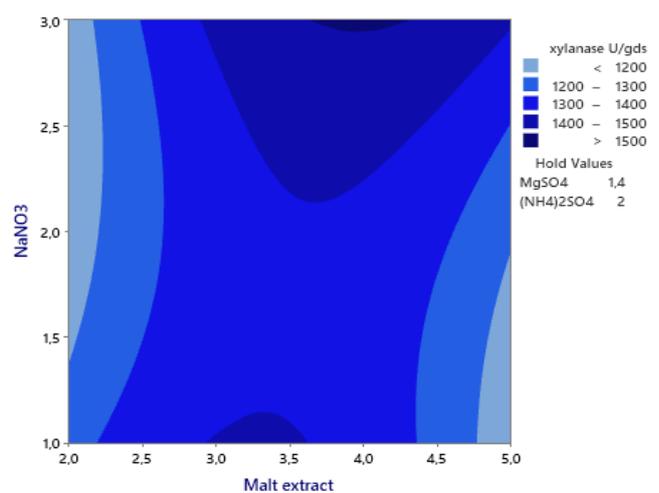
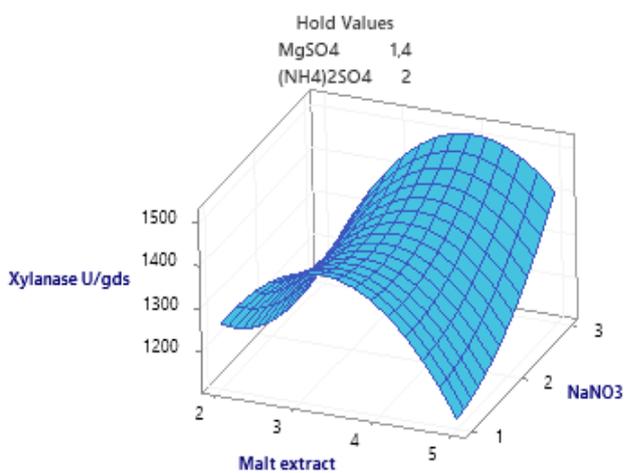
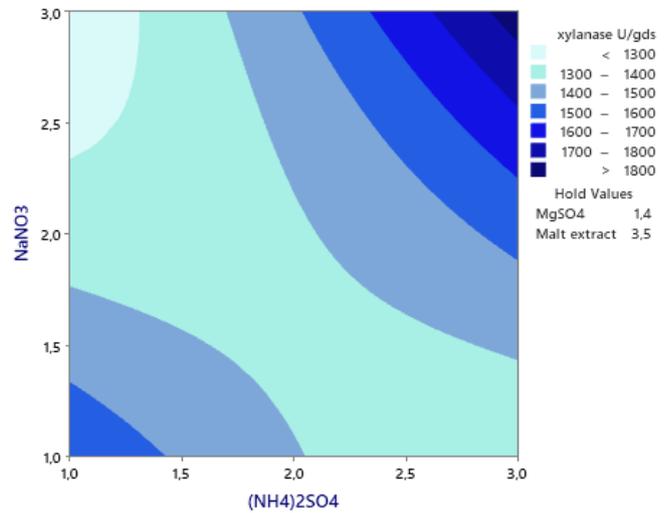
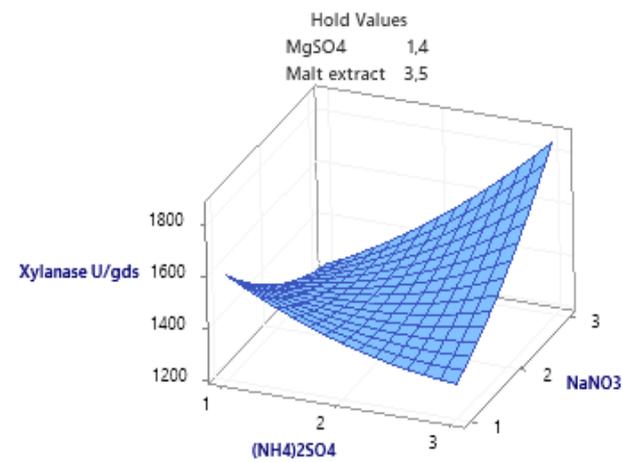
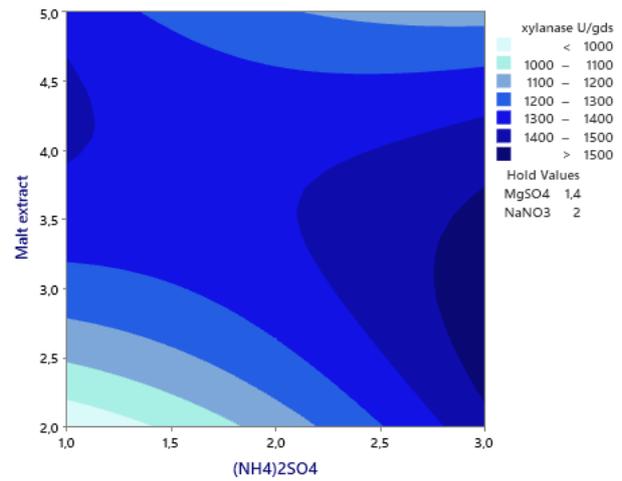
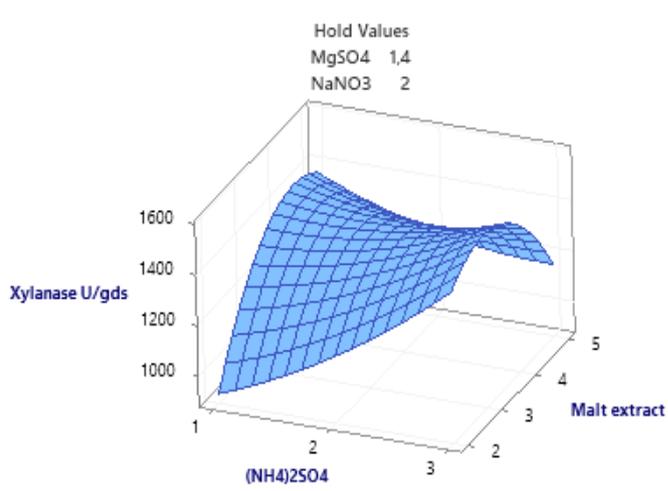


Figure 41 Graphiques de la surface de réponse et des effets combinés de : (A) MgSO₄ et (NH₄)₂SO₄, (B) MgSO₄ et extrait de malt, (C) MgSO₄ et NaNO₃, (D) (NH₄)₂SO₄ et extrait de malt (E) (NH₄)₂SO₄ et NaNO₃, (F) extrait de malt et NaNO₃ sur la production de xylanase par *Aspergillus fumigatus*.

3.6.2.2 Optimisation

La différence entre les valeurs estimées fournies par le modèle et les valeurs expérimentales obtenues dans les conditions optimales confirme l'adéquation du modèle. Le tableau 16 montre la gamme des niveaux de ces variables en fonction de la production optimale de xylanase enregistrée dans ce modèle.

Tableau 16 Valeurs prédites et expérimentales de la production de xylanase dans les conditions optimales du CCD.

Réponse	MgSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	Extrait de malt	NaNO ₃	Réponse prédite	Réponse expérimentale
Xylanase	1.030	3	2.878	3	1887.40	1659.41

3.7 Saccharification enzymatique de substrats lignocellulosique

Au cours de l'hydrolyse du xylane beechwood, le complexe enzymatique produit par *A. fumigatus* a présenté une activité enzymatique plus élevée que la xylanase et l'hémicellulase commerciales (environ 22.74 % et 40.15 % plus élevées que celles de l'hémicellulase et de la xylanase respectivement) (figure 42). Pour les essais de saccharification suivants, l'hémicellulase commerciale a été utilisée.

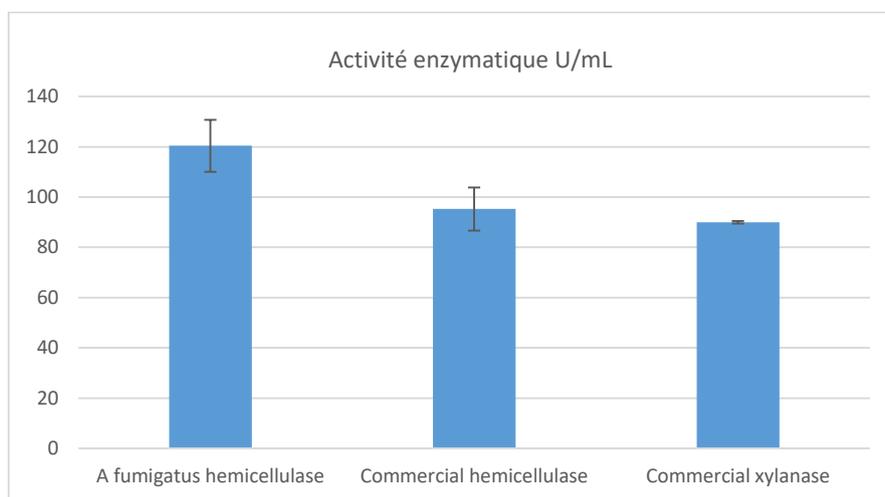


Figure 42 Comparaison de l'activité enzymatique de l'enzyme brute d'*A. fumigatus*, de l'hémicellulase et de la xylanase commerciales.

La saccharification des substrats lignocellulosique non traités : Alfa, son de blé, paille de blé et paille d'avoine en utilisant les enzymes produits par *A. fumigatus* a été procédée à 60 °C. La quantité maximale de sucres réducteurs libérés avec un taux de saccharification de 35,82 % a

RESULTATS

été observée avec le son de blé, suivi de la paille d'avoine (25.91 %), de l'Alfa (21.29 %) et de la paille de blé (2.29 %) après 24 h d'incubation. La libération de sucres réducteurs par *A. fumigatus* a augmenté avec le temps d'incubation, tandis que l'activité de l'hémicellulase commerciale était plus élevée après seulement 4 h d'incubation, avec des taux de saccharification de 22.59 %, 15.22 %, 13.18 % et 10.11 %, enregistrés avec de la paille d'avoine, le son de blé, la paille de blé et l'Alfa respectivement (figure 43 A-D).

Ces résultats démontrent clairement que les enzymes hydrolytiques d'*A. fumigatus* ont le potentiel de saccharifier toutes les biomasses lignocellulosique testées.

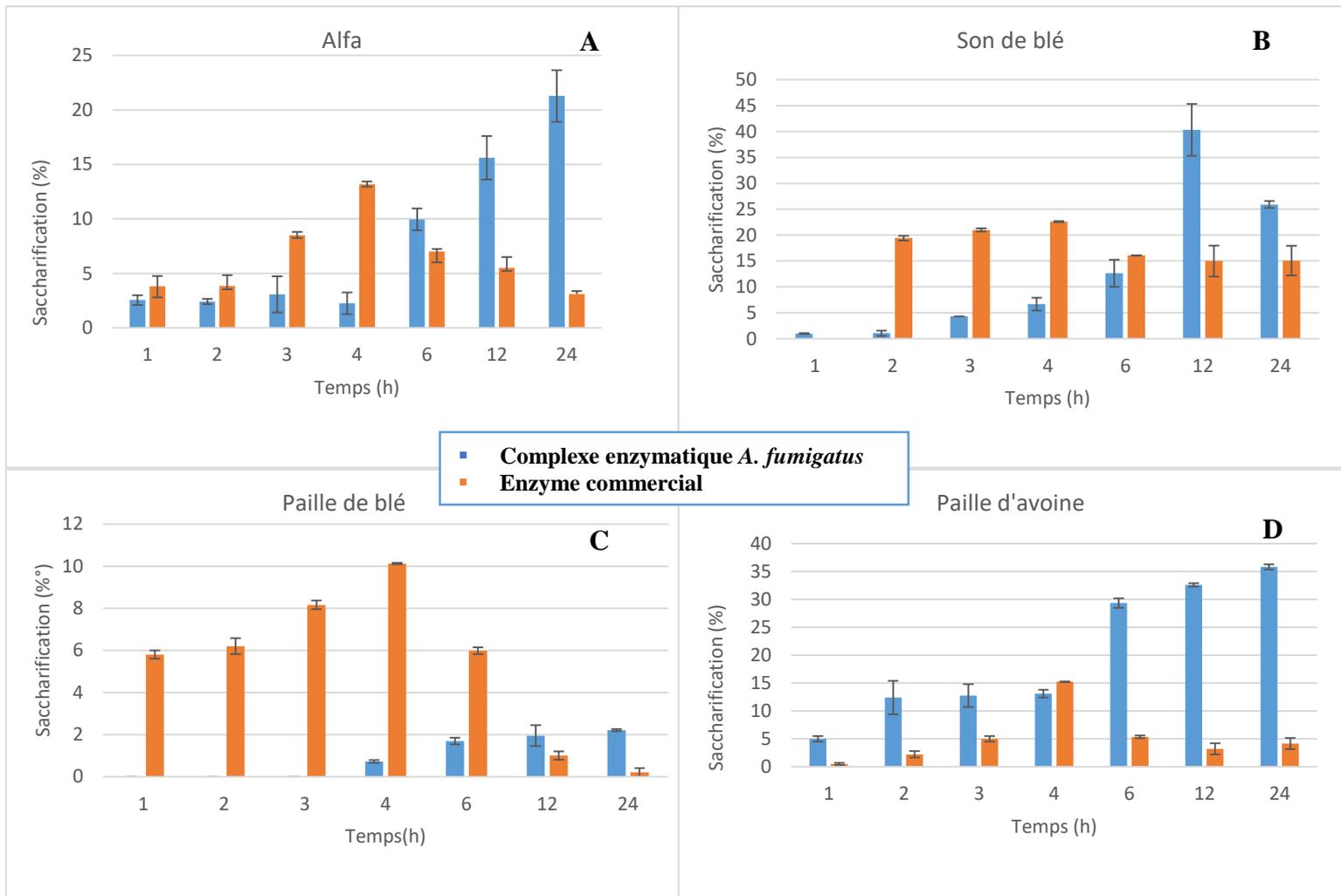


Figure 43 Processus de saccharification sur les substrats non traités Alfa (A), paille d'avoine (B), paille de blé (C) et son de blé (D) par le complexe enzymatique d'*A. fumigatus* et l'enzyme commerciale.

3.8 Optimisation de l'activité xylanolytique

Le facteur influençant l'hydrolyse de la xylanase a été exploré à l'aide de la matrice BBD. Les résultats correspondants sont présentés dans le tableau 17.

RESULTATS

Tableau 17 Les variables de la conception BBD et les réponses correspondantes pour l'activité xylanase.

Essais	pH	Température	Concentration de substrat	Xylanase U/ mL
1	7	60	1.5	89.230
2	10	50	0.5	0.800
3	10	40	1	5.824
4	4	40	1	66.949
5	7	50	1	74.640
6	7	60	0.5	36.630
7	4	60	1	97.170
8	7	40	1.5	95.740
9	7	40	0.5	44.810
10	4	50	1.5	65.870
11	4	50	0.5	44.270
12	7	50	1	75.330
13	10	50	1.5	6.847
14	7	50	1	76.800
15	10	60	1	9.310

L'analyse de la variance ANOVA (tableau 18), a démontré que le modèle est hautement significatif avec une valeur de probabilité très faible (0.026). L'efficacité du modèle est prouvée avec la valeur du coefficient de détermination R^2 de 0.92, qui indique que 92.16 % de la variation totale pourrait être expliquée par ce modèle.

Tableau 18 Analyse de variance pour l'activité xylanase (* Freedom Degree (degré de liberté)).

Source	DF*	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	15097.7	1677.52	6.53	0.026
Linear	3	10101.3	3367.09	13.10	0.008
pH	1	7905.1	7905.10	30.76	0.003
Temperature	1	45.2	45.20	0.18	0.692
substrate concentration	1	2151.0	2150.95	8.37	0.034
Square	3	4756.6	1585.53	6.17	0.039
pH*pH	1	4259.8	4259.79	16.57	0.010
Temperature*Temperature	1	37.6	37.56	0.15	0.718
substrate concentration*substrate concentration	1	547.5	547.49	2.13	0.204
2-Way Interaction	3	239.9	79.95	0.31	0.817
pH*Temperature	1	178.7	178.69	0.70	0.442
pH*substrate concentration	1	60.5	60.47	0.24	0.648
Temperature*substrate concentration	1	0.7	0.70	0.00	0.960
Error	5	1285.2	257.03		
Lack-of-Fit	3	1282.7	427.58	351.31	0.003
Pure Error	2	2.4	1.22		

Total

14 16382.9

L'équation du modèle de régression en unités codées peut être représentée comme suit :

Activité xylanase

$$= -142 + 56.1 A - 1.48 B + 144 C - 3.774 A^2 + 0.0319 B^2 - 48.7 C^2 - 0.223 AB - 2.59 AC - 0.08 BC$$

Les valeurs de *P* inférieures à 0.05 (tableau 18) désignent que les termes du modèle sont significatifs et dans ce cas, A, C, AA et AC sont les facteurs d'influence sur l'activité xylanase.

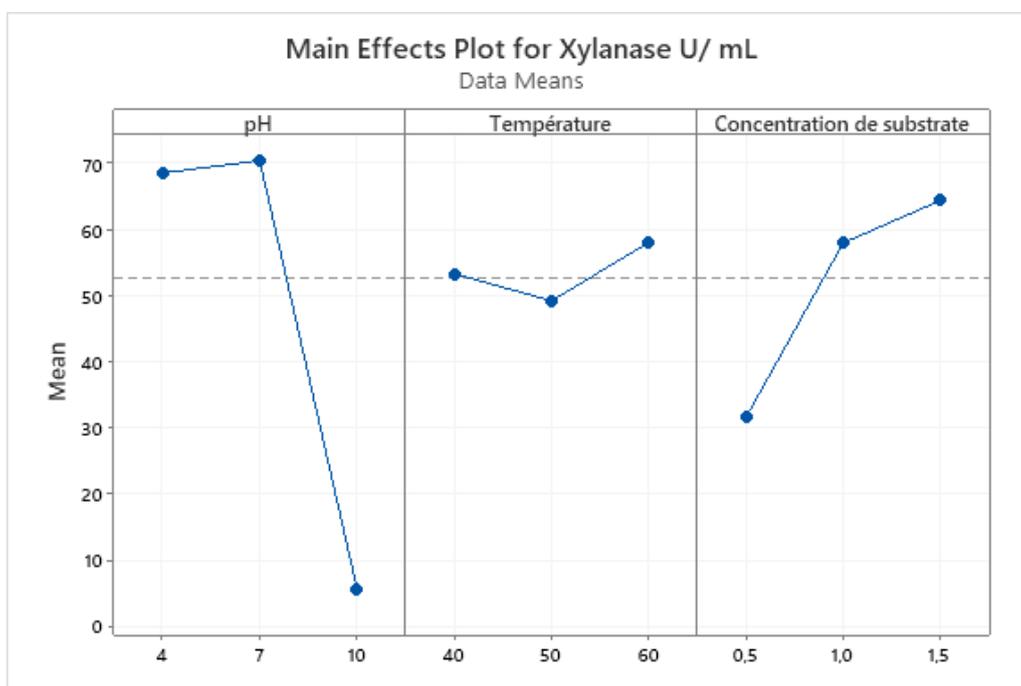


Figure 44 Effet du pH, de la température et de la concentration du substrat sur l'hydrolyse de la xylanase représenté par le graphique des effets principaux.

La figure 44 révèle l'influence des facteurs sur l'activité de la xylanase ; un pH entre 7 et 10 a une influence négative sur l'hydrolyse de la xylanase. Contrairement à la concentration en substrat, qui a une influence positive sur l'activité ; les valeurs les plus élevées ont été obtenues avec des concentrations > 1 g/L. En effet, un pH de 7, une température de 60 et une concentration de xylane de 1.5 sont liés au point d'activité de xylanase le plus élevé.

L'adéquation du modèle proposé pour l'optimisation de l'hydrolyse de xylanase est validée par la distinction entre les valeurs estimées ; donnée par le modèle ; et les valeurs expérimentales qui ont été réalisées dans des conditions optimales (tableau 19).

RESULTATS

Tableau 19 Valeur prédite et expérimentale de l'activité xylanase dans les conditions optimales.

Objectif	pH	Température	Concentration de substrat	Activité xylanase prédite	Activité xylanase expérimentale
Hydrolyse maximale	5.15	60	1.39	99.323	97.740 ± 3.86

3.9 Thermo-stabilité des conidies d'*Aspergillus fumigatus* et l'enzyme xylanase

3.9.1 Thermo-stabilité de l'enzyme xylanase

La stabilité de l'enzyme xylanase produite par la souche *A. fumigatus* vis à vis de la dénaturation thermique a été évaluée en incubant cette enzyme à différentes températures. L'enzyme s'est démontrée stable dans une large gamme de températures allant de 40 °C à 70 °C avec une activité maximale à 60 °C (767.44 ± 20.42) (figure 46). L'activité enzymatique était significativement inhibée au-dessus de 80 °C.

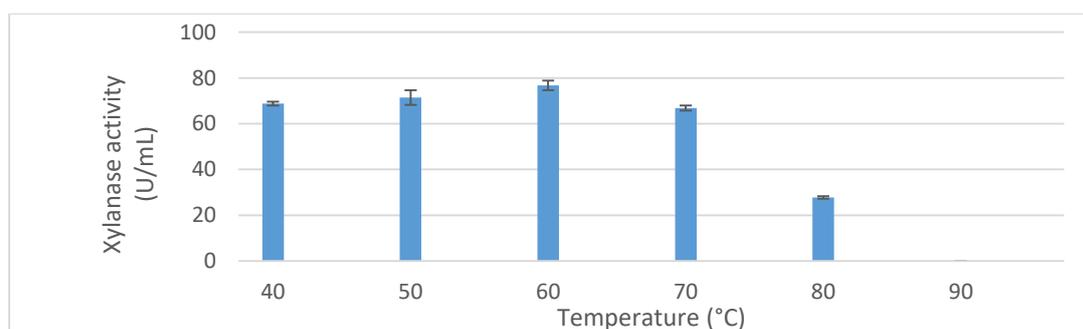


Figure 45 Effet de la température sur l'activité xylanase d'*Aspergillus fumigatus*.

3.9.2 Thermorésistante des conidies

La résistance à la chaleur des conidies d'*A. fumigatus* a été testée en étudiant la cinétique d'inactivation à trois niveaux de température différents. La cinétique d'inactivation à 60, 65 et 70 °C était log-linéaire (figure 45). Les valeurs D_{60} , D_{65} et D_{70} ont été calculées à partir de la courbe d'inactivation (tableau 20). Les conidies d'*A. fumigatus* étaient très résistantes à la chaleur à 60 et 65 °C, avec des valeurs D_{60} et D_{65} de 20.16 min et 15.26 min, respectivement. En effet, après 60 min de chauffage, plus de 60 % et 38 % des conidies ont survécu au traitement thermique à 60 °C et 65 °C, respectivement. En revanche, les conidies étaient plus sensibles à 70 °C, avec une valeur D_{70} de 8.98 min.

Tableau 20 Thermorésistance des conidies d'*Aspergillus fumigatus* exprimée par réduction décimale (D_t) à différentes températures (T).

T (°C)	Valeur D_t (min)	R^2
--------	--------------------	-------

60	20.161 ± 0.74	0.98
65	15.267 ± 1.67	0.94
70	8.896 ± 1.78	0.83

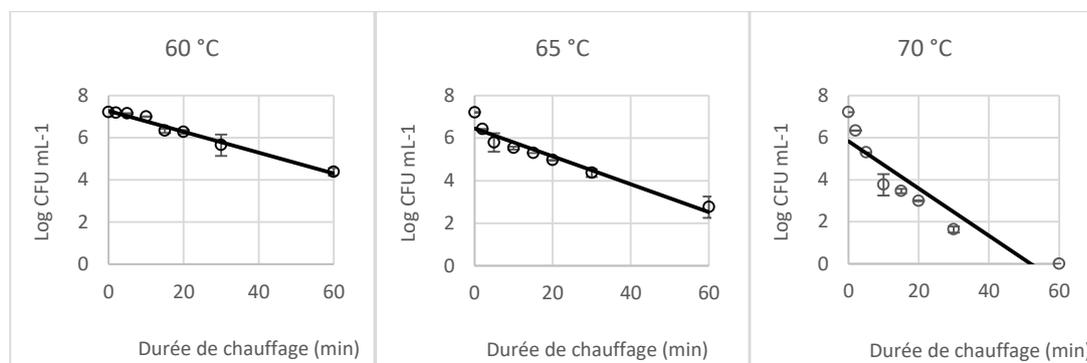


Figure 46 La survie des conidies d'*Aspergillus fumigatus* LOG₁₀ N de conidies VS la durée d'inactivation (minute) à différentes températures (60 °C, 65 °C et 70 °C).

3.10 Analyse coût-efficacité de la production de xylanase

Le coût de la production de xylanase en utilisant un substrat naturel en l'occurrence, l'Alfa, par rapport au xylane synthétique commercial a été comparé dans cette étude (tableau 21). Le milieu optimisé a produit significativement plus de xylanase que le milieu contenant du xylane commercial. En effet, le milieu optimisé à base d'Alfa est moins cher et supporte une production plus élevée de xylanase (165.94 U/mL) que le xylane pur (92.59 U/mL). La production annuelle de xylanase était plus élevée avec Alfa (près de 10 094 752 U/L) qu'avec le xylane commercial (8 449 697 U/L).

Tableau 21 Comparaison coût-efficacité du milieu optimisé Alfa par rapport au milieu commercial à base de xylane.

Composition	Quantité (g/L)	Coût unitaire (\$/kg)	Coût total (\$/kg)	
			Milieu commercial à base de xylane	Milieu à base d'Alfa
MgSO ₄	10.300	419.450	40.723	40.723
(NH ₄) ₂ SO ₄	30.000	226.350	7.545	7.545
Extrait de malt	28.000	248.880	8.889	8.889
NaNO ₃	30.000	151.260	5.042	5.042
Alfa	100.000	0.010	0.000	0.000
Xylane de beechwood	100.000	4 100.000	41.000	/
Eaux	900-871.7	0.001	0.000	0.000
Coût totale			103.199	62.199
Activité enzymatique U/L			92 599.417	165 941.124
Production optimal (N° de jours)			4	6

RESULTATS

Production annuelle U/L	8 449 696.760	10 094 751.685
Coût annuel (\$)	9 416.906	3 783.765
Coût d'un million d'unités /L (\$)	111.447	37.482

Discussion

4 Discussion

Les enzymes microbiennes revêtent une grande importance dans le développement de bioprocédés industriels. Les applications actuelles se concentrent sur divers marchés tels que les pâtes, le papier, le cuir, les détergents et les textiles, les produits pharmaceutiques et chimiques, les aliments et les boissons et aussi les biocarburants (Adrio & Demain, 2014).

L'hydrolyse enzymatique des polymères de la biomasse lignocellulosique en monomères, est une voie prometteuse pour la bioconversion des matières végétales en sucres. L'exploitation de la biomasse lignocellulosique au lieu de substrats commerciaux, en effet, peut réduire les coûts de production d'enzymes (Siqueira et al., 2020). L'application des enzymes lignocellulosiques, telles que ; les hémicellulases, dans l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique en sucre, est l'une des méthodes de prétraitement efficaces, à faible consommation d'énergie et respectueuses de l'environnement. Il est donc nécessaire de disposer des enzymes efficaces et d'optimiser leur production (Gares et al., 2020).

Dans la présente étude, le criblage réalisé sur la CMC et le xylane a permis de récupérer plusieurs isolats microbiens présentant des activités cellulase et hémicellulase avec des rendements variables. Un seul isolat fongique (MGA) a été sélectionné et identifié. L'identification de l'isolat, a été faite essentiellement à partir des caractères cultureux et morphologiques (identification macroscopique et microscopique). Ces caractéristiques ont permis d'identifier le genre de la souche par l'utilisation des clés spécifiques de détermination (Breton et al., 1990). En général, l'utilisation de l'objectif 40 est suffisante pour mettre en évidence les éléments importants de l'analyse (Rohde, 1978). L'identification microscopique est fondée essentiellement sur l'étude morphologique du mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation, etc.) et les spores (forme, couleur, texture des paroi, etc.) (Guiraud, 2012). Ces méthodes d'identification, basées sur des caractéristiques macroscopiques

DISCUSSION

et microscopiques, ont permis d'identifier le genre de l'isolat fongique. En effet, l'isolat sélectionné appartient au genre *Aspergillus*. Ces moisissures sont caractérisées par un appareil végétatif formé de filaments mycéliens de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs apparaissent des filaments dressés, non cloisonnés qui se terminent par une vésicule hémisphérique sur laquelle sont disposées les phialides (Vong, 2020). L'identification moléculaire par extraction d'ADN génomique et amplification d'ARN ribosomique 18S a permis ensuite, d'identifier l'espèce MGA. Cette souche a montré une similitude de 100 % avec *Aspergillus fumigatus*.

La capacité de la souche *A. fumigatus* à croître et à produire de l'hémicellulase à grande échelle a été inspectée. Pour réussir une production à grande échelle, il est nécessaire d'utiliser les outils modernes de la biotechnologie et une physiologie de fermentation adaptée (Goyal et al., 2017). Il est établi que, les meilleurs inducteurs pour la production d'enzymes xylanolytiques chez *Aspergillus spp.* sont le xylose, le xylane et les substrats bruts contenant du xylane (Amore et al., 2013). Ces souches fongiques produisent des métabolites secondaires tels que des acides organiques et des enzymes (ex. xylanase, cellulase, pectinase, protéase, amylase, etc.)(Ghosh & Ghosh, 2017; Gupta, 2016). Au cours de la fermentation en Erlenmeyer avec le xylose comme substrat, l'augmentation subséquente du pH après 96 heures de fermentation a été corrélée avec l'épuisement du substrat dans le milieu. Provoquant une accumulation de déchets azotés (Lin & Chen, 2004), ce qui a entraîné une augmentation du pH (7.04).

La morphologie des champignons filamenteux en culture liquide est principalement influencée par les conditions de culture et de la souche utilisée. De nombreuses études ont été menées sur la façon dont la morphologie du mycélium affecte la production de biomasse et la sécrétion de protéines (Cairns et al., 2019; He et al., 2016; Riquelme et al., 2018). Étant donné que ces micro-organismes ne sont pas unicellulaires mais filamenteux et que les hyphes fongiques se développent de manière hétérogène dans les milieux liquides, les champignons filamenteux

DISCUSSION

présentent une variété de macromorphologie telle que les pellettes. Ces agrégats mycéliens interfèrent avec l'absorption du substrat, provoquent des limitations métaboliques et diminuent l'efficacité de la production de protéines. Un transfert de masse plus efficace et une quantité et/ou une qualité de produits plus importante peuvent être achevés dans les fermentations liquides si le milieu est complètement homogène.

En effet, de nombreuses études ont décrit les conditions optimales d'agitation afin de réaliser une homogénéité dans le milieu de culture. Une vitesse d'agitation très élevée peut causer une lyse ou un stress mycélien, des apports de puissance élevés peuvent limiter la capacité et la productivité volumétrique d'un bioréacteur (Ghobadi et al., 2016). Pour chaque culture immergée, les conditions optimales d'agitation dépendent en partie de la résistance de l'hyphe aux forces mécaniques (Papagianni et al., 2003). En effet, pour les mycéliums dispersés, chaque hyphe est atteint par la convection du milieu agité (Nieland et al., 2021). Cependant, les échanges gazeux dans les macros-pellettes, ainsi que le transport des substrats et des produits sont perturbés par les pseudo-tissus. Cela peut être la cause du retard de la consommation de xylose avec la fermentation menée avec l'échantillon mycélien récolté à 350 rpm.

Au cours de la fermentation avec le xylane de maïs comme substrat en bioréacteur de 2 L, le champignon a initié la décomposition des oligosaccharides en monomères de xylose grâce à l'activité xylane 1,4- β xylosidase. La consommation de xylane de maïs était plus rapide que celle de xylose malgré sa complexité, qui est très probablement due à l'agitation optimale et au niveau adéquat d'O₂ dissous dans le milieu.

En effet, la limitation en oxygène est une cause fréquente de diminution de la production de produits aérobies telles que les enzymes. Pour contourner cette limitation, Fratebianchi et al., (2017) ont contrôlé les effets du débit d'air et de la vitesse d'agitation pour améliorer la production de polygalacturonase dans une fermentation submergée par *Aspergillus sojae*. Et a

DISCUSSION

constaté qu'une agitation de 600 rpm et un débit d'air de 1 à 1.7 vvm résolvaient le problème de limitation d'oxygène, par conséquent, une production maximale d'enzymes a été atteinte. La même étude a rapporté qu'une vitesse d'agitation plus élevée provoque un stress chez les micro-organismes entraînant une diminution de la production enzymatique. Une réaction correspondante a été précédemment rapportée concernant la production de protéines recombinantes par *A. niger* dans des bioréacteurs en fermentation liquide (Kelly et al., 2004; Wang et al., 2003). Bandaipheth and Prasertsan, (2006) ont rapporté que l'augmentation du débit d'air est un meilleur choix que l'augmentation de la vitesse d'agitation afin d'obtenir des valeurs élevées de kLa et d'éviter le stress des micro-organismes. Une autre étude menée par (Bakri et al., 2011a) a enregistré une activité maximale de la xylanase à une vitesse d'agitation de 200 rpm et un taux d'aération de 1.0 vvm. Or, à cette vitesse d'agitation, la formation de macro-pellettes est inévitable. En résumé, dans cette partie de recherche, **il a été déduit que les fermentations effectuées à des vitesses d'agitation plus élevées (supérieure à 350 rpm) et à des concentrations de conidies plus élevées (1×10^8) de la pré-culture serait plus efficace dans les fermentations liquides, et on peut citer : une croissance accélérée, une formation de biomasse réduite, une aération améliorée, une formation de pellettes plus petites et un temps de fermentation plus court.**

Plusieurs industries nécessitent un cocktail d'enzymes plutôt qu'une seule enzyme, car cette dernière ne fonctionnerait pas aussi bien dans de nombreuses applications, telles que l'hydrolyse de la biomasse ou le développement de détergents (Naganthran et al., 2017). Des micro-organismes uniques capables de produire plusieurs enzymes sont nécessaires, ainsi que des protocoles pour la production simultanée de plusieurs enzymes (Savino et al., 2021). Dans cette étude, le surnageant du bioréacteur de 2 L, contenait un ensemble d'enzymes qui dégradent significativement le xylane beechwood et le xylane de maïs. Selon l'analyse HPLC, *A. fumigatus* a montré un potentiel de production d'enzyme très élevé, en utilisant l'endo-1,4- β -

DISCUSSION

xylanase et la xylane 1,4- β xylosidase pour libérer le D-xylose du xylane beechwood et du xylane de maïs.

La fermentation en milieu solide (FSS) est un procédé intéressant qui peut, en effet, réduire le coût de la production d'enzymes (Martău et al., 2021). Les champignons filamenteux sont particulièrement adaptés au FSS (Nighojkar et al. 2019; Lodha et al. 2020). A notre connaissance, seules quelques données sont disponibles dans la littérature décrivant l'utilisation d'Alfa comme matière première pour la bioconversion en produits d'intérêt. Parmi eux, Semhaoui et al., (2017) et Zaafouri et al., (2016) ont étudié les procédés de prétraitement chimique de l'Alfa pour la production de bioéthanol de deuxième génération. Cependant, il n'existe actuellement aucune étude portant sur l'Alfa en tant que matière première potentielle pour la production d'enzymes dans le processus de fermentation solide. **L'Alfa a été utilisée comme substrat directement et sans prétraitement chimique, pour la première fois, afin de produire des enzymes par *A. fumigatus*.** En effet, l'activité xylanase fongique était détectable dès les premières 24 heures d'incubation, puis augmentait rapidement et atteignait son activité maximale à 120 h (684.64 ± 11.39 U/gds), accompagnée d'une importante activité CMCCase (34.08 ± 0.72 U/gds). De nombreuses études sur la production de xylanase et de cellulase utilisant différents substrats ont montré des rendements différents. Le rendement maximal en xylanase (496.9 et 648.448 U/gds) a été enregistré après 168 heures de fermentation avec des souches d' *A. niger* DX -23 et *A. fumigatus* SK1, respectivement (Ang, 2015; Desai and Iyer, 2020). En revanche, une activité CMCCase maximale a été atteinte après 168 heures (54.27 U/gds), 24 heures (4.1 U/gds) et 72 heures (8.89 U/gds) de fermentation avec *A. fumigatus* SK1, *A. unguis* et *A. niger* respectivement (Ang et al., 2013; Mrudula & Murugammal, 2011; Shruthi et al., 2018).

D'autre part, plusieurs études sur la production d'enzymes sous FSS ont révélé que la taille des particules du substrat influence la croissance microbienne ainsi le transfert de chaleur et de

DISCUSSION

masse (Lakshmi et al., 2011; Xin & Geng, 2010; Yeh et al., 2010). En effet, l'influence de la taille des particules sur la production d'enzymes varie selon le type de substrat et de microorganisme utilisé dans le procédé (Antoine et al., 2009). *Trichoderma reesei* a présenté un taux maximal de xylanase et de cellulase en utilisant une petite taille de particules de déchets horticoles (Xin & Geng, 2010). Néanmoins, *A. terreus* et *A. fumigatus* ont révélé une production optimale de xylanase lors de l'utilisation d'une grande taille de particules de fibre de palmier (Lakshmi et al., 2011). Des particules plus petites du substrat permettent une meilleure adhérence des microorganismes sur la surface, créant un meilleur environnement pour le transfert de chaleur et l'échange d'oxygène et de dioxyde de carbone entre la surface du substrat et l'air. Néanmoins, des particules excessivement petites peuvent provoquer une agrégation et une agglomération du substrat, ce qui peut affecter la respiration microbienne, entraînant une mauvaise croissance cellulaire et par la suite, une production de métabolites médiocre (Xin & Geng, 2010). D'autre part, une plus grande taille de particules de substrat fournit une meilleure aération pour les micro-organismes. En revanche, cela peut entraîner une mauvaise accessibilité des nutriments qui limite également la croissance microbienne (Lakshmi et al., 2011). Par conséquent, nous pensons qu'un mélange hétérogène de particules est le meilleur choix pour créer un environnement idéal pour la croissance microbienne, en évitant l'agglomération et en offrant une bonne accessibilité aux nutriments avec une meilleure aération.

La production efficace d'enzymes par les champignons filamenteux nécessite la recherche et l'optimisation des principaux facteurs d'influence et de leur niveaux, notamment le pH initial du milieu de culture, l'humidité et la température d'incubation (Azzouz et al., 2021; Desai & Iyer, 2020; Khan et al., 2020; Tai et al., 2019). En effet, l'optimisation statistique de la fermentation est une approche prometteuse par rapport aux méthodes expérimentales classiques et s'est avérée être un outil puissant pour optimiser la production d'enzymes (Dai et al., 2018). La matrice BBD a été utilisée dans la présente étude pour optimiser les facteurs d'influence.

DISCUSSION

Ainsi, nous avons analysé l'importance des effets de ces facteurs sur la production de xylanase et de cellulase par *A. fumigatus*. Dans cette partie de travail, on peut déduire que l'activité de la xylanase dépend principalement de la température et du temps de fermentation puisque, leurs effets quadratiques et linéaires sont significatifs. Ces deux facteurs peuvent affecter le métabolisme responsable de la production de xylanase. Les températures les plus élevées et les plus basses peuvent entraîner une réduction de la croissance microbienne et de la production d'enzymes. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Azzouz et al. (2020a) Pathania et al. (2017) et Yegin et al. (2017) où l'interaction entre le temps d'incubation et la température a affecté la production de xylanase des souches *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* F2 et *Aspergillus niger* BG, respectivement. Fait intéressant, une autre étude de Behnam et al. (2016) ont révélé que l'interaction entre ces deux facteurs n'a pas été significative pour l'optimisation de la xylanase par *Mucor indicus* via FSS.

Les interactions entre la température par rapport au niveau d'humidité et la température par rapport au pH n'ont pas affecté de manière significative la production de xylanase. Les mêmes résultats ont été rapportés par Azzouz et al. (2020a) dans leurs dernières recherches. Contrairement aux recherches menées Nishio et al. (1979) et Yadav (1988), qui ont rapporté que les niveaux de température et d'humidité sont considérés comme les principaux facteurs associés à la production optimale d'enzymes dans le FSS par les champignons. De plus, les effets de l'interaction entre le pH et la teneur en humidité, le pH et le temps d'incubation, et le temps d'incubation et la teneur en humidité sur l'activité de la xylanase n'étaient pas significativement influencés par la réponse. Cela a également été rapporté dans plusieurs études sur les effets interactifs de ces paramètres sur la production de xylanase par divers micro-organismes (Almeida et al., 2009; Azzouz, Bettache, Boucherba, et al., 2020; Behnam et al., 2016; Cao et al., 2008).

DISCUSSION

Dans cette étude, la température, le temps d'incubation et leur interaction se sont révélés être les paramètres les plus significatifs affectant la production de xylanase. En revanche, la production de CMC_{Case} était principalement affectée par la température, le temps d'incubation, l'humidité et l'interaction entre l'humidité et le temps d'incubation. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans un travail mené par Singhania et al. (2007), dans le but d'améliorer la production de cellulase par *Trichoderma reesei* sous FSS, où le taux d'humidité et le temps d'incubation étaient les facteurs les plus significatifs. Karmakar et Ray (2011) ont également signalé que l'interaction entre la température et le pH n'avait aucun effet significatif sur la production de cellulase par *Rhizopus oryzae*. Contrairement à l'étude précédente, Singh et Kaur (2012) ont rapporté que l'interaction entre ces deux facteurs était significative lors de l'utilisation de *Bacillus sp.* JS14 sous FSS pour optimiser la production de cellulase. Cependant, nos résultats ne sont pas en accord avec les résultats d'Ortiz et al. (2015), qui ont trouvé que le pH et l'humidité étaient les principales facteurs impliqués dans la production optimale de CMC_{Case}.

L'ajustement du modèle a été évalué à l'aide des coefficients R^2 , Adj R^2 et AAD. Les valeurs R^2 sont généralement comprises entre 0 et 1. Une valeur proche de 1 indique un modèle plus précis. Cependant, l'inclusion d'un grand nombre de variables non-significatifs dans le modèle peut conduire à des valeurs R^2 élevées, provoquant la défaillance du modèle et prédisant de mauvaises réponses. Le terme adj R^2 a été introduit pour corriger la valeur R^2 en fonction de la taille de l'échantillon et du nombre de termes dans le modèle. Idéalement, la valeur R^2 ajustée devrait être proche de la valeur R^2 . La grande différence entre R^2 et R^2 ajusté implique que le modèle comporte un grand nombre de termes non-significatifs (Garai & Kumar, 2013). Le coefficient de détermination R^2 de la xylanase (0.94) et de la CMC_{Case} (0,80), proche de 1, a confirmé la validité des deux modèles. Les valeurs du coefficient de détermination ajusté, adj R^2 , sont respectivement de 0.94 et 0.57 pour la xylanase et la CMC_{Case}. Si le modèle contient

DISCUSSION

de nombreux termes et que la taille de l'échantillon est petite, la valeur du adj R^2 peut être significativement inférieure à celle du R^2 d'origine (Paul et al., 2020).

De plus, une valeur R^2 plus élevée et une valeur AAD plus faible, ensemble, peuvent prédire avec plus de précision le véritable comportement du modèle (Baş & Boyacı, 2007). Les valeurs AAD calculées n'étaient que de 0.13 et 0.12 pour les modèles xylanase et CMCCase, respectivement, et ont été considérées comme suffisantes pour vérifier la pertinence de l'équation du modèle pour décrire la conception expérimentale. De plus, le coefficient de variation (CV) était une mesure de précision utilisée dans les expériences et s'est avéré être de 0.03 et 6.35 pour la xylanase et la CMCCase, respectivement. Une faible valeur de CV prédit la précision et la fiabilité des expériences (Baş & Boyacı, 2007; Sen & Swaminathan, 2004).

La corrélation entre les valeurs réelles et prédites de l'activité xylanase (figure 34 A) révèle une corrélation satisfaisante entre ces deux valeurs, avec des points de données situés près de la ligne diagonale. Ce modèle est considéré hautement efficace avec 97.53 % de probabilité de pouvoir expliquer les variations mesurées de la réponse. D'autre part, la corrélation entre les valeurs réelles et prédites de l'activité de la CMCCase (figure 34 B), d'autre part, montre les points distribués autour de la ligne de régression. Ainsi, la production prédite de CMCCase se situe dans les limites des facteurs expérimentaux. Par conséquent, le modèle est considéré comme adéquat, avec 80.21 % de chances d'expliquer les variations de réponse observées.

De ce fait, dans cette partie de travail, **trois options d'optimisation ont été présentées. Le premier modèle consiste à optimiser la production de xylanase seule en fixant la température à 30 °C, le pH du milieu à 4.5, en humidifiant l'Alfa à 89.19 % et en démarrant la fermentation pendant 144 heures. Le seconde modèle consiste à optimiser la CMCCase sous ; 31.61 °C, pH 6 et Alfa humidifiée à 90 % pendant 144 heures. Le troisième modèle consiste à optimiser les deux enzymes ensemble sous 30 °C, pH 6 et 90**

DISCUSSION

% d'humidité pendant 144 heures. Le pourcentage d'erreur entre l'activité enzymatique réelle et l'activité enzymatique prédite des modèles est de 4.66 %, 6.55 % et 3.67 % pour le premier, le deuxième et le troisième modèle, respectivement. Ceci est considéré comme très faible. Par conséquent, les résultats obtenus à partir des activités réelles de xylanase et de CMCCase dans des conditions expérimentales optimales étaient compatibles avec la production prévue. Cela indique que les optimisations effectuées dans cette étude sont très fiables.

Le plan de Plackett-Burman (PBD) a été utilisé pour étudier l'effet des constituants du milieu de fermentation sur la production de xylanase par la souche *A. fumigatus* sous FSS en utilisant l'Alfa comme support solide sous les conditions optimisées par le BBD (option 1, tableau 12). Le diagramme de Pareto des effets normalisés est utilisé afin d'analyser tous les paramètres et comparer la valeur relative et la signification statistique des effets. En effet, un facteur ayant le plus grand effet cumulatif sur le système est identifié comme le facteur le moins significatif (Cui & Zhao, 2012). Dans cette étude, les facteurs les plus significatifs ayant une influence sur la production de xylanase d'après les valeurs du t de Student sont : l'extrait de malt, $MgSO_4$, $NaNO_3$, et $(NH_4)_2SO_4$ (figure 37). D'après les résultats de l'ANOVA et le diagramme de Pareto, ces facteurs ont été sélectionnés pour une optimisation de second niveau par CCD. Les autres facteurs négatifs ont été exclus. Dans l'étude présente, la valeur CV de 0.28 montre une plus grande fiabilité. De plus, une valeur de R^2 (0.81) proche de 1 indique que le modèle est précis et explique 81.62% de la variabilité de la réponse.

Une conception composite centrale a, ensuite, été utilisée pour trouver les concentrations optimales des quatre nutriments dans le milieu de fermentation afin de maximiser la production de xylanase. En effet, l'optimisation de ces facteurs par le CCD a entraîné un rendement maximal de xylanase de 1556.55 ± 28.41 U/gds. Le R^2 de ce modèle était de 0.93, ce qui implique que la variation de 93.33 % de l'échantillon pour la production de xylanase est attribuée aux variables indépendantes. Une valeur R^2 Adj de 0.87 indiquant la qualité de ce

DISCUSSION

modèle pour la prédiction de la réponse. D'autre part, une valeur AAD de seulement 0.15 est considérée comme suffisante pour vérifier que l'équation du modèle décrit avec précision la conception expérimentale.

Le but de cette étude d'optimisation était de trouver les conditions qui optimisent l'activité xylanase. L'objectif a été sélectionné sur la base du maximum afin d'obtenir le rendement en xylanase le plus élevé. **Ceci représente le 4^{ème} modèle d'optimisation dans ce travail de recherche. Le logiciel a généré les concentrations optimales avec (g/L): 1.03 MgSO₄, 3 (NH₄)₂SO₄, 2.87 extrait de malt et 3 NaNO₃, qui ont prédit une activité enzymatique maximale de 1887.40 U/gds.** La production de xylanase par *A. niger* au cours de la fermentation solide a été étudiée en utilisant de la bagasse de canne à sucre. L'extrait de levure, CuSO₄ et MgSO₄ se sont avérés significatifs pour la production de xylanase après criblage par PBD (Vimalashanmugam & Viruthagiri, 2013). Les sources de nutriments pour la production de xylanase par *Penicillium sp.* ont été criblés et optimisés à l'aide des plans de Plackett-Burman et de Box-Behnken. Les éléments significatifs sélectionnés avec leurs optimales entre parenthèses (g/L) sont le son de blé (32.8), l'extrait de levure (1.02), NaNO₃ (12.71), MgSO₄ (0.96) et CaCl₂ (1.04) (Cui & Zhao, 2012).

Dans la présente étude, le test de validation a été effectué en utilisant les concentrations optimales données par le modèle pour une production optimale de xylanase par *A. fumigatus*. L'activité enzymatique réelle a été comparée avec l'activité enzymatique prédite. **Dans l'expérience, 1659.41U/gds a été obtenu dans les conditions optimales indiquées.** Le pourcentage d'erreur entre l'activité enzymatique réelle et l'activité enzymatique prédite est de 13.73 %, ce qui est considéré comme faible. Par conséquent, le résultat obtenu à partir de l'activité enzymatique réelle dans des conditions optimales pour la production de xylanase était compatible avec la production prédite. Cela indique que l'optimisation effectuée dans cette étude est fiable.

DISCUSSION

Le rendement en sucre lors de la saccharification de l'Alfa, de la paille de blé, de la paille d'avoine et du son de blé non traités avec le complexe enzymatique d'*A. fumigatus* a été comparé à la saccharification de ces substrats par l'hémicellulase commerciale. Plusieurs chercheurs ont évalué et discuté la capacité des enzymes de différents organismes à saccharifier la biomasse lignocellulosique (da Silva et al., 2020; Hammerer et al., 2020; Mondal et al., 2020; Østby et al., 2020). Contrairement à l'étude réalisée par (Sartori et al., 2015), le complexe enzymatique a présenté des différences de spécificité pour les différents substrats. La saccharification des substrats riches en glucides, tels que le son de blé, était plus efficace que la saccharification de substrats à faible teneur en glucides, tels que la paille de blé. En revanche, le comportement du complexe enzymatique était similaire dans tous les substrats étudiés lors de la période de saccharification. Le niveau de saccharification le plus élevé est atteint après 24 heures. D'autre part, l'hémicellulase commerciale a été plus active pendant les 4 premières heures d'incubation et a montré une faible valeur de conversion par rapport au complexe d'*A. fumigatus*, à l'exception de la paille de blé. Nous pensons que le complexe enzymatique, en plus de l'enzyme xylanase, et contrairement à l'enzyme hémicellulase commerciale, contient d'autres enzymes hydrolytiques telles que la cellulase et la ligninase. De plus, il a été démontré que les enzymes commerciales ont divers degrés de spécificité de substrat (Sartori et al., 2015).

Les micro-organismes thermophiles ont une valeur particulière en tant que sources de produits intéressants tels que les enzymes thermostables. De nombreux micro-organismes thermophiles possèdent des propriétés qui les rendent adaptés aux applications biotechnologiques et commerciales. Il existe une forte demande pour une nouvelle génération d'enzymes stables capables de résister aux conditions difficiles des processus industriels (Mehta et al., 2016). En effet, les champignons thermophiles possèdent une variété d'adaptations physiologiques et moléculaires aux températures élevées ; notamment les sclérotés épais (Dijksterhuis & Samson, 2007), la synthèse de substances protectrices contre divers stress (Jepsen & Jensen, 2004), et la

DISCUSSION

synthèse d'enzymes avec une stabilité thermique renforcée (Robledo et al., 2016). Tous ces facteurs se combinent pour rendre les champignons thermophiles biotechnologiquement désirables (Liu et al., 2017). La recherche et les applications des extrêmo-zymes ont gagné en popularité ces dernières années. En effet, leur application dans le domaine de biotechnologies, comme les processus agricoles, chimiques et biomédicaux, ouvre de nouvelles voies pour la biocatalyse et la biotransformations, ainsi que pour le développement économique et de nouvelles directions de recherche (Dumorné et al., 2017).

Les conidies les plus résistantes à la chaleur sont celles des espèces d'*Aspergillus* (Wyatt et al., 2013). La résistance à la chaleur des conidies est généralement évaluée à des températures inférieures à 60 °C, étant donné que les conidies de la plupart des espèces ne survivent pas à cette température plus de quelques minutes (Wyatt et al., 2013). **À notre connaissance, les conidies de la souche *A. fumigatus* avaient, avec 20.16 min, la valeur D la plus élevée pour cette espèce à 60° C jamais mesurée.** Des études sur les conidies d'*A. nidulans* et d'*A. oryzae* ont rapporté que les valeurs de température létale (LT) à 50 °C sont respectivement de 10 et 42 min (Fillinger et al., 2001; Sakamoto et al., 2009). Les conidies d'*A. niger* ont montré un D₅₉ de 3.3 min (Samson & Reenen-Hoekstra, 1988), environ 6 fois plus court que celui d'*A. fumigatus* MGA. Une autre étude rapporte que seulement 7% des conidies d'*A. fumigatus* survivent après 15 min de traitement thermique à 60°C lorsque les cultures sont cultivées à 25°C (Hagiwara et al., 2017), ce qui correspond à une valeur D₆₀ de 13 min (Van den brule et al., 2020), soit presque égal à nos résultats avec des valeurs D₆₅ de 15.26 avec la souche *A. fumigatus* MGA.

L'enzyme xylanase produite par *A. fumigatus* s'est avérée stable sur une large gamme de température de 40 °C à 70 °C avec une activité maximale à 60 °C. Conformément à nos conclusions concernant la thermo-stabilité de la xylanase *A. fumigatus*-MGA. Plusieurs études ont décrit la thermo stabilité des xylanases produites par des souches fongiques à 50 °C (Bajaj

DISCUSSION

& Abbass, 2011; Barbieri et al., 2022; Graciano et al., 2020; Seemakram et al., 2020). Les xylanases d'*Aspergillus terreus* et de *Streptomyce ssp.* se sont montrées stables à 50 °C (Moreira et al., 2013; Pradeep et al., 2013). Cependant, les xylanases d'*A. tubingensis* et d'*A. terreus* étaient plus actives à 65 °C (Bakri et al., 2011b), tandis qu'*A. fumigatus* et *A. niveus* présentaient des maxima à 60-70 °C (Peixoto-Nogueira et al., 2009).

L'activité enzymatique est fortement influencée par le pH; la fixation du substrat et la catalyse dépendent de la distribution des charges des molécules de substrat et d'enzyme (Dhaver et al., 2022). Le pH de la réaction a été ajusté entre 4 et 10 avec différents tampons. Le pH optimal de la xylanase d'*A. fumigatus* est de 6. He et al., (2015) a, aussi, rapporté que l'activité xylanase d'*A. oryzae* s'est avérée optimale à un pH de 6, tout en restant active à un pH de 4 à 10 et à des températures inférieures à 70 °C. **En effet, un pH de 5.15, une température de 60 °C avec une concentration en substrat de 1.39 g/L, sont les conditions optimales générées par le logiciel afin de maximiser l'hydrolyse de la xylanase. Il s'agit du 5^{ème} modèle d'optimisation de cette étude.**

Finalemt, une étude de rentabilité a confirmé l'efficacité de la production de xylanase par *A. fumigatus* avec l'Alfa sous fermentation solide; **La production d'enzymes avec l'Alfa était 3 fois moins chère qu'avec le xylane commercial.**

Conclusion et perspectives

5 Conclusion et perspectives

Cette thèse s'inscrit dans le contexte de la valorisation des biomasses lignocellulosiques par des enzymes lignocellulosiques et plus particulièrement, l'hémicellulase. En premier lieu, un criblage a été effectué, directement, sur gélose CMC à partir d'échantillons de sol provenant de deux forêts et d'une ancienne décharge à Constantine, en Algérie. 16 isolats microbiens ont été obtenus et conservés pour les travaux ultérieurs. Tous ces isolats avaient des activités cellulase et hémicellulase avec des rendements différents. Un seul isolat fongique (MGA) a été sélectionné et identifié. L'identification moléculaire de MGA a révélé qu'il s'agissait d'*Aspergillus fumigatus* ON226990. Il a été conclu de cette partie, que la méthode de criblage qui a été utilisée, s'est avérée très efficace en l'appliquant directement sur les échantillons du sol.

L'étude effectuée sur cette souche a révélé sa capacité croître et à produire de l'hémicellulase dans un milieu submergé à base de substrat hemicellulosique, et ce, dans des Erlenmeyers de 250 mL, des bioréacteurs de 2 et de 20 L. En outre, cette souche a montré une certaine résistance face aux cisaillements opérés sous des agitations supérieures à 500 rpm. De plus, durant une fermentation en bioréacteur de 2 L à base de xylan de maïs comme substrat, *A. fumigatus* a montré un potentiel de production très élevé d'hémicellulase. Il est à mettre en exergue, que la souche sélectionnée pour son activité élevée, est un micro-organisme industriel.

Cependant, le procédé de production tel qu'habituellement utilisé, en l'occurrence, la fermentation en milieu liquide, demeure très coûteux à cause du prix élevé de substrat et de la faible stabilité des enzymes produites. De ce fait, le choix du substrat pour la fermentation solide a été profondément étudié et discuté dans notre revue scientifique, traitant le potentiel de plusieurs substrats et déchets lignocellulosiques comme matière première en Algérie. L'Alfa a été choisie grâce à sa concentration élevée de polysaccharides, et son potentiel d'adaptation aux

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

climats arides et semi-arides. L'adoption de cultures énergétiques tolérantes à la sécheresse comme l'Alfa, devrait être le choix le plus pertinent en termes de durabilité environnementale. En effet, cette herbe a été utilisée comme substrat directement, sans prétraitement chimique, afin de produire des enzymes par *A. fumigatus*. **A notre connaissance, l'Alfa n'a jamais été étudiée comme source potentielle de production d'enzymes. Cette propriété est démontrée pour la première fois dans ce travail.**

Sur un autre volet, **trois modèles mathématiques ont été présentés** dans lesquels les conditions physico-chimiques ; le pH, la température, le degré d'humidité et le temps d'incubation ont été optimisés **pour maximiser la production de xylanase et de CMCase séparément et simultanément par Box-Behnken design.**

En suite, 11 facteurs comprenant des sources d'azote organiques et inorganiques, des sources de carbone et de phosphore ont été sélectionnées et criblées par la conception plackett-burman afin d'étudier les effets de ces nutriments sur la production de xylanase. Quatre facteurs significatifs : extrait de malt, $MgSO_4$, $NaNO_3$, et $(NH_4)_2SO_4$ ont été sélectionnés pour une optimisation de second niveau par la conception Central-Composite. **Par conséquent, un quatrième modèle a été présenté pour optimiser les composants du milieu afin de maximiser la production de xylanase.** Il a été conclu que l'utilisation de modèles mathématiques facilitent le choix de facteurs permettant production optimale en enzymes d'une part, et que l'utilisation de l'Alfa comme substrat de fermentation permet à l'*A. fumigatus* de développer une activité enzymatique conséquente.

Il a été conclu par ailleurs, que l'activité xylanase produite par *A. fumigatus* dans les conditions optimales, était plus efficace que celle des enzymes industrielles. Ce complexe enzymatique a, également, démontré son efficacité dans la saccharification de plusieurs substrats lignocellulosiques naturels, notamment, l'Alfa, la paille de blé, la paille d'avoine et le son de blé, par rapport à la saccharification de ces substrats par l'hémicellulase commerciale.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Finalelement, une étude coût-efficacité a confirmé l'efficience de la production de xylanase par *A. fumigatus*; **la production d'enzymes avec l'Alfa était 3 fois moins chère qu'avec le xylane commercial.**

En termes de cette recherche, de nombreuses perspectives émergent:

- L'extrapolation de la stratégie de production d'enzymes à partir d'Alfa dans des bioréacteurs ; les paramètres de culture devront être définis en se basant sur les conditions optimisées des cultures en Erlenmeyer obtenues dans cette étude.
- Approfondir l'étude des mécanismes biochimiques, moléculaires et physiologiques impliqués dans la dégradation des polymères de la matière lignocellulosiques
- Utilisation des techniques méta-génomiques pour identifier les gènes qui codent pour les enzymes étudiées en vue de les utiliser dans autres systèmes microbiens facilement cultivables.

Abstract

6 Abstract

The main objective of this work is to search for microorganisms capable of degrading lignocellulosic biomass by lignocellulosic enzymes and more particularly, hemicellulase. The exploration of soil samples from two forests and a former landfill in Constantine (Algeria), resulted in the selection of 16 microbial isolates. A single mold isolate (MGA) was selected for its high cellulase and hemicellulase activity. Molecular identification of MGA revealed it to be *Aspergillus fumigatus* ON226990. The selected strain was subsequently subjected to a scaling-up study to test its ability to grow and produce hemicellulase on a large scale. *A. fumigatus* showed an ability to grow in a liquid medium based on xylose as substrate, in 250 mL Erlenmeyer flasks, 2 and 20 liter bioreactors. In addition, three shaking speeds: 350, 500 and 650 rpm were tested in the 2 L bioreactor in order to follow the impact of the shear effect on the morphology of *A. fumigatus*. Indeed, this strain showed a certain "robustness" to the shear that can occur on an industrial scale; by increasing the agitation speed to 500 rpm, the mold forms free micro-pellets ensuring a good homogeneity in the culture medium. On the other hand, at agitation speeds lower than 300 rpm, the mycelium develops as macro-pellets. Furthermore, according to HPLC analyses, *A. fumigatus* showed a very high potential for production of endo-1,4- β -xylanase and xylan 1,4- β xylosidase during using corn xylan as substrate in a 2-L bioreactor fermentation. The production process in liquid medium, remains very expensive because of the high price of pure substrate. Therefore, the interest is redirected to the valorization of *Stipa tenacissima* (Alfa) as raw material for the production of hemicellulase by *A. fumigatus*. It is important to emphasize that this work is the first to have exploited Alfa as a raw material for the production of enzymes without pretreatment by *A. fumigatus*. For this purpose, the polymers of dried and ground esparto samples were analyzed by chemical methods (strong and dilute acid). Indeed, the results obtained by HPLC analysis show that this herb is mainly composed of 46-44% of cellulose and 12.5-13.33% of hemicellulose. On another aspect, experiments were statistically planned with the Box-Behnken design to optimize the production of xylanase and cellulase by *A. fumigatus*, using Alfa as the only carbon source, where the inputs are; pH, temperature, humidity and incubation time. The optimal conditions established by the response surface method for maximum xylanase production (841.78 U/gds) are: pH; 4.5, temperature; 30 °C, humidity; 89.19% and a fermentation time of 144 h, and for maximum cellulase production (74.41 U/gds): pH; 6, temperature; 31.61 °C, humidity; 90% for 144 h incubation. Subsequently, 11 factors, including organic and inorganic nitrogen sources, carbon and phosphorus sources, were screened using the Plackett-Burman design to investigate their influence on xylanase production. Malt extract, MgSO₄, NaNO₃ and (NH₄)₂SO₄ were selected for further optimization using the Central-Composite design. The maximum xylanase production under the optimized conditions is 1659.41 U/gds, which represents a nearly 3-fold increase over the first xylanase production before optimization. Furthermore, the enzyme activity produced by *A. fumigatus* under the optimized conditions, is more efficient than that of commercial enzymes. This enzyme complex also showed its efficiency in the saccharification of Alfa, wheat straw, oat straw and wheat bran, compared to the saccharification of these substrates by commercial hemicellulase. A saccharification rate of 35.82% was observed with wheat bran, oat straw (25.91%), Alfa (21.29%) and wheat straw (2.29%) after 24 h of incubation. Finally, a cost-effectiveness study confirmed the value of xylanase production by *A. fumigatus*; enzyme production with Alfa is 3 times cheaper than with pure commercial xylan.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, Alfa, solid state fermentation Box Behnken design, lignocellulosic biomass, Central-Composite design, hemicellulase, hemicellulose, Plackett-Burman design, valorization.

ملخص

7 ملخص

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو البحث عن الكائنات الحية الدقيقة القادرة على تحطيم الكتلة الحيوية الينوسلولوزية بواسطة إنزيمات لينوسلولوزية وعلى وجه الخصوص ، الهيميسلولاز. أدى استكشاف عينات التربة من غابتين ومكب نفايات سابق بقسنطينة (الجزائر) إلى اختيار 16 عزلة ميكروبية. تم اختيار عزلة واحدة، لارتفاع نشاطها السليولازي والهيميسليلازي. أظهر التحديد الجزيئي لهذه بعد ON226990 تم إخضاع السلالة المختارة ذات الرقم . *Aspergillus fumigatus* السلالة المعزولة أنها تنتمي الي سلالة ذلك لدراسة موسعة لاختبار قدرتها على النمو وإنتاج الهيميسليلاز على نطاق واسع. أظهر فوميجاتوس قدرة على النمو في وسط سائل يعتمد على الزيولوز كركيزة ، في قوارير إرنماير سعة 250 مل ، مفاعلات حيوية سعة 2 و 20 لترًا. بالإضافة إلى ذلك ، تم اختبار ثلاث سرعات دوران: 350 و 500 و 650 دورة في الدقيقة في مفاعل حيوي سعة 2 لتر من أجل متابعة تأثير تأثير القص على في الواقع ، أظهرت هذه السلالة "متانة" كبيرة للقص والتي يمكن أن تحدث على المستوى الصناعي. *A. fumigatus* مورفولوجيا من خلال زيادة سرعة التحريك إلى 500 دورة في الدقيقة ، تشكل هذه لسلالة حبيبات دقيقة تضمن تجانساً جيداً في وسط الاستزراع. من ناحية أخرى ، عند سرعات الدوران التي تقل عن 300 دورة في الدقيقة ، تتطور الفطريات على شكل حبيبات كبيرة. علاوة على β -xylanase و β -xylosidase ، أظهر فوميجاتوس إمكانات عالية جداً لإنتاج إندو 1.4 HPLC ذلك ، وفقاً لتحليلات أثناء استخدام زيلان الذرة كركيزة في تخمير مفاعل حيوي 2 لتر. تظل عملية الإنتاج في الوسط السائل مكلفة للغاية *xylosidase* كمادة لإنتاج *Stipa tenacissima* (Alfa) بسبب ارتفاع سعر الركيزة النقية. لذلك ، يتم إعادة توجيه الاهتمام إلى تثمين من المهم التأكيد على أن هذا العمل هو أول من استغل الحلفاء كمادة خام لإنتاج الإنزيمات *A. fumigatus* الهيميسليلاز بواسطة لهذا الغرض ، تم تحليل عينات الحلفاء المجففة والمطحونة بالطرق الكيميائية (حمض *A. fumigatus* دون معالجة مسبقة بواسطة أن هذه العشبة تتكون أساساً من 44-46% من HPLC قوي ومخفف). وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من خلال تحليل *Box-Behnken* السليولوز و 12.5-13.33% من الهيميسليولوز. من ناحية أخرى ، تم التخطيط للتجارب إحصائياً باستخدام تصميم ، باستخدام الحلفاء كمصدر الكربون الوحيد ، حيث تكون المدخلات ؛ *A. fumigatus* لتحسين إنتاج الزيلاناز والسليولاز بواسطة درجة الحموضة ودرجة الحرارة والرطوبة ووقت الحضانة. الشروط المثلى التي حددتها طريقة سطح الاستجابة لأقصى إنتاج ؛ 4.5 درجة الحرارة 30 درجة مئوية ، الرطوبة ؛ 89.19% ووقت تخمير 144 ساعة ، pH: هي (841.78 U / gds) للزيلاناز وللحد الأقصى من إنتاج السليلاز (74.41 وحدة / جرام): درجة الحموضة ؛ 6 ، درجة الحرارة 31.61 درجة مئوية ، الرطوبة. 90% لحضانة 144 ساعة. بعد ذلك ، تم فحص 11 عاملاً ، بما في ذلك مصادر النيتروجين العضوية وغير العضوية ، ومصادر للتحقق من تأثيرها على إنتاج الزيلاناز. تم اختيار مستخلص الشعير و *Plackett-Burman* الكربون والفوسفور ، باستخدام تصميم لمزيد من التحسين باستخدام تصميم المركب المركزي. يبلغ الحد الأقصى لإنتاج $(NH_4)_2SO_4$ و $NaNO_3$ و $MgSO_4$ الزيلاناز في ظل الظروف المُحسَّنة 1659.41 وحدة / وحدة ، وهو ما يمثل زيادة بمقدار 3 أضعاف تقريباً عن إنتاج الزيلاناز الأول في ظل الظروف المثلى ، يكون أكثر كفاءة من *A. fumigatus* قبل التحسين. علاوة على ذلك ، فإن نشاط الإنزيم المنتج بواسطة نشاط الإنزيمات التجارية. أظهر مركب الإنزيم هذا أيضاً كفاءته في تسكر ألفا وقش القمح وقش الشوفان ونخاله القمح ، مقارنةً بتسكير هذه الركائز عن طريق الهيميسليولاز التجاري. لوحظ معدل تكسير بنسبة 35.82% مع نخالة القمح وقش الشوفان (25.91%) والألفا *A.* (21.29%) وقش القمح (2.29%) بعد 24 ساعة من الحضانة. أخيراً ، أكدت دراسة فعالية التكلفة قيمة إنتاج الزيلاناز بواسطة أرخص بثلاث مرات من إنتاج الزيلان التجاري النقي *Alfa* ؛ إن إنتاج الإنزيم باستخدام *fumigatus*

الكلمات الرئيسية

، hemicellulase ، تصميم المركب المركزي ، lignocellulosic ، الكتلة الحيوية *Box Behnken design* ، *Aspergillus fumigatus* ، تثمين الكتلة الحيوية . *Plackett-Burman* ، تصميم *Stipa tenacissima* ، تخمير الحالة الصلبة ، التخمير المغمور ، hemicellulose ،

*Références
bibliographiques*

8 Références bibliographiques

1. Aavos. (2017). Lignocellulose refers to plant dry matter (biomass). *AAVOS International*. <https://aavos.eu/glossary/lignocellulose/>
2. Abdella, A., Segato, F., & Wilkins, M. R. (2019). Optimization of nutrient medium components for production of a client endo- β -1,4-xylanase from *Aspergillus fumigatus* var. *Niveus* using a recombinant *Aspergillus nidulans* strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101267. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101267>
3. Abdoullahi, H. O., Tidjani, A., Sawadogo, A., Tarnagda, B., Idriss, L., Cissé, H., & Traoré, Y. (2019). *Isolement et caracterisation de souches fongiques a partir de poissons fumes/seches du lac Fitri au tchad*. 6.
4. Abdulmajeed, A. T. A., Şahin, S., & Ozmen, I. (2021). Production and Purification of the Endoglucanase Enzyme from Local Isolate *Aspergillus fumigatus* HBF356. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(4), 4337-4347. <https://doi.org/10.33263/BRIAC124.43374347>
5. Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial Enzymes : Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139. <https://doi.org/10.3390/biom4010117>
6. Afrazmanech, BOSTSARRON, T., IENG, S., & PLESSIX, P.-A. (2022). *Organisation de la cellulose*. <https://cellulose.tpelakanal.pagesperso-orange.fr/Organisation%20de%20la%20cellulose.htm>
7. 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. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1337657>
8. Ait-Amir, B., Pougnet, P., & El Hami, A. (2015). 6—Meta-Model Development. In A. El Hami & P. Pougnet (Éds.), *Embedded Mechatronic Systems 2* (p. 151-179). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-014-0.50006-2>
9. Akchiche, O., & Messaoud, B. K. (2007). Esparto grass (*Stipa tenacissima* L.), raw material of papermaking. First part. *Химия растительного сырья*, 4, 25-30. <https://elibrary.ru/item.asp?id=9570125>
10. Al Abdallah, Q., Ge, W., & Fortwendel, J. R. (2017). A Simple and Universal System for Gene Manipulation in *Aspergillus fumigatus*: In Vitro-Assembled Cas9-Guide RNA

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ribonucleoproteins Coupled with Microhomology Repair Templates. *MSphere*, 2(6), e00446-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00446-17>
11. Alio, M. A. (2021). *Production de bioéthanol à partir d'une biomasse lignocellulosique multi-ressources locale par prétraitement Organosolv et hydrolyse enzymatique*. Génie des procédés. Université Clermont Auvergne.
 12. Allman, T. (2020, juillet 23). *The Difference Between Batch, Fed-batch and Continuous Processes*. EN Blog. <https://www.infors-ht.com/fr/blog/the-difference-between-batch-fed-batch-and-continuous-processes/>
 13. Almeida, J. R. M., Bertilsson, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Gorsich, S., & Lidén, G. (2009). Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(4), 625-638. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1875-1>
 14. Alzagameem, A., Klein, S. E., Bergs, M., Do, X. T., Korte, I., Dohlen, S., Hüwe, C., Kreyenschmidt, J., Kamm, B., Larkins, M., & Schulze, M. (2019). Antimicrobial Activity of Lignin and Lignin-Derived Cellulose and Chitosan Composites against Selected Pathogenic and Spoilage Microorganisms. *Polymers*, 11(4), 670. <https://doi.org/10.3390/polym11040670>
 15. Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., & Pillai, S. (2021). *Beauveria bassiana* Xylanase : Characterization and Wastepaper Deinking Potential of a Novel Glycosyl Hydrolase from an Endophytic Fungal Entomopathogen. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(8), 668. <https://doi.org/10.3390/jof7080668>
 16. Amore, A., Giacobbe, S., & Faraco, V. (2013). Regulation of Cellulase and Hemicellulase Gene Expression in Fungi. *Current Genomics*, 14(4), 230-249. <https://doi.org/10.2174/1389202911314040002>
 17. Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation : An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 768-778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>
 18. Andro, T., Chambost, J. P., Kotoujansky, A., Cattaneo, J., Bertheau, Y., Barras, F., Van Gijsegem, F., & Coleno, A. (1984). Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *Journal of Bacteriology*, 160(3), 1199-1203. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC215846/>
 19. Ang, S. K. (2015). *Cellulases and xylanase production by « Aspergillus fumigatus » SK1 through solid state fermentation for ethanol fermentation* [Phd, Universiti Teknologi Malaysia, Faculty

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- of Biosciences and Medical Engineering].
<http://dms.library.utm.my:8080/vital/access/manager/Repository/vital:96722>
20. Ang, S. K. (2013). Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 48(9), 1293-1302. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.019>
 21. Anonyme. (2022). *Aspergillus* Genomes. *Aspergillus and Aspergillosis*. <https://www.aspergillus.org.uk/genomes/aspergillus-genomes/>
 22. Anonymous. (2016, novembre 23). *Paquet sur le climat et l'énergie à l'horizon 2020*. Action Pour Le Climat - European Commission. https://ec.europa.eu/clima/policies/strategies/2020_fr
 23. Antoine, A., Jacqueline, D., & Thonart, P. (2009). Xylanase Production by *Penicillium canescens* on Soya Oil Cake in Solid-State Fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160, 50-62. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8496-5>
 24. Antoine Assamoi, 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*. *BASE*. <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=4129>
 25. APS. (2021). *Bioenergie : Le potentiel bioénergétique est évalué à plus de 500.000 Tep*. Algérie Presse Service. <https://www.aps.dz/economie/116809-bioenergie-le-potentiel-bioenergetique-est-evalue-a-plus-de-500-000-tep>
 26. Aro, S. (2009). Improvement in the nutritive quality of cassava and its by-products through microbial fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 725, 4789-4797.
 27. Azzouz, Z., Bettache, A., & Boucherba, N. (2020). Biotechnological production and statistical optimization of fungal xylanase by bioconversion of the lignocellulosic biomass residues in solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01018-z>
 28. Azzouz, Z., Bettache, A., Boucherba, N., Amghar, Z., & Benallaoua, S. (2020). 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*. <https://doi.org/10.35812/CelluloseChemTechnol.2020.54.46>
 29. Azzouz, Z., Bettache, A., Boucherba, N., Prieto, A., Martinez, M. J., Benallaoua, S., & de Eugenio, L. I. (2021). Optimization of β -1,4-Endoxylanase Production by an *Aspergillus niger* Strain Growing on Wheat Straw and Application in Xylooligosaccharides Production. *Molecules*, 26(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/molecules26092527>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

30. Bailey, M. J., Biely, P., & Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23(3), 257-270. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J)
31. Bajaj, B. K., & Abbass, M. (2011). Studies on an alkali-thermostable xylanase from *Aspergillus fumigatus* MA28. *3 Biotech*, 1(3), 161-171. <https://doi.org/10.1007/s13205-011-0020-x>
32. Bakri, Y., Mekaeel, A., & Koreih, A. (2011a). Influence of agitation speeds and aeration rates on the Xylanase activity of *Aspergillus niger* SS7. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000400003>
33. Bakri, Y., Mekaeel, A., & Koreih, A. (2011b). Influence of agitation speeds and aeration rates on the Xylanase activity of *Aspergillus niger* SS7. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 659-664. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000400003>
34. Bandaiphet, C., & Prasertsan, P. (2006). Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, kLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydrate Polymers*, 66(2), 216-228. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.004>
35. Barbieri, G. S., Bento, H. B. S., de Oliveira, F., Picheli, F. P., Dias, L. M., Masarin, F., & Santos-Ebinuma, V. C. (2022). Xylanase Production by *Talaromyces amestolkiae* Valuing Agroindustrial Byproducts. *BioTech*, 11(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/biotech11020015>
36. Baş, D., & Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836-845. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>
37. Basit, A., Liu, J., Miao, T., Zheng, F., Rahim, K., Lou, H., & Jiang, W. (2018). Characterization of Two Endo-β-1, 4-Xylanases from *Myceliophthora thermophila* and Their Saccharification Efficiencies, Synergistic with Commercial Cellulase. *Frontiers in Microbiology*, 9, 233. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00233>
38. Baya, B., & Moussa, A. (2010). Production of dissolving grade pulp from alfa. *BioResources*, 5. <https://doi.org/10.15376/biores.5.1.291-302>
39. Behnam, S., Khanahmadi, M., Karimi, K., & Salimian, Z. (2016). Optimization of xylanase production by *Mucor indicus*, *Mucor hiemalis*, and *Rhizopus oryzae* through solid state fermentation. *Biological Journal of Microorganism*, 4, 1-10.
40. Belbahi, A., Bohuon, P., Leguérinel, I., Meot, J.-M., Loiseau, G., & Madani, K. (2017). Heat Resistances of *Candida Apicola* and *Aspergillus Niger* Spores Isolated From Date Fruit Surface : Inactivation of Fungi Spores in Date Surface. *Journal of Food Process Engineering*, 40(1), e12272. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12272>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

41. Benaïmeche, O., Seghir, N. T., Sadowski, Ł., & Mellas, M. (2020). The Utilization of Vegetable Fibers in Cementitious Materials. In S. Hashmi & I. A. Choudhury (Éds.), *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials* (p. 649-662). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.11596-6>
42. Benallaoua, S. (encadreur), & Azzouz, Z. (2015). Production de cellulases et de xylanases fongiques par fermentation solide et liquide à base de paille et de son de blé. <http://172.17.1.105:8080/xmlui/handle/123456789/10507>
43. Bergquist, P. L., Te'o, V. S. J., Gibbs, M. D., Cziferszky, A. C. E., De Faria, F. P., Azevedo, M. O., & Nevalainen, K. M. H. (2002). Production of recombinant bleaching enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98(1), 165-176. <https://doi.org/10.1385/ABAB:98-100:1-9:165>
44. Bhardwaj, N., Kumar, B., & Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases : An emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>
45. Boonpuang, R., Mongkolwongroj, M., Sakulkalavek, A., & Sakdanuphab, R. (2020). Empirical Modeling and Optimization of Laser Bending Process Parameters using the Central Composite Design Method for HDD Slider PSA/RSA Adjustment. *Lasers in Manufacturing and Materials Processing*, 7(3), 290-304. <https://doi.org/10.1007/s40516-020-00122-2>
46. Bouiri, B., & Amrani, M. (2010). Elemental chlorine-free bleaching halfa pulp. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 16(4), 587-592. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2010.03.015>
47. Bouzaouit, N. (2016). *Optimisation de la synthèse enzymatique d'esters de sucres par la méthodologie des plans d'expériences*. Badji mokhtar university, Annaba.
48. Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 13(1), 1-45. <https://www.jstor.org/stable/2983966>
49. Breton, A., Gauthier, Botton, B., Fèvre, M., Guy, P., & Larpent, J.-P. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles - 2ème édition - Importance industrielle : Importance industrielle*. Dunod.
50. Cairns, T. C., Zheng, X., Zheng, P., Sun, J., & Meyer, V. (2019). Moulding the mould : Understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1400-4>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

51. Cao, Y., Meng, D., Lu, J., & Long, J. (2008). Statistical optimization of xylanase production by *Aspergillus niger* AN-13 under submerged fermentation using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 7(5), Article 5. <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i5.58488>
52. Carle-Urioste, J. C., Escobar-Vera, J., El-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Torigoi, E., Crivellaro, O., Herrera-Estrella, A., & El-Dorry, H. (1997). Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(15), 10169-10174. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.15.10169>
53. Carpita, N. C., & McCann, M. C. (2020). Redesigning plant cell walls for the biomass-based bioeconomy. *Journal of Biological Chemistry*, 295(44), 15144-15157. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.014561>
54. Catalogue of life. (2021). *Stipa tenacissima* L. / COL. <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/52RGM>
55. Chandel, A. K., Garlapati, V. K., Singh, A. K., Antunes, F. A. F., & da Silva, S. S. (2018). The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology*, 264, 370-381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.004>
56. Chen, Q., Li, M., & Wang, X. (2016). Enzymology properties of two different xylanases and their impacts on growth performance and intestinal microflora of weaned piglets. *Animal Nutrition*, 2(1), 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.02.003>
57. Cherfi, S. (2011). *L'avenir énergétique de l'Algérie: Quelles seront les perspectives de consommation, de production et d'exportation du pétrole et du gaz à l'horizon 2020-2030*.
58. Cherubini, F., Peters, G. P., Berntsen, T., Stroman, A., H., & Herwich, E. (2011). *CO2 emissions from biomass combustion for bioenergy: Atmospheric decay and contribution to global warming—CHERUBINI - 2011—GCB Bioenergy—Wiley Online Library*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1757-1707.2011.01102.x/full>
59. Chukwuma, O. B., Rafatullah, M., Tajarudin, H. A., & Ismail, N. (2020). Lignocellulolytic Enzymes in Biotechnological and Industrial Processes: A Review. *Sustainability*, 12(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/su12187282>
60. Clayton, W., D., Harman, K. T., & Williamson, H. (2006). *The Board of Trustees, Royal Botanic Gardens, Kew | Feedipedia*. <https://www.feedipedia.org/node/4565>
61. Costa, J. A. V., Treichel, H., Kumar, V., & Pandey, A. (2018). Chapter 1—Advances in Solid-State Fermentation. In A. Pandey, C. Larroche, & C. R. Soccol (Éds.), *Current Developments in*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Biotechnology and Bioengineering* (p. 1-17). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00001-3>
62. Cui, F., & Zhao, L. (2012). Optimization of Xylanase production from *Penicillium sp.* WX-Z1 by a two-step statistical strategy: Plackett-Burman and Box-Behnken experimental design. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(8), 10630-10646. <https://doi.org/10.3390/ijms130810630>
63. Cuissinat, C., & Navard, P. (2006). Swelling and Dissolution of Cellulose Part 1 : Free Floating Cotton and Wood Fibres in N-Methylmorpholine-N-oxide–Water Mixtures. *Macromolecular Symposia*, *244*(1), 1-18. <https://doi.org/10.1002/masy.200651201>
64. Cunha, L., Martarello, R., Souza, P. M. de, Freitas, M. M. de, Barros, K. V. G., Ferreira Filho, E. X., Homem-de-Mello, M., & Magalhães, P. O. (2018). Optimization of Xylanase Production from *Aspergillus foetidus* in Soybean Residue. *Enzyme Research*, *2018*, e6597017. <https://doi.org/10.1155/2018/6597017>
65. Dai, X.-J., Liu, M., Jin, H.-X., & Jing, M.-Y. (2018). Optimisation of solid-state fermentation of *Aspergillus niger* JL-15 for xylanase production and xylooligosaccharides preparation. *Czech Journal of Food Sciences*, *29*, 557-567. <https://doi.org/10.17221/103/2010-CJFS>
66. Dalila, N., & Slimane, B. (2008). La désertification dans les steppes algériennes : Causes, impacts et actions de lutte. *Vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement*, *Volume 8 Numéro 1*, Article Volume 8 Numéro 1. <https://doi.org/10.4000/vertigo.5375>
67. Dalla, M., Mancini, M., Orlando, F., Natali, F., Capecchi, L., & Orlandini, S. (2014). Sweet sorghum for bioethanol production : Crop responses to different water stress levels. *Biomass and Bioenergy*, *64*, 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.03.033>
68. Dallel, M. (2012). *Evaluation du potentiel textile des fibres d'Alfa (Stipa Tenacissima L.) : Caractérisation physico-chimique de la fibre au fil* [Université de Haute Alsace-Mulhouse]. <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00844129/>
69. da Silva, A. S., Espinheira, R. P., Teixeira, R. S. S., de Souza, M. F., Ferreira-Leitão, V., & Bon, E. P. S. (2020). Constraints and advances in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass : A critical review. *Biotechnology for Biofuels*, *13*(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01697-w>
70. Desai, D. I., & Iyer, B. D. (2020). Optimization of medium composition for cellulase-free xylanase production by solid-state fermentation on corn cob waste by *Aspergillus niger* DX-23. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00749-3>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

71. de Souza Moreira, L. R., de Carvalho Campos, M., de Siqueira, P. H. V. M., Silva, L. P., Ricart, C. A. O., Martins, P. A., Queiroz, R. M. L., & Filho, E. X. F. (2013). Two β -xylanases from *Aspergillus terreus* : Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 60, 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.07.006>
72. Develve. (2020). *Box-Behnken design*. <https://develve.net/Box-Behnken%20design.html>
73. Devi, A., Singh, A., Bajar, S., Pant, D., & Din, Z. U. (2021). Ethanol from lignocellulosic biomass : An in-depth analysis of pre-treatment methods, fermentation approaches and detoxification processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105798. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105798>
74. de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., Battaglia, E., Bayram, Ö., Benocci, T., Braus-Stromeyer, S. A., Caldana, C., Cánovas, D., Cerqueira, G. C., Chen, F., Chen, W., ... Grigoriev, I. V. (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biology*, 18(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>
75. Dhaver, P., Pletschke, B., Sithole, B., & Govinden, R. (2022). Optimization, purification, and characterization of xylanase production by a newly isolated *Trichoderma harzianum* strain by a two-step statistical experimental design strategy. *Scientific Reports*, 12(1), 17791. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22723-x>
76. Dhingra, S., & Cramer, R. A. (2017). Regulation of Sterol Biosynthesis in the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus* : Opportunities for Therapeutic Development. *Frontiers in Microbiology*, 8, 92. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00092>
77. Díaz, G. V., Coniglio, R. O., Velazquez, J. E., Zapata, P. D., Villalba, L., & Fonseca, M. I. (2019). Adding value to lignocellulosic wastes via their use for endoxylanase production by *Aspergillus* fungi. *Mycologia*, 111(2), 195-205. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1556557>
78. Dijksterhuis, J., & Samson, R. A. (Éds.). (2007). *Food Mycology : A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420020984>
79. Duchaufour, P., & Blum, W. E. H. (1997). *Abrégé de pédologie : Sol, végétation, environnement*. Masson.
80. Duchiron , F., & Copinet, E. (2011). *Fermentation en milieu solide (FMS)*. Techniques de l'Ingénieur. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/archives-th12/archives-bioprocédes-et-bioproductions-tiabi/archive-1/fermentation-en-milieu-solide-fms-bio620/>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

81. Dumorné, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M., & Renganathan, P. (2017). Extremozymes : A Potential Source for Industrial Applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 649-659. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006>
82. El-abbassi, F., Assarar, M., Ayad, R., & Lamdouar, N. (2015). *ANALYSE EXPERIMENTALE ET MODELISATION COMPORTEMENTALE D'AGRO-COMPOSITES A BASE DE FIBRES D'ALFA*. <http://smsm.fsac.ac.ma/congres/12congres/VI/t3/0347.pdf>
83. Elamin, E. A., Elias, S., Dauschies, A., & Rommel, M. (1992). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pastoral camels (*Camelus dromedarius*) in the Butana plains, mid-Eastern Sudan. *Veterinary Parasitology*, 43(3-4), 171-175. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90158-6](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90158-6)
84. Fang, W., & Latgé, J.-P. (2018). Microbe Profile : *Aspergillus fumigatus*: a saprotrophic and opportunistic fungal pathogen. *Microbiology*, 164(8), 1009-1011. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000651>
85. 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. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092>
86. Ferdeş, M., Dincă, M. N., Moiceanu, G., Zăbavă, B. Ştefania, & Paraschiv, G. (2020). Microorganisms and Enzymes Used in the Biological Pretreatment of the Substrate to Enhance Biogas Production : A Review. *Sustainability*, 12(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/su12177205>
87. Ferraz, J., Souza, L., Fernandes, A., Oliveira, M., Oliveira, J., & Franco, M. (2019). Optimization of the solid-state fermentation conditions and characterization of xylanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 using yellow mombin residue (*Spondias mombin* L.). *Chemical Engineering Communications*, 207, 1-12. <https://doi.org/10.1080/00986445.2019.1572000>
88. Fillingner, S., Chaverroche, M.-K., van Dijck, P., de Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J., & d'Enfert, C. 2001. (2001). Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 147(7), 1851-1862. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-7-1851>
89. Flórez-Pardo, L. M., González-Córdoba, A., & López-Galán, J. E. (2019). Characterization of hemicelluloses from leaves and tops of the CC 8475, CC 8592, and V 7151 varieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *DYNA*, 86(210), 98-107. <https://www.redalyc.org/journal/496/49662789012/html/>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

90. Foulds, L. R. (2011). *Optimization Techniques : An Introduction* (Softcover reprint of the original 1st ed. 1981 édition). Springer-Verlag New York Inc.
91. Fratebianchi, D., Crespo, J. M., Tari, C., & Cavalitto, S. (2017). Control of agitation rate and aeration for enhanced polygalacturonase production in submerged fermentation by *Aspergillus sojae* using agro-industrial wastes: Enhanced polygalacturonase production by controlled agitation rate and aeration. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(2), 305-310. <https://doi.org/10.1002/jctb.5006>
92. Fuller, K. K., Chen, S., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2015). Development of the CRISPR/Cas9 System for Targeted Gene Disruption in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 14(11), 1073-1080. <https://doi.org/10.1128/EC.00107-15>
93. 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. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.027>
94. Gares, M. Gares, M., Benaissa, A., Hiligsmann, S., Cherfia, R., Flahaut, S., Alloun, W., Djelid, H., Chaoua, S., & Kacem Chaouche, N. (2023). Box-Behnken design optimization of xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* on *Stipa tenacissima* biomass. *Mycologia*, 0(0), 1-19. <https://doi.org/10.1080/00275514.2023.2205331>
95. Gares, M., Hiligsmann, S., & Kacem Chaouche, N. (2020). Lignocellulosic biomass and industrial bioprocesses for the production of second generation bio-ethanol, does it have a future in Algeria? *SN Applied Sciences*, 2(10), 1680. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03442-2>
96. Garima, D., & Kumar, A. (2021). Statistical optimization of chitinase production by Box Behnken design in submerged fermentation using *Bacillus cereus* GS02 -. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 9(2), 60-66. <https://www.bibliomed.org/?mno=19469>
97. Gebruers, K., Dornez, E., Bedő, Z., Rakszegi, M., Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2010). Variability in Xylanase and Xylanase Inhibition Activities in Different Cereals in the HEALTHGRAIN Diversity Screen and Contribution of Environment and Genotype to This Variability in Common Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9362-9371. <https://doi.org/10.1021/jf100474m>
98. Gerhardt, P. (1994). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

99. GFP. (2000). *Groupe Français d'Etudes et d'Applications des Polymères Livres GFP, Les polymères naturels : Structure, modifications, applications ; Initiation à la chimie et à la physico-chimie macromoléculaires*. (1ère édition). <https://www.gfp.asso.fr/ressources/livres-gfp>
100. Ghobadi, N., Ogino, C., & Ohmura, N. (2016). Intensifying the Fermentation of in a Stirred Bioreactor Using Maxblend Impeller. *The Open Chemical Engineering Journal*, 10(1). <https://doi.org/10.2174/1874123101610010088>
101. Ghorri, S., Benslama, O., Benserradj, O., & Mihoubi, I. (2022). Application of Plackett-Burman design for the optimization of protease production by *Aspergillus niger*. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 12(4), Article 4. [https://doi.org/10.38150/sajeb.12\(4\).p515-521](https://doi.org/10.38150/sajeb.12(4).p515-521)
102. Ghosh, P., & Ghosh, U. (2017). *Statistical optimization of laccase production by Aspergillus flavus PUF5 through submerged fermentation using agro-waste as cheap substrate*. 10.
103. Goukanapalle, P. K. R., Kanderi, D. K., Rajoji, G., Shanthi Kumari, B. S., & Bontha, R. R. (2020). Optimization of cellulase production by a novel endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* TKBRR isolated from Thalakona forest. *Cellulose*, 27(11), 6299-6316. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03220-8>
104. Goyal, S., Ramawat, K. G., & Mérillon, J.-M. (2017). Different Shades of Fungal Metabolites : An Overview. In J.-M. Mérillon & K. G. Ramawat (Éds.), *Fungal Metabolites* (p. 1-29). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_34
105. Graciano, L., Candido, K. L., Jacomini, D., Simioni, B., Christ, D., Kadowaki, M. K., Silva, J. L. da C., Henn, C., Maller, A., & Simão, R. de C. G. (2020). A thermostable xylanase from a new strain of *Aspergillus fumigatus* presents high ability to hydrolyze hemicellulose from corn straw / Uma xilanase termoestável de uma nova estirpe de *Aspergillus fumigatus* apresenta elevada capacidade de hidrolisar hemicelulose a partir de palha de milho. *Brazilian Journal of Development*, 6(9), 69054-69077. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n9-377>
106. GU, X., HUA, Y.-H., ZHANG, Y.-D., BAO, D., LV, J., & HU, H.-F. (2021). The Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*, Host Defense Mechanisms, and the Development of AFMP4 Antigen as a Vaccine. *Polish Journal of Microbiology*, 70(1), 3-11. <https://doi.org/10.33073/pjm-2021-003>
107. Guiraud, J.-P. (2012). *Microbiologie alimentaire*. <https://www.dunod.com/sciences-techniques/microbiologie-alimentaire>
108. Gupta, V. K. (Éd.). (2016). *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Aspergillus system properties and applications*. Elsevier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

109. Haberra, S. (2014). *Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet*. <https://docplayer.fr/15640839-Production-optimisation-et-etude-de-xylanases-chez-une-nouvelle-souche-d-actinomycete-thermophile-isolee-du-compost-de-poulet.html>
110. Hagiwara, D., Sakai, K., Suzuki, S., Umemura, M., Nogawa, T., Kato, N., Osada, H., Watanabe, A., Kawamoto, S., Gonoï, T., & Kamei, K. (2017). Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and trypacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLOS ONE*, *12*(5), e0177050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177050>
111. Hammerer, F., Ostadjoo, S., Dietrich, K., Dumont, M.-J., Rio, L. F. D., Frišćić, T., & Auclair, K. (2020). Rapid mechanoenzymatic saccharification of lignocellulosic biomass without bulk water or chemical pre-treatment. *Green Chemistry*, *22*(12), 3877-3884. <https://doi.org/10.1039/D0GC00903B>
112. Haq, I., Qaisar, K., Nawaz, A., Akram, F., Mukhtar, H., Zohu, X., Xu, Y., Mumtaz, M., Rashid, Ts. Dr. U., Karim, A., & Choong, T. (2021). Advances in Valorization of Lignocellulosic Biomass towards Energy Generation. *Catalysts*, *11*, 309. <https://doi.org/10.3390/catal11030309>
113. He, H., Qin, Y., Li, N., Chen, G., & Liang, Z. (2015). Purification and Characterization of a Thermostable Hypothetical Xylanase from *Aspergillus oryzae* HML366. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *175*(6), 3148-3161. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1352-x>
114. He, R., Li, C., Ma, L., Zhang, D., & Chen, S. (2016). Effect of highly branched hyphal morphology on the enhanced production of cellulase in *Trichoderma reesei* DES-15. *3 Biotech*, *6*(2), 214. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0516-5>
115. Houfani, A. A., Větrovský, T., Baldrian, P., & Benallaoua, S. (2017). Efficient screening of potential cellulases and hemicellulases produced by *Bosea sp.* FBZP-16 using the combination of enzyme assays and genome analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *33*(2). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2198-x>
116. Hua, X., Zhou, X., Du, G., & Xu, Y. (2020). Resolving the formidable barrier of oxygen transferring rate (OTR) in ultrahigh-titer bioconversion/biocatalysis by a sealed-oxygen supply biotechnology (SOS). *Biotechnology for Biofuels*, *13*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1642-1>
117. Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases : An Overview and Applications. In *Cellulose*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84531>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

118. Jepsen, H. F., & Jensen, B. (2004). Accumulation of trehalose in the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* var. *Coprophilum* in response to heat or salt stress. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(10), 1669-1674. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.010>
119. Jin, F.-J., Wang, B.-T., Wang, Z.-D., Jin, L., & Han, P. (2022). CRISPR/Cas9-Based Genome Editing and Its Application in *Aspergillus* Species. *Journal of Fungi*, 8(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/jof8050467>
120. Jones, J. M., Lea-Langton, A. R., Ma, L., Pourkashanian, M., & Williams, A. (2012). *Pollutants Generated by the Combustion of Solid Biomass Fuels* | Jenny M Jones | Springer. [//www.springer.com/la/book/9781447164364](http://www.springer.com/la/book/9781447164364)
121. Karlapudi, A. P., Krupanidhi, S. (2018). Plackett-Burman design for screening of process components and their effects on production of lactase by newly isolated *Bacillus* sp. VUVD101 strain from Dairy effluent. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(4), 543-546. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.06.006>
122. Karmakar, M., & Ray, R. (2011). Statistical optimization of FPase production from water hyacinth using *Rhizopus oryzae* PR 7. *Journal of Biochemical Technology*, 3.
123. Kelly, S., Grimm, L. H., Hengstler, J., Schultheis, E., Krull, R., & Hempel, D. C. (2004). Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(5), 315-323. <https://doi.org/10.1007/s00449-004-0368-y>
124. Kerbachi, R., Oucher, N., Bitouche, A., Berkouki, N., & Demri. (2009). *Pollution par les particules fines dans l'agglomération d'Alger*. <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.univ-tebessa.dz/fichiers/ENP/Rabah%2520Kerbachi.pdf>
125. Khan, M., Ahmad, T., Yasmeen, R., & Imran, M. (2020). Optimization of *Aspergillus Tubingensis* Growth for Cellulase Production. *Pakistan journal of science*, 72, 221-229.
126. Kjærboelling, I., Vesth, T., Frisvad, J. C., Nybo, J. L., Theobald, S., Kildgaard, S., Petersen, T. I., Kuo, A., Sato, A., Lyhne, E. K., Kogle, M. E., Wiebenga, A., Kun, R. S., Lubbers, R. J. M., Mäkelä, M. R., Barry, K., Chovatia, M., Clum, A., Daum, C., Andersen, M. R. (2020). A comparative genomics study of 23 *Aspergillus* species from section Flavi. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14051-y>
127. Kosseva, M. R., & Webb, C. (Éds.). (2020). Contents. In *Food Industry Wastes (Second Edition)* (p. v-viii). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817121-9.00025-5>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

128. Kpogbemabou, D. (2011). *Procédé de fabrication de biocarburants à partir de biomasse lignocellulosique biologiquement déstructurée* [These de doctorat, Poitiers]. <http://www.theses.fr/2011POIT2267>
129. Kumar, V., Singh, S., & Singh, J. (2018). *Fungal Biotechnology : Role and Aspects Current Perspectives* (p. 91-103).
130. Kusari, S., Lamshöft, M., & Spiteller, M. (2009). *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 1019-1030. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04285.x>
131. Lakshmi, G. S., Paruchuru, L., & reddy shetty, P. (2011). Sustainable bioprocess evaluation for xylanase production by isolated *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* under solid—State fermentation using oil palm empty fruit bunch fiber. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 5, 1434-1444.
132. Lekounougou, S.-T. (2018). *Evaluation et compréhension des mécanismes fongiques impliqués dans la dégradation du bois*. 187.
133. Li, Y., Ruan, R., Chen, P. L., Liu, Z., Pan, X., Lin, X., Liu, Y., Mok, C. K., & Yang, T. (2004). Enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated by combined dilute alkaline treatment and homogenization. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 47(3), 821-825. <https://experts.umn.edu/en/publications/enzymatic-hydrolysis-of-corn-stover-pretreated-by-combined-dilute>
134. Lin, T.-C., & Chen, C. (2004). Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger* NCH-189 using defatted copra based media. *Process Biochemistry*, 39, 1103-1109. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00218-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00218-8)
135. Liu, K., Du, H., Zheng, T., Liu, H., Zhang, M., Zhang, R., Li, H., Xie, H., Zhang, X., Ma, M., & Si, C. (2021). Recent advances in cellulose and its derivatives for oilfield applications. *Carbohydrate Polymers*, 259, 117740. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117740>
136. Liu, Q., Gao, R., Li, J., Lin, L., Zhao, J., Sun, W., & Tian, C. (2017). Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain engineering. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0693-9>
137. Liu, W., Liu, C., Gogoi, P., & Deng, Y. (2020). Overview of Biomass Conversion to Electricity and Hydrogen and Recent Developments in Low-Temperature Electrochemical Approaches. *Engineering*, 6(12), 1351-1363. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.02.021>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

138. Liu, X. (2016). *Valorisation énergétique de la biomasse lignocellulosique par digestion anaérobie : Prétraitement fongique aérobie*. 248.
139. Lodha, A., Pawar, S., & Rathod, V. (2020). Optimised cellulase production from fungal co-culture of *Trichoderma reesei* NCIM 1186 and *Penicillium citrinum* NCIM 768 under solid state fermentation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 103958. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103958>
140. Lübeck, M., & Lübeck, P. S. (2022). Fungal Cell Factories for Efficient and Sustainable Production of Proteins and Peptides. *Microorganisms*, 10(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040753>
141. Magar, S. T. (2021, septembre 14). *Fed-batch Culture- Definition, Principle, Process, Types, Applications, Limitations*. Microbe Notes. <https://microbenotes.com/fed-batch-culture/>
142. Mahmood, Z., Yameen, M., Jahangeer, M., Riaz, M., Ghaffar, A., & Javid, I. (2018). Lignin as Natural Antioxidant Capacity. In *Lignin—Trends and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73284>
143. Makhlof, A. (2018). Méthodologie pour l'optimisation dynamique multicritère d'un procédé discontinu alimenté : Application à la production bactérienne d'arômes laitiers. *Alimentation et Nutrition*. Institut National Polytechnique de Lorraine, 203.
144. Mantas, svazas, Navickas, V., KrajHáková, E., & Nakonieczny, J. (2019). Sustainable supply chain of the biomass cluster as a factor for preservation and enhancement of forests. *Journal of International Studies*.
145. Marrakchi, Z., Khiari, R., Oueslati, H., Mauret, E., & Mhenni, F. (2011). Pulping and papermaking properties of Tunisian Alfa stems (*Stipa tenacissima*)—Effects of refining process. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1572-1582. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.05.022>
146. Martău, G.-A., Unger, P., Schneider, R., Venus, J., Vodnar, D. C., & López-Gómez, J. P. (2021). Integration of Solid State and Submerged Fermentations for the Valorization of Organic Municipal Solid Waste. *Journal of Fungi*, 7(9), 766. <https://doi.org/10.3390/jof7090766>
147. Mehta, R., Singhal, P., Singh, H., Damle, D., & Sharma, A. K. (2016). Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech*, 6(1), 81. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0368-z>
148. Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar | Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry*. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60147a030>
149. Ministère de l'Énergie. (2021). *Ministère de l'Énergie | Algérie*. <https://www.energy.gov.dz/?article=bilan-energetique-national-du-secteur>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

150. Moloney, A. P., McCrae, S. I., Wood, T. M., & Coughlan, M. P. (1985). Isolation and characterization of the 1,4-beta-D-glucan glucanohydrolases of *Talaromyces emersonii*. *The Biochemical Journal*, 225(2), 365-374. <https://doi.org/10.1042/bj2250365>
151. Mondal, S., Soren, J. P., Mondal, J., Rakshit, S., Kumar Halder, S., & Mondal, K. C. (2020). Contemporaneous synthesis of multiple carbohydrate debranching enzymes from newly isolated *Aspergillus fumigatus* SKF-2 under solid state fermentation : A unique enzyme mixture for proficient saccharification of plant bioresources. *Industrial Crops and Products*, 150, 112409. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112409>
152. Morán-Aguilar, M. G., Calderón-Santoyo, M., Domínguez, J. M., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2021). Optimization of cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* CECT 2700 using brewery spent grain based on Taguchi design. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01808-z>
153. Mrudula, S., & Murugammal, R. (2011). Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 1119-1127. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300033>
154. Musoni, M., Destain, J., Thonart, P., Bahama, J.-B., & Delvigne, F. (2015). Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites : From traditional methods to engineered systems. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13.
155. Naganthran, A., Masomian, M., Rahman, R. N. Z. R. A., Ali, M. S. M., & Nooh, H. M. (2017). Improving the Efficiency of New Automatic Dishwashing Detergent Formulation by Addition of Thermostable Lipase, Protease and Amylase. *Molecules*, 22(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/molecules22091577>
156. Namnuch, N., Thammasittirong, A., & Thammasittirong, S. N.-R. (2021). Lignocellulose hydrolytic enzymes production by *Aspergillus flavus* KUB2 using submerged fermentation of sugarcane bagasse waste. *Mycology*, 12(2), 119-127. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1806938>
157. Naraiyan, R., & Gautam, R. L. (2018). Chapter 6—*Penicillium* Enzymes for the Saccharification of Lignocellulosic Feedstocks. In V. K. Gupta & S. Rodriguez-Couto (Éds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (p. 121-136). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00006-5>
158. Nevalainen, H. (2020). *Grand challenges in fungal biotechnology*. Springer, Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

159. Nevalainen, H., & Peterson, R. (2014). Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00075>
160. Newman, R., H., Ha, M., A., & Melton, L., d. (1994). Solid-state ¹³C NMR investigation of molecular ordering in the cellulose of apple cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Solid-state+13C+NMR+investigation+of+molecular+ordering+in+the+cellulose+of+apple+cell+wall+s.&author=Newman+R.H.&publication_year=1994
161. Nieland, S., Barig, S., Salzmann, J., Gehrau, F., Zamani, A. I., Richter, A., Ibrahim, J., Gräser, Y., Ng, C. L., & Stahmann, K.-P. (2021). *Aspergillus fumigatus* AR04 obeys Arrhenius' rule in cultivation temperature shifts from 30 to 40°C. *Microbial Biotechnology*, 14(4), 1422-1432. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13739>
162. Nighojkar, A., Patidar, M. K., & Nighojkar, S. (2019). 8 - Pectinases : Production and Applications for Fruit Juice Beverages. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Éds.), *Processing and Sustainability of Beverages* (p. 235-273). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815259-1.00008-2>
163. Nishio, N., Tai, K., & Nagai, S. (1979). Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 8(4), 263-270. <https://doi.org/10.1007/BF00508790>
164. Nordmann, V. (2013). *Caractérisation et impact des différentes fractions d'une biomasse lignocellulosique pour améliorer les prétraitements favorisant sa méthanisation : Utilisation de la paille de blé comme biomasse lignocellulosique d'étude* [These de doctorat, Bordeaux 1]. <http://www.theses.fr/2013BOR15247>
165. O'Gorman, C. M., Fuller, H. T., & Dyer, P. S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457(7228), 471-474. <https://doi.org/10.1038/nature07528>
166. Olanbiwoninu, A. A., & Odunfa, S. A. (2016). Production of Cellulase and Xylanase by *Aspergillus terreus* KJ829487 Using Cassava Peels as Substrates. *Advances in Microbiology*, 6(7), Article 7. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.67050>
167. Oliveira, S. D., de Araújo Padilha, C. E., Asevedo, E. A., Pimentel, V. C., de Araújo, F. R., de Macedo, G. R., & dos Santos, E. S. (2018). Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(1), 937-944. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.12.038>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

168. Ortiz, G. E., Guitart, M. E., Cavalitto, S. F., Albertó, E. O., Fernández-Lahore, M., & Blasco, M. (2015). Characterization, optimization, and scale-up of cellulases production by *trichoderma reesei* cbs 836.91 in solid-state fermentation using agro-industrial products. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(11), 2117-2128. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1451-2>
169. Østby, H., Hansen, L. D., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H., & Várnai, A. (2020). Enzymatic processing of lignocellulosic biomass : Principles, recent advances and perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 47(9), 623-657. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02301-8>
170. Ouedraogo, J.-P., & Tsang, A. (2021). Production of Native and Recombinant Enzymes by Fungi for Industrial Applications. In Ó. Zaragoza & A. Casadevall (Éds.), *Encyclopedia of Mycology* (p. 222-232). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819990-9.00046-9>
171. Papagianni, M., Mattey, M., & Kristiansen, B. (2003). Design of a tubular loop bioreactor for scale-up and scale-down of fermentation processes. *Biotechnology Progress*, 19(5), 1498-1504. <https://doi.org/10.1021/bp030002y>
172. Park, S., Venditti, R. A., Abrecht, D. G., Jameel, H., Pawlak, J. J., & Lee, J. M. (2007). Surface and pore structure modification of cellulose fibers through cellulase treatment. *Journal of Applied Polymer Science*, 103(6), 3833-3839. <https://doi.org/10.1002/app.25457>
173. Pasma, S. A., Daik, R., Maskat, M. Y., & Hassan, O. (2013). Application of Box-Behnken Design in Optimization of Glucose Production from Oil Palm Empty Fruit Bunch Cellulose. *International Journal of Polymer Science*, 2013, e104502. <https://doi.org/10.1155/2013/104502>
174. 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. <https://www.phytojournal.com/archives/?year=2017&vol=6&issue=6&ArticleId=2307>
175. Paul, M., Nayak, D. P., & Thatoi, H. (2020). Optimization of xylanase from *Pseudomonas mohnii* isolated from Simlipal Biosphere Reserve, Odisha, using response surface methodology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00099-7>
176. Peixoto-Nogueira, S., Michelin, M., Betini, J., Jorge, J., Terenzi, H., & Polizeli, M. de L. (2009). Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources : Application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 149-155. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0482-y>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

177. Perrin, J. (2020). *Conservation des souches congélations*. http://www.perrin33.com/genie_ferment/conservation_souches_congelation.php
178. Pfeifer, L., & Classen, B. (2020). The Cell Wall of Seagrasses : Fascinating, Peculiar and a Blank Canvas for Future Research. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.588754>
179. Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). THE DESIGN OF OPTIMUM MULTIFACTORIAL EXPERIMENTS. *Biometrika*, 33(4), 305-325. <https://doi.org/10.1093/biomet/33.4.305>
180. Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi : Properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577-591. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
181. Popp, J., Kovács, S., Oláh, J., Divéki, Z., & Balázs, E. (2021). Bioeconomy : Biomass and biomass-based energy supply and demand. *New Biotechnology*, 60, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.10.004>
182. Pradeep, G., c, Choi, Y. H., Choi, Y. S., Seong, C. N., Cho, S. S., Lee, H. J., & Yoo, J. C. (2013). A novel thermostable cellulase free xylanase stable in broad range of pH from *Streptomyces sp.* CS428. *Process Biochemistry*, 48(8), 1188-1196. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.007>
183. Prasertsan, P., Kittikul, A. H.-, Kungphae, A., Maneesri, J., & Oi, S. (1997). Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATTC 6275 in palm oil mill wastes and its application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(5), 555-559. <https://doi.org/10.1023/A:1018569426594>
184. Prevot, V. (2013). *Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide*. 159.
185. Puértolas-Balint, F., Rossen, J. W. A., Oliveira dos Santos, C., Chlebowicz, M. M. A., Raangs, E. C., van Putten, M. L., Sola-Campoy, P. J., Han, L., Schmidt, M., & García-Cobos, S. (2019). Revealing the Virulence Potential of Clinical and Environmental *Aspergillus fumigatus* Isolates Using Whole-Genome Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01970>
186. Renge, V. C., Khedkar, S. V., & Nandurkar, N. R. (2012). *ENZYME SYNTHESIS BY FERMENTATION METHOD : A REVIEW*. 6.
187. Reports and Data. (2021). *Xylanase Market*. Food and Beverage. <https://www.reportsanddata.com/report-detail/xylanase-market>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

188. Rhanem, M. (2009). L'alfa (*Stipa tenacissima* L.) dans la plaine de Midelt (haut bassin versant de la Moulouya, Maroc) – Éléments de climatologie. *Physio-Géo. Géographie physique et environnement, Volume 3*, Article Volume 3. <https://doi.org/10.4000/physio-geo.696>
189. Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G. H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., Mouriño-Pérez, R. R., Takeshita, N., & Fischer, R. (2018). Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 82(2), e00068-17. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00068-17>
190. Robledo, A., Aguilar, C. N., Belmares-Cerda, R. E., Flores-Gallegos, A. C., Contreras-Esquivel, J. C., Montañez, J. C., & Mussatto, S. I. (2016). Production of thermostable xylanase by thermophilic fungal strains isolated from maize silage. *CyTA - Journal of Food*, 14(2), 302-308. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1105298>
191. Rohde, R. (1978). W. F. HARRIGAN and MARGARET F. McCANCE (Editors), Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology (Revised Edition). 452 S., 24 Abb. London-New York-San Francisco 1976. Academic Press. £ 9.20. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*, 18(3), 226-227. <https://doi.org/10.1002/jobm.19780180316>
192. Roig, F. (2011). *Transitions et dynamique relaxationnelle de polymères issus de la paroi végétale* [These de doctorat, Toulouse 3]. <http://www.theses.fr/2011TOU30089>
193. Saidur, R., Abdelaziz, E. A., Demirbas, A., Hossain, M. S., & Mekhilef, S. (2011). A review on biomass as a fuel for boilers. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(5), 2262-2289. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.02.015>
194. Sakamoto, K., Iwashita, K., Yamada, O., Kobayashi, K., Mizuno, A., Akita, O., Mikami, S., Shimoi, H., & Gomi, K. (2009). *Aspergillus oryzae* atfA controls conidial germination and stress tolerance. *Fungal Genetics and Biology*, 46(12), 887-897. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.09.004>
195. Sakekar, A. A., Gaikwad, S. R., & Punekar, N. S. (2021). Protein expression and secretion by filamentous fungi. *Journal of Biosciences*, 46(1), 5. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00120-8>
196. Samanthi. (2019). *Difference Between Solid State Fermentation and Submerged Fermentation. Compare the Difference Between Similar Terms.* <https://www.differencebetween.com/difference-between-solid-state-fermentation-and-submerged-fermentation/>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

197. Samson, R. A., & Reenen-Hoekstra, E. S. van. (1988). *Introduction to food-borne fungi* (3rd ed). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
198. Sartori, T., Tibolla, H., Prigol, E., Colla, L. M., Costa, J. A. V., & Bertolin, T. E. (2015). Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Residues by Cellulases Obtained from Solid State Fermentation Using *Trichoderma viride*. *BioMed Research International*, 2015, e342716. <https://doi.org/10.1155/2015/342716>
199. Savino, S., Bulgari, D., Monti, E., & Gobbi, E. (2021). Agro-Industrial Wastes : A Substrate for Multi-Enzymes Production by *Cryphonectria parasitica*. *Fermentation*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040279>
200. Seemakram, W., Boonrung, S., Aimi, T., Ekprasert, J., Lumyong, S., & Boonlue, S. (2020). Purification, characterization and partial amino acid sequences of thermo-alkali-stable and mercury ion-tolerant xylanase from *Thermomyces dupontii* KKU-CLD-E2-3. *Scientific Reports*, 10(1), 21663. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78670-y>
201. Semhaoui, I., Zarguili, I., Rezzoug, S. A., Maugard, T., Zhao, J. M. Q., Toyir, J., Nawdali, M., & Maache-Rezzoug, Z. (2017). Bioconversion of Moroccan Alfa (*Stipa Tenacissima*) by Thermomechanical Pretreatment Combined to Acid or Alkali Spraying for Ethanol Production. *Journal of Materials*, 8(8), 2619-2631. https://www.jmaterenvironsci.com/Document/vol8/vol8_N8/282-JMES-Semhaoui.pdf
202. Sen, R., & Swaminathan, T. (2004). Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochemical Engineering Journal*, 21(2), 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.06.006>
203. Shah, A., Patel, H., & Narra, M. (2016). Bioproduction of Fungal Cellulases and Hemicellulases Through Solid State Fermentation. In J.-M. Merillon & K. G. Ramawat (Éds.), *Fungal Metabolites* (p. 1-45). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19456-1_7-1
204. Shahbazi, A., & Zhang, B. (2010). 5—Dilute and concentrated acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. In K. Waldron (Éd.), *Bioalcohol Production* (p. 143-158). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845699611.2.143>
205. Sherief, A. A., El-Tanash, A. B., & Atia, N. (2010). Cellulase Production by *Aspergillus fumigatus* Grown on Mixed Substrate of Rice Straw and Wheat Bran—SciAlert Responsive Version. *Research Journal of Microbiology*, 5: 199-211. <https://doi.org/10.3923/jm.2010.199.211>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

206. Shruthi, K., Yadav, P., Prasad, B., & Chandra, M. (2018). Cellulase production by *Aspergillus unguis* in solid state fermentation. *Journal of Forestry Research*, 30. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0619-4>
207. Silva, T. P., Ferreira, A. N., de Albuquerque, F. S., de Almeida Barros, A. C., da Luz, J. M. R., Gomes, F. S., & Pereira, H. J. V. (2021). Box–Behnken experimental design for the optimization of enzymatic saccharification of wheat bran. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01378-0>
208. Simon, F. (2020, mars 13). Six États membres veulent 100% d'énergies renouvelables pour 2050. *www.euractiv.fr*. <https://www.euractiv.fr/section/energie/news/six-eu-countries-join-call-for-100-renewable-energy-scenario/>
209. Singh, A., Toor, M., Yadav, A., & Bishnoi, N. (2012). Statistical screening and optimization of process variables for xylanase production utilizing alkali-pretreated rice husk. *Annals of Microbiology*, 63. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0482-z>
210. 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, 505-512. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000400004>
211. Singh, S., Tyagi, C. H., Dutt, D., & Upadhyaya, J. S. (2009). Production of high level of cellulase-poor xylanases by wild strains of white-rot fungus *Coprinellus disseminatus* in solid-state fermentation. *New Biotechnology*, 26(3-4), 165-170. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.09.004>
212. Singhanian, R., Sukumaran, R., & Pandey, A. (2007). Improved Cellulase Production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF Through Process Optimization. *Applied biochemistry and biotechnology*, 142, 60-70. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0019-2>
213. Siqueira, J. G. W., Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P. de S., Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2020). Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. *Biomass and Bioenergy*, 132, 105419. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>
214. Son, Y.-E., & Park, H.-S. (2021). Genetic Manipulation and Transformation Methods for *Aspergillus spp.* *Mycobiology*, 49(2), 95-104. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1838115>
215. Steudler, S., Werner, A., & Walther, T. (2019). It Is the Mix that Matters : Substrate-Specific Enzyme Production from Filamentous Fungi and Bacteria Through Solid-State Fermentation. In

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- S. Steudler, A. Werner, & J. J. Cheng (Éds.), *Solid State Fermentation* (Vol. 169, p. 51-81). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2019_85
216. Stevenson, F. J. (1994). *Humus Chemistry : Genesis, Composition, Reactions, 2nd Edition* / Wiley: Vol. 512 Pages. <https://www.wiley.com/en-us/Humus+Chemistry%3A+Genesis%2C+Composition%2C+Reactions%2C+2nd+Edition-p-9780471594741>
217. Sun, R. C. (2010). *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels : Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose* (1st edition). Elsevier.
218. Sun, R.-C. (2020). Lignin Source and Structural Characterization. *ChemSusChem*, 13(17), 4385-4393. <https://doi.org/10.1002/cssc.202001324>
219. Sun, T., Yan, P., Zhan, N., Zhang, L., Chen, Z., Zhang, A., & Shan, A. (2020). The optimization of fermentation conditions for *Pichia pastoris* GS115 producing recombinant xylanase. *Engineering in Life Sciences*, 20(5-6), 216-228. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900116>
220. Sun, X., & Su, X. (2019). Harnessing the knowledge of protein secretion for enhanced protein production in filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(4), 54. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2630-0>
221. Świątek, K., Gaag, S., Klier, A., Kruse, A., Sauer, J., & Steinbach, D. (2020). Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Sugars and Furfurals Formation. *Catalysts*, 10(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/catal10040437>
222. Tai, W. Y., Tan, J. S., Lim, V., & Lee, C. K. (2019). Comprehensive studies on optimization of cellulase and xylanase production by a local indigenous fungus strain via solid state fermentation using oil palm frond as substrate. *Biotechnology Progress*, 35(3), e2781. <https://doi.org/10.1002/btpr.2781>
223. Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777-780. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC241917/>
224. Tsukahara, T. (1977). Studies on Heat Resistance of Conidiospores of *Aspergillus fumigatus*. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 18(2), 112-118. <https://doi.org/10.3314/jjmm1960.18.112>
225. Ul- Haq, I., Roheena, A., Hamad, A., & Athar, H. S. (2002). *Isolation and Screening of Fungi for the Biosynthesis of Alpha Amylase*. <https://doi.org/10.3923/biotech.2002.61.66>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

226. Usher, J. (2019). The Mechanisms of Mating in Pathogenic Fungi—A Plastic Trait. *Genes*, *10*, 831. <https://doi.org/10.3390/genes10100831>
227. Van den brule, T., Punt, M., Teertstra, W., Houbraeken, J., Wösten, H., & Dijksterhuis, J. (2020). The most heat-resistant conidia observed to date are formed by distinct strains of *Paecilomyces variotii*. *Environmental Microbiology*, *22*(3), 986-999. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14791>
228. van Rhijn, N., Furukawa, T., Zhao, C., McCann, B. L., Bignell, E., & Bromley, M. J. (2020). Development of a marker-free mutagenesis system using CRISPR-Cas9 in the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, *145*, 103479. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103479>
229. Verma, N., & Kumar, V. (2019). Application of Box–Behnken design for the optimization of cellulase production under solid-state fermentation. *SN Applied Sciences*, *1*(12), 1733. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1779-3>
230. Vimalashanmugam, K., & Viruthagiri, T. (2013). *OPTIMIZATION OF MINERAL NUTRIENT SUPPLEMENTS FOR THE PRODUCTION OF XYLANASE BY ASPERGILLUS NIGER UNDER SSF USING CENTRAL COMPOSITE DESIGN*.
231. Vong, O. (2020, octobre 12). Champignon du mois—Octobre 2020. *Société Française de Microbiologie*. <https://www.sfm-microbiologie.org/2020/10/12/champignon-du-mois-octobre-2020/>
232. Wang, B.-T., Hu, S., Yu, X.-Y., Jin, L., Zhu, Y.-J., & Jin, F.-J. (2020). Studies of Cellulose and Starch Utilization and the Regulatory Mechanisms of Related Enzymes in Fungi. *Polymers*, *12*(3), 530. <https://doi.org/10.3390/polym12030530>
233. Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., & Moo-Young, M. (2003). Effects of process parameters on heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *78*, 1259-1266. <https://doi.org/10.1002/jctb.898>
234. Wertz, J.-L. (2011). Les hémicelluloses. *Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège*, 16.
235. WHO. (2016). *CLIMATE AND HEALTH COUNTRY PROFILE – 2015 ALGERIA*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246137/WHO-FWC-PHE-EPE-15.32-eng.pdf;jsessionid=995BF4FE702CE54591C6198D398B9570?sequence=1>
236. Wyatt, T. T., Wösten, H. A. B., & Dijksterhuis, J. (2013). Chapter Two—Fungal Spores for Dispersion in Space and Time. In S. Sariaslani & G. M. Gadd (Éds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 85, p. 43-91). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00002-2>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

237. Xie, C., Yan, L., Gong, W., Zhu, Z., Tan, S., Chen, D., Hu, Z., & Peng, Y. (2016). Effects of Different Substrates on Lignocellulosic Enzyme Expression, Enzyme Activity, Substrate Utilization and Biological Efficiency of *Pleurotus eryngii*. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 39(4), 1479-1494. <https://doi.org/10.1159/000447851>
238. Xin, F., & Geng, A. (2010). Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(1), 295-306. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8745-2>
239. Xu, F. (2010). Structure, Ultrastructure, and Chemical Composition. In *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels* (p. 9-47). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53234-3.00002-X>
240. Yadav, J. S. (1988). SSF of wheat straw with alcaliphilic *Coprinus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(5), 414-417. <https://doi.org/10.1002/bit.260310504>
241. Yang, C., & Lü, X. (2021). Chapter 5—Composition of plant biomass and its impact on pretreatment. In X. Lü (Éd.), *Advances in 2nd Generation of Bioethanol Production* (p. 71-85). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818862-0.00002-9>
242. Yegin, S., Buyukkileci, A. O., Sargin, S., & Goksungur, Y. (2017). Exploitation of Agricultural Wastes and By-Products for Production of *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 Xylanase : Screening, Bioprocess Optimization and Scale Up. *Waste and Biomass Valorization*, 8(3), 999-1010. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9646-6>
243. Yeh, A.-I., Huang, Y.-C., & Chen, S. (2010). Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 79, 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.049>
244. Zaafour, K., Ziadi, M., Ben Farah, R., Farid, M., Hamdi, M., & Regaya, I. (2016). Potential of Tunisian Alfa (*Stipa tenassicima*) fibers for energy recovery to 2G bioethanol : Study of pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 94, 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.08.008>
245. Zhang, C., Meng, X., Wei, X., & Lu, L. (2016). Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 86, 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.007>

Annexe

ANNEXE

9 Annexe

9.1 Milieux de culture

Milieux minimal CMC (en g/L)

- CMC : 10
- NaNO₃ : 1.2
- KH₂PO₄ : 3
- K₂HPO₄ : 6
- MgSO₄. 7H₂O : 0.2
- CaCl₂ : 0.05
- MnSO₄.7H₂O : 0.01
- ZnSO₄.7H₂O : 0.001
- pH 7

Stérilisation 20 min à 120 °C

Milieu minimal modifié (en g/L)

- Peptone : 0.1
- NaNO₃ : 1.2
- KH₂PO₄ : 3
- K₂HPO₄ : 6
- MgSO 7H₂O : 0.2
- CaCl₂ : 0.05
- MnSO₄ 7H₂O : 0.01
- ZnSO₄ 7H₂O : 0.001
- tween80 : 0.1 mL

Milieu 863 (en g/L)

- Glucose : 10
- Extrait de levure : 10
- Peptone : 10

Milieu PDA

Extrait de pomme de terre : 1000 mL

Dextrose : 20g

Agar 15g

Extrait de pomme de terre : laver et couper 200g de pommes de terre non épluchées. Les mettre dans un litre d'eau distillée et faire bouillir pendant une heure. Ecraser, filtrer et compléter un litre.

ANNEXE

9.2 Réactifs et colorant

Rouge de Congo (100 mL)

- 3 g de Rouge Congo
- 98 mL distillée
- 2 mL d'ammoniaque

Réactif DNS selon Coughlan & Moloney (Moloney et al., 1985) en g/L

- Acide dinitrosalicylique (DNS) : 10
- NaOH 0.5 N: 800 ml
- Sodium potassium tartrate (sel de Rochelle) : 300

Filtrer le mélange à l'aide d'un filtre en papier et compléter le volume à 1000 mL avec de l'eau distillée.

Conserver dans une bouteille en verre foncé à une température inférieure à 20 °C.

Solution substrat xylan/CMC (en g/L de tampon phosphate)

1 g de Na-CMC/xylane beech wood est dissous à froid dans 100 mL de tampon phosphate 50 mM (pH 7.0).

Tampon phosphate 50mM, pH 7,0

Dans un bécher contenant 800 ml d'eau distillée, on ajoute

Disodium phosphate $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 7.744 g.

Monosodium phosphate $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 2.913 g.

Ajuster le pH à 7 en utilisant HCl ou NaOH.

Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 1 L.

Tampon phosphate 0,1 M, pH 5,5 (en g/L)

Monopotassium phosphate KH_2PO_4 : 12.9 g

Monosodium phosphate Na_2HPO_4 : 0.63 g

Azoture de sodium NaN_3 : 0.5 g

Tampon acetate 0.1M pH4

Dans un bécher contenant 80 ml d'eau distillée, on ajoute

Sodium acétate $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$: 0.186 g.

ANNEXE

Acide acétique CH_3COOH : 0.464 g.

Ajuster le pH à 4 en utilisant 10N HCL.

Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 100ml.

Tampon Glycine-NAOH pH 10

Dans un bécher contenant 80 ml d'eau distillée, on ajoute

Glycine $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$: 601 mg

Sodium hydroxide NaOH : 205 mg

Ajuster le pH à 10 en utilisant des pastilles de NaOH

Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 100 mL.

ANNEXE

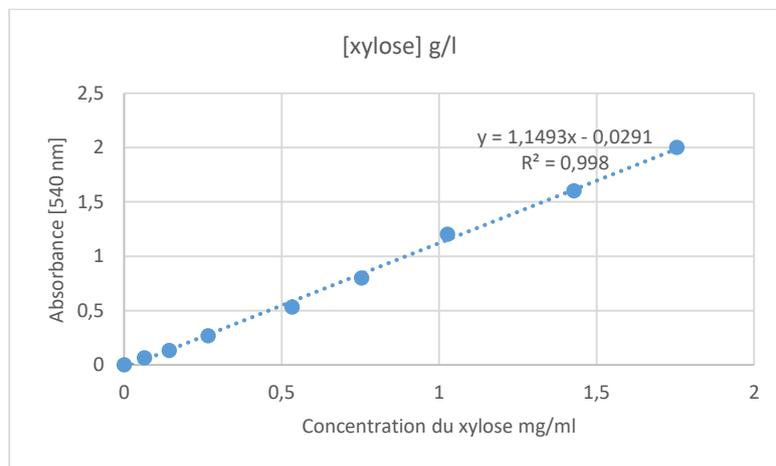
9.3 Méthode de détermination de l'activité enzymatique « dosage au DNS »

- **Mélange réactionnel**

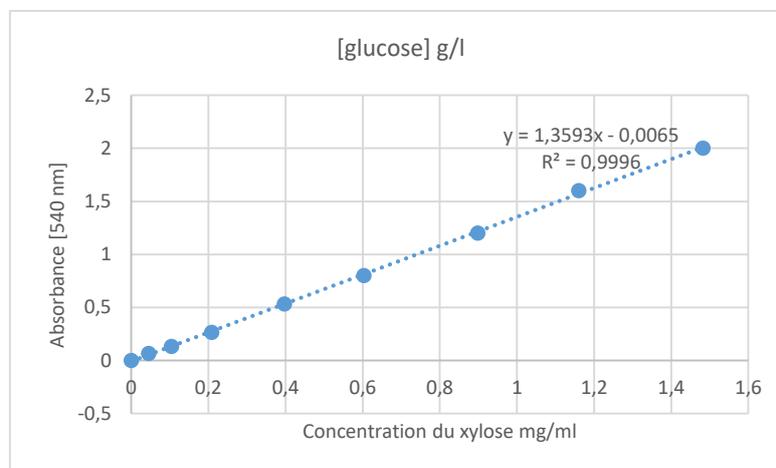
Un volume de 100 μL du contrôle enzymatique, de solution standard ou d'échantillon est mélangé avec 900 μL de substrat suivi d'une incubation à 50°C pendant 5 min. La réaction enzymatique est stoppée avec 1,5 ml de DNS et incubée à 100°C pendant 5 min. Les échantillons sont refroidis pendant 20 min et mesurés par spectrophotomètre à 540 nm. L'exposition des échantillons à la lumière vive devrait être évitée à toutes les étapes.

- **Courbes d'étalonnages**

Courbe étalonnage de la xylose pour l'activité xylanase



Courbe étalonnage du glucose pour l'activité cellulase



ANNEXE

Les valeurs d'absorbance mesurées sont converties en équivalents xylose ou glucose selon la courbe standard. Les courbes d'étalonnages sont basées sur la xylose ou le glucose, selon les mesures enzymatiques à effectuer. Les étalons de références de xylose/glucose couvrent la plage de 0.066 à 2 mg/mL et au moins 8 points ont été considérés. La ligne résultante correspond aux mesures avec un R^2 qui doit être supérieur à 0,99.

La relation linéaire entre l'absorbance et la quantité de sucres des solutions étalons permet d'établir une relation mathématique liant ces deux valeurs.

- **Mesure de l'activité enzymatique**

L'activité enzymatique est calculée comme suit (Bailey et al., 1992; Miller, 1959) :

$$\text{Activité enzymatique U/mL} = \frac{\frac{\text{mg de glucose libéré}}{\text{masse molaire du substrat}}}{\text{Volume de l'échantillon} \times \text{Temps de réaction}}$$

Remarque : 1 unité (U) est la quantité d'enzyme qui catalyse la réaction de 1 μmol de substrat/ minute.

Nom et prénom : GARES Maroua

Date de soutenance :

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

Intitulé : Recherche de micro-organismes producteurs d'hémi-cellulases à partir de la biomasse lignocellulosique ; valorisation des hémicelluloses dans les domaines des bio-polymères et les fermentations non agro-alimentaires

Résumé : L'objectif majeur de ce travail est de rechercher des microorganismes capables de dégrader la biomasse lignocellulosique en vue de sa valorisation par des enzymes lignocellulosiques et plus particulièrement, l'hémicellulase. L'exploration des échantillons du sol en provenance de deux forêts et d'une ancienne décharge à Constantine (Algérie), a abouti à la sélection de 16 isolats microbiens. Un seul isolat de moisissure (MGA) est sélectionné pour sa forte activité cellulosique et hémicellulosique. L'identification moléculaire de MGA a révélé qu'il s'agissait d'*Aspergillus fumigatus* ON226990. La souche sélectionnée a, par la suite, fait l'objet d'une étude en scaling-up afin de tester sa capacité à croître et à produire de l'hémicellulase à grande échelle. *A. fumigatus* a montré une aptitude à se développer dans un milieu liquide à base de xylose comme substrat, dans des Erlenmeyers de 250 mL, des bioréacteurs de 2 et de 20 litres. De plus, trois vitesses d'agitations : 350, 500 et 650 rpm ont été testées dans le bioréacteur de 2 L afin de suivre l'impact de l'effet du cisaillement sur la morphologie d'*A. fumigatus*. En effet, **cette souche a présenté une certaine « robustesse » face au cisaillement susceptible d'apparaître à l'échelle industrielle** ; en augmentant la vitesse d'agitation à 500 rpm, la moisissure forme des micros-pellettes libres assurant une bonne homogénéité dans le milieu de culture. En revanche, à des vitesses d'agitation inférieures à 300 rpm, le mycélium se développe sous forme de macro-pellettes. De plus, selon les analyses HPLC, *A. fumigatus* a montré un potentiel de production très élevé d'endo-1,4- β -xylanase et de xylane 1,4- β xylosidase, et ce, durant une fermentation en bioréacteur de 2 L à base de xylan de maïs comme substrat. Le procédé de production en milieu liquide, demeure très coûteux à cause du prix élevé du substrat pur. De ce fait, l'intérêt est réorienté vers la valorisation de *Stipa tenacissima* (Alfa) comme matière première pour la production de l'hémicellulase par *A. fumigatus*. **Il est important de mettre en exergue, que ce travail est le premier à avoir exploité l'Alfa comme matière première pour la production d'enzymes sans prétraitement chimique par *A. fumigatus*.** Pour ce faire, les polymères des échantillons d'Alfa ont été analysés par des méthodes chimiques (acide fort et acide dilué). En effet, les résultats obtenus par analyse HPLC montrent que cette herbe est, principalement, composée de 46-44% de cellulose et de 12.5-13.33% d'hémicellulose. Sur un autre volet, des expériences ont été planifiées statistiquement avec la conception Box-Behnken pour optimiser la production de xylanase et de cellulase par *A. fumigatus*, en utilisant l'Alfa comme seule source de carbone, où les entrants sont ; le pH, la température, l'humidité et le temps d'incubation. Les conditions optimales établies par la méthode de surface de réponse pour une production maximale de xylanase (841,78 U/gds) sont : pH ; 4.5, température ; 30 °C, humidité ; 89,19 % et une durée de fermentation de 144h, et pour une production maximale de cellulase (74,41 U/gds): pH ; 6, température ; 31,61 °C, humidité ; 90 % pendant 144 h d'incubation. Par la suite, 11 facteurs, incluant des sources d'azote organique et inorganique, des sources de carbone et de phosphore, ont été criblés en utilisant le plan Plackett-Burman afin d'étudier leur influence sur la production de xylanase. L'extrait de malt, le MgSO₄, le NaNO₃ et le (NH₄)₂SO₄ ont été sélectionnés pour une optimisation supplémentaire à l'aide du plan Central-Composite. **La production maximale de xylanase dans les conditions optimisées est de 1659,41 U/gds, ce qui représente une augmentation de près de 3 fois par rapport à la première production de xylanase avant l'optimisation.** De plus, l'activité enzymatique produite par *A. fumigatus* dans les conditions optimales, est plus efficace que celle des enzymes commerciales. Ce complexe enzymatique a également montré son efficacité dans la saccharification de l'Alfa, la paille de blé, la paille d'avoine et le son de blé, par rapport à la saccharification de ces substrats par l'hémicellulase commerciale. Un taux de saccharification de 35,82 % a été observé avec le son de blé, la paille d'avoine (25,91 %), l'Alfa (21,29 %) et la paille de blé (2,29 %) après 24 h d'incubation. Finalement, une étude coût-efficacité a confirmé l'intérêt de la production de xylanase par *A. fumigatus*; **la production d'enzymes avec l'Alfa est 3 fois moins chère qu'avec le xylane commercial pur.**

Mots clé : *Aspergillus fumigatus*, l'Alfa, fermentation à l'état solide Box Behnken design, biomasse lignocellulosique, Central-Composite design, hémicellulase, hémicellulose, Plackett-Burman design, valorisation.

Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne, Université Frère Mentouri Constantine 1