O.R.S.T.O.M.

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE

POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION

. = . = . = . = . = .

Laboratoire de Biotechnologie
et de Microbiologie Appliquée

O.R.S.T.O.M. _ B.P. 81

97 201 - FORT DE FRANCE
MARTINIQUE

VALORISATION BIOTECHNOLOGIQUE DE LA BAGASSE PAR LA PRODUCTION AU NIVEAU PILOTE D'ENZYMES DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX CELLULOLYTIQUES

Par

ROUSSOS S. et HANNIBAL L.

Compte Rendu Final
d'une Recherche financée
par le CORDET 83 .

Fonds Documentaire ORSTOM
Cote : A*6068 Ex : 1

Date : Juillet 1984.

Commission CORDET. Projet C.100.

VALORISATION BIOTECHNOLOGIQUE DE LA BAGASSE PAR LA PRODUCTION (AU NIVEAU PILOTE) D' ENZYMES DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX CELLULOLYTIQUES .

ROUSSOS S. et HANNIBAL L.

Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Appliquée

ORSTOM - B. P. - 81 - 97 201 - Fort de France - MARTINIQUE

SOMMAIRE pages

RESUME

INTRODUCTION 1

CONDUITE DE LA RECHERCHE 6

1. Production de cellulases de Trichoderma harzianum cultivé sur bagasse par fermentation en milieu solide 6

   1.1. Les sous produits de la canne en Martinique 6
   1.2. Le procédé ORSTOM 6
   1.3. Les cultures en colonne 8
   1.4. Les cultures en Zymotis 11

2. Extraction et Conditionnement des cellulases 13

3. Ensilage de la fraction insoluble de la bagasse fermentée..... 13

4. Production de conidiospores de Trichoderma harzianum dans un fermenteur à disques 14

   4.1. Cultures en erlen 14

   4.2. Cultures en fermenteur 14

ANALYSE ET INTERPRETATION .

1. Production de cellulases de Trichoderma harzianum cultivé sur bagasse par fermentation en milieu solide 17

1.1. Culturesen colonne 17

1.2. Cultures en Zymotis 19

2. Extraction et Conditionnement des cellulases 23

2.1. Mise au point de la méthode 23

2.2. Bilan de l'extraction 23

2.3. Conditionnement des cellulases 25

3. Ensilage de la Fraction insoluble de la bagasse fermentée 27

3.1. Les traitements 27

3.2. Le produit à conserver 29

3.3. Analyses du produit avant et après ensilage 29

4. Production de conidiospores de Trichoderma harzianum dans un fermenteur à disques 29

4.1. Cinétique de production en erlen 30

4.2. Production de conidiospores en fermenteur 35

4.3. Effet des ions Ca $^{++}$ sur la conidiogénèse 37

4.4. Cinétique de production en fermenteur 37

CONCLUSIONS 42

BIBLIOGRAPHIE 45

REMERCIEMENTS 48

R E S U M E

L'étape clé pour les applications possibles de la valorisation biotechnologique de la bagasse de canne à sucre est l'hydrolyse enzymatique de la cellulose contenue dans ce substrat. Nos recherches ont donc été orientées vers la production de cellulases de champignons filamenteux.

Le choix du microorganisme, l'optimisation des conditions de culture, les prétraitements de la bagasse, l'extraction et le conditionnement des cellulases, nous ont permis de mettre au point un procédé simple pour la production de cellulases en grande quantité et dans des conditions économiques avantageuses.

Le principe du procédé ORSTOM de production de cellulases par fermentation en milieu solide statique des substrats lignocellulosiques repose sur cinq étapes :

- Le conditionnement du substrat
- L'inoculation
- La fermentation en Zymotis
- L'extraction de cellulases
- Le conditionnement des produits obtenus

Ce procédé a été mis au point au niveau Laboratoire dans des fermenteurs contenant 20 g de produit. Le passage au niveau pilote expérimental a été possible grâce à l'utilisation d'un Zymotis qui est un biofermenteur statique capable de contenir 50 kg de substrat inoculé à 72 % d'humidité.

Au total, après 48 heures de fermentation en Zymotis de 12 kg de substrat poids sec, nous avons obtenu le bilan suivant :

- 164 520 U.I. d'Activité Papier Filtre
- 1 623 240 U.I. " " Carboxyméthylcellulase

Après extraction, 80 % de cellulases produites ont été récupérées dans 27 litres de solution.

Ces résultats très prometteurs, nous autorisent à envisager l'utilisation du Zymotis pour la production de cellulases et de métabolites de champignons filamenteux cellulolytiques cultivés sur bagasse de canne à sucre.

1. INTRODUCTION

La cellulose, constituant majeur des végétaux, représente la principale ressource de carbone organique continuellement renouvelable grâce au mécanisme de la photosynthèse. Sa décomposition en sucres simples, permettrait de résoudre de nombreux problèmes, tels que la pollution de l'environnement (par la bioconversion des déchets urbains, industriels et agroindustriels) ainsi que des problèmes énergétiques (par la production d'énergie : alcools, méthane).

Certains sous-produits agricoles (cossette de betterave, paille de blé, rafles de maïs, bagasse de canne à sucre, rapures d'ananas) peuvent être utilisés pour l'alimentation du bêtail, la fertilisation des sols et la production d'énergie par combustion. Toutefois, leur valorisation pourrait être améliorée par de nouveaux procédés permettant une exploitation plus approfondie de l'énergie potentielle que représente cette biomasse cellulosique. Ceux-ci nécessitent la disponibilité des sucres simples obtenus par hydrolyse chimique ou enzymatique de la cellulose. Les cellulases capables de réaliser cette hydrolyse, peuvent être obtenues par la croissance de microorganismes sélectionnés, sur les substrats lignocellulosiques eux-mêmes.

L'intérêt d'une telle orientation est d'autant plus important que les applications des cellulases sont très variées. Outre leur utilisation dans l'Industrie Agroalimentaire et Pharmaceutique, la voie la plus prometteuse, dans le contexte économique actuel, semble être la production de carburants de substitution. Les résidus cellulosiques hydrolysés par les cellulase, fournissent un mélange de sucres qui par fermentation, conduisent à des produits tels que l'acétone, le butanol, l'éthanol ou le méthane.

Sur le Tableau I les différentes approches d'utilisation de la cellulose par les processus biotechnologiques sont sommairement shématisées (SRINIVASAN ; 1975) .

La cellulose par hydrolyse acide est transformée en sucres simples. Ces sucres servant de substrat pour la culture de levures ou de champignons filamenteux. Une autre méthode consiste à utiliser la cellulose directement par des microorganismes cellulolytiques pour la production de S.C.P. (Single-cell Proteïn = Protéïnes d' Organismes Unicellulaires).

Par fermentation anaérobie de la cellulose il y a production de méthanol, par fermentation anaérobie à un seul étage il y a production de méthane et de méthanol, par fermentation aérobie à plusieurs étages il y a production d'acétone , d'éthanol, de butanol, d'isopropanol. La digestion enzymatique ou microbiologique partielle de la cellulose conduit à l'obtention d'aliments pour bêtail.

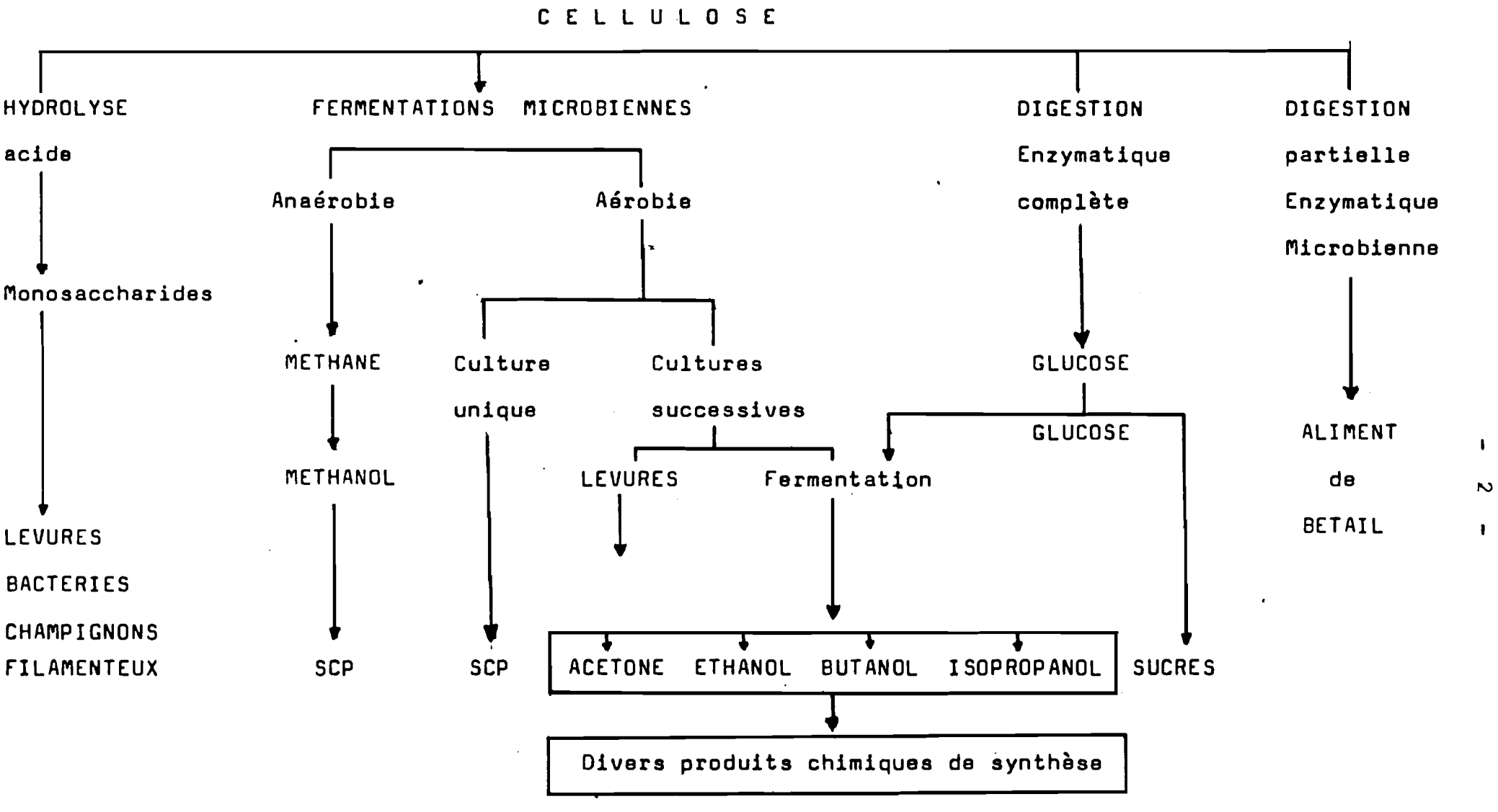


TABLEAU I : Méthodes proposées par SRINIVASAN (1975) pour l'utilisation de la cellulose.

Actuellement, les travaux de recherche visent le développement industriel de la production de cellulases de champignons filamenteux cultivés en fermenteurs en milieu liquide. Cette technique n'a pas encore franchi le stade pilote et présente entre autres inconvénients, une limitation des contacts substrat/microorganisme et une viscosité des milieux de culture.

Dans le cadre des recherches sur l'enrichissement en Protéïnes des substrats amylacés, des chercheurs à l'ORSTOM ont mis au point une technique originale de culture des champignons filamenteux en milieu solide (RAIMBAULT et GERMON ; 1976) . Ce type de fermentation appliqué aux substrats cellulosiques, donne des résultats prometteurs pour la production de cellulases ainsi que des Protéïnes pour l'alimentation du bêtail (ROUSSOS et Coll.; 1983).

En effet, de très nombreux champignons filamenteux cellulolytiques (Trichoderma) produisent des cellulases en grande quantité au cours de leur croissance. La quantité d'éléments nutritifs indispensables à leur développement est très faible, d'autre part leur équipement enzymatique varié les prédispose particulièrement à ce type de culture en milieu solide.

Cependant l'utilisation en Biotechnologie des déchets Agro-industriels lignocellulosiques reste actuellement limitée. Divers exemples tirés de la pratique industrielle montrent que des procédés séduisants peuvent parfois être mis en oeuvre afin de valoriser dans des conditions économiques certains déchets agroindustriels. Ces réalisations restent, le plus souvent, au niveau pilote expérimental.

Lors du Symposium sur la Transformation Enzymatique des Substrats Cellulosiques la Technologie et ses applications qui a eu lieu à Natick (U.S.A.) GADEN (1976) avait résumé ainsi les applications potentielles pour les cellulases et la cellulose transformée en glucose.

1) Utilisation directe des cellulases dans l'alimentation et les Technologies Agroalimentaires et Pharmaceutiques.

2) Utilisation de la cellulose transformée en glucose

   a) Comme substitut du dextrose dans l'industrie alimentaire

   b) comme substrat pour les fermentations

   c) pour la production d'Aliments Fermentés enrichis en Protéïnes (AFEP)

   d) Pour la production d'éthanol par fermentation

Il avait conclu que les applications directes des cellulases, autres que celles de l'hydrolyse de la cellulose à grande échelle, n'étaient pas évidentes à ce moment là. Parce que l'utilisation du glucose, dérivé de l'hydrolyse de la cellulose, pour le commerce ou la production de levures n'était pas compétitive avec celle des sucres dérivés de l'amidon. La prespective de production d'alcools à partir de la cellulose est plus intéressante. Cependant, la rentabilité économique est étroitement liée à la production de cellulases et les technologies enzymatiques de la saccharification de la cellulose.

Il nous a semblé intéressant d'orienter nos travaux de Recherche vers les applications possibles de valorisation des déchets après transformation chimique et bioconversion. Dans ce but l'étape clé est : l'Hydrolyse Enzymatique des Matériaux cellulosiques . Elle doit permettre d'obtenir des solutions d'hexoses et de pentoses dans des conditions avantageuses.

Nos recherches ont donc été orientées vers la production de cellulases de champignons filamenteux .

Ces enzymes sont obtenues par un procédé nouveau de fermentation en milieu solide de produits lignocellulosiques. Le choix du microorganisme, l'optimisation des conditions de culture, les prétraitements des substrats, l'extraction et le conditionnement des cellulases, nous ont permis de produire ces enzymes en grande quantité tout en utilisant un procédé simple.

Depuis la création à l'ORSTOM du programme de Recherche " hydrolyse de la cellulose par les moisissures " qui a démarré à l'Institut de Recherche Chimique Appliquée (IRCHA) en octobre 1979, plusieurs travaux ont été réalisés dans ce domaine et en particulier :

- divers prétraitements (Physiques, Chimiques et Biochimiques) de substrats lignocellulosiques ont été étudiés (VIDAUD et Coll. 1982) .

- Une souche Trichoderma harzianum a été selectionnée pour sa haute activité cellulasique. La production de cellulases de T. harzianum a été étudiée en milieu liquide sur différents substrats; en particulier sur cellulose microcristalline (ROUSSOS et RAIMBAULT ; 1982), sur cossette de betterave (ROUSSOS et Coll. 1983) sur paille de blé (ROUSSOS, 1981; GIULIANO, 1982) et sur bagasse de canne à sucre (ROUSSOS et SEDHA , 1983).

- La production d'AFEP à partir de paille de blé, au niveau pilote, a été étudiée (ASTHER , 1982).

Cependant, le plus souvent, nos travaux de Recherche ont porté sur des études de Laboratoire en utilisant de petits fermenteurs contenant 20 g de produit uniformément inoculé.

Des études au niveau pilote ont commencé en 1982 à l'IRCHA en utilisant un fermenteur agité de type Pétrin, d'une capacité de 6 kg (ASTHER, 1982). Pour nos travaux de production de cellulases de T.harzianum nous avons expérimenté en Martinique un fermenteur statique (ZYMOTIS) pour la culture de ce microorganisme sur bagasse au niveau pilote. Ce Zymotis peut contenir 50 kg de produit à 72 % d'humidité.

L'étude décrite dans ce rapport a porté sur quatre points qui seront développés séparément. Nous avons tout d'abord étudié la production de cellulases de T. harzianum cultivé sur bagasse par fermentation en milieu solide. La technique de la culture en colonne a été utilisée pour la mise au point du procédé et l'optimisation d'un certain nombre de paramètre pour la croissance de T.harzianum sur ce nouveau substrat. L'utilisation d'un nouveau fermenteur statique (Zymotis) nous a permis de développer, au niveau pilote expérimental, le procédé ORSTOM de production de cellulases par culture d'un champignon filamenteux.

Le produit fermenté, riche en protéïnes fongiques et en cellulases, a été pressé pour en récupérer les cellulases dans la fraction soluble.. Celle-ci, qui en fait est un concentré d'enzymes a été conditionnée de différentes façons pour la conservation à long terme des activités enzymatiques.

La fraction insoluble, composée essentiellement de la bagasse et de son de blé non utilisés par le microorganisme ainsi que les protéïnes mycéliennes, a été ensilée. Seule la nature des conservateurs utilisés ainsi que le mode de confection des silos seront décrits dans ce rapport, l'étude de conservation par ensilage de cette fraction insoluble n'étant pas terminée.

Enfin nous avons longuement étudié la production de conidiospores de T. harzianum , point de départ de cette bioconversion. Nous avons expérimenté plusieurs milieux de culture différents afin de définir un milieu et des conditions de cultures optimales pour produire dans un fermenteur à disques le maximum de conidiospores de cette souches dans un minimum de temps .

CONDUITE DE LA RECHERCHE

1. Production de cellulases de Trichoderma harzianum cultivé sur bagasse par fermentation en milieu solide.

1.1. Les sous produits de la canne en Martinique

Les distilleries et la sucrerie (usine) après traitement de la canne à sucre , disposent de quantités importantes de bagasse, dont une partie est directement brûlée en chaudière pour produire l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'unité. La bagasse excédentaire est brûlée sur place, ce qui représente une perte d'énergie importante (FiG 1).

Une Tonne de canne correspond à 0,3 T. de bagasse dont les 2/3 sont utilisés comme combustible d'usine. Pour une production annuelle de 200 000 T. de canne en peut estimer la quantité de bagasse excédentaire à 20 000 T. La campagne de récolte de canne à sucre en Martinique dure environ cinq mois (de février à juin). De ce fait, la bagasse n'est disponible en usine que pendant une période de l' année bien délimitée.

Plusieurs techniques peuvent être envisagées pour valoriser la bagasse excédentaire. Au centre Technique de la Canne et du Sucre (CTCS) en Martinique, des essais de carbonisation ou de gazéification ont été effectués, toutefois la valorisation de la bagasse pourrait être améliorée par des procédés biotechnologiques, permettant une exploitation plus approfondie de cette source de carbone.

Les champignons filamenteux cellulolytiques sont capables d'utiliser la cellulose de la bagasse en produisant des cellulases. Celles-ci peuvent être extraites en fin de fermentation, le résidu solide contenant la biomasse fongique et les composés carbonés plus ou moins hydrolysés pouvant servir à l'alimentation des ruminants.

Cependant la bagasse étant un substrat relativement pauvre en sucres libres et en composés azotés, nous avons montré lors des études précédentes (ROUSSOS et SEDHA; 1983) qu'il est indispensable d'y ajouter un complément plus assimilable (par exemple du son de blé) pour le démarrage de la culture.

1.2. Le procédé ORSTOM

Le principe du procédé ORSTOM de production de cellulases par fermentation en milieu solide de la bagasse est représenté sur le Tableau II . Il comprend cinq étapes :

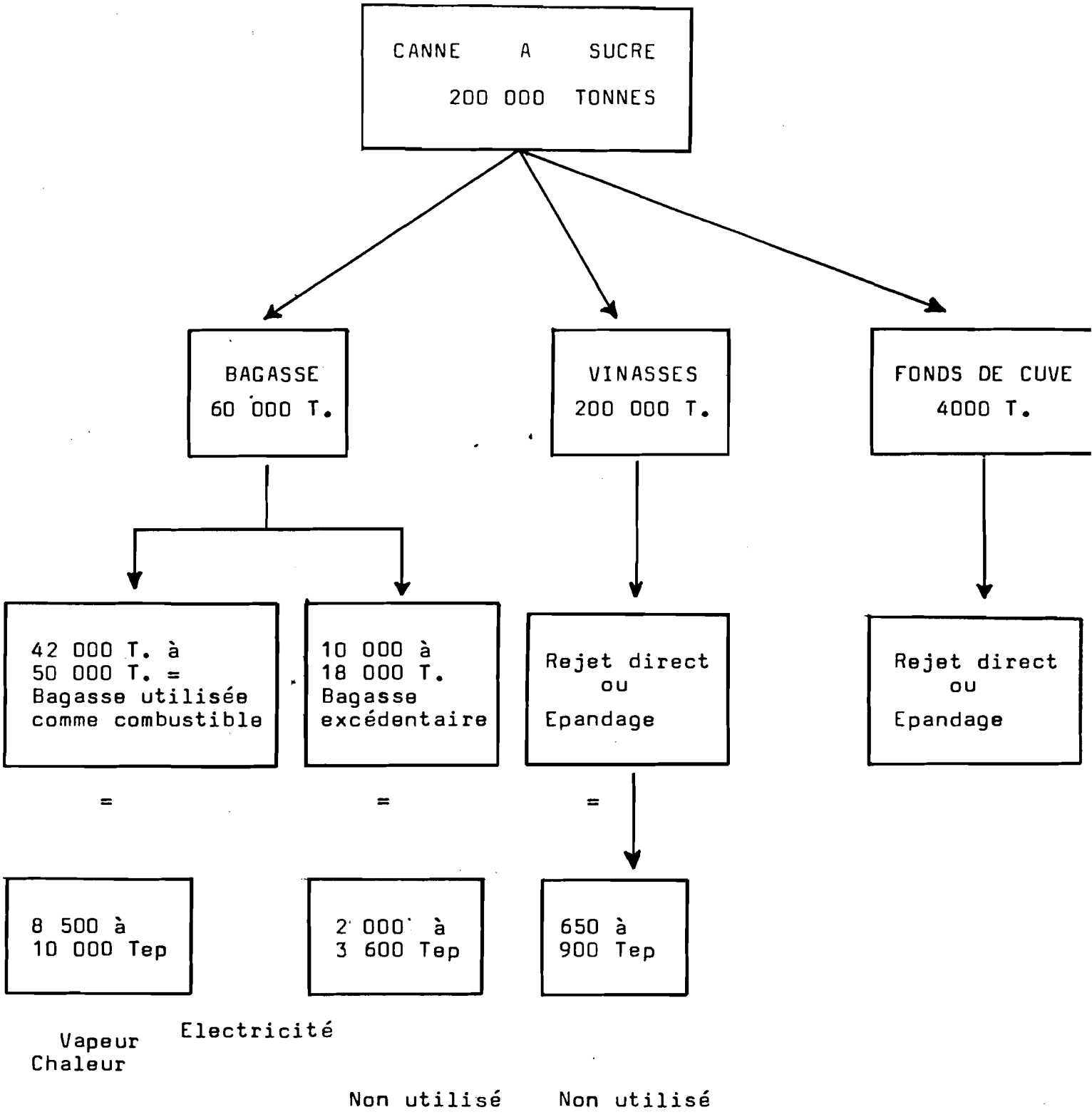


Fig. 1 Schéma de sous produits de canne à sucre en MARTINIQUE (ROSEMAIN 1983).

a) Le préconditionnement du substrat consiste en un broyage mécanique de la bagasse brute afin d'obtenir des particules homogènes d'une taille inférieure à 3 mm de longueur, éventuellement suivi d'un séchage pour conserver le substrat en dehors de la période de la campagne sucrière. Avant la fermentation, l'humidité est amenée à 50 % avec une solution minérale. Un prétraitement à la chaleur (autoclavage à 110 ° C) du mélange ainsi obtenu est indispensable pour améliorer l'accessibilité de la cellulose aux enzymes cellulolytiques et faciliter la culture de T. harzianum .

b) L'inoculation se fait avec une suspension de conidiospores du champignon et le produit est amené à 72 % d'humidité.

c) La fermentation aérobie est obtenue par passage continu d'un flux d'air humidifié à travers la masse du substrat; la fermentation est arrêtée après 48 heures.

d) L'extraction des cellulases se fait à partir de la totalité du produit fermenté, à l'aide d'une presse hydraulique. On obtient deux fractions : la fraction soluble contenant les cellulases et la fraction insoluble, contenant les protéïnes mycéliennes insolubles ainsi que le substrat non utilisés par le microorganisme.

e) Le conditionnement desdeux fractions est différent. Tout d'abord par évaporation de la fraction soluble on obtient les cellulases sous forme de poudre sèche. Par ensilage de la fraction insoluble, ce sous-produit de la fermentation est stabilisé. La fraction insoluble ainsi conservée serait utilisée comme AFEP pour l'alimentation des ruminants.

1.3. Les cultures en colonnes

L'optimisation des conditions de culture (prétraitements de la bagasse, concentration des sels minéraux apportés, humidité initiale du substrat, quantité d'inoculum) ont été ralisés en utilisant de faibles quantités de substrat.

Nous avons utilisé un mélange de 80 g de bagasse finement broyée et de 20 g de son de blé. De même , les cultures ont été réalisées en utilisant les dispositifs de colonnes décrits par RAIMBAULT et ALAZARD (1980).

Les conditions générales pour la production de cellulases de T. harzianum par fermentation en milieu solide figurent sur le Tableau III. Les colonnes chargées avec 20 g de substrat inoculé à 72 % d'humidité ont été placées dans un bain marie à 29 ° C. L'aération des cultures a été obtenue par passage forcé, d'air saturé en eau, à travers le substrat avec un débit de 5 l / h / colonne.

TABLEAU II Procédé ORSTOM de Fermentation en milieu solide de la Bagasse en Zymotis.

PRECONDITIONNEMENT :	Broyage et séchage de la Bagasse 10 kg de Bagasse + 2 kg de son de blé 18 l de solution minérale Prétraitement à la chaleur 4 h à 110° C	
INOCULATION::	Suspension de $3,6 \times 10^{11}$ spores de T.harzianum dans 14,5 l d'eau	
FERMENTATION :	Température : 29 ° C Aération : 7 200 l/h Durée : 48 h	
EXTRACTION :	PRESSAGE ET FILTRATION	
	Fraction Soluble	Fraction Insoluble
CONDITIONNEMENT :	Lyophilisation	Ensilage
PRODUIT FINAL :	CELLULASES, Métabolites	AFEP

TABLEAU III Conditions générales pour la production de cellulases de T.harzianum par fermentation en milieu solide

SUBSTRAT 100 g Poids Sec (SPS) :	Mélange de Bagasse (80g) + son de blé (20g).	
SOLUTION MINERALE :	$(NH_4)_2SO_4$:	9,75 g
	Urée :	2,35 g
	KH_2PO_4 :	5,00 g
	Eau :	100 ml
	pH :	4,4
PRETRAITEMENT :	Autoclavage 1 h à 110 °C du mélange Substrat + Solution Minérale	
INOCULATION :	Avec une suspension de 3×10^9 spores de T.harzianum (Th 15)	
HUMIDITE INITIALE:	72 % d'eau	
TEMPERATURE D'INCUBATION :	29 ° C	
AERATION DU PRODUIT :	5 l/h / colonne de 20 g	
DUREE DE FERMENTATION :	48 h	

1.4. Les cultures en Zymotis

A partir de résultats expérimentaux obtenus au Laboratoire et des observations que nous avons faites, nous avons voulu vérifier que le passage de la Technique de fermentation solide en colonne était possible en utilisant un fermenteur statique beaucoup plus grand de type Zymotis.

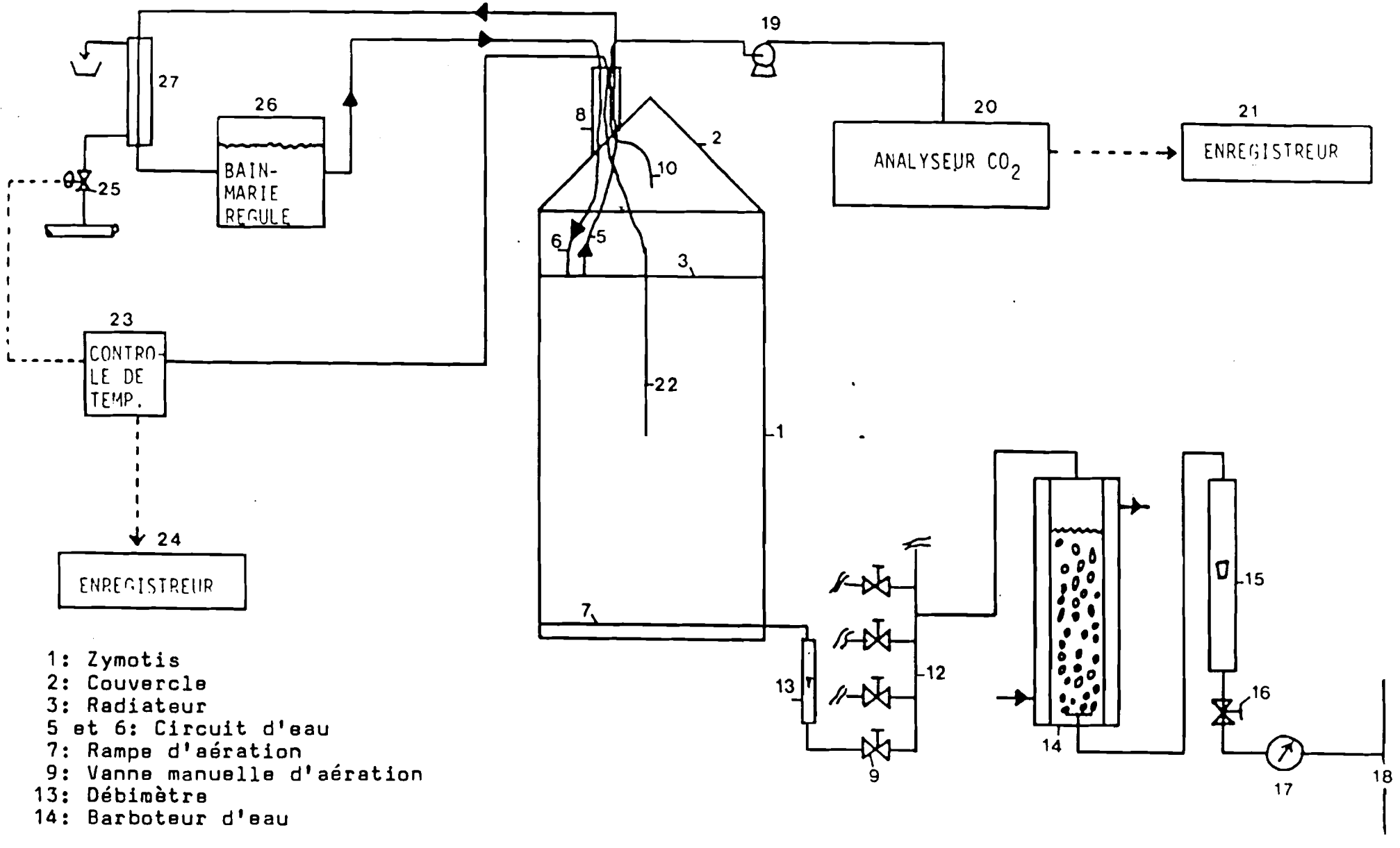
Le Zymotis, une fois chargé, peut contenir 50 kg de substrat inoculé à 72 % d'humidité. C'est donc l'équivalent de 2 500 colonnes. La description du Zymotis équipé de ses accessoires est donnée sur la Fig.2. Son fonctionnement a été décrit par ailleurs (RAIMBAULT et Coll. 1982.).

Le remplissage duZymotis se fait, le couvercle étant soulevé, en garnissant chaque compartiment avec la bagasse prétraitée et inoculée. La bagasse au fur et à mesure de son introduction dans le Zymotis est tassée à l'intérieur des compartiments.

En cours de fermentation, le Zymotis est fermé afin d'éviter toute contamination du produit. Nous pouvons agir cependant sur le débit d'air et sa saturation , sur le circuit d'eau, son débit ainsi que sa température. A des temps variables le couvercle du Zymotis est retiré pour prélever des parties aliquotes du substrat afin de suivre l'évolution des différents paramètres au cours de la fermentation (germination de conidiospores, évolution du mycélium , du pH, de l' humidité et de la biosynthèse de cellulases).

D'autres paramètres (production de CO_2, température dans la masse du produit, température de l'air à la sortie du Zymotis, température du circuit d'eau) sont mesurés en continu tout au long de la fermentation qui dure 48 h.

En fin d'opération on arrête le circuit d'eau, on déconnecte le circuit d'eau (5) et (6) il est alors possible d'extraire de la cuve (1) l'ensemble des radiateurs (3) avec le produit fermenté. Ce dernier ayant pris en masse reste sous forme de gâteaux assez compacts, prisonnier entre les radiateurs. Une légère pression sur le dessus de chaque gâteau suffit à détacher des blocs du produit bien structuré par le mycélium de T. harzianum .



1: Zymotis
2: Couvercle
3: Radiateur
5 et 6: Circuit d'eau
7: Rampe d'aération
9: Vanne manuelle d'aération
13: Débimètre
14: Barboteur d'eau

Fig. 2 : Schéma du Zymotis équipé de ses annexes .

2. Extraction et Conditionnement des Cellulases

La totalité du produit fermenté a été récupérée à la fin de la fermentation. Après une homogénéisation sommaire par malaxage, il a été immédiatement réparti en lots de 500 g dans des sacs en plastique.

Le produit à presser a été placé dans une cuve cylindrique ouverte qui repose sur un piston. La cuve, munie de nombreux orifices à sa base, ainsi chargée avec la bagasse fermentée est positionnée sous un deuxième piston. Lors de la mise en marche de la presse , les pistons exercent une pression de 220 Bar sur le produit pendant une minute. Nous avons ainsi séparé la Fraction Soluble (F.S.) de la Fraction Insoluble (F.I.).

La F.S. a été directement récupérée dans un récipient. Afin d'éliminer les particules solides en suspension dans la F.S., nous l'avons filtrée et mesuré ensuite son volume total.

De faibles quantités de la F.S. ont été conservées au réfrigérateur à + 4 ° C et au congélateur à - 18 ° C.
La plus grande partie de la F.S. a été congelée puis lyophilisée

3. Ensilage de la Fraction Insoluble de la Bagasse fermentée.

Les ensilages ont été réalisés sur 5 kg de produit fini (F.I. contenant le conservateur et dont l'humidité a été ramenée à 55 et 65 %). Des sacs en matière plastique assez résistants ont été utilisés pour obtenir des silos étanches. La durée de conservation sera d'environ 60 jours à la température ambiante (23 - 28 °C).

Au produit à ensiler à 35 et 45 % de Matière Sèche nous avons ajouté les conservateurs suivants :

- MELASSE de canne à sucre à 50 g %
- ENSIPRON à 3 g et à 4 g %
- PROTEINOR à 2 g, 3 g et 4 g %
- A.I.V. à 10 g %

Le produit à conserver a été bien tassé et les sacs ont été fermés hermétiquement.

4. Production de conidiospores de T.harzianum dans un fermenteur à disques.

4.1. Cultures en erlen

Lors des études précédentes sur l'hydrolyse de la cellulose par les champignons filamenteux (ROUSSOS et RAIMBAULT ; 1982) nous avions selectionné une souche T.harzianum parmi les microorganismes de notre collection pour sa production élevée en cellulases et également pour les rendements élevés de production de conidiospores.

Cependant nous n'avions pas défini un milieu de culture optimal pour la production de conidiospores de cette souche. D' autre part, pour l'inoculation de quantités importantes de substrat (12 kg) il fallait disposer de quantités élevées en conidiospores. Nous avons donc utilisé un nouveau type de fermenteur à disques pour cette production de conidiospores de T.harzianum .

L'optimisation des conditions de culture pour la production de conidiospores de T.harzianum a été réalisée en vue d'utiliser ce fermenteur à disques. Les cultures ont été faites sur milieu solidifié et la production de conidiospores a été obtenue par culture en surface. Les différents milieux de culture ont été inoculés dans la masse. Nous avons ainsi étudié la production de conidiospores de T. harzianum en fonction du temps, de la concentration de la source de Carbone, de l'Azote et des sels minéraux.

Ces études ont été réalisées en erlen de 250 ml contenant 20 g de milieu de culture.

4.2. Cultures en fermenteur à disques

Pour la présente étude nous avons utilisé un nouveau procédé pour la production de conidiospores de T.harzianum . Ce procédé allie l'avantage de la culture en surface sur un milieu solidifié avec l'utilisation d'un fermenteur à disques rotatifs particulier (RAIMBAULT et ROUSSOS, 1981). Le principe d'utilisation de ce fermenteur à disques permet d'obtenir une très grande surface de sporulation, une répartition homogène du milieu de culture stérilisé

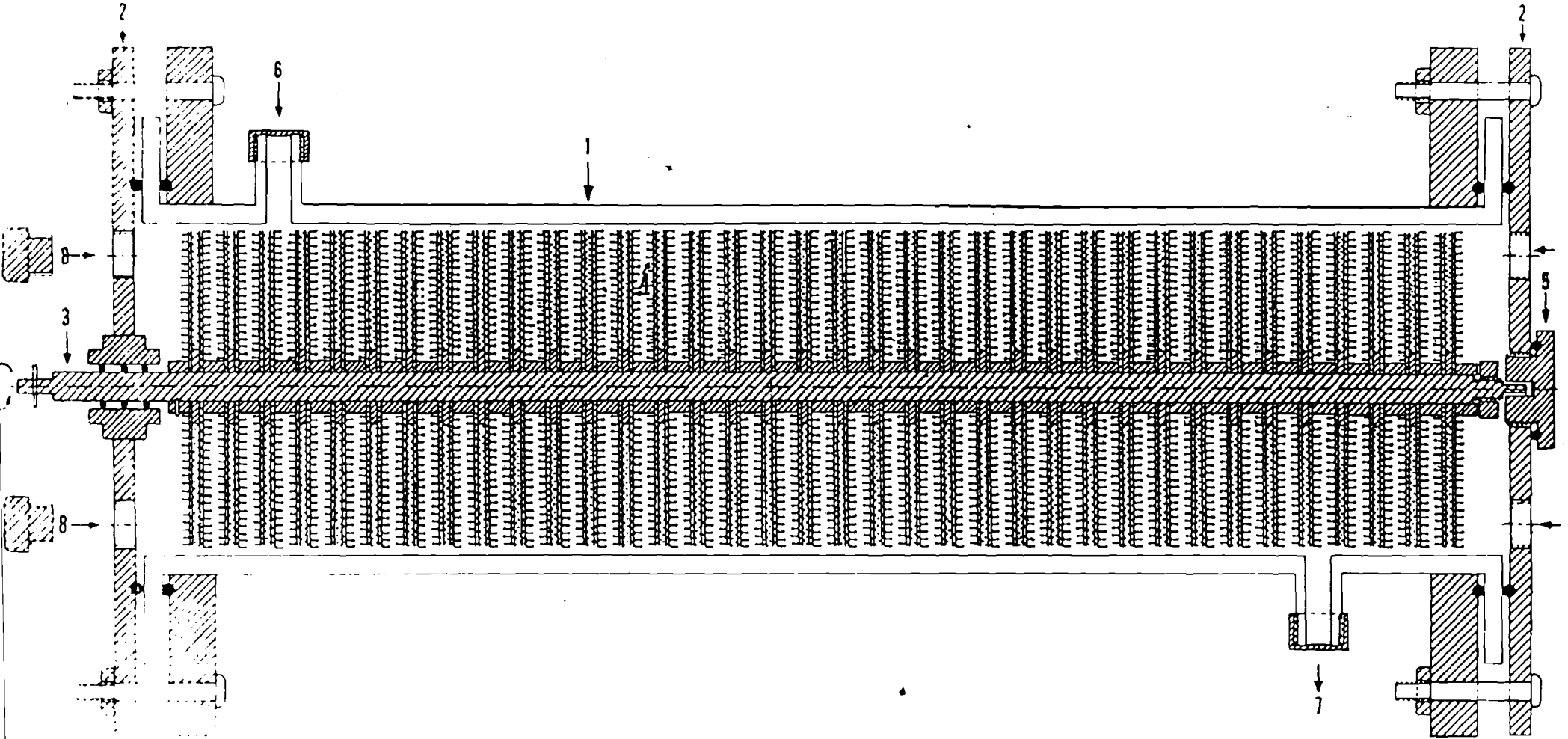


Fig. 3 Schéma détaillé du Fermenteur à disques.

dans le fermenteur, une aération régulée tout au long de la croissance de T.harzianum , une récolte aisée de conidiospores par simple lavage des surfaces. La biomasse mycélienne reste emprisonnée dans le milieu solidifié.

Toutes ces opérations se font dans le même appareil stérilisable , assurant ainsi une grande simplicité d'utilisation et une asepsie stricte. Le schéma détaillé du fermenteur à disques est donné sur la Fig. 3.

A N A L Y S E E T I N T E R P R E T A T I O N

1. Production de cellulases de Trichoderma harzianum cultivé sur bagasse par fermentation en milieu solide.

1.1.. Cultures en colonne

L'optimisation des conditions de culture (prétraitement de la bagasse, concentration des seils minéraux apportés dans la solution minérale, humidité initiale du substrat et quantité d'inoculum) ont été réalisés en utilisant de faibles quantités de substrat. Nous avons utilisé un mélange de 80 g de bagasse finement broyée et de 20 g de sonde blé. De même les cultures ont été realisées en utilisant les dispositifs de colonnes décrits par RAIMBAULT et ALAZARD (1980).

Les conditions générales retenues pour la production de cellulases de T.harzianum par fermentation en milieu solide figurent sur le Tableau III. Les colonnes chargées avec 20 g de substrat inoculé à 72 % d' humidité ont été placées dans un bain marie à 29 ° C. L'aération des cultures a été obtenue par passage forcé, d'air saturé en eau, à travers le substrat avec un débit de 5 l / h / colonne.

Sur la Figure 4 nous avons représenté sous forme de graphiques les résultats obtenus au cours de la croissance de T. harzianum cultivé sur un mélange de bagasse et de son de blé. Les activités enzymatiques (cellulases) ont été exprimées en Unités Internationales (U.I.). Une U.I. de cellulase libère une micromole de glucose par minute c'est-à-dire 0,18 mg / min. Nous avons dosé les activités Carboxyméthylcellulase (ACMC) ainsi que les ectivités Papier Filtre (APF).

La cinétique d'évolution des principaux paramètres (pH, humidité, production de cellulases) en fonction du temps de culture de T.harzianum en colonne est représentée sur la Fig. 4. Les cellulases apparaissent dans le milieu après 28 h. de culture. Le maximum de production de ces enzymes est obtenu après 48 h. de culture.

L'humidité initiale du produit a été de 68 %, elle a régulièrement augmenté au cours de la fermentation pour atteindre une valeur de 73 % après 48 h .

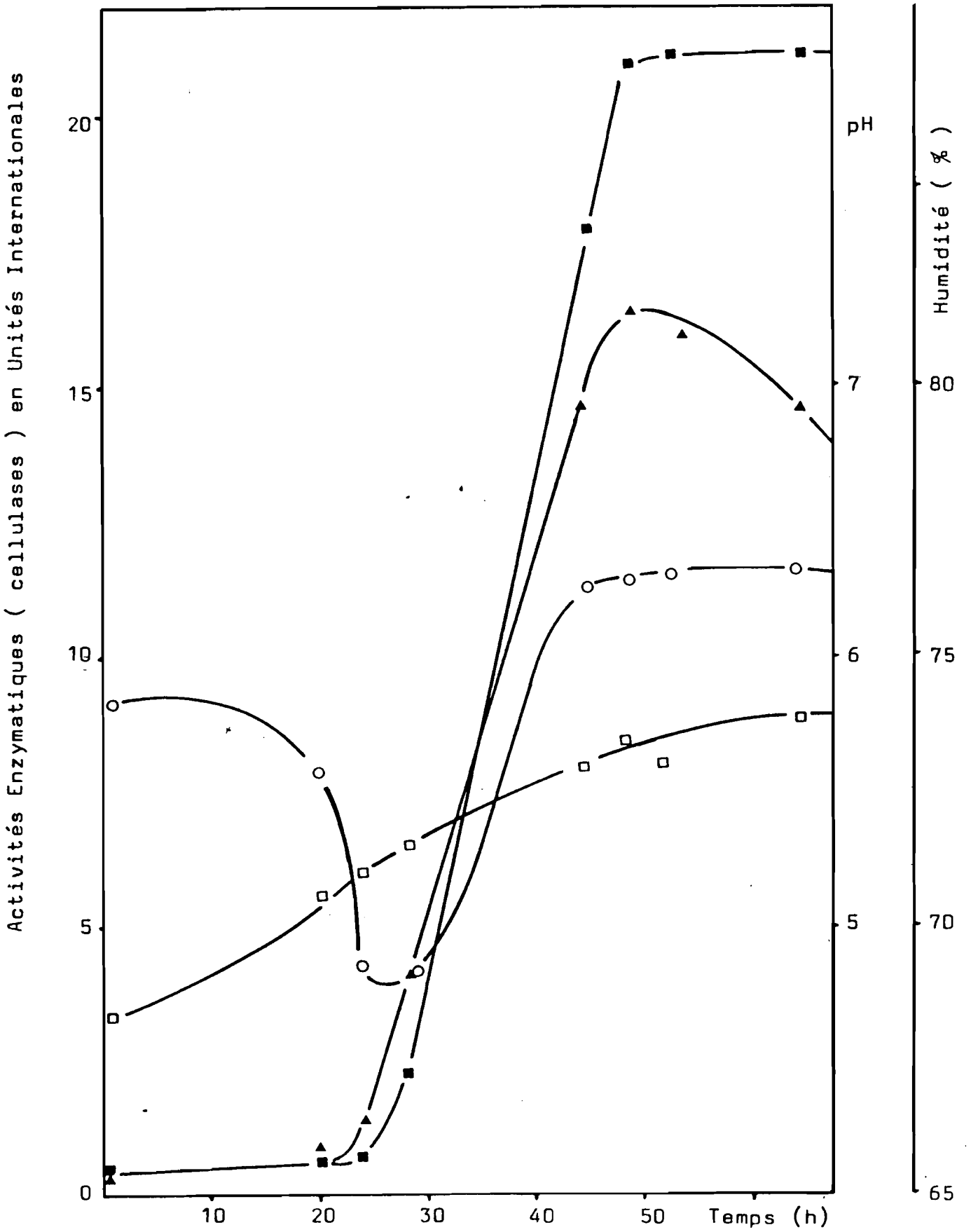


Fig.4 : Cinétique de production de cellulases (▲—▲ APF x 100 UI et ■—■ ACMC x 1000 UI), de l'évolution du pH (○—○) et de l'(□—□)Humidité du produit pendant la fermentation en colonne.

Le pH initial du milieu de culture a été de 5,8. Pendant la phase de germination des conidiospores (les 16 premières heures de fermentation) les valeurs du pH restent stables. Au cours de la multiplication active du mycélium les valeurs du pH diminuent très rapidement (entre 16-24 heures de culture) et atteignent des valeurs minimales. La remontée du pH correspond au début de libération de cellulases dans le milieu de culture (après 28 h).

Le bilan global pour la production de cellulases en colonne après 48 h de culture est le suivant pour 100 g de substrat poids sec (SPS)

- 1 605 U.I. d'Activité Papier Filtre
- 20 443 U.I. " " Carboxyméthycellulase

1.2. Cultures en Zymotis

L'utilisation de quantités importantes de substrat pour la production de cellulases de T.harzianum cultivé en Zymotis nous a amené à résoudre un certain nombre de problèmes pratiques posés par le passage de la technique de la colonne (20 g de substrat) à celle du Zymotis (50 kg de substrat à 72 % d'humidité).

Pour obtenir un mélange homogène du substrat nous avons utilisé un mélangeur type pétrin dont la capacité était de 2 kg SPS. Nous avons donc défini l'Unité de Base (U.B.) en substrat composée de 1,6 kg de bagasse sèche et de 0,4 kg de son de blé. A cette U.B. placée dans le pétrin on a ajouté 2,85 litres de la solution minérale ($(NH_4)_2SO_4$: 194 g ; urée : 48 g et KH_2PO_4 : 100 g). L'homogénéisation du substrat a été obtenue par agitation au pétrin pendant 3 mn. Le poids de l'Unité de base avant prétraitement a été de 5,2 kg.

Le prétraitement, à la chaleur, du substrat à 50 % d'humidité a été effectué par autoclavage. Pour se faire, nous avons placé dans un récipient de grand volume deux unités de base totalisant un poids de 10,4 kg. Le récipient ainsi chargé a été autoclavé à 110 °C pendant 3 heures.

L'inoculation, du produit prétraité placé dans le pétrin a été effectuée en ajoutant 2,5 l d'une suspension de 6×10^{10} conidiospores de T.harzianum par U.B. de substrat prétraité. Nous avons fait plusieurs fermentations en zymotis chargé avec 2,4, 5 et 6 unités de base correspondant à une charge de 4 kg,8 kg,10 kg et de 12 kg SPS / Zymotis.

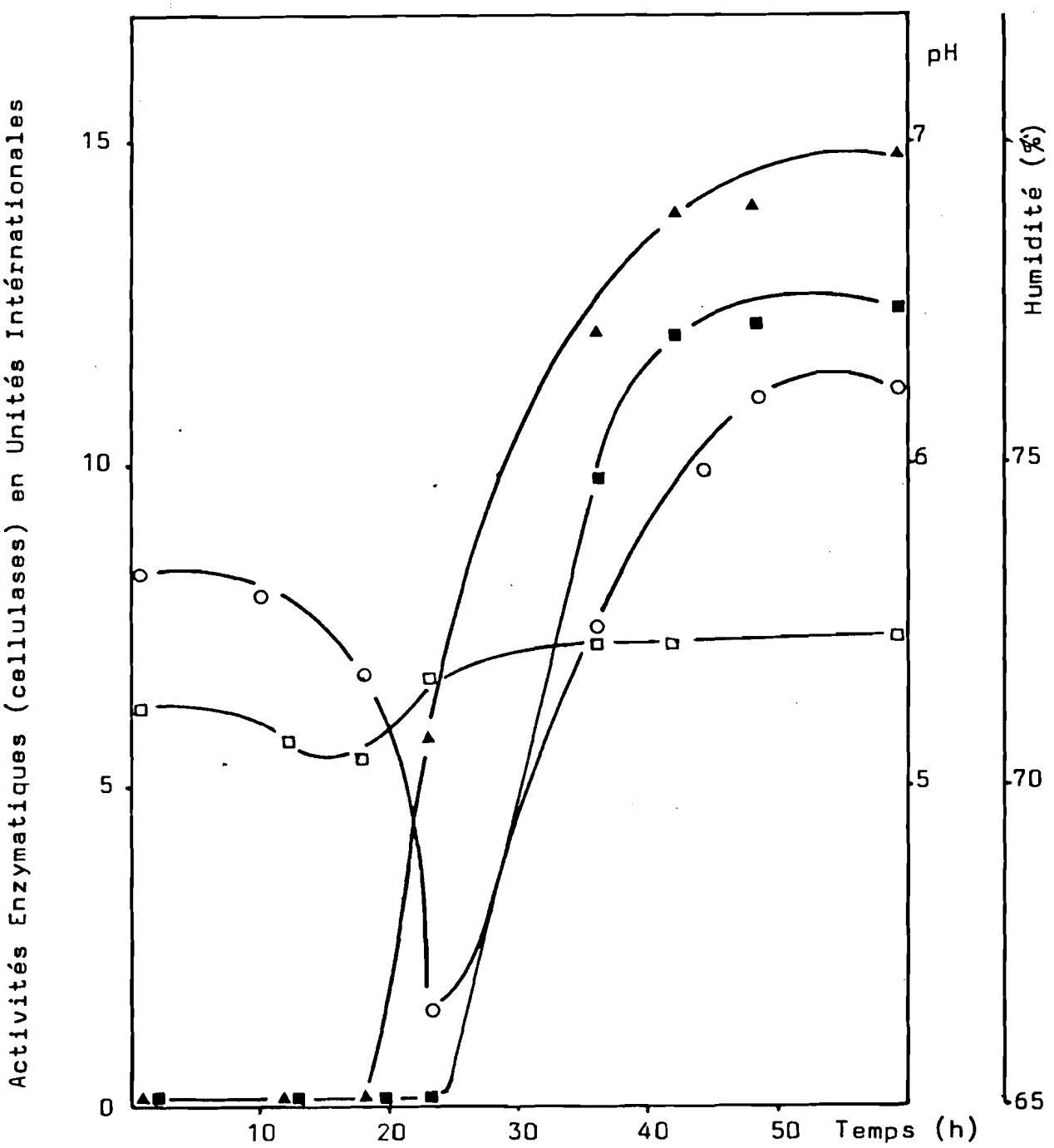


Fig. 5 : Cinétique de production de cellulases (▲—▲ APF x 100 UI et ■—■ ACMC x 1000 UI), de l'évolution du pH (o—o) et de l'Humidité (□—□) du produit pendant la fermentation de la bagasse en Zymotis.

Nous avons également suivi en prallèle la croissance de T.harzianum en colonne. Nous avons utilisé pour cela une faible quantité de substrat inoculé prélevé au temps zéro dans le Zymotis.

Les résultats des analyses faites sur les échantillons prélevés pour le Zymotis N° 6 (chargé avec 12 kg SPS) sont données sur la Fig .5. Ceux obtenus en colonne sont donnés sur la Fig. 6.

Tout d'abord l'humidité du produit varie peu, aussi bien en zymotis qu'en colonne. Elle est de 71,3 % au temps 0 et après 48 heures de culture elle gagne deux points.

Les conidiospores germent après 18 h de culture en colonne, alors qu'en Zymotis la germination est plus précoce. En effet, après 12 h. de culture 80 % de conidiospores ont germé. Par la suite le développement du mycélium est plus important en Zymotis qu'en colonne.

Ce décalage de l'évolution du mycélium on le retrouve au niveau du pH. En effet, les valeurs du pH varient différemment pour les deux types de culture. Après 23 heures de culture les valeurs minimales du pH sont atteintes. Après cette période , le pH remonte.

C'est à ce moment que les premières activités cellulasiques apparaissent dans le milieu.

Après 48 h. de fermentation la production maximale de cellulases est atteinte aussi bien par les cultures de T.harzianum en colonne et en Zymotis. A cet instant le mycélium est foisonnant et le substrat est envahi uniformément. Cependant quelques cellules mycéliennes sont lysées et il y a apparition des premières formes de reproduction (phialides). C'est à ce moment que la fermentation a été arrêtée et le produit traité pour en extraire les cellulases.

Le bilan global pour la production de cellulases en colonne est le suivant :

- 1 444 U.I. d'Activité Papier Filtre / 100 g SPS
- 13 527 U.I. " Carboxyméthylcellulase /100 g SPS

Pour les cultures en Zymotis le bilan pour 100 g de SPS est très voisin :

- 1 371 U.I. d'Activité Papier Filtre / 100 g SPS
- 12 000 U.I. " Carboxyméthylcellulase / 100 g SPS

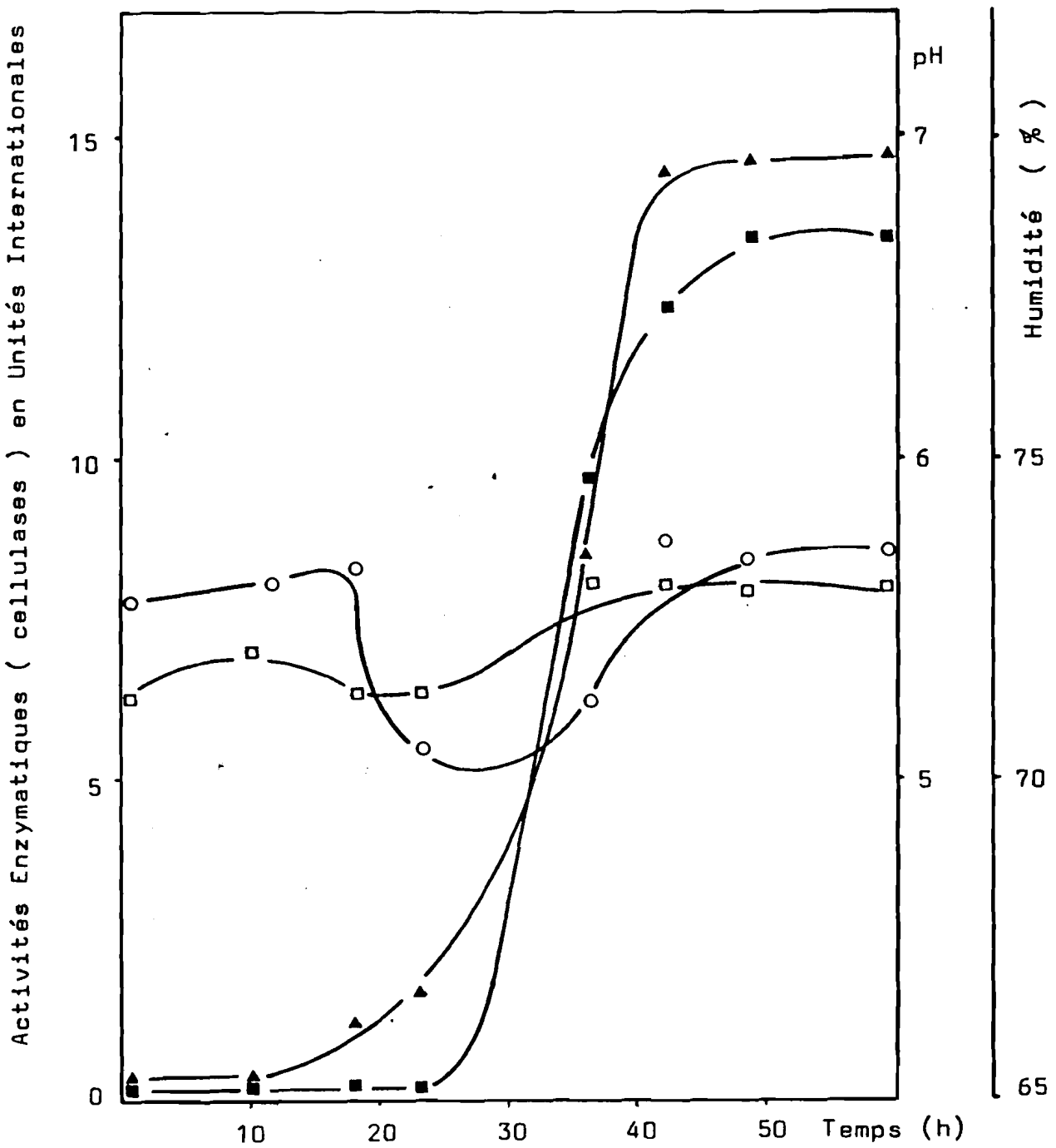


Fig. 6 : Cinétique de production de cellulases (▲—▲ APF x 100 UI et ■—■ ACMC x 1000 UI), de l'évolution du pH (o—o) et de l'Humidité (□—□) du produit pendant la fermentation de la bagasse en colonne.

Au total en Zymotis pour 12 kg de substrat poids sec initial, nous avons obtenu le bilan suivant :

- 164 520 U.I. d' APF /12 kg SPS

  1 623 240 U.I. d' ACMC / 12 kg SPS

Ces résultats très prometteurs nous autorisent à envisager l'utilisation du Zymotis pour la production au niveau pilote, de cellulases de T.harzianum cultivé sur bagasse de canne à sucre.

2. Extraction et conditionnement des cellulases

Pour la réalisation de ce travail, nous avons été inspirés des recherches faites par SEBO (1975) sur la séparation du plasma cellulaire des éléments structuraux des cellules végétales.

2.1. Mise au point de la méthode

Afin de mettre au point la méthode d'extraction de cellulases, nous avons utilisé de la bagasse fermentée par culture de T.harzianum en colonne pendant 60 h. Le produit fermenté était à 28,3 % de matière sèche; 500 g de ce produit ont été pressés à 220 Bar pendant 2 mn. 30 s.

Sur la Fig. 7 , nous avons représenté le schéma d'extraction de cellulases à partir de la bagasse fermentée à l'aide d'une presse hydraulique. Par cette méthode d'extraction, dans la première fraction soluble il y a une récupération de 80 % de l'eau libre du produit, ce qui entraîne une grande partie de cellulases qui sont présentes. Au cours du premier lavage à l'eau il y a rehydratation de la fraction insoluble. Avec le deuxième traitement il y a de nouveau récupération de 80 % d' eau, entraînant une grande partie des protéïnes solubles qui n'ont pu être extraites au cours du premier traitement.

2.2. Bilan de l'extraction

Pour l'extraction des cellulases produites au cours de la fermentation de quantités importantes de bagasse (en Zymotis), nous avons pressé dans la journée, suivant la charge du Zymotis, de 20 à 100 unités de 500 g.

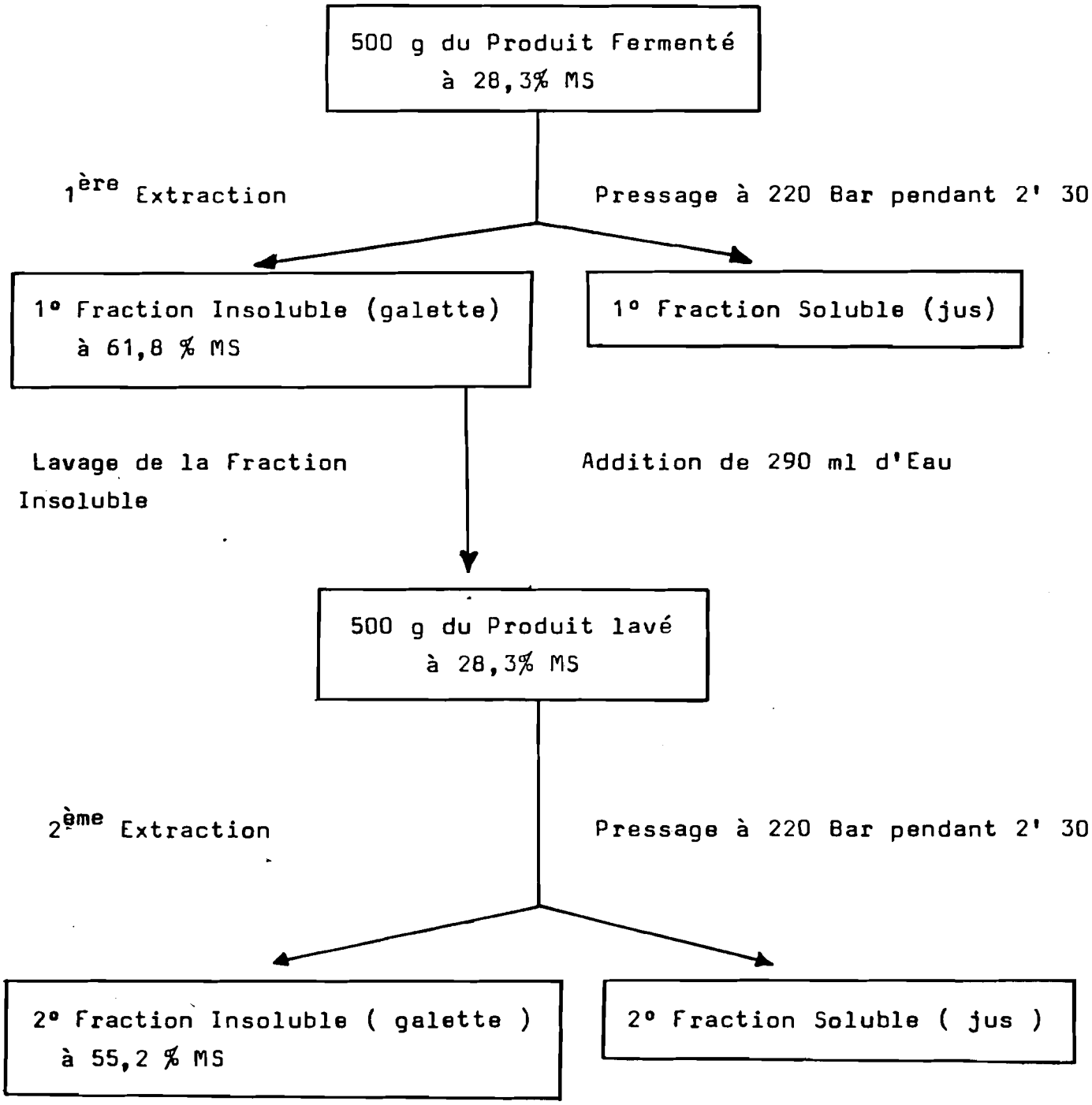


Fig. 7 Extraction de cellulases à partir de la bagasse de canne à sucre fermentée à l'aide d'une presse hydrolique .

Afin de diminuer le temps de pressage, nous avons augmenté la pression à 230 Bar et diminué la durée à 1 mn.

En général, nous avons extrait dans ces conditions 77 % de la fraction soluble contenue dans le produit fermenté. Afin qu'il n'y ait pas de grand décalage entre les échantillons traités au cours de l'extraction, nous n'avons pas lavé les galettes récupérées. De ce fait, les galettes contenaient 23 % de la fraction soluble non extraite.

Sur le Tableau IV nous avons donné un bilan détaillé de la quantité de produit traité à la presse hydraulique pour obtenir la séparation de la fraction soluble contenant les cellulases et la fraction insoluble contenant le substrat non utilisé par le microorganisme.

Le produit fermenté provenait de 7 fermentations différentes en Zymotis. Pour ces fermentations la charge du Zymotis était comprise de 11 à 48 kg (Tableau IV) . Une quantité totale de 225,7 kg de produit fermenté a été conditionnée et traitée à la presse pour en extraire les cellulases. Nous avons pu ainsi obtenir des solutions hautement concentrées en cellulases d'un volume total de 127 litres. De même, nous avons récupéré 452 galettes d'un poids total de 93 kg.

La presse hydraulique a fonctionné 514 mn. à la pression de 230 Bar. Cependant cette pression maximale est atteinte au bout d' une minute après la mise en marche. Par conséquent, le temps réel d'occupation de la presse a été de 17 h.

2.3. Conditionnement des cellulases

La fraction soluble contenant les cellulases a été directement récupérée à la sortie de la presse dans un bidon de 20 litres. Par la suite, le jus a été filtré pour éliminer les particules solides en suspension et son volume mesuré.

La plus grande quantité du jus a été congelée dans des barquettes en aluminium avant lyophilisation.

Le conditionnement par lyophilisation de ces solutions concentrées en enzymes paraît être un bon choix. Outre la conservation à long terme de ces enzymes, une concentration supplémentaire est obtenue par cette méthode.

TABLEAU IV Bilan détaillé de la quantité de produit traité à la presse hydraulique pour extraire les cellulases. Ce produit provenait de 7 fermentations différentes.

PRODUIT FERMENTE			DUREE	GALETTES			JUS	
N°	Durée Ferment. h	Quantité kg	Pression mn	Nombre	Poids moyen	Kg total	Volume /galette	litres total
Z 28	67	31,0	2	62	0,17	10,54	0,32	19,84
Z 37	64	11,4	1	23	0,21	4,83	0,29	6,67
Z 48	68	24,5	1	49	0,22	10,68	0,28	13,52
Z 58	61	30,0	1	60	0,20	12,06	0,30	17,74
Z 68	60	45,0	1	90	0,21	19,03	0,26	23,58
Z 77	48	48,0	1	96	0,21	20,64	0,27	26,21
Z 87	48	35,8	1	72	0,21	15,41	0,27	19,37
Total	416	225,7	514	452	/	93,19	/	126,90

3. Ensilage de la fraction insoluble de la bagasse fermentée

Récemment une étude de l'évolution microbiologique et des caractéristiques fermentaires des ensilages de canne à sucre, de sorgho et de pangola en climat tropical humide a été réalisée (CELANIE, 1982) . De cette étude, il ressort que le sorgho constitue le meilleur support au développement de l'activité lactique. Quant à la canne à sucre, bien qu'elle présente une bonne aptitude à l'ensilage, elle ne remplit pas les conditions favorables à la mise en place d'une conservation stabilisée . Ceci est dû principalement à la fermentation du saccharose par les levures avec une production important d'alcool.

L'objet de cette étude a été l'ensilage de la fraction insoluble de la bagasse fermentée. Ce substrat est pauvre en sucres libres et enrichi en Azote. Sa composition biochimique est donc différente de celle de la canne à sucre brute. Le protocole expérimental de l'ensilage a été établi par Mr. GEOFFROY de la station de Recherches Zootechniques de l'INRA Antilles-Guyane. De même les analyses chimiques pour déterminer les produits frais avant et après fermentation de la bagasse ainsi que les produits ensilés seront faites à l'INRA Guadeloupe après la période de conservation (60 jours) .

3.1. Les Traitements

Nous avons testé quatre conservateurs d'ensilage, pour obtenir une bonne conservation de la fraction insoluble en protégeant particulièrement la fraction protéïque, et la stabilisation de l'ensilage.

Les ensilages ont été réalisés sur 5 kg de la fraction Insoluble amenée à 35 % et à 45 % de matière sèche par addition d'une solution aqueuse contenant les différents conservateurs :

- ENSIPRON (mélange d'acide formique et de formol) à 3 g et à 4 g % de produit.
- PROTEINOR (Bioconservateur à base de ferments lactiques) à 2 g, 3 g et 4 g % g de produit.
- MELASSE de canne à sucre à 50 g % g de produit.

TABLEAU V Analyses chimiques pour déterminer les produits frais avant et après fermentation de la bagasse ainsi que les produits ensilés.

Composition chimique	Produits frais		Produit conservé
	FERMENTATION AVANT	FERMENTATION APRES	
Matière sèche	+	+	+
Matière organique	+	+	+
Matière Azotée Totale	+	+	+
Azote soluble	+	+	+
A D F	+	+	+
N D F	+	+	+
Sucres solubles	+	+	+
Amidon	+	+	+
<u>Caractéristiques fermentaires</u>			
P.H.	-	-	+
N - NH_3	-	-	+
A G V	-	-	+
Alcools	-	-	+
Acide lactique	-	-	+

- A.I.V. (mélange d'acide chlorhydrique concentré 7 volumes et d'acide sulfurique concentré 1 volume) à 10 g % g de produit à ensiler.

3.2. Le produit à conserver

La charge maximale du Zymotis ne dépassant pas 12 kg , nous avons été amenés à utiliser le fermenteur quatre fois pour obtenir 160 kg de produit fermenté à 28 % de matière sèche.

Par conséquent, le produit à ensiler provenait de quatre fermentations différentes (Z 58 , Z 68, Z 77 et Z 87). De même la confection de silos a été réalisée dans la journée au cours de laquelle le produit fermenté était traité pour séparer les cellulases de la fraction insoluble.

3.3. Analyses du produit avant et après ensilage

A la fin de la période de conservation (60 jours à la température ambiante 23 - 28 ° C) un certain nombre d'analyses nous permettra de connaître si le produit fermenté est apte à servir pour l'alimentation des ruminants et pour choisir également la concentration et la nature du conservateur pour la réalisation des ensilages de la fraction insoluble (Tableau V).

Etant donné que l'ouverture des silos va se faire en Août prochain, nous n'avons pas eu la possibilité d'analyser les ensilages confectionnées. De ce fait, nous ne pouvons à ce stade, développer ce chapitre davantage.

4. Production de conidiospores de *Trichoderma harzianum* dans un fermenteur à disques.

Les conidiospores sont les formes de multiplication végétative (reproduction asexuée) des champignons Imparfaits (Fungi imperfecti). Elles prennent naissance à l'extrémité du mycélium dans des cellules spécialisées : les phialides.

La capacité d'un champignon filamenteux pour produire des conidiospores est un caractère génétique et son expression phénotypique (qualitative et quantitative) dépend largement de l'environnement (HAWKER; 1966). Tous les champignons filamenteux ne répondent pas de la même façon aux variations des facteurs extérieurs, ainsi une

TABLEAU VI. Cinétique de production de conidiospores de T. harzianum en fonction du temps. Les résultats sont exprimés en nombre (x 10^9) conidiospores produites par erlen.

Milieux	TEMPS D' INCUBATION EN JOURS							
	3	5	7	9	12	14	20	25
A	0	0,40	1,22	1,60	5,89	8,59	23,70	26,60
B	/	7,60	7,60	11,70	17,30	24,50	27,30	/
C	2,37	4,57	5,00	/	5,30	5,50	4,45	6,60
D	2,90	6,62	10,20	17,30	19,70	15,00	18,20	14,60
E	0,62	1,47	3,52	2,34	6,83	10,60	11,20	12,00
F	0,08	0,22	0,16	0,54	0,22	0,67	12,00	11,50
G	/	5,00	5,63	6,72	5,08	5,40	7,70	8,20
H	6,03	11,00	18,00	26,80	28,20	35,80	45,90	30,60

grande divergence a été observée entre espèces du même genre et souvent entre des souches de la même espèce (VEZINA et Coll. 1968). Il est donc important de sélectionner un champignon filamenteux caractérisé par une production élevée de conidiospores et veiller à maintenir cette capacité de production pour cette souche (LAMBERT et MEERS; 1983) .

L'utilisation de conidiospores de T.harzianum pour lancer une fermentation en milieu solide de la bagasse, nécessite la disponibilité de quantités importantes de conidiospores (3×10^7 conidiospores g de substrat inoculé). Pour obtenir des conidiospores à un prix raisonnable il faut utiliser des conditions d'environnement et des milieux de culture optimisés. Nous avons donc expérimenté différents milieux de culture en erlen pour optimiser la production de conidiospores de T.harzianum. Cette optimisation des milieux de culture a été réalisée en vue d'utiliser un nouveau fermenteur à disques pour la production en grande quantité de conidiospores de T.harzianum.

4.1. Cinétique de production en erlen

Nous avons utilisé 8 milieux de culture de composition différente. Les milieux maintenus en surfusion ont été inoculés dans la masse avec des conidiospores de T.harzianum .L'incubation a duré plusieurs semaines à la température du Laboratoire (22 - 26 ° C). Nous avons ainsi étudié la cinétique de production de conidiospores de T.harzianum en fonction du temps et des milieux de culture.

Sur les Tableaux VI et VII, nous avons exprimé les résultats en nombre de conidiospores produites par erlen et par gramme de substrat carboné respectivement.

Tout d'abord, nous avons étudié les effets de la source de Carbone sur la sporulation en utilisant les milieux A, B et C dont la composition respective en farine de manioc a été 100 g, 40 g et 20 g par litre de milieu. Suivant les résultats obtenus, il semble que la concentration du substrat utilisé comme source de Carbone influence la conidiogénèse. Les conidiospores sont produites dès les premiers jours de culture. Il en est de même pour l'indice de sporulation (Tableau VII). Le palier maximum de production de conidiospores est atteint à la fin de la première semaine de culture. Par contre lorsque la concentration du substrat est pléthorique (milieu A), il y a inhibition de la conidiogénèse pendant une période, après une semaine de culture, il apparaît une induction tardive de la conidiogénèse qui s'exprime à partir du 7 ème jour. Le palier maximum de l'indice de sporulation est atteint au delà de 30 jours de culture.

TABLEAU VII Cinétique de production de conidiospores de T. harzianum en fonction du temps. Les résultats sont exprimés en nombre (x 10^9) conidiospores produites par gramme de farine de manioc(Ω) en erlen.

Milieux \ TEMPS D' INCUBATION EN JOURS	3	5	7	9	12	14	20	25
A	/	0,30	0,92	1,20	4,43	6,46	17,82	20,00
B	/	9,47	7,38	16,70	21,90	33,60	24,40	/
C	4,56	6,35	10,60	/	8,30	9,82	6,45	11,79
D	2,96	5,91	14,80	16,50	22,10	22,10	20,90	19,90
E	0,80	3,06	7,18	3,30	13,39	18,00	20,00	19,35
F	0,14	0,25	0,20	0,30	0,32	0,64	11,80	18,00
G	/	7,04	7,71	8,25	7,15	6,92	10,26	10,51
H	7,01	16,90	18,00	35,70	38,60	42,62	50,00	39,70

Par conséquent, il suffirait de faire varier la concentration de la source de Carbone du milieu de culture, entre ces deux valeurs, pour obtenir non seulement une conidiogénèse précoce ou tardive, mais également une production quantitative de conidiospores de T.harzianum .

Cette hypothèse a été confirmée par les résultats obtenus sur le milieu B, dont la composition est intermédiaire entre celle des milieux A et C. On constate en effet, une conidiogénèse précoce obtenue après 5 jours de culture, une production de conidiospores croissante et l'indice de sporulation suit un accroissement linéaire à partir du 7 ème jour pour atteindre des valeurs maximales à partir du 14 jour(Tableau (VII).

Un autre facteur qui influence également la conidiogénèse de T.harzianum est la concentration de la source d'Azote présente dans les milieux de culture. Pour suivre cette cinétique nous avons utilisé les milieux B, D, E et F pour lesquels la quantité de substrat carboné a été maintenue stable (40 g / l) et l'on a diminué la concentration d' Azote total disponible dans le milieu . On a observé deux phénomènes.

Tout d'abord, il se produit une baisse sensible de la production de conidiospores. Cette diminution suit la diminution de la concentration de l'Azote total disponible dans le milieu de culture. C'est le cas notamment pour les milieux D et E pour lesquels la production de conidiospores est diminuée par rapport à celle obtenue sur le milieu B (Tableau VI). D'autre part, l'indice de sporulation atteint un palier maximum à des temps variables. En d'autres termes, lorsqu'on diminue la concentration d'Azote contenue dans un milieu de culture dont la quantité de Carbone reste stable, il y aurait un phénomène d'inhibition de la conidiogénèse qui apparaît.

Cette hypothèse a été confirmée par les résultats obtenus en utilisant le milieu F (très pauvre en Azote). En effet, lorsque dans un milieu de culture la quantité de la source de Carbone est élevée et la concentration en Azote est très faible, il y a inhibition de la conidiogénèse. Cette inhibition dure environ 15 jours (Tableau VI). Après cette période, il y a production massive de conidiospores de T.harzianum en l'espace de quelques jours.

Il semble que l'Azote disponible serait d'abord utilisé pour la croissance exclusive du mycélium. La conidiogénèse intervient très tardivement et pour se faire il y aurait utilisation d'une grande partie de l'Azote déjà fixé par les cellules mycélienne.

TABLEAU VIII. Production de conidiospores de T. harzianum cultivé sur différents milieux de culture dans un fermenteur à disques.

Milieux	Quantité par fermenteur				Durée jours	Spores ($x10^9$) produites par			
	Milieu g	Manioc g	Azote m Mole	Carbone m Mole		Fermenteur	g Manioc Ω	m Mole Azote Ω N	m Mole Carbone Ω C
A	500	44,0	82,0	1.455	13	569	11,4	6,9	0,39
B	629	23,7	55,0	782	8	442	18,6	8,0	0,57
C	500	9,6	44,6	317	18	155	15,5	3,5	0,49
D	551	20,8	32,8	687	8	350	16,8	10,8	0,51
E	601	22,7	27,3	750	8	358	15,8	13,1	0,48
F	487	18,4	18,7	608	8	330	17,9	17,6	0,54
G	625	22,8	108,7	772	8	357	15,7	3,3	0,46
H	733	27,6	64,2	911	8	558	20,2	8,7	0,61

4.2. Production de conidiospores en fermenteur

Le nombre total de conidiospores produites dans un fermenteur à disques a été de 57 de 44 et de 15,5 x 10^{10} pour les milieux de culture A, B et C respectivement (Tableau VIII). Cette production élevée en conidiospores a été obtenue avec des rendements différents. En effet, les valeurs de l'indice de sporulation (Ω = N b de spores produites par gramme de substrat carboné) ont été de 11,4, de 18,6 et de 15,5 x 10^9 pour les milieux respectifs A, B et C.

Cependant, malgré les effets d'induction-répression dûs principalement à la concentration de la source de Carbone, la production globale de conidiospores de T.harzianum dans un fermenteur à disques est proportionnelle à la quantité du substrat carboné du milieu de culture.

Nous avons également suivi la production de conidiospores, en fonction de la quantité de la source d'Azote présente dans les milieux B, D, E, F et G.

La production globale de conidiospores de T. harzianum par fermenteur a été importante avec des valeurs très proches. Ces valeurs ont été comprises de 33 à 44 x 10^{10} conidiospores pour ces 5 milieux (Tableau VIII). De même, les indices de sporulation (Ω) obtenus sur ces milieux imposent la même remarque; à savoir que ces indices sont proches et caractérisés par des valeurs élevées (de 15,7 à 18,6 x 10^9).

Il semble donc que lorsque T. harzianum est cultivé dans un fermenteur à disques, sur des milieux différents, le nombre de conidiospores produits après 8 jours d'incubation est étroitement lié à la quantité de la source de Carbone initialement présente dans les milieux de culture.

Effectivement pour les milieux B, D, E, F et G la quantité de la source de Carbone est la même alors que celle de l'Azote varie de 1 à 6 sans pour autant avoir une conséquence sur les indices de sporulation (Ω). Cependant, il faut remarquer que les effets d'inhibition dûs à des concentrations élevées (Milieu G) ou très faibles en Azote (milieu F) qui ont été observés lors des cultures en erlen de T. harzianum ont disparu pour les cultures en fermenteur à disques après 8 jours de culture.

Cette constatation peut être dûe principalement à l'aération des milieux de culture au cours de la croissance de T.harzianum, car l'aération est le seul paramètre qui différencie les cultures en erlen de celles réalisées dans le fermenteur à disques. De ce fait, lorsque les

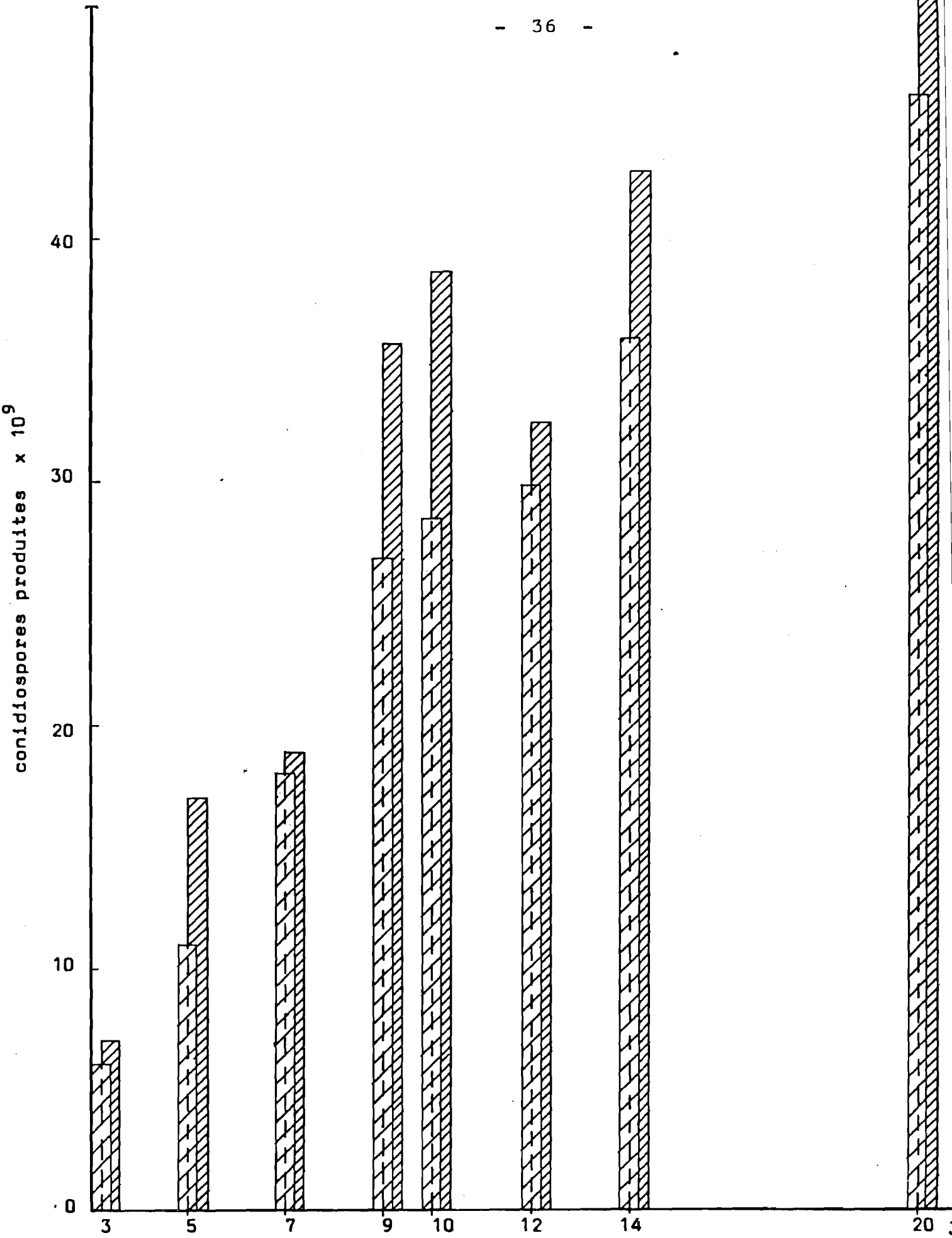


Fig. 8 Cinétique de production de conidiospores de T.harzianum cultivé sur le milieu H en erlen. La première colonne exprime le nombre Total de conidiospores la seconde exprime l'indice de sporulatio

cultures sont aérées, le développement du mycélium est plus rapide. Cette croissance rapide masquerait les effets d'induction-inhibition qui ont été observés et décrits pour les cultures en erlen. Cependant ces phénomènes d' inhibition existent mais sont très atténués (Milieu A et G) .

4.3. Effets des ions Ca^{++} sur la conidiogénèse

Les sels minéraux à concentration élevée, peuvent avoir des effets opposés sur la croissance, la sporulation et la pigmentation de Trichoderma (GINDRAT, 1977) . Dans les milieux de culture que nous avons utilisé il y avait des ions K^+ qui présentaient un effet " anti-sporulant ".

Nous avons donc utilisé le milieu H dont la composition,donnée sur le Tableau IX, est très proche de celle du milieu B (dépourvu en ions Ca^{++}) pour vérifier si les ions Ca++ pouvaient annuler cet effet " anti-sporulant".

Les résultats ont été spectaculaires aussi bien pour les cultures en erlen qu'en fermenteur (Fig. 1, Tableaux VI, VII, VIII). La comparaison des résultats obtenus à partir des cultures sur les milieux B et H, démontre que le nombre total de conidiospores produites est doublé. De même les différents indices de sporulation suivent cette évolution.

Pour les cultures en fermenteur le nombre total de conidiospores obtenu sur le milieu H est 25 % plus élevé que pour le milieu B. De plus, l'indice de sporulation pour le milieu H a été le plus élevé pour l'ensemble des milieux de culture utilisés.

4.4. Cinétique de production en fermenteur

A la suite de cette étude, nous avons défini un milieu et des conditions de culture optimales pour produire dans un erlen ou dans un fermenteur à disques le maximum de conidiospores de T.harzianum dans un minimum de temps avec des rendements de sporulation élevés.

La composition de ce milieu de culture (Milieu H) ainsi que les conditions optimales pour la production de conidiospores de T.harzianum sont données sur le Tableau IX.

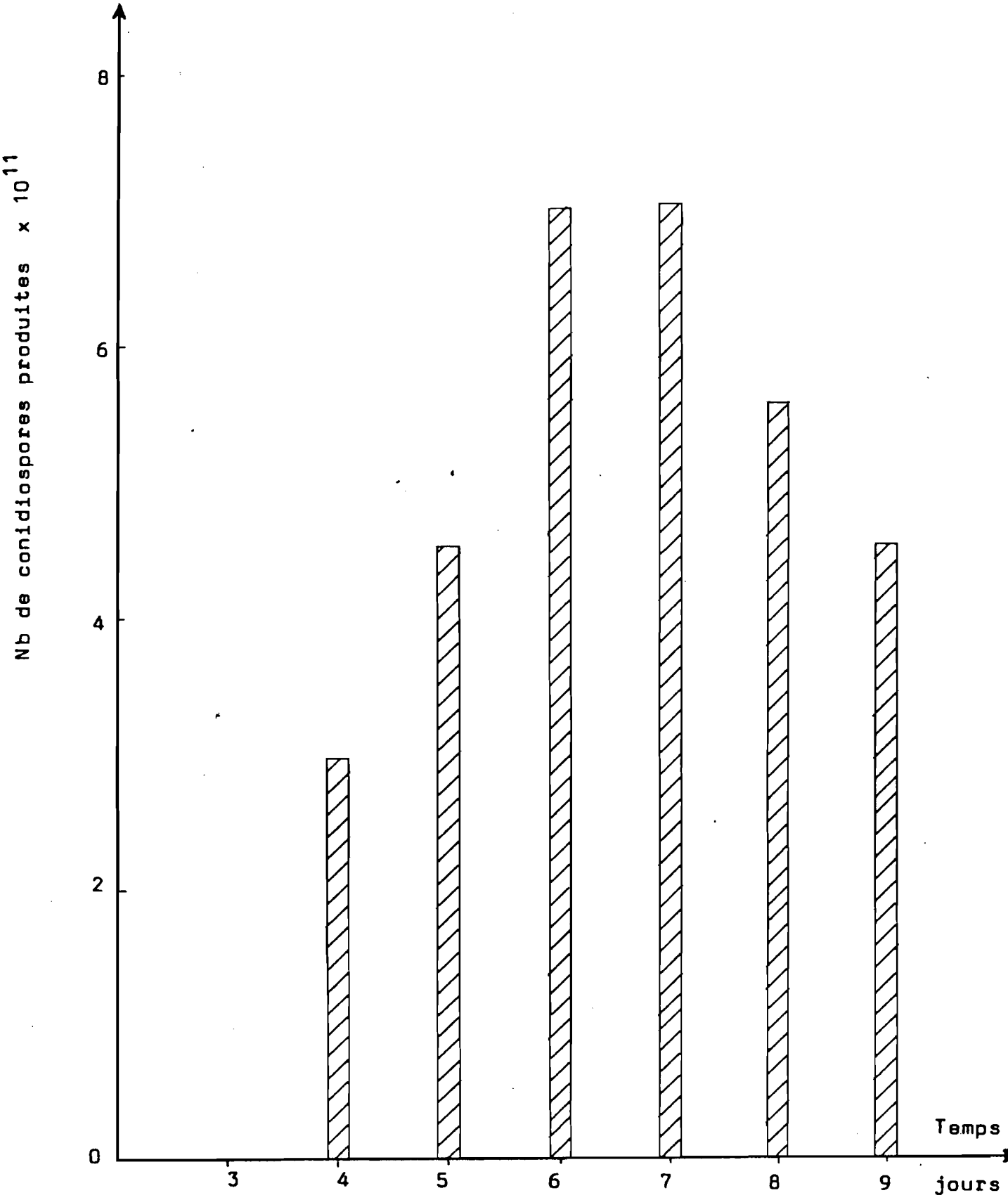


Fig. 9 Production de conidiospores de T.harzianum, cultivé sur le milieu H dans un fermenteur à disques en fonction du temps d'incubation. Les résultats expriment le nombre Total de conidiospores produites par fermenteur.

Sur les Fig. 9 et 10 ont été représentées les cinétiques de production de conidiospores de T.harzianum cultivé sur le milieu optimisé (Milieu H) dans le fermenteur à disques en fonction du temps.

Le nombre total de conidiospores évolue en fonction du temps. A partir du 4 ème jour de culture de quantités très importantes de conidiospores sont produites (3×10^{11}) . Cette production suit une croissance linéaire pour atteindre les valeurs maximales après le 6 ème jour. A partir du 8 ème jour il y a diminution régulière de cette production (Fig. 9).

Lorsqu'on examine les indices de sporulation (Fig. 10) on s'aperçoit que le maximum de conidiospores produits dans un fermenteur à disques est atteint le 7 ème jour avec les meilleurs rendements de sporulation . Sur le Tableau IX nous avons donné les résultats quantitatifs de la récolte de conidiospores après 7 jours.

Au total il y a eu production de $7,3 \times 10^{11}$ conidiospores par fermenteur. L' indice de sporulation a été de $3,25 \times 10^{10}$ conidiospores produites par gramme de farine de manioc initialement présente dans le fermenteur. Ce qui correspond à $1,47 \times 10^{8}$ conidiospores produites par cm^{-2}.

Pour l'inoculation de 12 kg SPS de bagasse pour la fermentation en milieu solide statique (Zymotis) nous avons besoin de $4,6 \times 10^{11}$ conidiospores. Cette production suffit largement pour lancer une fermentation.

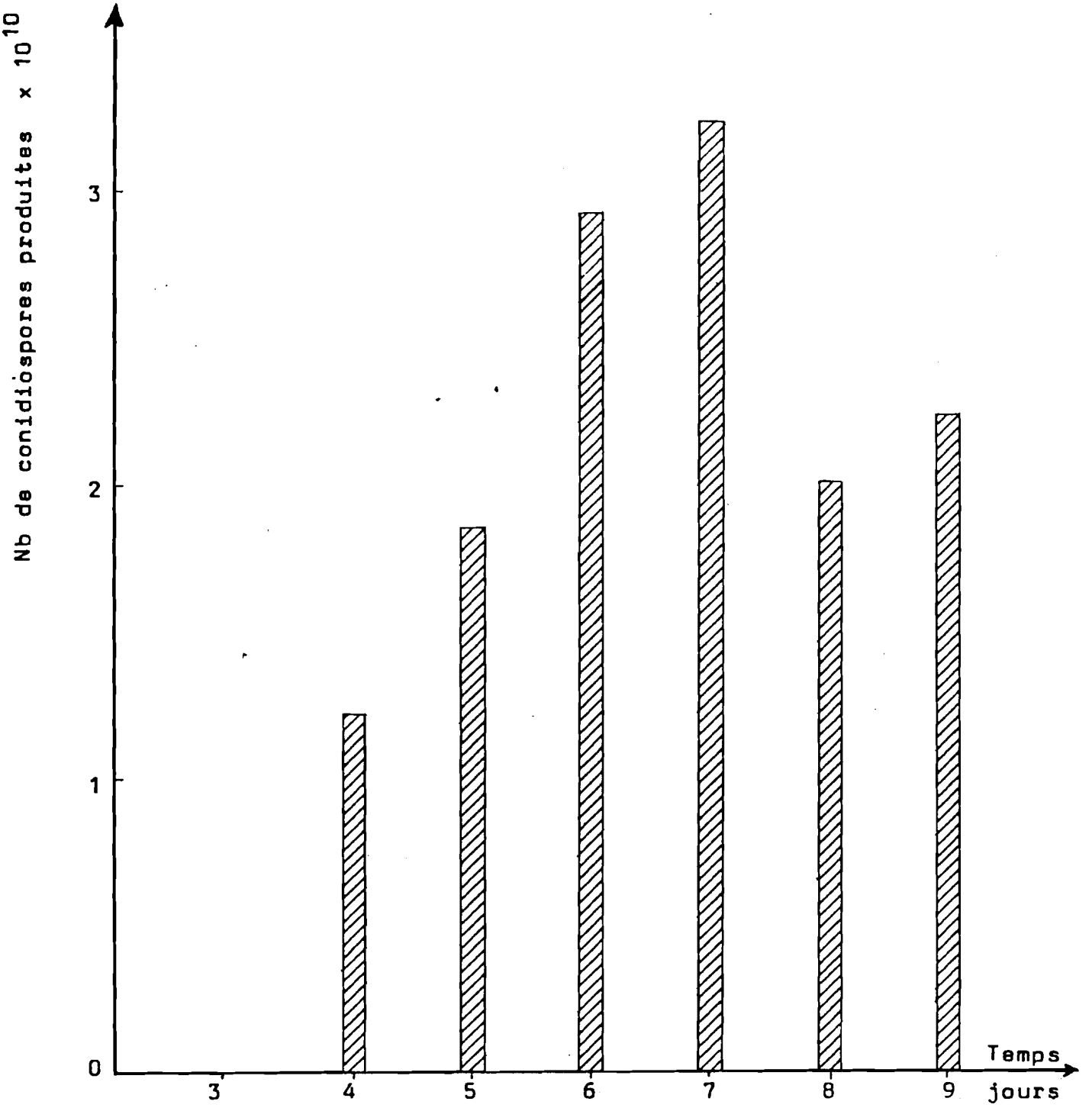


Fig. 10 Production de conidiospores de T.harzianum, cultivé sur le milieu H dans un fermenteur à disques, en fonction du temps d'incubation. Les résultats sont exprimés en nombre de conidiospores produites par gramme de substrat (Ω).

TABLEAU IX. Conditions optimales pour la production de conidiospores de T.harzianum dans un fermenteur à disques.

MILIEU DE CULTURE :	Farine de manioc	40 g
	KH_2PO_4	2 g
	$(NH_4)_2SO_4$	4 g
	Urée	1 g
	$CaCl_2$	1 g
	Agar	15 g
	Eau	1000 ml
	pH	5,6

QUANTITE DU MILIEU EN /FERMENTEUR : 600 g

STERILISATION : Autoclavage 40 mn à 110°C

INOCULATION : 6×10^8 spores de T. harzianum

INCUBATION : Température du Laboratoire (25 - 29°C)
Aération 40 l/h d'air humide
durée 7 jours

RECOLTE DES SPORES : dans 2 l d'eau additionnée de tween 80

NOMBRE TOTAL DE SPORES : $7,30 \times 10^{11}$ spores/fermenteur

INDICE DE SPORULATION : $3,25 \times 10^{10}$ spores /g S.P.S.

NOMBRE DE SPORES/cm^2: $1,47 \times 10^8$ spores / cm^2

C O N C L U S I O N S

Les distilleries et sucreries après traitement de la canne à sucre, disposent de quantités importantes de bagasse. Pour l'ensemble des unités de production en Martinique, l'excédent global de bagasse varie entre 15 % et 30 % du tonnage de canne broyée. Pour une production annuelle de 200.000 T. de canne à sucre on peut estimer la quantité de bagasse excédentaire à 200 000 T.

Actuellement la presque totalité de la bagasse excédentaire est brûlée sur place, ce qui représente une énergie perdue de 10 000 Tep. Plusieurs techniques peuvent être envisagées pour valoriser cette Biomasse. Au centre Technique de la Canne et du Sucre (CTCS) en Martinique, des essais de carbonisation de bagasse ont déj) été effectués, de même que des essais de gazéification. Ces deux techniques visent à la production d'énergie par combustion.

Dans notre Laboratoire en Martinique, nous avons mis au point un nouveau procédé Biotechnologique pour la valorisation de la Bagasse par culture de champignons filamenteux cellulolytiques. Il s'agit de la fermentation en milieu solide de la bagasse avec un champignon cellulolytique Trichoderma harzianum .

Le produit principal obtenu au cours de cette fermentation de la bagasse en milieu solide, sont des enzymes à haute valeur ajoutée : les cellulases. Celles-ci peuvent être utilisées dans l'industrie pharmaceutique, comme aide digestif dans les rations alimentaires contenant de la cellulose. Cependant la voie la plus prometteuse, dans le contexte économique actue, semble être la production de carburants de substitution. Les résidus cellulosiques une fois hydrolysés par les cellulases, fournissent un mélange de sucres simples, qui par fermentation, conduisent à des produits tels que l' acétone, l'éthanol industriel, le butanol ou le méthane.

De plus, la fraction insoluble de la bagasse fermentée obtenue. après extraction de cellulases, fraction enrichie en protéïnes fongiques, pourrait être utilisée pour l'alimentation des ruminants.

Le procédé ORSTOM de la " Valorisation Biotechnologique de la Bagasse par la production d'Enzymes de champignons filamenteux cellulolytiques " a été d'abord mis au point au niveau du Laboratoire en utilisant pour la fermentation en milieu solide des incubateurs de type colonne d'une capacité de 20 g de produit à 72 % d'humidité.

Nous avons par la suite vérifié que le passage de la Technique de fermentation solide en colonne était , expérimentalement , possible en utilisant un fermenteur statique beaucoup plus grand de type Zymotis.

Le Zymotis, une fois chargé, peut contenir 50 KG de substrat inoculé à 72 % d'humidité. C'est donc l'équivalent de 2 500 colonnes. A ce stade d'extrapolation on peut donc parler d'un procédé au niveau pilote expérimental.

Pour la production de cellulases de T. harzianum cultivé en Zymotis, nous avons été amenés à résoudre un certain nombre de problèmes pratiques posés par le passage de la technique de la colonne (20 g) à celle du Zymotis (50 kg). A savoir qu'il fallait :

- disposer de quantités très importantes d'inoculum
- optimiser le prétraitement du substrat
- optimiser les paramètres de la fermentation en Zymotis (température, humidité, aération).
- extraire les cellulases du produit fermenté
- conditionner et conserver les produits obtenus

Nous avons étudié la cinétique de production de conidiospores de T.harzianum cultivés sur différents milieux de culture en erlen afin de définir un milieu et des conditions de culture optimales. Un nouveau fermenteur à disques a été expérimenté pour la production de conidiospores de T.harzianum cultivé sur le milieu optimum. Après 7 jours de culture il y a eu $7,3 \times 10^{11}$ conidiospores produits par fermenteur avec un indice de sporulation de $3,25 \times 10^{10}$ conidiospores produites par cm^2 . Alors que pour l'inoculation de 12 kg SPS de substrat pour la fermentation en milieu solide statique (Zymotis) il en fallait seulement $4,6 \times 10^{11}$.

Au total, pour la fermentation en Zymotis de 12 kg poids sec de substrat, nous avons obtenu après 48 h de culture de T.harzianum les rendements suivants en cellulases.

- 164 520 U.I. d'Activité Papier Filtre
- 1 623 240 U.I. " Carboxyméthylcellulase

Ces résultats très prometteurs, nous autorisent à envisager l'utilisation de ce nouveau Biofermenteur pour la production, au niveau pilote, de cellulases de T.harzianum et valoriser ainsi la bagasse de canne à sucre.

De plus, après traitement du produit fermenté et extraction de cellulases, nous avons récupéré grâce à ce procédé, dans la Fraction Soluble 80 % des activités enzymatiques contenues dans 27 litres . Nous avons ainsi obtenu une solution très concentrée en cellulases. Cette solution peut être conservée pour une longue période par lyophilisation . Le produit obtenu se présente sous forme de poudre sèche et pèse 1 kg; de plus, les cellulases n'on subi aucune détérioration.

La Fraction Insoluble a été conservée par ensilage, et suivant les résultats des analyses qui seront faites au Centre de Zootechnie de l'INRA - Guadeloupe, elle pourrait être utilisée pour l'alimentation des ruminants.

L'originalité et l'intérêt économique de ce nouveau procédé mis au point à l'ORSTOM, est de faire appel à une Technologie simple, pouvant être mise en oeuvre au niveau rural, dans le site même d'accumulation de la bagasse (Distilleries ou sucreries).

.. = . = . = . = ..

B I B L I O G R A P H I E

ASTHER, M. 1982. Production d'Aliments Fermentés Enrichis en Protéïnes à partir de substrats ligno-cellulosiques par fermentation en milieu solide. D.E.A. de Microbiologie Univ. Aix-Marseille II. 35 p.

CELANIE, E. 1982. Etude de l'évolution microbiologique et des caractéristiques fermentaires des ensilages de canne à sucre de sorgho et de pangola en climat tropical humide. Thèse 3 ème Cycle. Univ. Pierre et Marie CURIE. Paris.114 p.

GADEN, E.L. 1976. Enzymatic conversion of cellulosic materials Applications : Summary; Biotechnol. Bioeng. Symp. N° 6 : 316-314.

GIULIANO, C. 1982. Production de cellulases par fermentation en milieu solide. D.E.A. de Microbilogie Univ. Aix-Marseille II. 45 p.

HAWKER, L.E. 1966. Environmental influences on reproduction In the Fungi, Vol. II pp. 435-69. AINSWORTH, G.C. et A.S. SUSSMAN, New-York et London Academic Press.

LAMBERT, P.W. et J.L. MEERS. 1983. The production of industrial enzymes. Phil. Trans.R. Soc. Lond. B. 300 : 263-282

RAIMBAULT, M. et J.C. GERMON. 1976. Procédé d'enrichissement en protéïnes de produits comestibles solides. Brevet français ANVAR n° 76.06.677.

RAIMBAULT, M. et D. ALAZARD. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation.Europ. J. appl. microbiol. Biotechnol. 9 -199-209.

RAIMBAULT,M. et S. ROUSSOS. 1981. Procédé de production de spores de champignons filamenteux. Demande de Brevet d'invention déposée à l'ANVAR en Janvier 1981.

RAIMBAULT, M. PREBOIS J.P. et S. ROUSSOS. 1982. Bio-fermenteur pour la culture de champignons filamenteux en milieu solide statique. Demande de Brevet d'invention déposée à l'ANVAR en Juin 1982.

ROUSSOS, S. 1981. Etude de l'Hydrolyse de la cellulose par des moisissures cultivées en milieu solide. Rapport élève ORSTOM 80 p.

ROUSSOS, S. et M. RAIMBAULT. 1982. Hydrolyse de la cellulose par les moisissures I.. Screening des souches cellulolytiques. Ann. Microbiol. 133 : 455-464.

ROUSSOS, S. et M. RAIMBAULT. 1982. Hydrolyse de la cellulose par les moisissures II. Production de cellulases de Trichoderma harzianum par fermentation en milieu liquide. Ann. Microbiol. 133 : 465-474.

ROUSSOS, S. , GARCIA, J.L et M. RAIMBAULT. 1983. Valorisation de la cossette de betterave par culture de Trichoderma harzianum en milieu liquide et solide. Ind. Aliment. Agric. 100 : 449-452.

ROUSSOS, S. et R.K. SEDHA. 1983. Production comparée de cellulases de Trichoderma harzianum et de Chaetomium cellulolyticum cultivés sur bagasse prétraitée en fermentation en milieu solide et liquide. Colloque Int. Biotechnol. " BIOSCIENCES 83 " Paris 6-9 Sept. 1983.

SEBO, J. 1975. Press extraction of green plants for separation of the cell sap and the fiber fraction In Symposium on Enzymatic hydrolysis of cellulose.
pp. 65-72. BAILEY, M., ENARI, T.M. et M. LINKO. eds. SITRA, Aulanko, Finland 12 - 14 March 1975.

SRINIVASAN, V. 1975. Production of Bio-protéin from cellulose in Symposium on Enzymatic hydrolysis of cellulose. BAILEY, M. ENARI; T.M. et M. LINKO eds. Aulanko, Finland 12-14 March 1975.

VEZINA, C., SEHGAL, S.N. et K. SINGH.1968. Transformation of organic compounds by fungal spores. Advances in Appl. Microbiol. 10 : 221 - 268.

VIDAUD, C., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M. et F. DESCHAMP. 1982 Effet de divers prétraitements sur l'accessibilité de la cellulose de la paille de blé aux cellulases de Trichoderma harzianum . Cah. ORSTOM Ser. Biol. 45 : 17-23.

ROSEMAIN, R. 1983. Les sous-produits de la canne à sucre. Note interne CTCS. Martinique. 5 p.

R E M E R C I E M E N T S

Je tiens à remercier :

Les Directeurs des Centres ORSTOM de la MARTINIQUE, Mr. J.P. TONNIER et de GUADELOUPE, Mr. M. HOEPFFNER.

Le responsable du Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Appliquée Mr. J. BALDENSPERGER ainsi que ses collaborateurs : Mlles. L. HANNIBAL, I. PERRAUD et Mr. J. Le MER.

Le Directeur du C.T.C.S., Mr. R. ROSEMAIN ainsi que ses collaborateurs , en particulier Mlle. DUFRENOT.

Mr. GEOFFROY de la station de Recherches Zootechniques de l'INRA Antilles-Guyane .

Les responsables des Laboratoires ORSTOM en Martinique et en particulier , Mr. F. DELPEUCH, du Laboratoire de Nutrition et Mr. C. FELLER du Laboratoire de Pédologie.

Les responsables des Laboratoires communs de l' ORSTOM aux Antilles , Mr. A. PLENECASSAGNE et Mr. PETARD, ainsi que Mr. BERNARD du service de Cartographie.

Mr. De la GARRIGUE de la Distillerie DILLON ainsi que le personnel de celle-ci.

Sans leur aide, discrète et efficace, ce travail n'aurait pas abouti sous cette forme. Je tiens, en remettant ce rapport, à leur témoigner mon estime et ma vive sympathie.

S. ROUSSOS

Chargé de Recherches à l'ORSTOM

O. R. S T. O. M.

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE

POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION

. = . = . = . = . = .

Laboratoire de Biotechnologie
et de Microbiologie Appliquée

O.R.S.T.O.M. _ B.P. 81

97 201 - FORT DE FRANCE
MARTINIQUE

A N N E X E S

VALORISATION BIOTECHNOLOGIQUE DE LA BAGASSE PAR LA PRODUCTION AU NIVEAU PILOTE D'ENZYMES DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX CELLULOLYTIQUES

Par

ROUSSOS S. et HANNIBAL L.

Compte Rendu Final
d'une Recherche financée
par le CORDET 83 .

Date : Juillet 1984.

Commission CORDET. Projet C. 100.

Fonds Documentaire ORSTOM
Cote: A*6068 Ex: 1

A N N E X E I

PRODUCTION DE CELLULASES DE TRICHODERMA HARZIANUM CULTIVE SUR BAGASSE PAR FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE

pages

1. INTRODUCTION I-1

2. LA BAGASSE DE LA CANNE & SUCRE I-3

2.1. La culture de la canne dans le monde I-3

2.2. Les sous produits de la canne I-3

2.2.1. Au Brésil I-3

2.2.2. En Martinique I-5

2.3. La bagasse et sa transformation I-10

3. LA NATURE DES CELLULASES I-14

3.1. Les enzymes de la cellulolyse I-14

3.2. Mécanisme d'action de cellulases I-14

3.3. Contrôle et régulation de la biosynthèse de cellulases I-17

4. LES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX CELLULOLYTIQUES I-19

4.1. Les Aspergillus I-19

4.2. Les Chaetomium I-20

4.3. Les Sporotrichum I-20

4.4. Les Trichoderma I-21

5. LES FERMENTATIONS DES SUBSTRATS CELLULOSIQUES I-23

5.1. Les fermentations en milieu liquide I-23

5.2. Les fermentations en milieu solide I-24

6. MATERIEL ET METHODES I-27

6.1. Matériel Biologique I-27

6.2. Milieux de culture I-27

6.2.1. Conservation et entretien de souches I-27

6.2.2. Production d'inoculum I-27

6.2.3. Production de cellulases I-28

6.2.4. Microflore hétérotrophe aérobie de la bagasse ... I-28

6.2.4.a. Bactéries totales I-28

6.2.4.b. Champignons totaux I-28

6.2.4.c. Champignons cellulolytiques I-29

6.3. Conditions de culture pour la production de cellulases I-29

6.3.1. Fermentation en milieu liquide I-29

6.3.2. Fermentation en milieu solide I-31

6.3.2.a. En colonne I-31

6.3.2b. En Zymotis I-31

6.4. Conditionnement et analyses des échantillons I-38

6.5. Expression des résultats I-38

7. RESULTATS ET INTERPRETATIONS I.39

7.1. Microflore hétérotrophe aérobie de la bagasse I-39

7.2. Production de cellulases en fermenteur de 2 l I-42

7.3. Production de cellulases en colonne I-44

7.3.1. culture sur bagasse uniquement I.44
7.3.2. culture sur son de blé uniquement I.46
7.3.3. culture sur un mélange de bagasse et son de blé. I-46
7.3.4. optimisation de la solution minérale I-48

7.4 Production de cellulases en Zymotis I-53

7.4.1. mise au point de la fermentation I-53
7.4.2. Zymotis chargé avec 4 kg SPS I-58
7.4.3. Zymotis chargé avec 8 kg SPS I-61
7.4.4. Zymotis chargé avec 10 kg SPS I-61
7.4.5. Zymotis chargé avec 12 kg SPS I-64

8. .CONCLUSIONS I-68

9. BIBLIOGRAPHIE I-71

PRODUCTION DE CELLULASES DE TRICHODERMA HARZIANUM CULTIVE SUR BAGASSE PAR FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE

1. INTRODUCTION

Les substrats lignocellulosiques, abondants et continuellement renouvellés grâce au mécanisme de la photosynthèse constituent la principale ressource de Carbone organique. Parmi eux, les sous-produits agricoles s'avèrent, malgré leur dispersion géographique, la source la plus disponible et la moins coûteuse.

L'explosion démographique et la menace de la faim dans le monde posent de graves problèmes d'approvisionnement alimentaire et énergétique, en particulier dans les P.V.D. Beaucoup d'efforts ont été faits pour accroître le rendement de céreales et développer de meilleurs procédés pour l'agriculture. La production d'aliments amylacés fermentés enrichis en protéïnes (AFEP) par culture de champignons filamenteux , est une voie de recherche originale et prometteuse.

Cependant, dans cette recherche universelle pour la découverte de nouvelles nourritures, il est surprenant de constater que la cellulose et les substrats lignocellulosiques aient reçu si peu d'applications. La cellulose, dont les disponibilités potentielles sont très élevées, présente l'inconvénient de necessiter l'hydrolyse des liaisons glucidiques (β-1,4), processus lent et difficile à réaliser aussi bien par voie chimique que biologique.

Un intérêt grandissant a été porté sur les ressources naturelles renouvenables (la Biomasse) depuis le début de la crise énergétique. A ce titre, la cellulose est tout naturellement au centre de ces recherches pour la production d'énergie (carburants de substitution) ou de matières premières pour l'industrie chimique.

On peut donc considérer que dans l'avenir, la cellulose ainsi que les sous-produits agroindustriels cellulosiques, seront utilisés comme une source possible pour l'obtention de divers produits

chimiques de grande consommation.

Pour cela il est nécessaire de disposer des sucres simples obtenus par hydrolyse chimique ou enzymatique de la cellulose. Les cellulases capables de réaliser cette hydrolyse, peuvent être obtenues par la croissance de microorganismes sélectionnés sur les substrats lignocellulosiques eux-mêmes.

Actuellement, les travaux de recherche sont orientés vers le développement industriel de la production de cellulases de champignons filamenteux cultivés en fermenteurs en milieu liquide. Cette technique, qui n'a pas encore franchi le stade pilote expérimental, présente entre autres inconvénients une limitation des contacts substrat / microorganisme et une forte viscosité des milieux de culture.

Nos recherches ont donc été orientées, depuis cinq ans, vers la production de cellulases de champignons filamenteux. Ces enzymes sont obtenues par un procédé nouveau de fermentation en milieu solide de produits lignocellulosiques.

Dans cette partie du rapport nous avons développé la production de cellulases de Trichoderma harzianum , cultivé sur bagasse de canne à sucre, par fermentation en milieu solide. Nous avons donné quelques indications sur la nature et les quantités de bagasse disponible après le traitement de la canne à sucre au Brésil et en Martinique, ainsi que les possibilités de valorisation de la bagasse excédentaire.

La valorisation biotechnologique de ce substrat lignocellulosique fait appel à des enzymes produites par des champignons filamenteux. Il a été donc nécessaire de faire le point des connaissances actuelles sur la nature des cellulases ainsi que sur les microorganismes utilisés pour produire ces enzymes.

L'originalité de ce travail a été de produire les cellulases de T.harzianum cultivé sur bagasse, au niveau pilote expérimental, en utilisant un nouveau type de biofermenteur statique : le Zymotis. L'optimisation des conditions de culture par fermentation en milieu solide a été mise au point en colonne et ensuite en Zymotis. Des cultures en parallèle (colonne - Zymotis) nous ont permis de vérifier la faisabilité de ce nouveau procédé.

2. LA BAGASSE DE LA CANNE A SUCRE

2.1. La culture de la canne dans le monde

La théorie actuelle, la plus généralement admise propose le Saccharum robustum comme espèce botanique de départ et la Nouvelle Guinée ainsi que les îles voisinescomme centre d' origine.

Les Romains connaissaient ce produit, mais les Arabes ont diffusé des boutures de canne à sucre en Palestine d'abord, puis en Egypte, en Sicile en Espagne et au Maroc.

Christophe COLOMB, à son second voyage, a apporté des boutures de canne des îles Canaries à la République Dominicaine. Cette culture s'est développée entre 1500 et 1600 dans la plupart des pays tropicaux de l'Amérique (Antilles,Mexique, Brésil, Pérou ...), et a été pendant longtemps leur principale richesse agricole.

La canne à sucre n'étant limitée que par le froid ou l'altitude, la majeure partie des régions tropicales et de nombreuses zones subtropicales se prêtent à cette culture (Fig.1).

C'est ainsi que la limite Nord englobe Madère, le Sud-Est de l'Espagne, la Haute Egypte, le Sud de l'Iran, le Pakistan, l' Inde.du Gange, la Chine du Sud, Formose, l'île japonaise de Riou Kiou, les îles Hawaï, le Mexique et le Sud de la Louisiane et de la Floride. La limite Sud contient la province de Natal en Afrique du Sud, Madagascar, la Réunion et l'île Maurice, le Queensland en Australie, les îles Fidji, la côte Péruvienne, la province de Tucuman en Argentine et le Nord de l'état du Parana au Brésil (FAUCONNIER et BASSELEAU; 1970).

Les principaux producteurs sont actuellement le Brésil, l'Inde, Cuba, puis le Mexique, la Chine, les Philippines, l' Australie, l'Afrique du Sud, Hawaï, la République Dominicaine et Formose.

2.2. Les sous produits de la canne

2.2.1. Au Brésil

Ainsi que nous venons de le voir le Brésil est en tête des principaux producteurs de canne à sucre. La fabrication de sucre

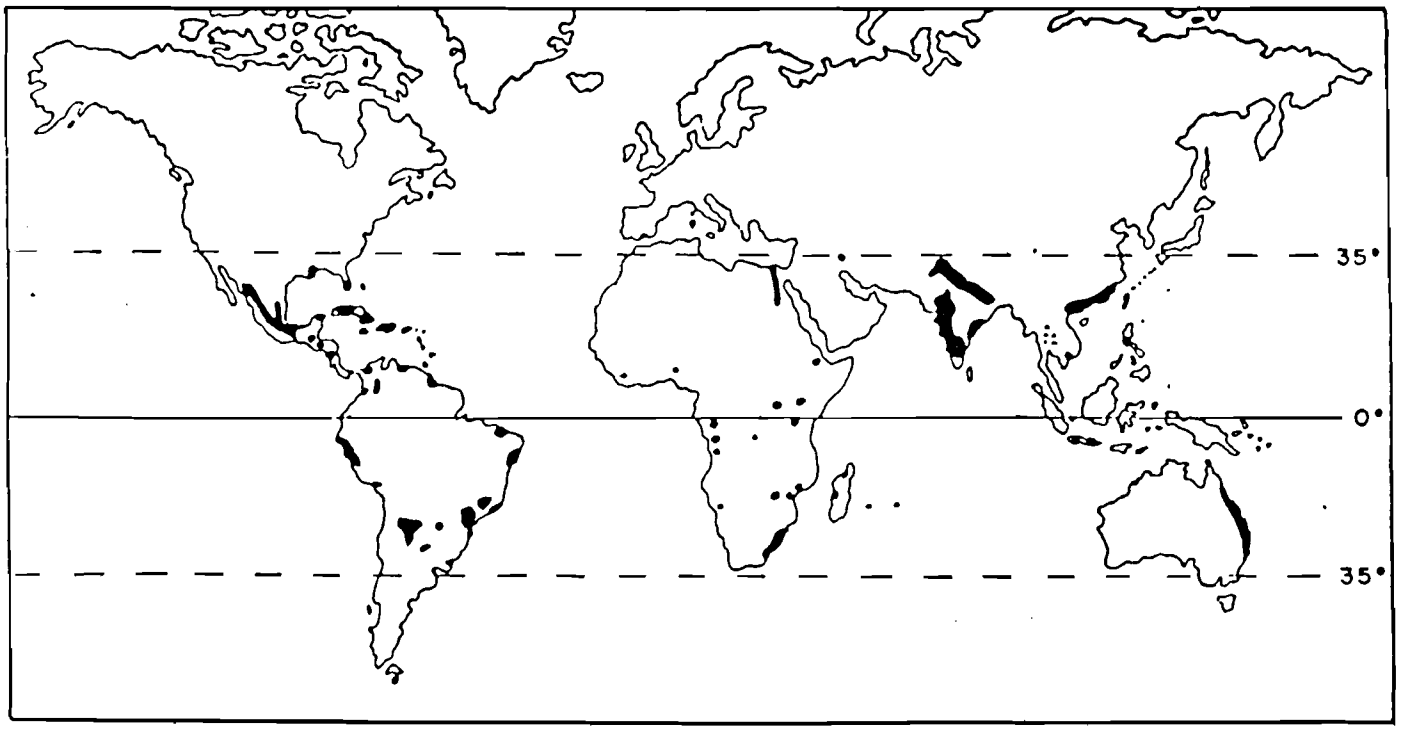


Fig. 1 : Localisation des cultures de canne à sucre dans le monde .

artisanal, très prospère, il y a encore quelques décennies, a été en sensible régression vers les années 70. Cependant, depuis la crise du pétrole et la grande crise éconimique qui a secoué ce pays pendant cette période, le gouvernement Brésilien a été amené à développer un programme de production de carburant de substitution.

C'est pour cette raison que les autorités Brésiliennes ont crée en 1975 le programme Alcool (Proalcool), dont l'objectif vise au remplacement partiel et progressivement total de l'essence par l'alcool carburant (éthanol) .

Le choix a porté sur la production d'alcool à partir de la canne à sucre. Le Brésil ayant déjà à cette époque une technologie et une infrastructure importantes dans le domaine des sucreries, il a été seulement nécessaire d'ajouter des distilleries aux complexes sucriers par la production d'alcool.

Le gouvernement a programmé une production de 10,7 milliards de litres d'alcool pour l'année 1985. Il faudrait, pour atteindre cet objectif, planter 5.500.00 ha de canne à sucre, ce qui représente 1 % de la surface du Brésil et la production de 126.000.000 T de canne à sucre (GERRI, 1983).

La production industrielle d'alcool au Brésil est assurée d'une part dans des distilleries annexes des sucreries (Fig.2) et d'autre part dans des distilleries autonomes (Fig. 3).

La production de sucre d'alcool au Brésil offre des quantités considérables de sous-produits en particulier des vinasses, de la bagasse, des tourteaux de filtration et des cendres. Pour une production de 10,7 millions de m^3 d'alcool prévue pour 1985, découleront 140 millions de m^3 de vinasse et 28.350.000 T de bagasse dont le 1/3 c'est à dire 9.450.000 T de bagasse excédentaire.

2.2.2. Les sous-produits de la canne à sucre en Martinique

La production de la canne à sucre en Martinique a été de 200 000 T en 1982, de 213 000 T en 1983 et estimée entre 205 et 215 000 T pour 1984. Cette canne est destinée principalement aux 13 distilleries de Rhum et à l'usine (Sucrerie du GALLION). Cette dernière a effectivement traité en 1982 56 000 T et en 1983 83 000 T de canne à sucre.

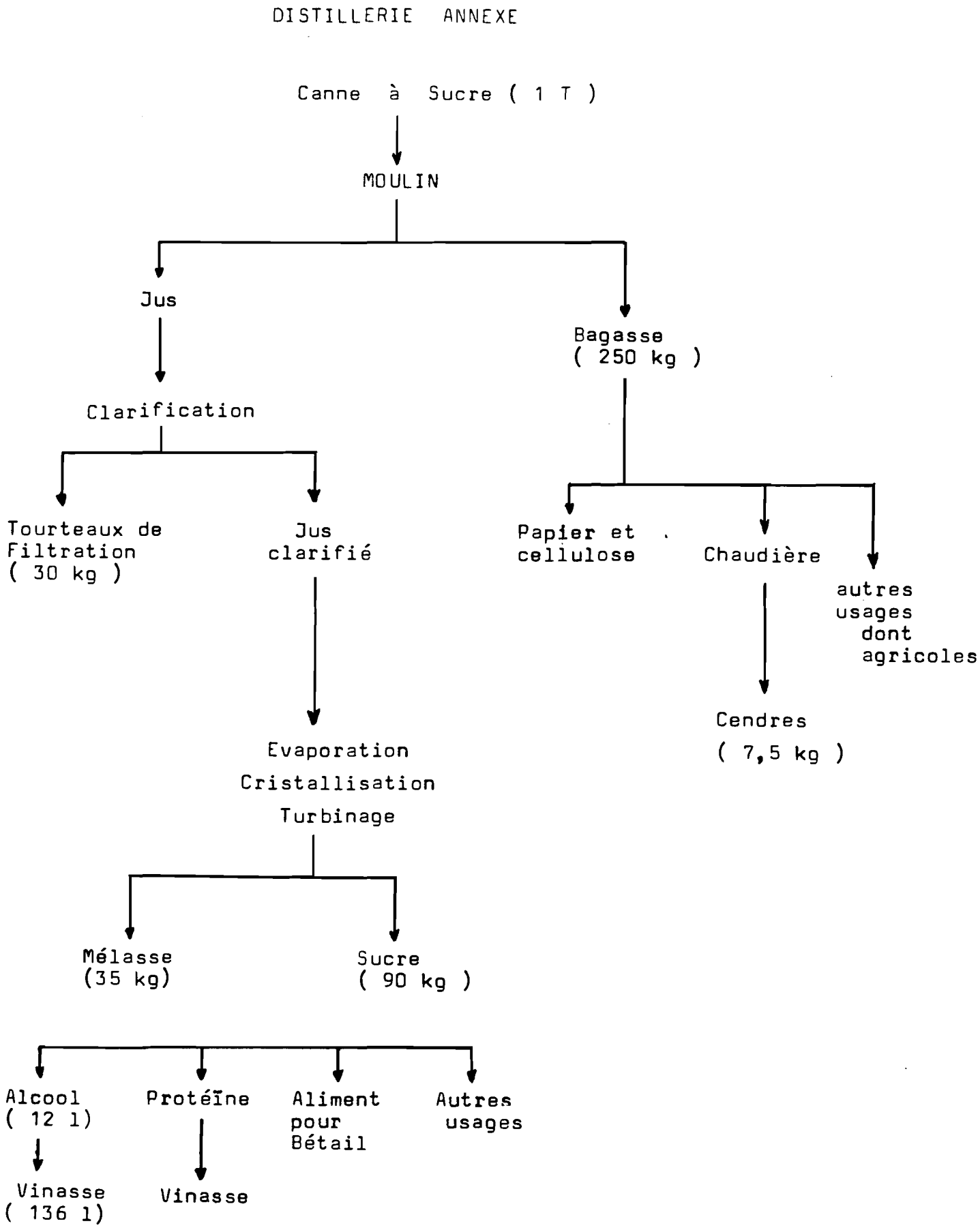


Fig.2Produits obtenus par Tonne de canne à sucre en distillerie annexe au Brésil. valeurs moyennes (BACCHI, 1983).

DISTILLERIE AUTONOME

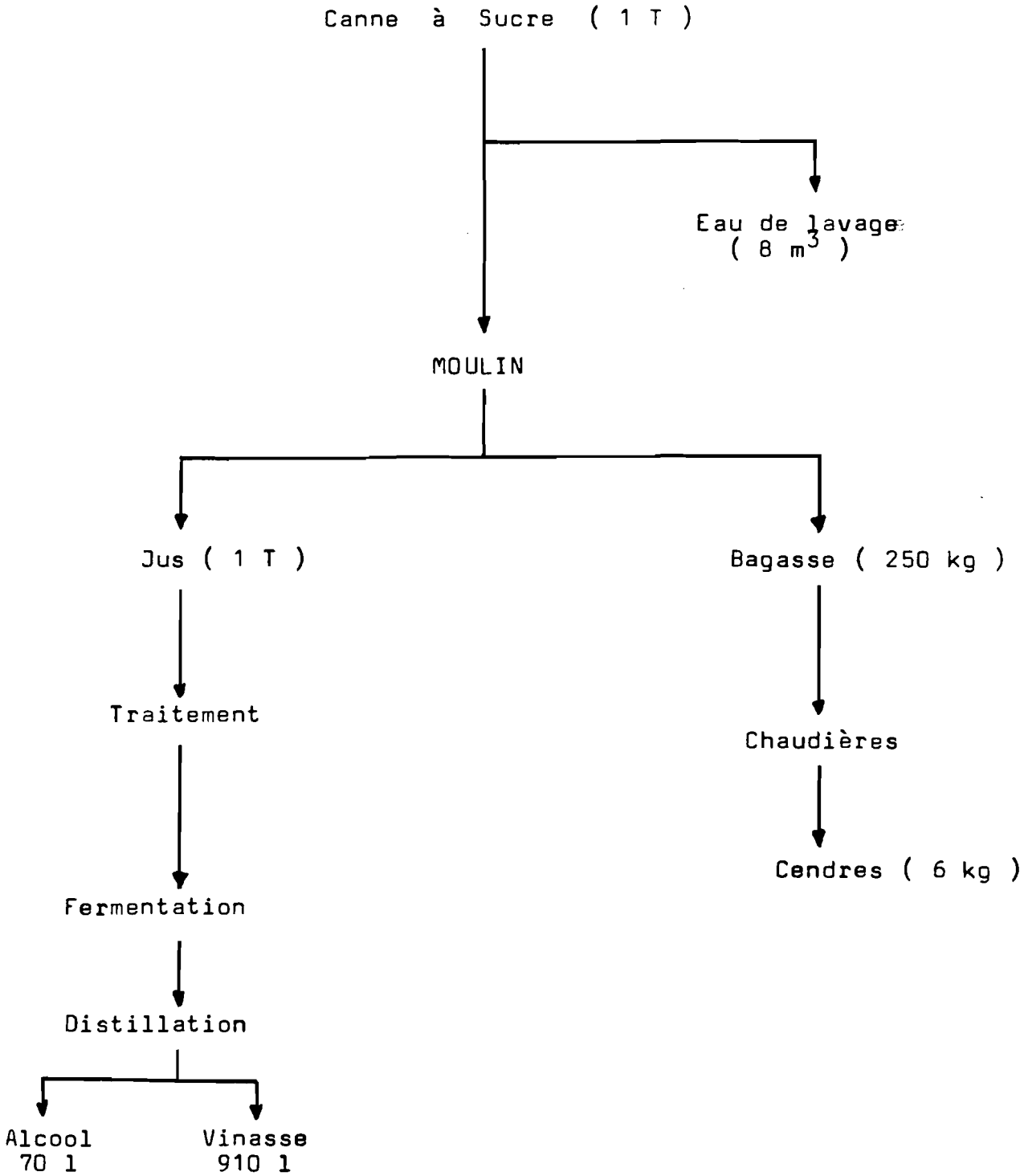


Fig. 3 Produits obtenus par Tonne de Canne à sucre en distillerie autonome au Brésil. Valeurs moyennes (BACCHI, 1983.)

Sur la Fig. 5 nous avons reproduit le schéma de sous-produits de canne en Martinique (ROSEMAIN,1983). Les distilleries et la sucrerie après traitement de la canne à sucre disposent de sous-produit suivants:

- la bagasse
- la vinasse
- les fonds de cuve

Après passage dans les moulins de la canne, on obtient 30 % de bagasse par rapport au tonnage de canne broyée.

1 Tonne canne ⟶ 0,3 T bagasse

Une partie de la bagasse est brûlée en chaudière pour produire de la vapeur qui sert à produire de l'électricité (grosses unités) à entraîner les moulins et à produire de la chaleur.

La bagasse ainsi brûlée permet aux usines de ne pas consommer de fuel. Les grosses et moyennes unités qui fonctionnent régulièrement, ont après avoir assuré leur besoins énergétiques, des excédents en bagasse pouvant aller jusqu'à 30 % de la bagasse produite.

Sur la Fig. 4 nous avons donné le schéma de la bagasse produite et de son utilisation principalement en chaudières.

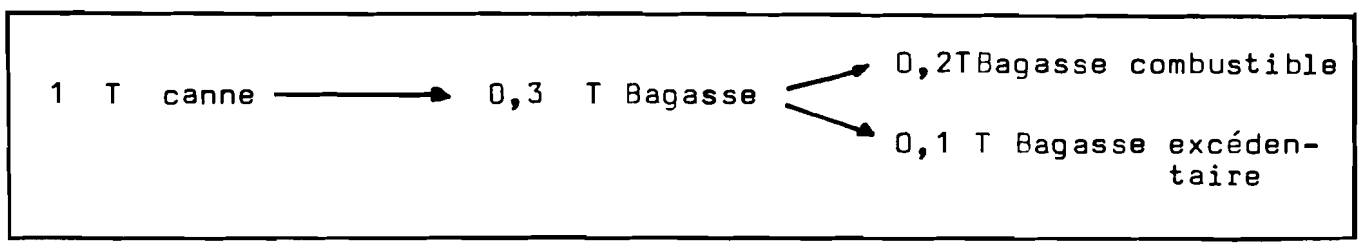


Fig. 4 Schéma de la production de bagasse et des quantités utilisées ou excédentaires (ROSEMAIN,1983).

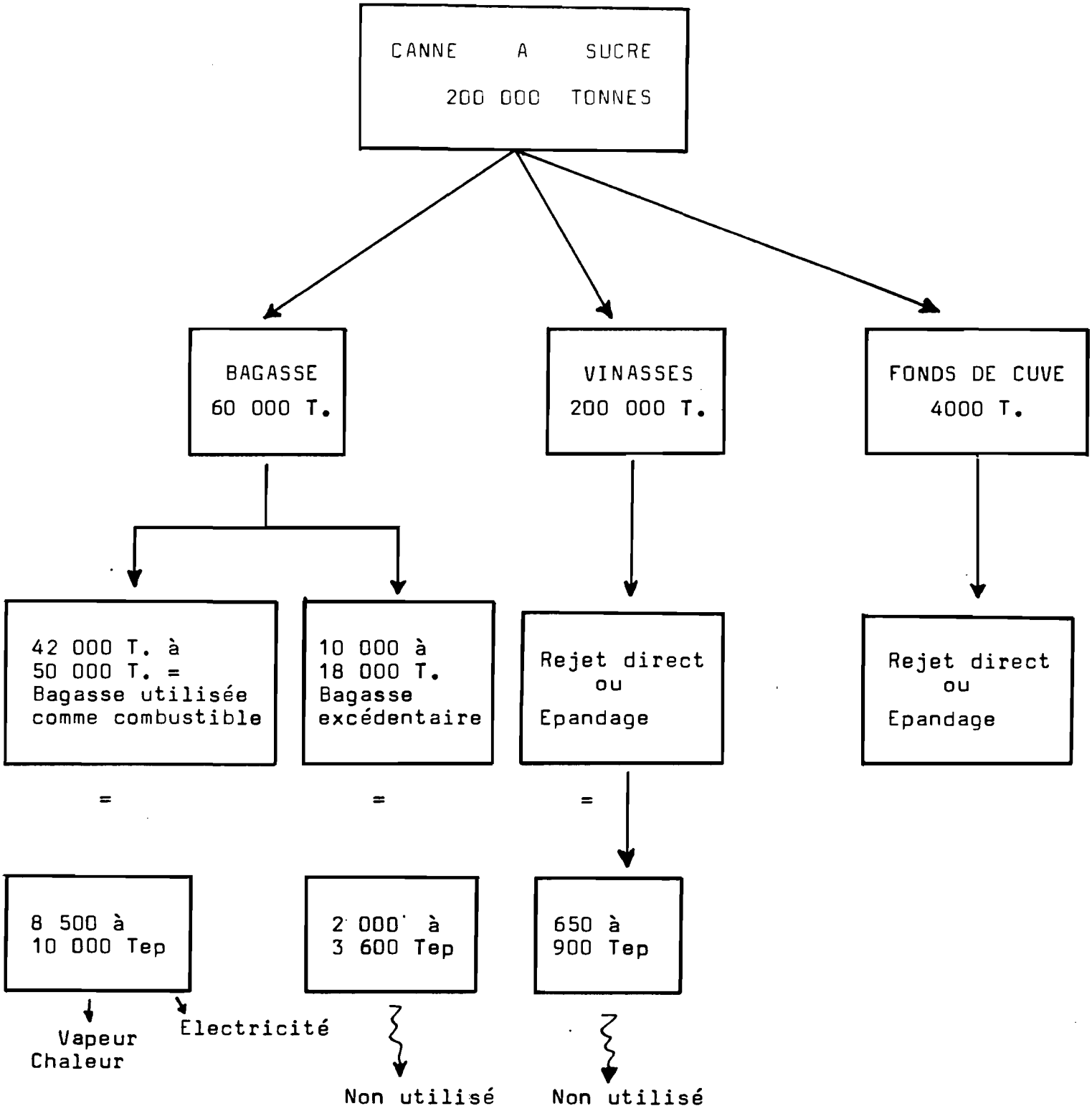


Fig. 5 Schéma de sous produits de canne à sucre en MARTINIQUE (ROSEMAIN 1983).

On peut considérer que pour l'ensemble des unités de production de la Martinique, l'excédent global de bagasse varie entre 15 % et 30 % Lorsque la campagne sucrière se déroule dans de bonnes conditions climatiques (pluviométrie faible) on atteint 30 % d'excédent.

2.3. La bagasse et sa transformation

La bagasse est le résidu de l'extraction du jus de la canne au moulin ou à la presse.

Sur le Tableau 1 nous avons indiqué la composition moyenne de la bagasse. La cellulose est le principal constituant, suivie par les hémicelluloses et la lignine. Elle constitue de ce fait un substrat lignocellulosique qui peut être transformé en panneaux de fibres ou en pâte à papier.

TABLEAU I : Composition moyenne de la Bagasse (% de Poids sec)

CELLULOSE	HEMICELLULOSE	LIGNINE
39-50	25-35	20-28

La transformation chimique des produits lignocellulosiques a été explorée par GOLDSTEIN (1976). Nous l'avons résumé sur les trois Figures (6, 7 et 8).

Tout d'abord, la transformation des produits lignocellulosiques par voie chimique nécessite des procédés drastiques avec une température élevée (1000°C) et de fortes pressions pour obtenir

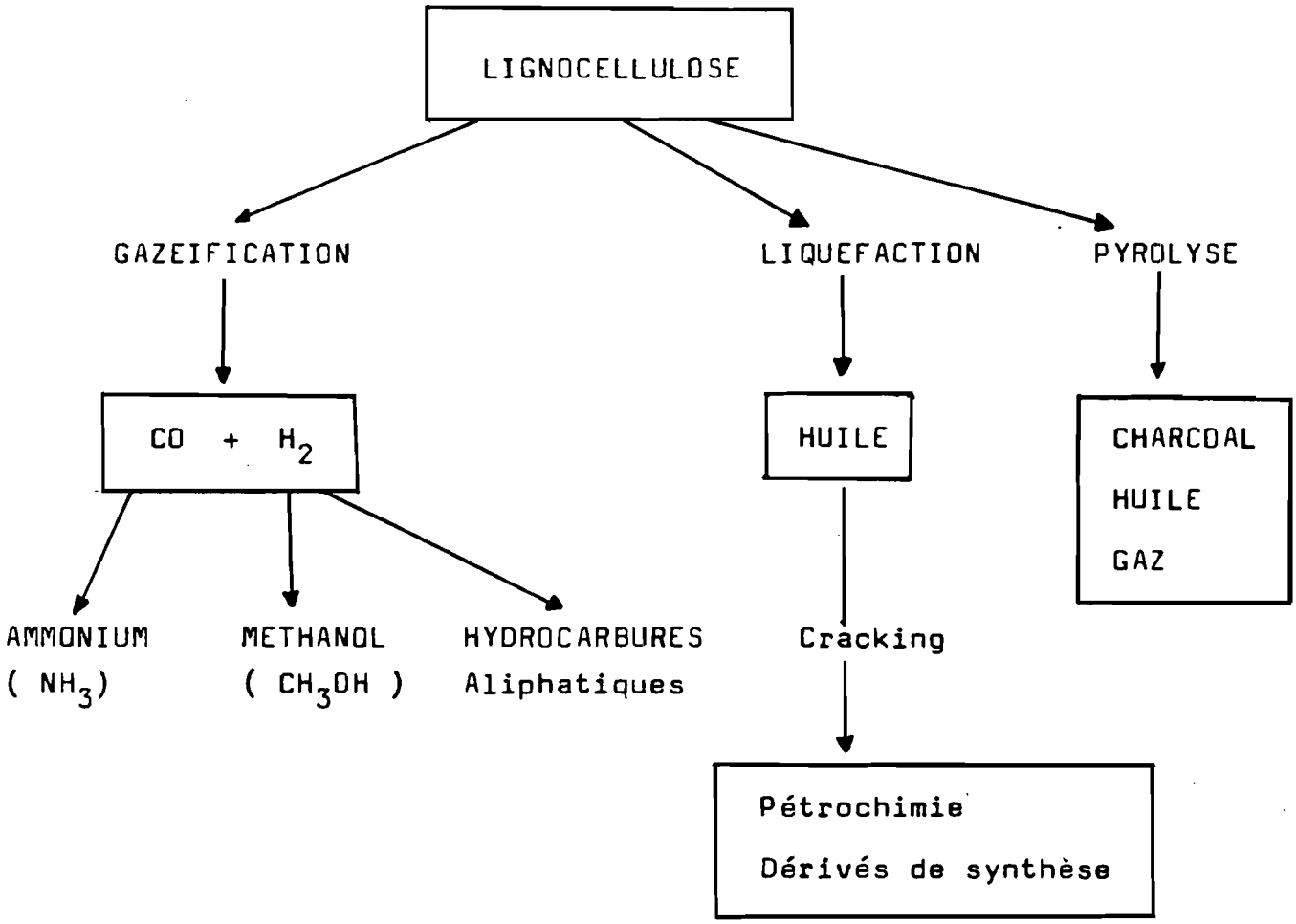


Fig. 6 : Procédé de transformation chimique des substrats lignocellulosiques selon GOLDSTEIN (1976).

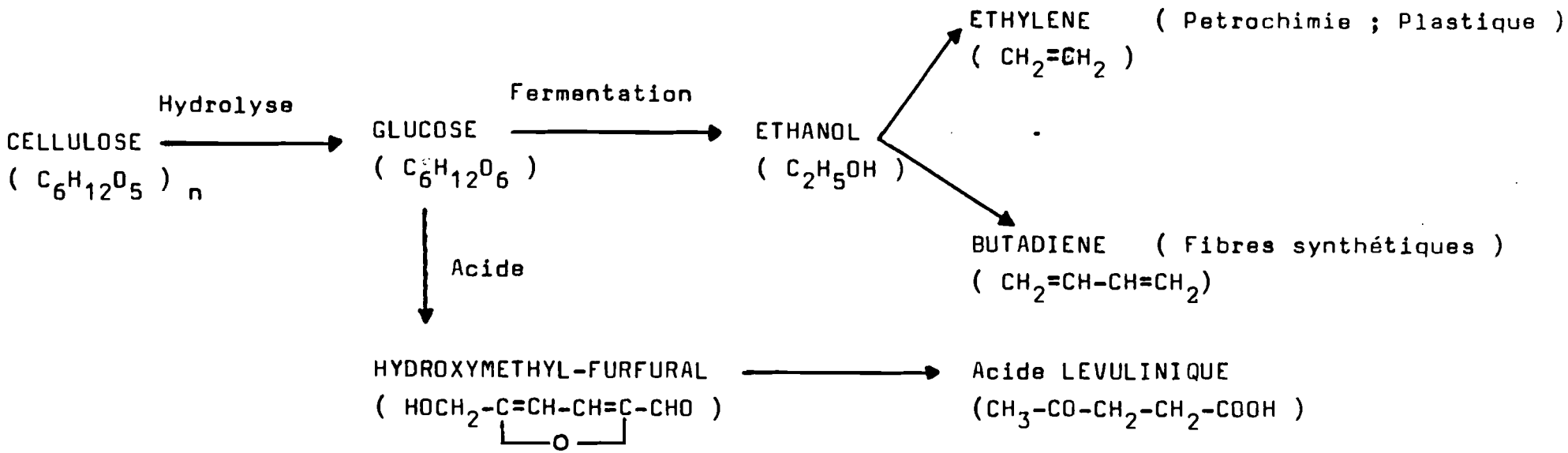


Fig. 7 : Transformation chimique de la cellulose selon GOLDSTEIN (1976).

des produits tels que Méthanol, Ammonium, hydrocarbures aliphatiques huiles et gaz par pyrolyse, liouéfaction ou encore par gazéïfication (Fig. 6).

La cellulose par hydrolyse acide libère du glucose lequel par transformation chimique du glucose donne de l'hydroxyméthyl furfural, lequel est tranformé en acide levulimique (Fig. 7).

De même, les hémicellules par hydrolyse acide libèrent du mannose et du xylose/ Le Mannose par fermentation produit de l'éthanol alors que le xylose par traitement acide se transforme en furfural (Fig. 8).

Enfin la lignine par voie chimique peut être tranformée en phénol puis en Benzène.

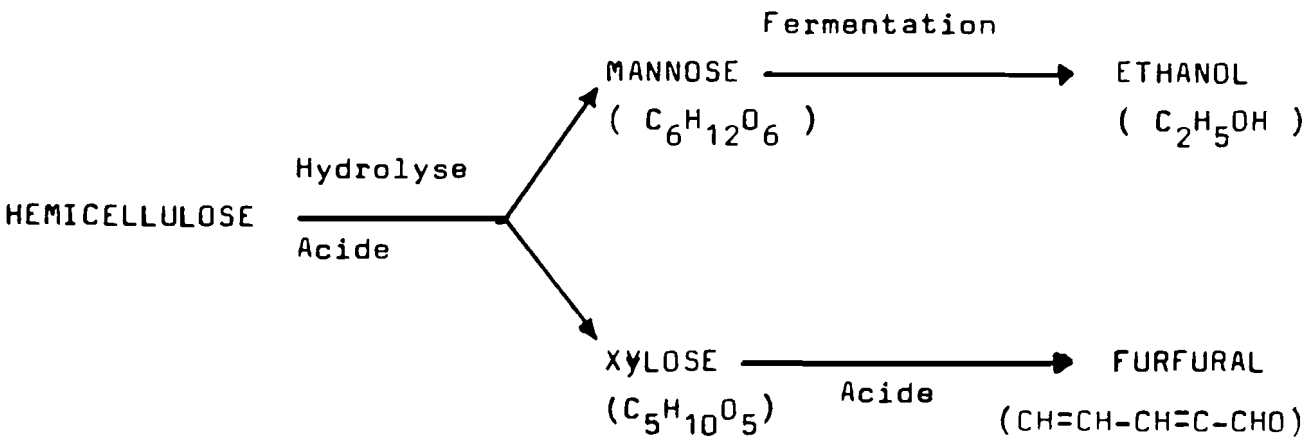


Fig. 8 : Transformation chimique des hemicelluloses

3. LA NATURE DES CELLULASES

3.1. Les enzymes de la cellulolyse

Il n'existe pas une enzyme seule, capable de dégrader complétement la cellulose brute jusqu'à ses composants ultimes, cellobiose et glucose. En fait, la plus simple définition des cellulases consiste en un système polyenzymatique qui attaque les fibres cellulosiques en libérant des sucres suffisamment petits capables de traverser la paroi cellulaire. Selon cette définition, le système enzymatique complet n'existe que chez relativement peu d'organismes; les mieux connus parmi les champignons filamenteux sont les Aspergillus , Chaetomium, Penicillium, Sporotrichum et Trichoderma (ERIKSSON et HAMP; IKEDA et Coll.1973; SIMBSON et MARSH,1964; BHATAWADEKAR,S.P. 1981; OGAWA et Coll. 1982; COUDRAY et Coll. 1982) et les Clostridium parmi les bactéries anaérobies (GIULIANO et Coll. 1983; KUNDU et Coll. 1983; AIT et Coll.1979).

Pour Trichoderma viride le complexe cellulase a été fractionné en quatre composés par PETTERSSON (1975) en utilisant différentes méthodes de chromatographie. Deux de ces composés étaient des endo-glucanases, l'un, une exoglucanase et l'autre une β-glucosidase.

Depuis cette date plusieurs auteurs(Halliwell et Griffin 1978; GONG et Coll. 1979; GHOSE ET BISARIA, 1979, WEBER et Coll. 1980, FLIESS et SCHUGERL, 1983) en utilisant des techniques de séparation diverse de chrometographie (tamis moléculaire, échangeuse d'ions, affinité) ou électrofocusing ont obtenu en général trois enzymes pour Trichoderma reesei . Ces enzymes sont :

1)	1.4- β-D glucan E.C. 3.2.1.4.	ou	4- glucanohydrolase Endo-β- glucanase (EG : Cx)
2)	Exo-1.4.β-D-glucan E.C. 3.2.1.91.	ou	Cellobiohydrolase Cellobiohydrolase (CBH : C_1)
3)	β -glucosidase E.C. 3.2.1.21.	ou	Cellobiase

3.2. Mécanisme d'action des cellulases

Prenant en considération ces résultats expérimentaux, PETTERSSON (1975) pense qu'il existe une coopération entre les différentes enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose.

L'exoglucanase est la seule enzyme qui peut dégrader la cellulose cristalline et la transformer jusqu'à 80 %. Il est donc naturel de donner à cette enzyme un rôle prépondérant dans le schéma de la dégradation totale de la cellulose native.Il a donc proposé un mécanisme de la dégradation enzymatique de la cellulose native pour Trichoderma viride (Tableau II).

TABLEAU II : Le mécanisme de la dégradation enzymatique de la cellulose selon PETTERSSON (1975) pour Trichoderma viride.

1.	Cellulose native	Endoglucanase →	Cellulose*
2.	Cellulose*	Exoglucanase →	Cellobiose
3.	Cellobiose	β- gluosidase →	2 Glucoses

Cellulose * : Obtenue à partir de la cellulose native par action del'endoglucanase dans les régions non cristallines des fibres de cellulose

LES CELLULASES

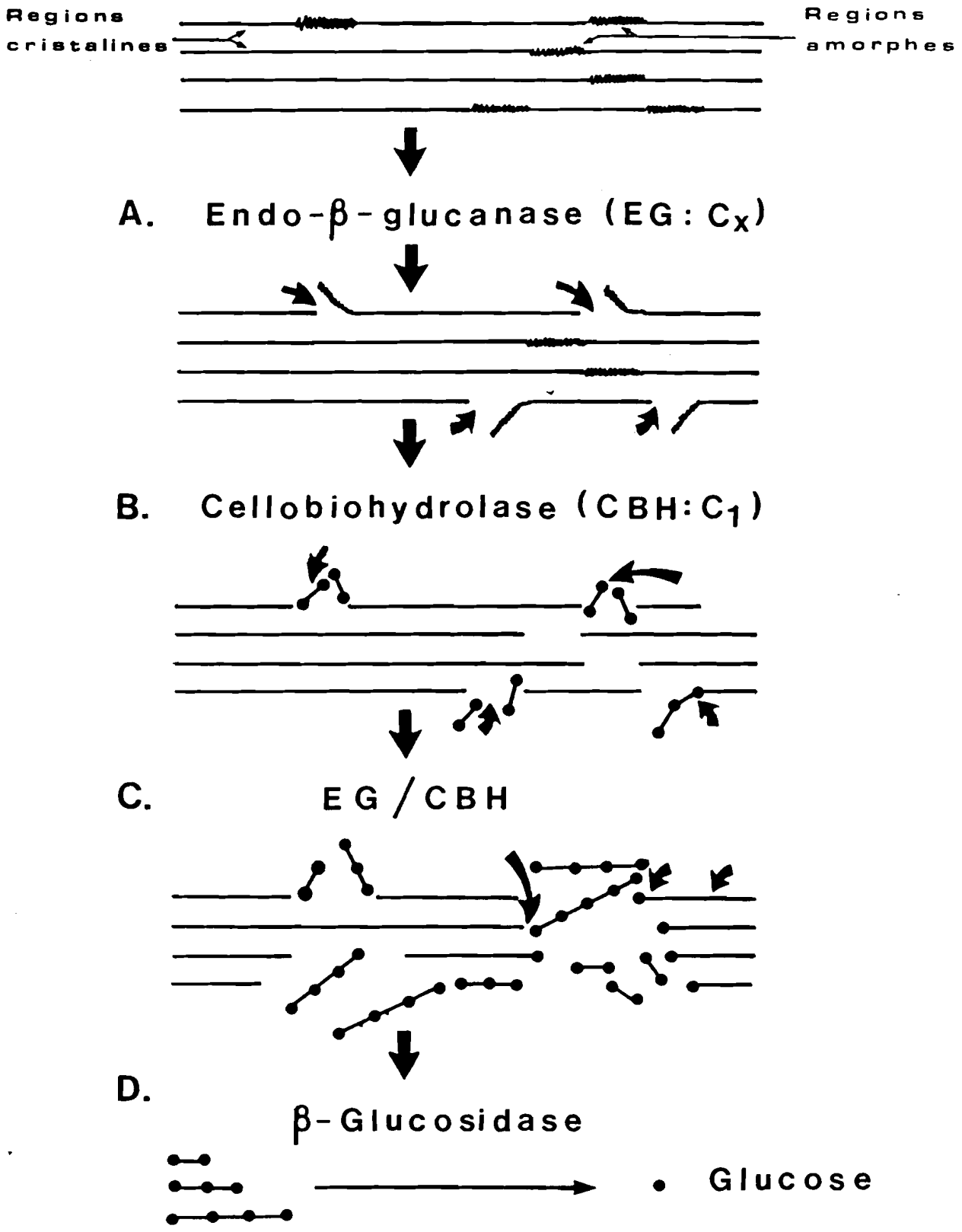


Fig. 10 : Représentation schématique des différentes étapes de la cellulolyse selon MONTENECOURT et EVELEIGH (1979).

MONTENECOURT et EVELEIGH (1979) basés sur l'hypothèse de PETTERSSON (1975) selon laquelle les enzymes réagissent réciproquement pour dégrader complétement la cellulose microcristalline ont proposé un schéma des différentes étapes de la cellulolyse (Fig. 10) ;ce modèle a pu être élaboré en tenant compte d'un certain nombre de travaux antérieurs qui ont été fait indépendamment (ERIKSSON et PETTERSSON; 1975. HALLIWELL et GRIFFIN, 1973; WOOD et Mc CRAE, 1975).

Dans un premier temps, l'endoglucanase est supposée attaquer la cellulose microcristalline , créant des failles dans les chaînes linéaires de la cellulose. L'action de l'endoglucanase est suivie par l'attaque des cellobiohydrolases à ces points de rupture qui libèrent du cellobiose. L'action continue et combinée de l'endoglucanase et cellobiohydrolase a comme résultat la conversion complète de la cellulose en cellobiose et petits oligosaccharides. La β-glucosidase agit sur le cellobiose et les petits oligosaccharides pour produire le glucose. L'action synergétiques de toutes les enzymes impliquées dans ce phénomène est requise pour l'hydrolyse effective de la cellulose cristalline comme produit d'une réaction devenue le substrat pour la suivante (MONTENECOURT et EVELEIGH, 1979).

3.3. Contrôle et régulation de la biosynthèse de cellulases

Le fonctionnement des enzymes cellulolytiques témoigne d'une interdépendance complexe qui n'est d'ailleurs pas encore totalement élucidée.

Le schéma (Fig. 11) résume les connaissances actuelles telles qu'il ressort des travaux des différents auteurs (GONG et TSAO,1979; ROSS et Coll. 1983)

Tout d'abord, il est maintenant admis que la synthèse des enzymes de dégradation de la cellulose est contrôlée par un système inducteur-represseur. Cela signifie que le complexe cellulasique est naturellement réprimé grâce à un répresseur qui bloque la transcription des gènes de structure de ces enzymes Les inducteurs ont pour rôle de lever cette répression. Cependant, plusieurs auteurs s'accordent à penser qu'il existe aussi une petite quantité de cellulases constitutives (MANDELS et REESE,1960) dont la β-glucosidase (GHOSE, 1977).

La régulation des enzymes cellulasiques s'effectue à trois niveaux :

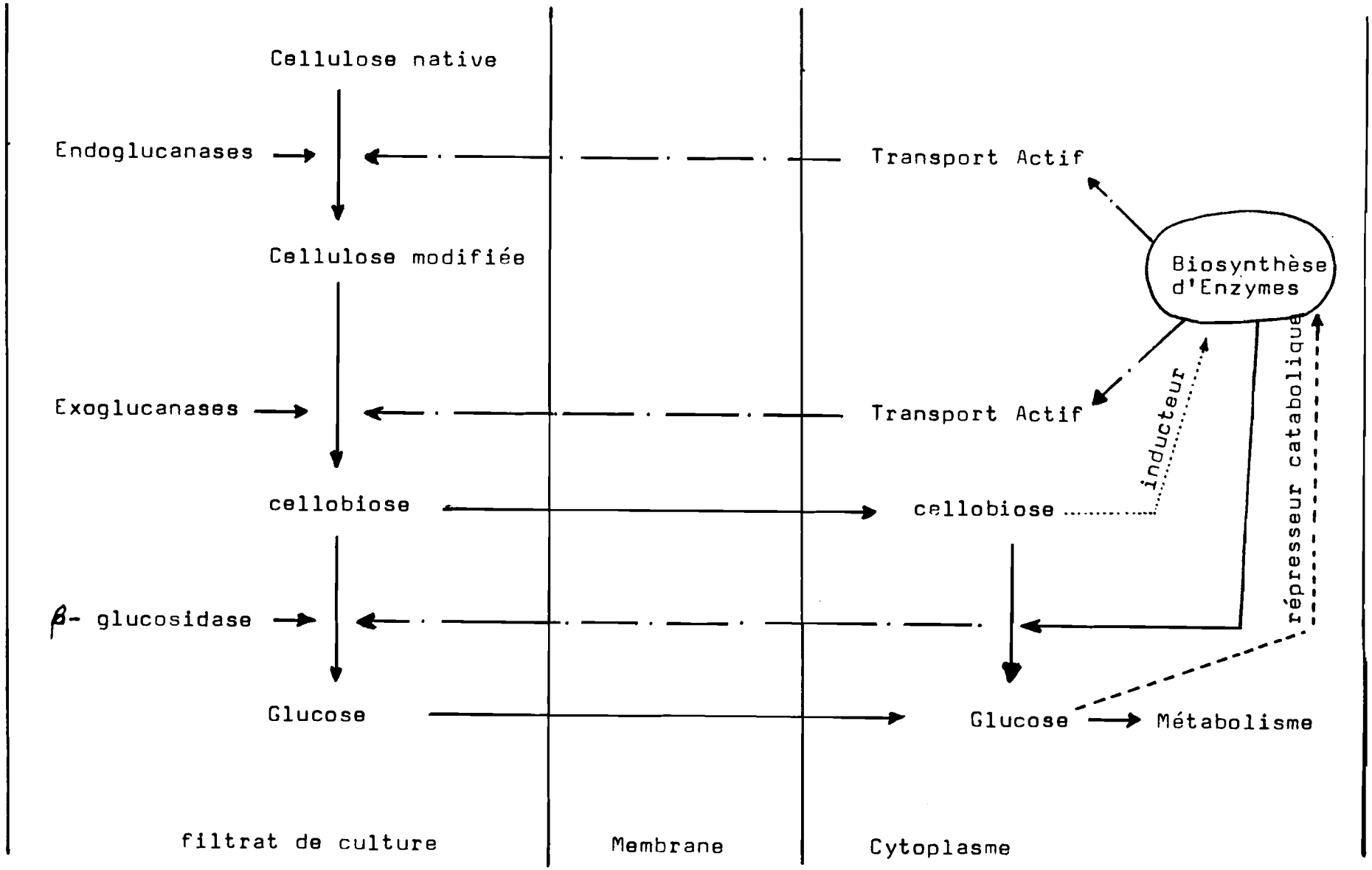


Fig. 11 Schéma simplifié de la production régulée et de l'excrétion de cellulases

a. Induction-répression : Le système enzymatique est donc naturellement réprimé. La répression de la synthèse des cellulases est levée par les inducteurs, substrat ou non, tels que la cellulose cristalline, la Carboxyméthylcellulose, le cellobiose etc..., sans connaître précisément les activités enzymatiques impliquées dans cette induction.

b. Répression catabolique exercée par le produit final de la réaction, le glucose, qui bloque principalement la synthèse de β-glucosidase (GHOSE, 1977, GONG et Coll. 1977, MANDELS et Coll. 1975).

c. Rétroinhibition qui s'exerce à plusieurs niveaux: le glucose inhibe l'activité de la β-glucosidase et des endo-glucanases. Le cellobiose, associé aux cellodextrines, inhibe les endo et exoglucanases (GHOSE, 1977).

4. LES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX CELLULOLYTIQUES

Les champignons cellulolytiques assurent la minéralisation de la matière organique complexe dans le sol ou en surface et sont à l'origine de la formation de l'humus. Parmi les moisissures cellulolytiques (Altemaria, Aspergillus, Chaetomium, Fusarium, Myrothécium, Pénicillium, Sporotrichum), Les Trichoderma sont les plus fréquemment utilisés dans les processus d'hydrolyse de la cellulose et des produits lignocellulosiques. Ils produisent en effet des quantités importantes d'Exoenzymes, capables d'hydrolyser complètement la cellulose en glucose.

4.1. Les Aspergillus

Au cours d'une étude précédente, nous avons démontré que parmi les Aspergillus quelques espèces produisaient des cellulases en particulier A.oryzae, A.versicolor, A.aculeatus, A.niger, A.wentii .Cette production de cellulase était cependant faible (ROUSSOS,1981).

D'autres souches d'Aspergillus (A.terreus et A. fumigatus) sont capables de se développer sur la cellulose microcristalline et produire en quantité importante de β-glucosidase (D'SOUZA et VOLFOVA, 1982; WASE et VAID,1983; STEWART et Coll. 1983).

Les cellulases produites par des Aspergillus sont généralement riches en endo-β-glucanases et β-glucosidases, mais pauvres en exo-β-glucosidases. De ce fait, elles sont limitées pour l'hydrolyse de la cellulose microcristalline. Cependant on trouve dans le commerce des cellulases d' A.niger commercialisées par les Laboratoires Miles, Elkhart, Indiana,U.S.A.

4.2. Les Chaetomium

Deux espèce cellulolytiques sont le plus souvent utilisées (C.thermophile et C. cellulolyticum) pour les études de l'hydrolyse de la cellulose et la bioconversion de substrats lignocellulosiques.

Les effets de la température sur la croissance et la production de cellulases de C.thermophile ont été décrits par ERIKSEN et GOKSOYR (1976).

L'hydrolyse de la cellulose en sucres simples par le système d'enzymes extracellulaires de C. Cellulolyticum , ainsi que la détermination de ce système d'enzymes ont été décrits par FAHNRICH et IRRGANG (1982 a et 1982 b).

Le plus souvent C. cellulolyticum est utilisé pour la bioconversion de substrats lignocellulosiques (sciure de bois, bagasse de canne à sucre). Les fermentations de ces substrats inoculés avec C.cellulolyticum se font en milieu solide (PAMMENT et Coll. 1978, ULMER et TENGERDY,1981;ROUSSOS et SEDHA,1983).

4.3. Sporotrichum

Tout d'abord il convient de donner un éclaircissement: En effet par le terme Sporotrichum , on désigne une souche qui est l'anamorphe de Phanerochoete (téléomorphe). Dans la littérature on rencontre principalement deux espèces :

- Sporotrichum thermophile anamorphe de P. thermophile

- Sporotrichum pulverulentum anamorphe de P. chrysosporium

Toutes ces espèces attaquent le bois et sont appelées à juste titre " pourriture blanche du bois". Depuis plusieurs années une équipe de chercheurs Suédois dirigée par K_E. ERIKSSON utilise une souche de S.pulverulentum et a décrit, par de nombreux travaux, le processus de dégradation de substrats lignocellulosiques (ERIKSSON et HAMP, 1978; ERIKSSON,1978; AYERS et Coll. 1978; ERIKSSON et HAMP, 1978; DESHPANDE et Coll.1978; THOMKE et Coll.1978; EK et ERIKSSON,1978; ERIKSSON et PETTERSSON,1975; ANDER et Coll. 1983 Le système enzymatique de cette souche comprend les enzymes suivantes

endo-β-glucanases, exo-β-glucanases, β-glucosidases, xylanases, lactonases, glucose oxidase, cellobiose oxidase, cellobiose quinone oxido réductase, catalase, laccase, peroxidase ainsi que les enzymes de dégradation de la lignine en monomères. Ce microorganisme est utilisé également pour la production de Protéïnes d'orgnismes Unicellulaires à partir de substrats lignocellulosiques (THOMKE et Coll. 1980). Cependant S.pulverulentum n'a pas été utilisée pour la production de cellulases pour les procédés de saccharification de la cellulose.

L'autre souche S. thermophile a été utilisée pour l'étude de régulation de la biosynthèse de cellulases (induction - répréssion) pour les espèces thermophiles (CANEVASCINI et Coll. 1979, COUDRAY et Coll. 1982).

4.4. Les Trichoderma

Contrairement aux Sporotrichum , les Trichoderma appartiennent au grand ensemble des champignons imparfaits (Fungi Imperfecti) (RIFAI;1969) et sont fréquemment utilisés dans les processus d'hydrolyse de la cellulose. Ils produisent en effet des quantités importantes d'exoenzymes, capables d'hydrolyser complètement la cellulose en glucose.

Parmi les Trichoderma les T.reesei (OGAWA et Coll. 1982; ALLEN et ANDREOTTI, 1982; MANDELS, 1982) T. viride (GONG et Coll. 1979; WEBER et Coll. 1980; STERNBERG, 1976; PETTERSSON,1975) T. koningii (HALLIWELL et GRIFFIN,1978; HALLIWELL et VINCENT, 1981),T. pseudo-koningii (HARRER et Coll. 1983), T.longibranchiatum (SIDHN et SANDHU,1980) ainsi que T.harzianum (ROUSSOS et RAIMBAULT 1982) sont le plus souvent utilisés pour l'étude du complexe enzymatique ainsi que pour la production de cellulases.

Il existe une certaine confusion, que l'on trouve fréquemment dans la littérature, à propos de la nomenclature de T.viride . Cette espèce a changé de nom et actuellement on la retrouve sous l'appéllation T. reesei. Cependant, il faut préciser que cette dénomination est valable uniquement pour la souche T.viride Q.M 6 a , laquelle a subi de nombreuses mutations.cette souche Uniquement et ses descendants sont nommés T.reesei (MANDELS; 1982).

Les différents mutants obtenus à partir de T.viride QM 6 a produisent des quantités importantes de cellulases, mais la composition ainsi que les propriété du complexe enzymatique sont similaires à l'égard des substrats cellulosiques. De même les proportions relatives en endo et exo-glucanases ne changent pas. Toutes les souches de T.reesei produisent de faibles quantités de cellulases constitutives. L'objet de manipulations génétiques vise

TABLEAU III Composition en aminoacides des Protéïnes Brutes (P.B.) contenues dans les tubercules de manioc(T M.) et les tubercules de manioc fermentés (TMF) avec Trichoderma harzianum selon MUINDI et HANSSEN(1981)

Aminoacides	g Aminoacides/100 g SPS	
	TM	TMF
AMINOACIDES ESSENTIELS		
Tryptophane	0,01	0,40
Lysine	0,08	1,50
Méthionine	0,02	0,30
1/2 Cystine	0,04	0,50
Thréonine	0,07	1,40
Isolencine	0,08	1,40
Lencine	0,12	2,00
Valine	0,09	1,60
Phenylalamine	0,07	1,20
Tyrosine	0,04	0,90
Histidine	0,05	0,90
Arginine	0,08	1,60
Total	0,75	13,70
AMINOACIDES NON ESSENTIELS		
Alamine	0,12	1,70
Acide aspartique	0,15	2,50
Acide glutamique	0,26	3,10
Proline	0,08	1,30
Glycine	0,07	1,30
Serine	0,08	1,30
Hydroxyproline	0,03	0,04
Total	0,79	11,24
TOTAL AMINOACIDES	1,54	24,94

à la production de cellulases constituves. Cependant, pour l'ensemble des Trichoderma la biosynthèse de cellulases est régulée par le contrôle d'induction-répression précedemment décrit. L'intensité de cette régulation est fonction de la souche ainsi que des conditions de culture.

Les cellulases de T.reesei sont commercialisées par NOVO ENZYME (QM 9414 - Copenhaguen - DENMARK) Les préparations de ces cellulases de T. reesei contiennent d'autres carbohydrolases : xylanases, mannanases etc...

Une souche de T.harzianum a déjà été utilisée pour l'enrichissement en protéïnes de la farine de manioc par fermentation en milieu liquide. (MUINDI et HANSSEN; 1981). Après 60 h de fermentation en milieu liquide la biomasse récoltée contenait 38 % de protéïnes brutes. Sur le Tableau III , nous avons donné la composition en aminoacides des protéïnes brutes contenues dans les tubercules de manioc et les tubercules de manioc fermentés avec T.harzianum (MUINDI et HANSSEN; 1981). Ces auteurs ont également étudié la valeur nutritive de ce produit enrichi en protéïnes de T.harzianum . Le coefficient de digestibilité pour les protéïnes brutes a été de 66 % et de 81 % pour les aminoacides. D'autre part le produit fermenté a été utilisé dans des rations alimentaires de poulets avec succès .

5. LES FERMENTATIONS DES SUBSTRATS CELLULOSIQUES

5.1. Les fermentations en milieu liquide

L'équipement utilisé pour les cultures des champignons filamenteux cellulolytiques en fermenteur liquide est généralement semblable à celui utilisé pour la production d'antibiotiques. Le substrat, généralement de la cellulose à 1 % est en suspension dans la phase liquide contenant la solution minérale de MANDELS et WEBER (1969).

L'inoculation du fermenteur se fait avec une préculture de T.reesei pouvant atteindre 10 % du volume du milieu à inoculer. L'étude, au niveau pilote expérimental, de la production et du prix de revient des cellulases a été réalisée par NYSTROM et ALLEN (1976).

Des fermenteurs en acier inoxydable, de 30 litres (22,5 l volume utile) et de 400 litres (287 l volume utile) ont été utilisés pour la production d'inoculum et de cellulases.

Les fermenteurs ont été équipés avec des accessoires de régulation et de mesure suivants :
Température, pression, poids, pH, oxygène dissous, agitation, CO_2 ainsi que des détecteurs de formation de mousse.

Les fermenteurs sont équipés avec des systèmes d'aération ainsi que des purgeurs pour introduire de l'air stérile. Les milieux de culture sont autoclavés à l'intérieur du fermenteur. Les milieux sont ensuite refroidis par un système de circuit d'eau couplé à une aération et une agitation énergique. Les prélèvements des échantillons se font le long de la fermentation à l'aide de sondes profondes.

Malgré le nombre important de paramètres mesurés et régulés au cours de la fermentation en milieu liquide, ce mode de culture présente beaucoup d'inconvénients :

- le rapport substrat /volume est très faible (1 %)
- le substrat cellulosique est insoluble dans l'eau
- le champignon en se développant forme des " pellettes "
- Stérilisation de grands volumes
- La Biomasse et les métabolites produits sont très diluées
- Nécessité d'une grande quantité d'eau au départ avec production d'effluent à la fin
- Mode de culture qui n'est pas l'environnement naturel des champignons (il y a très peu de champignons filamenteux dans l'eau)
- Matériel extrèmement sophistiqué et coûteux

5.2. Les Fermentations en milieu solide

Le terme " fermentation en milieu solide " en Anglais " Solid state fermentation " désigne toute fermentation dans laquelle le substrat n'est pas liquide. RAIMBAULT (1980) avait défini ainsi les milieux solides en opposition aux milieux liquides et pâteux " comme étant ceux pour lesquels le substrat n'est pas liquide et possède une granulométrie et une structure organisée".

Les milieux solides peuvent donc être des produits végétaux fragmentés dans lesquels l'eau se trouve sous forme d'eau de constitution, d'eau libre et d'eau liée par des forces de différentes natures. En aucun cas l'eau ne doit occuper la totalité des espaces libres et ne doit s'écouler librement.

Ils'agit en fait du type de milieux qui se rapproche le plus de l'environnement habituel des champignons. Il se prête bien à leur mode de croissance par allongement apical et ramification, conduisant à une exploration rapide de l'environnement de l'organisme sur de grandes distances.

L'utilisation des fermentations en milieu solide n'est pas récente et de nombreuses fermentations alimentaires sont basées sur ce principe et ont été pratiquées traditionnellement depuis très longtemps en Europe (fromages, champignons comestibles) ou en Extrême Orient (Koji, Miso, Saké, Tempech,Ontjom,Ragi).

A présent fivers procédés de fermentation en milieu solide sont utilisés au niveau commercial, pour la production de différents types d'aliments fermentés en Extrême Orient(Hesseltine, 1965) ou de métabolites de champignons filamenteux. Sur le Tableau suivant, nous avons donné les enzymes produites par fermentation en milieu solide.

TABLEAU IV: Enzymes fongiques produites par fermentation en milieu solide

Enzyme	Microorganisme	Référence
α-amylase	Aspergillus oryzae	CANNEL et MOO-YOUNG(1980)
Cellulase	Trichoderma viride	TOYAMA (1976)
Lactase	Aspergillus oryzae	KIUCHI et TANAKA (1975)
Pectinase	Aspergillus niger	BECKHORN et Coll.(1965)
Protéase	Aspergillus oryzae	YOSHIDA et ICHISHIMA(1964)

Les fermentations en milieu solide présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux fermentations en milieu liquide ; LAMBERT et MEERS (1983) les ont ainsi résumés :

1. L'aération est plus facile à travers les espaces du substrat granuleux; l'agitation du substrat lorsqu'elle intervient, est discontinue.

2. L'absence de phase liquide et d'humidité faible contenue par le substrat, présente un certain nombre d'avantages:

- faible volume des fermenteurs
- absence d'effluent à traiter
- récupération de métabolites par précipitation nécessitant moins de réactifs
- l'humidité faible du substrat inhibe la croissance de bactéries et il n'est pas indispensable de stériliser le substrat.

3. Les milieux de culture sont très simples (céréales, lignocelluloses additionnés de quelques sels minéraux).

Le principe de la méthode de culture en milieu solide développée par RAIMBAULT et ALAZARD (1980) est basée sur la distribution homogène d'un inoculum de spores et des sels minéraux nécessaires à la croissance du mycélium dans la masse du substrat amylacé mis sous une forme adéquate permettant le maintien des conditions aérobies. La préparation d'un substrat granulaire poreux avec un pH et une teneur en eau déterminés est essentielle pour obtenir une croissance rapide et homogène dans toute la masse du substrat. Cette structure granulaire permet au flux d'air humidifié de traverser aisément la masse du produit pendant toute la durée de l'incubation, ce qui permet d'apporter l'oxygène nécessaire à la croissance du mycélium, tout en évitant la dessicetion du produit.

La production de cellulases de T.viride cultivé en milieu solide a été décrite par TOYAMA (1976). Le procédé Koji a été adapté par cet auteur et la technique consiste à cultiver T.viride sur un milieu solide composé essentiellement de paille de riz et de germes de blé. Un appareil automatique à chambre rotative a été mis au point et la culture se fait en plateaux.

6. MATERIEL ET METHODES

6.1. Matériel Biologique.

Une étude précédente (ROUSSOS et RAIMBAULT, 1982), nous a permis de sélectionner, parmi les microorganismes de notre collection de champignons filamenteux cellulolytiques, une souche de Trichoderma harzianum . Cette souche est caractérisée par une activité cellulasique importante, une croissance apicale rapide et un rendement de sporulation élevé. La température optimale de croissance pour T.harzianum est de 29 °C. Cette souche porte le n° Th 15 dans notre collection. Elle provient d'une collection internationale (Czechoslovak Collection of Microorganisms) où elle avait le n° CCM F- 470.

6.2 Milieux de Culture.

6.2.1. Conservation et entretien des souches

A des temps réguliers (environ tous les six mois), T. harzianum a été repiqué en alternance sur deux milieux : Malt, Agar et Patate Dextrose Agar (la composition est donnée au Chapitre Sporulation & 2.2.). Il a été ensuite incubé pendant une semaine à la température du Laboratoire (23 - 30° C).

6.2.2. Production d'Inoculum

Pour l' inoculation de faibles quantités de substrat (200 g) nous avons utilisé des cultures en pillulier ou en erlen contenant le milieu d'entretien. Pour l'inoculation de quantité plus importantes de substrat (3 - 12 kg) l'inoculum provenait des cultures de T. harzianum dans un fermenteur à disques contenant le milieu H (la composition est donnée sur le Tableau II, chapitre de sporulation & 2.2.2.).

6.2.3. Production de cellulases

La composition des différents milieux utilisés pour la culture et la production de cellulases de T. Harzianum en fermentation en milieu liquide et en milieu solide est reportée sur le Tableau V. Sauf indication contraire le milieu N° 1 a été utilisé pour cette étude.

6.2.4. Microflore hétérotrophe Aérobie de la Bagasse

Les Numérations de Bactéries Totales, des champignons totaux et des champignons cellulolytiques ont été réalisées à partir d'une suspension homogène de 5 g de Bagasse dans 200 ml d'eau stérile. Plusieurs dilutions ont été réalisées. A partir de chaque dilution 0,2 ml ont été étalés à la surface des boîtes de Pétri contenant les différents milieux de culture ; des lectures ont été faites pendant 6 jours. Les résultats ont été exprimés en nombre de germe par gramme de bagasse poids sec.

6.2.4.a Bactéries Totales

Bacto peptone	10 g
Glucose	5 g
extrait de levure	3 g
Agar	15 g
Eau	1000 ml

pH : 7,2

Stérilisation par autoclavage à 110 °C pendant 30 minutes; répartir en boîte de Pétri.

6.2.4.b. Champignons Totaux

Extrait de Malt	15 g
Agar	15 g
Eau	1000 ml

pH : 5

Stérilisation30 minutes à 110 °C; ajouter stérilement 10 ml/l de Streptomycine à 80 U. Repartir en Boîtes de Pétri.

6.2.4.c. Champignons cellulolytiques (MANDELS et WEBER,1969)

Sulfate d'Ammonium	1,4 g
Phosphate monopotassique	2,0 g
Urée	0,3 g
$CaCl_2$	0,3 g
Sulfate de Magnésium	0,3 g
Cellulose Avicel	10,0 g
Tween 80	1 ml
Extrait de levure	0,25 g
Peptone	0,25 g
$FeSO_4.7H_2O$	5,00 mg
$M_4SO_4.\ H_2O$	1,56 mg
$Z_4SO_4\ .7H_2O$	1,40 mg
$COCl_2$	2,00 mg
Eau	1000 ml

pH : 5,6

Stérilisation 30 minutes à 110°C. Ajouter stérilement 10 ml/l de Streptomycine à 80 u. Répartir en Boîtes de Pétri.

6.3. Conditions de culture pour la production de cellulases

6.3.1. Fermentation en milieu liquide

Les cultures ont été faites dans des fermenteurs Biolafitte de 2 litres contenant 1250 ml de milieu de culture en utilisant comme substrat soit de la bagasse (10 g/l) soit un mélange de bagasse (8 g) et de son de blé (2 g) .

Prétraitement du substrat : la bagasse séchée et broyée a été introduite dans le fermenteur contenant la solution minérale. Le milieu était ensuite stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 1 h.

Inoculation : Avec une suspension de conidiospores pour ramener à 3×10^7 conidiospores/g de substrat.
Conditions de culture :

- Température	:	29°C + 1°C
- Aération	:	10 l/h
- Agitation	:	500 t/min.
- pH	:	non régulé
- Antimousse	:	huile de colza

Mesure des paramètres: aux temps choisis, nous avons procédé à des prélèvements de 10 ml dans le fermenteur. Nous avons ainsi suivi l'évolution de l'inoculum en observant au microscope , après coloration au bleu Cotton une partie de chaque échantillon. Les prélèvements ont été congelés pour être analysés tous en même temps.

TABLEAU V Composition des milieux utilisés pour la culture et la production de cellulases de T.harzianum.

Composition en g.	MILIEUX Fermentation solide 1	2	3	Fermentation liquide
$(NH_4)_2SO_4$	9,70	4,85	3,23	0,975
Urée	2,40	1,20	0,80	0,238
KH_2PO_4	5,00	2,50	1,67	0,500
Bagasse	80,00	80,00	80,00	8,000
Son de blé	20,00	20,00	20,00	2,000
Eau ml	117	107	106	1000 ml
pH	4,4	4,4	4,4	5,6

Sur les échantillons décongelés et homogénéïsés par broyage à l'ultraturrax les différentes analyses ont été faites.

6.3.2. Fermentation en milieu solide

6.3.2.a. En colonne:

Les cultures ont été réalisées en utilisant les dispositifs de colonnes décrits par RAIMBAULT et ALAZARD (1980) (photos 1 et 2).

Substrats : bagasse de canne à sucre séchée ou fraîche, son de blé et mélange de bagasse (80 g) et son de blé (20 g).

Solution Minérale : La composition de la solution minérale pour 100 g de substrat a été donnée au Tableau V.

Prétraitement : A 100 g de substrat finement broyé l'on ajoute la solution minérale pour amener l'humidité du produit à 50 %. Le tout est mélangé et autoclavé à 110°C pendant 1 h.

Inoculation: Avec une suspension concentrée de conidiospores pour ramener la concentration finale à 3×10^7 conidiospores/g de substrat poids sec ainsi que l'humidité du produit à 70 % environ.

Conditions de culture : On mélange le substrat traité et refroidi à 50 % d'humidité avec la suspension de conidiospores. 20 g de ce mélange à 70 % D'humidité sont répartis dans chaque incubateur, ces derniers sont placés dans un bain-marie à 29 °C.

L'aération des cultures se fait avec de l'airsaturé en eau. Le débit d'air a été réglé à 5 l/h.

Mesure des paramètres. A des temps variables les incubateurs ont été retirés du bain-marie et le contenu du fermenteur a été pesé (poids humide) . Le produit a été ensuite homogénéisé à l'aide d'une spatule; un échantillon de 2,5 g a été prélevé et placé dans un erlen de 150 ml et immédiatement congelé. Sur le produit restant des échantillons ont été prelevés pour les mesures du poids sec ainsi que pour les observations au microscope afin d'apprécier l'évolution de l'inoculum en fonction du temps.

6.3.2. b. En zymotis :

(en Grec : Fermenteur); Lors d'une étude précédente, nous avons mis au point un Biofermenteur (Zymotis) pour la culture de champignons filamenteux en milieu solide statique pour des substrats amylacés (RAIMBAULT et Coll. 1982). Ce zymotis, d'un volume utile d'environ 100 litres, a été utilisé pour la production de cellulases de T.harzianum au niveau pilote en extrapolant les résultats de la fermentation de la bagasse obtenus en colonne.

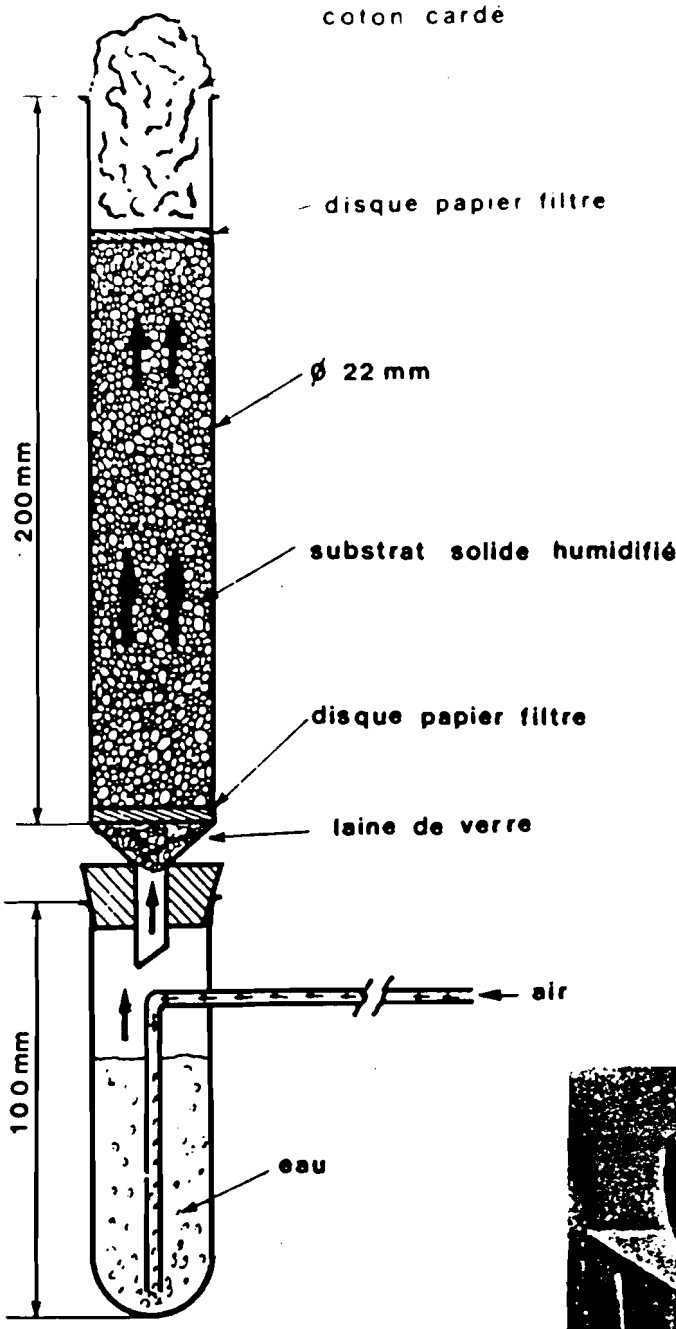
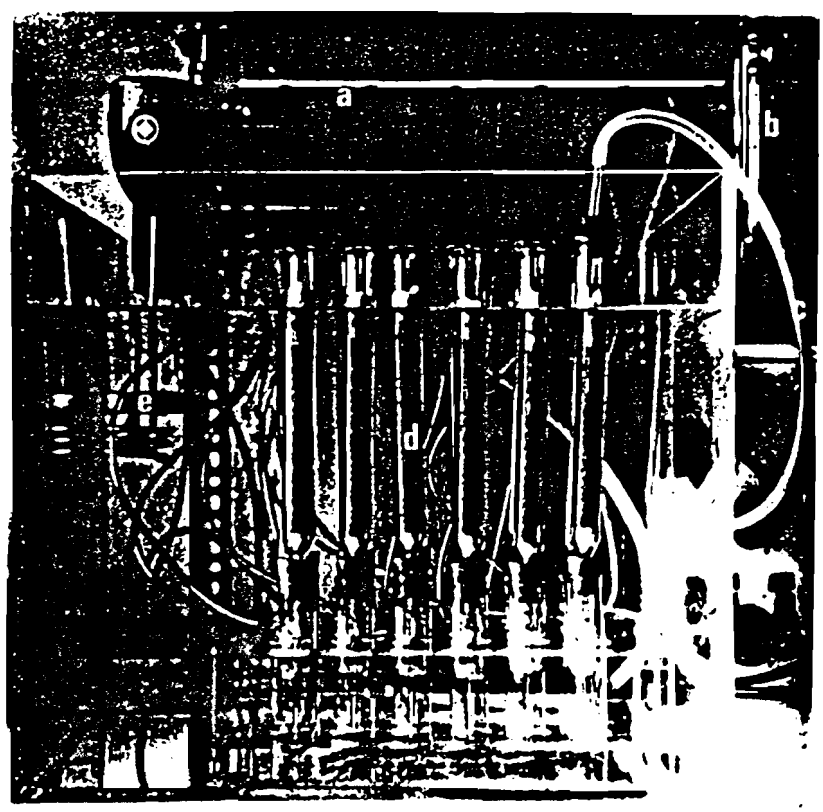


Photo 1 - Dispositif d'incubation



a - vanne à aiguille pour ajuster le flux d'air

b - débit-mètre

c - contrôle du débit d'air

d - incubateur

e - thermostat

Photo 2 - Equipement de 24 dispositifs d'incubation

Le Zymotis est constitué d'une cuve rectangulaire(1), surmontée d'un couvercle (2) muni d'une cheminée (8) permettant le passage de différents conduits (circuit d'eau (5) et (6) prélèvement de gaz (10)), ainsi que la sortie d'air du Zymotis. A l'intérieur de la cuve (1) sont placés dix radiateurs (3) espacés de 5 cm par des entretoises (4). Chaque radiateur est raccordé à une arrivée d'eau (6) et une sortie d'eau (5). L'ensemble des dix radiateurs montés avec les entretoises occupe complétement le volume de la cuve,soit 108 litres, Fig. 12 et 14

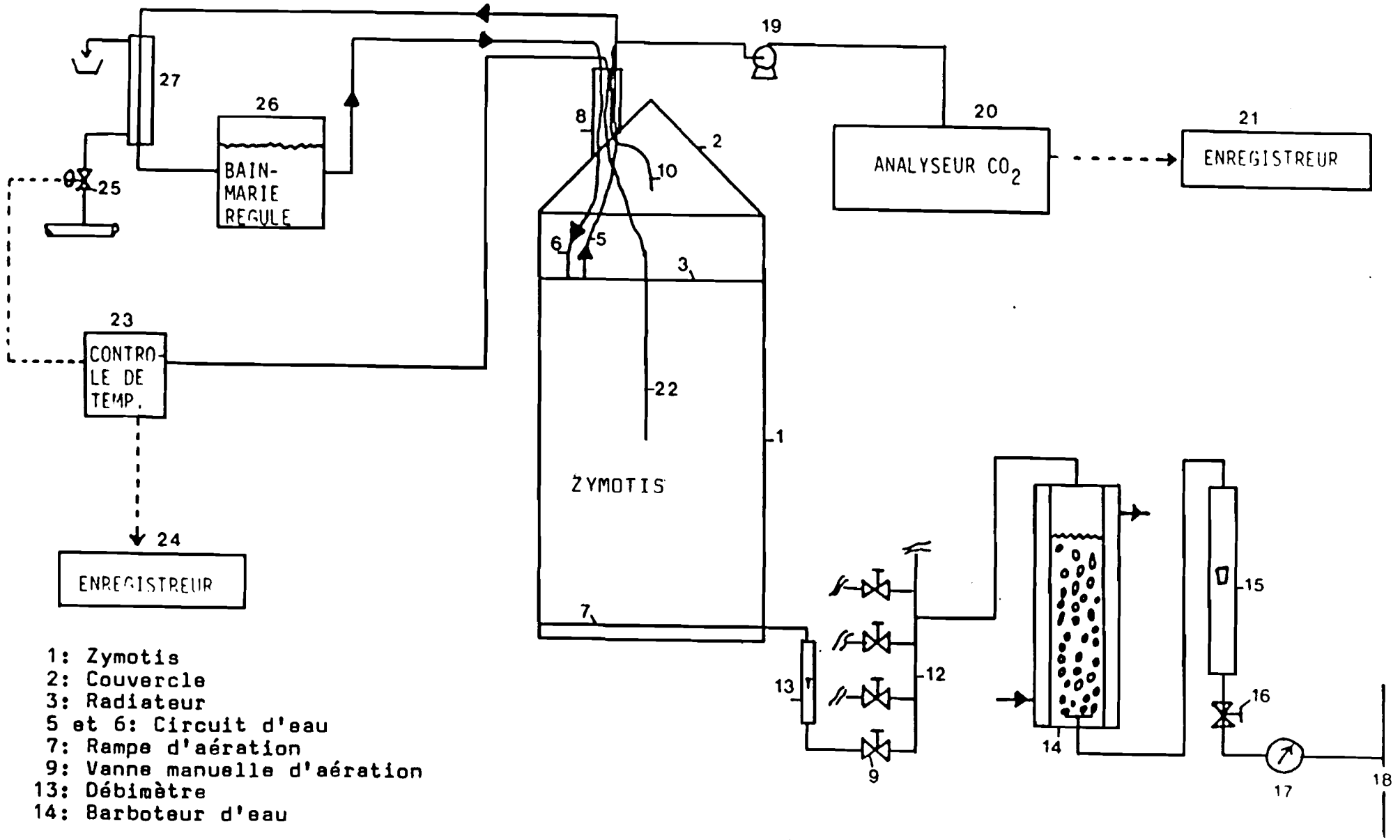
Dans le bas de la cuve, se trouve une série de neuf rampes d'aération (7). Chaque rampe est placée au milieu du compartiment délimité par deux radiateurs successifs et à une longueur égale à celle du compartiment.

Chaque rampe d'aération traverse le bas de la cuve et est raccordée à une vanne mannuelle (9) qui sert à faire varier le débit d'air envoyé dans la rampe. Un débimètre (13) peut être intercalé entre chaque vanne et sa rampe correspondante, pour mesurer ce débit. Les débimètres sont fixés sur un humidificateur NEBAL 2 (Air-Liquide KP 0010). Les détails sur cet humidificateur sont donnés sur la fig. 13 . L'ensemble de neuf humidificateurs munis d'un débimètre individuel est fixé sur un support métallique Les humidificateurs sont montés en série et sont reliés au circuit général (12) d'air comprimé. Ce circuit comporte un mano-détendeur (17) qui le relie au circuit général d'air comprimé (18).

A l'intérieur du couvercle du Zymotis (2) un tuyau souple (10) permet le prélèvement en continu de l'air sortant du produit(11). Ce tuyau par l'intermédiaire d'une pompe (19) est raccordé à un analyseur de CO_2 (20) relié à un enregistreur (21). Nous mesurons ainsi en permanence le pourcentage de CO_2 dans l'air de sortie du Zymotis.

Le remplissage du Zymotis se fait, le couvercle étant soulevé, en garnissant chaque compartiment avec le substrat (bagasse + son de blé) prétraité et conditionné par ailleurs. Le substrat au fur et à mesure de son introduction dans le Zymotis est tassé à l' intérieur des compartiments.

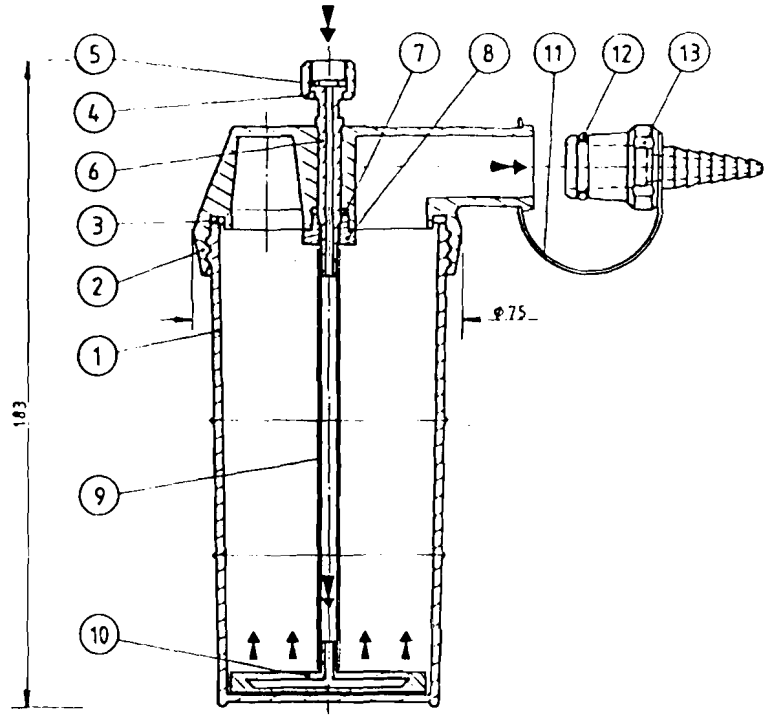
En cours de fermentation, le Zymotis est fermé afin d'éviter toute contamination du produit . Nous pouvons agir cependant sur le débit d'air et sa saturation, sur le circuit d'eau, son débit ainsi que sa température.



1: Zymotis
2: Couvercle
3: Radiateur
5 et 6: Circuit d'eau
7: Rampe d'aération
9: Vanne manuelle d'aération
13: Débimètre
14: Barboteur d'eau

Fig. 12 : Schéma du Zymotis équipé de ses annexes .

L'AIR LIQUIDE medical	HUMIDIFICATEUR NEBAL 2	KP 0010



Repère		Nb		Code
1 +	Bocal	1	Polycarbonate transp	KP 0604
2	Couvercle	1	Polycarbonate jaune	
3 +	Joint plat	1	Caoutchouc nitrile	KP 0606
4	Ecrou	1	Laiton chromé	
5 +	Joint	1	Caoutchouc	KP 0503
6	Traversée de couvercle	1	Laiton chrome	
7 +	Bague R n°5	1	Caoutchouc nitrile	YJ 0005
8	Ecrou	1	Laiton chromé	
9 +	Tube 3 x 5	1	Silicone	KP 0607
10 +	Diffuseur	1	Polyéthylène fritté	KP 0608
11 +	Patte de retenue	1	Caoutch. aliment. blanc	KP 0510
12 +	Joint torique R 11	1	Caoutchouc nitrile	YJ 0011
13	Olive	1	Polycarbonate transp	

+ Pièces détachées de maintenance

Fig. 13 Schéma détaillé de l'humidificateur.

En fin d'opération (60 h) on arrête le circuit d'eau, on déconnecte les circuits d'eau (5) et (6) et il est alors possible d'extraire de la cuve (1) l'ensemble des radiateurs (3) avec le produit . Ce dernier ayant pris en masse reste sous forme de gâteaux assez compacts , prisonnier entre deux radiateurs.

Une légère pression sur le dessus de chaque gâteau , suffit à détacher des blocs de produit bien structuré par le mycélium de T. harzianum.

Substrats : Bagasse de canne à sucre finement broyée séchée ou fraîche, mélange de bagasse (80 g) et de son de blé (20g). La bagasse provenait de la Distillerie DILLON, le son de blé provenait soit de minoteries de Guadeloupe sous forme de bouchons (son industriel) soit du son en poudre non traité.

Solution Minérale : La composition de la solution minérale n°1 pour 100 g de substrat poids sec a été donnée sur le Tableau V .

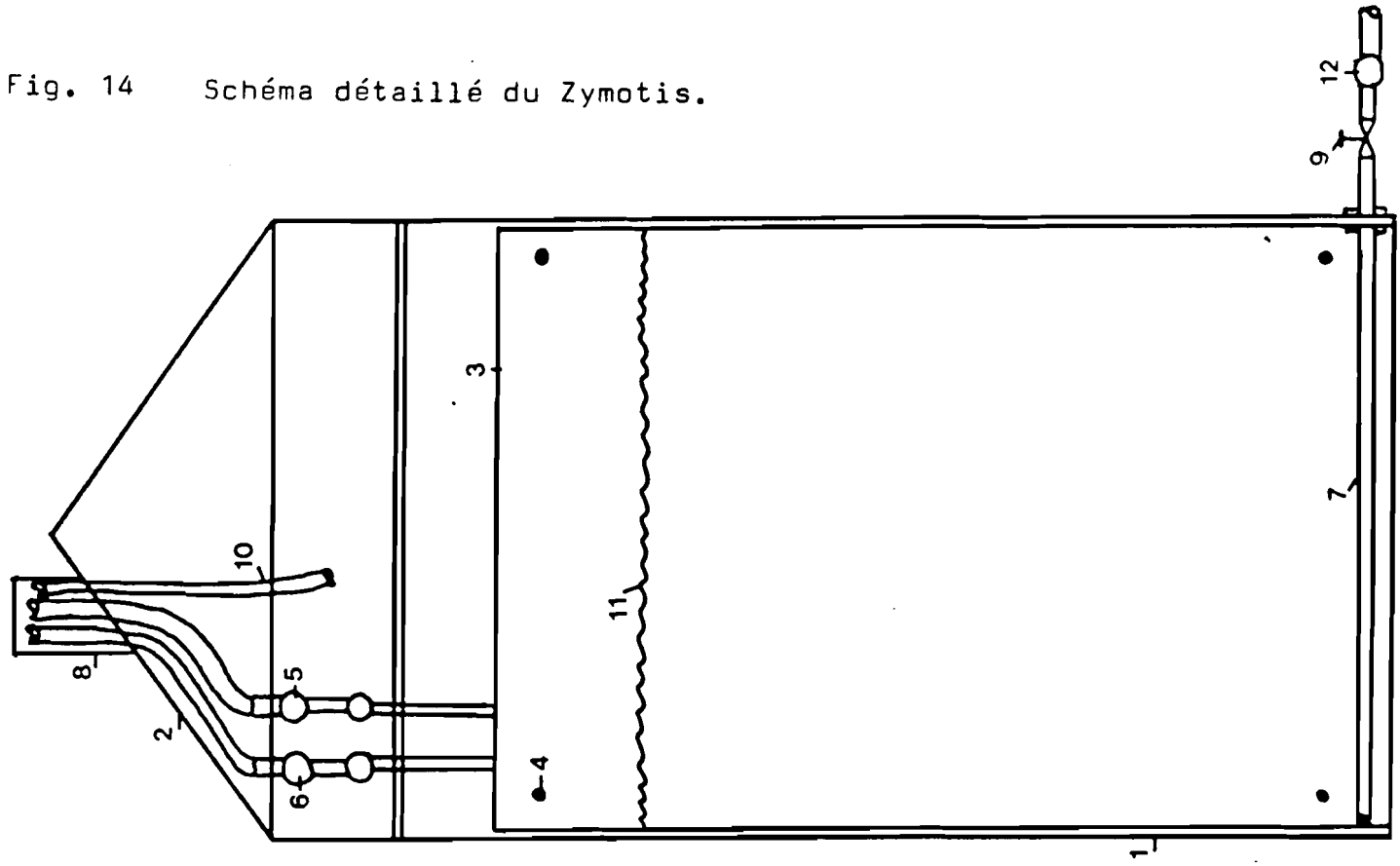
Prétraitement : A 4 kg de substrat finement broyé, la solution minérale a été ajoutée pour amener l'humidité du produit à 50%. Le tout est mélangé dans un Pétrin pendant 5 min. Le produit ainsi malaxé est introduit dans un récipient metallique et autoclavé à 110°C durant 3 h. Cette opération a été faite une, deux ou trois fois afin d'obtenir 4,8 ou 12kg de substrat prétraité avant inoculation par les conidiospores de T.harzianum .

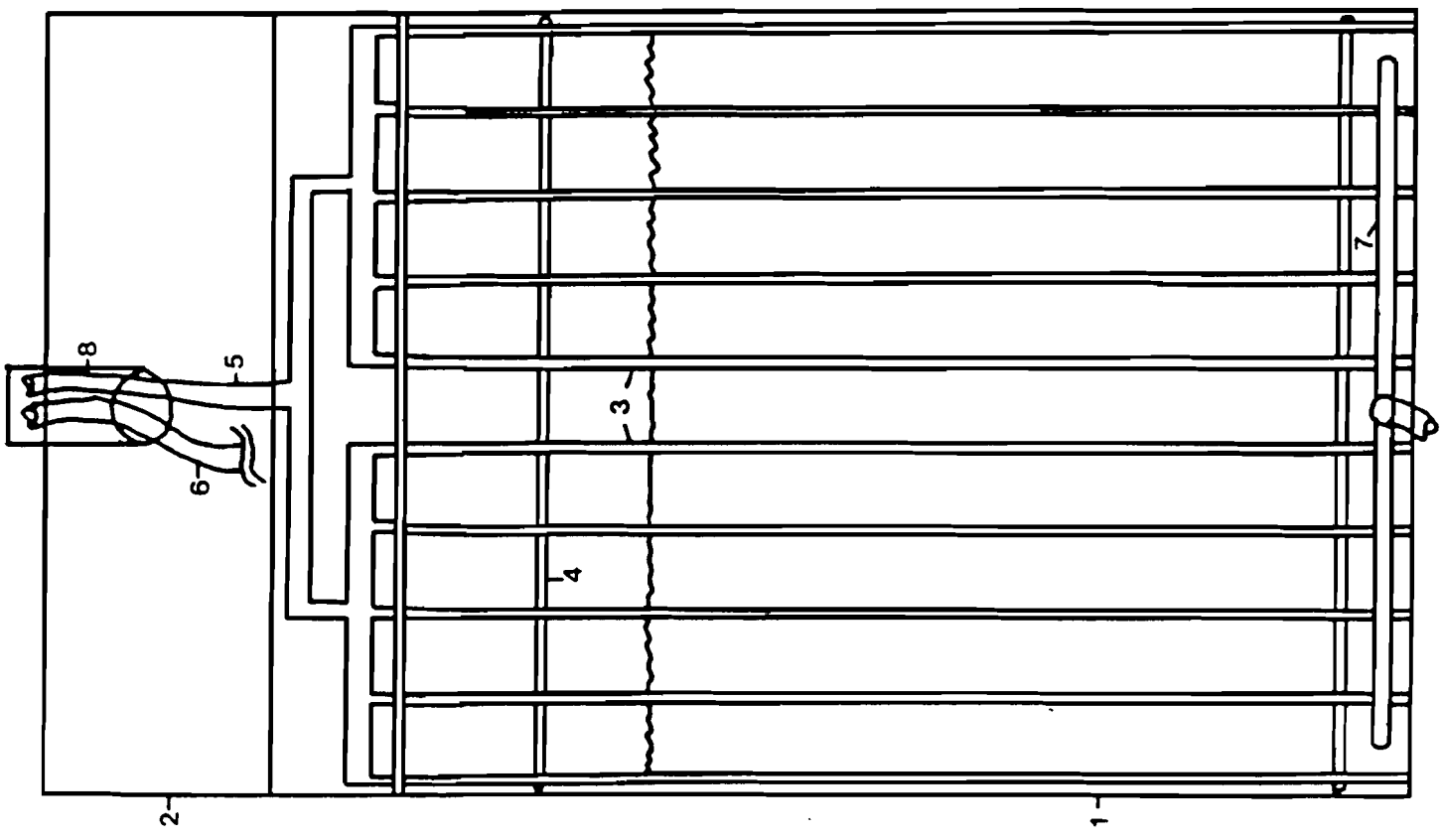
Inoculation: Au produit prétraité et refroidi à 50 % d' humidité, nous avons ajouté une suspension concentrée de conidiospores de T.harzianum pour ramener la concentration finale à 3×10^7 conidiospores/g de substrat poids sec ainsi que l'humidité du produit prétraité a 70 % environ. Pour ce faire, le produit prétraité a été placé dans un pétrin , puis pendant le malaxage la suspension de spores a été ajoutée par aspersion lente afin d' obtenir une inoculation uniforme du produit.

Conditions de culture : Le produit ainsi inoculé a été placé à l'intérieur des neuf compartiments du Zymotis et tassé au fur et à mesure.
La température du circuit d'eau a été réglée à 29°C pendant les 20 premières heures. Après cette période elle a été réglée à 27°C.

Le débit d'aération pour chaque compartiment a été de 300l/h/kg. de substrat poids sec pendant les 16 premières heures de fermentation. Il a été de 600l/h/kg. de substrat après cette période.

Fig. 14 Schéma détaillé du Zymotis.





Mesure des paramètres : Une télésonde de température a été placée au sein du produit pour la mesure en continue de l' évolution de la température.
Un tuyau souple a été introduit à l'intérieur du couvercle du zymotis permettant un prélevement en continu de l'air sortant du produit. Ce tuyau est raccordé à un analyseur de CO_2 pour mesurer en permanence le pourcentage de CO_2 dans l'air à la sortie du Zymotis.

A des temps variables des échantillonages du produit placé dans le Zymotis ont été faits. Le produit a été homogénéisé à l' aide d'une spatule et 2,5 g de ce produit ont été prélevés et placés dans un erlen de 150 ml et immédiatement congelés.Sur le produit restant des parties aliquotes ont été utilisées pour les mesures du poids sec ainsi que pour les observations au microscope afin d'apprécier l'évolution de l'inoculum en fonction du temps.

6.4. Conditionnement et Analyses des échantillons

Aux échantillons décongelés (2,5 g poids humide) 100 ml d'eau distillée ont été ajoutés. Cette suspension a été homogénéisée à l'ultraturrax (1 min.). Le pH a été mesuré.

A partir de ces suspensions différentes dilutions (1/2, 1/5, 1/15 ou 1/100) ont été nécessaires pour effectuer les dosages suivants:

- Sucres Réducteurs au DNS (MILLER,1959)
- Sucres Totaux à l'anthrone

- Activités Enzymatiques (MANDELS et al. 1976)
  - . Activité Carboxymethylcellulose (ACMC)
  - . Activité papier filtre (APF)

6.5. Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en heures pour le temps, en unités pH pour le pH, en % pour l'humidité et le poids sec en g de produit formé ou disparu pour 100 g de substrat poids sec au départ et en unité Internationale (U I) pour les Activités Enzymatiques.

Une UI de ACMC correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer, à partir d'une solution tampon Citrate 0,05 M pH 4,8 à 1 % de Carboxymethylcellulose à 50°C, une micromole de glucose par minute.

7. RESULTATS ET INTERPRETATIONS

7.1. Microflore hétérotrophe aérobie de la bagasse

Le dénombrement des bactéries hétérotrophes aérobies, des champignons cellulolytiques ainsi que des champignons totaux a été réalisé à partir de la bagasse fraîche (à la sortie des moulins) et de la bagasse ayant séjourné en tas pendant 15 jours à l'extérieur de l'usine. Les milieux de culture utilisés pour cette étude ont été donnés dans le chapitre 6 (Matériel et Méthodes). Les résultats sont présentés sur les Tableaux VI et VII.

Tout d'abord, les populations de bactéries hétérotrophes aérobies sont dominantes par rapport à celles des champignons. Elles sont de l'ordre de $2,6 \times 10^6$ bactéries pour $1,1 \times 10^4$ champignons par gramme de bagasse fraîche. Ces populations, après 15 jours de stockage de la bagasse à l'extérieur de l'usine, sont beaucoup plus importantes et atteignent les valeurs suivantes : $1,9 \times 10^9$ bactéries pour $9,9 \times 10^6$ champignons. De même les populations de champignons cellulolytiques ont suivi cette évolution.

Si l'on compare ces résultats, l'on constate qu' après 15 jours de stockage de la bagasse à l'extérieur de l'usine, la population de bactéries a augmenté de 700 fois, celle des champignons totaux a augmenté de 900 fois, mais c'est bien la population des champignons cellulolytiques qui a le plus proliféré. En effet, elle a été 2 269 fois supérieure à celle du départ, et, par conséquent, elle s'est développée trois fois plus vite que celle des bactéries.

Le facteur principal qui influence cette prolifération, outre la composition biochimique de la bagasse, est l'humidité de celle-ci qui a augmenté; cette humidité a été faible au départ : 44,4 %; après 15 jours elle est passée à 55,6 %.

Ces résultats démontrent qu'il existe une population microbienne très importante sur la bagasse fraîche. Cette population augmente très vite en fonction du temps de stockage. Il est donc indispensable, lors des processus de valorisation biotechnologique de la bagasse, de tenir compte de cette microflore ainsi que de son évolution.

TABLEAU VI Microflore hétérotrophe aérobie de la bagasse fraîche (à la sortie des moulins).

	BACTERIES Totales	CHAMPIGNONS Totaux	CHAMPIGNONS Cellulolytiques
Nombre /ml Solution mère	36.500	150	37
Nombre /5 g Bagasse P.H.	7.300.000	30.000	7.400
Nombre / 1 g bagasse P.S.	2.630.000	10.800	2.660
Poids sec de la bagasse à la sortie des Moulins : 55,6 % .			

TABLEAU VII Microflore hétérotrophe aérobie de la bagasse qui a été stockée en tas pendant 15 jours à l'extérieur de l'usine.

	BACTERIES	CHAMPIGNONS	
	Totales	Totaux	Cellulolytiques
Nombre/ ml de solution mère	3.800.000	20.000	13.000
Nombre/ 10 g Bagasse P.H	7.600.000.000	40.000.000	26.000.000
Nombre / 1 g Bagasse P.S	1.880.000.000	9.900.00	5.900.000
Poids sec de la bagasse : 40,4 % .			

Pour la mise au point de notre procédé, nous avons utilisé de la bagasse fraîche. Cette bagasse a été stérilisée à l'autoclave avant d'être inoculée avec les conidiospores de T.harzianum .

7.2 Production de cellulases en fermenteur de 2 litres

Nous avons utilisé un fermenteur Biolafitte de 2 litres (volume utile 1,25 litres), contenant le milieu de culture dont la composition a été donnée sur le Tableau V. Les conditions de culture ont été décrites précédemment (& 6.3.1.).

La fermentation a été arrêtée après 68 heures. Sur la figure 15 nous avons exprimé la cinétique d'évolution du pH ainsi que oelle de la production de cellulases.

Etant donné que nous n'avions pas régulé le pH pendant la fermentation en milieu liquide de la bagasse, les valeurs du pH ont commencé à diminuer à partir de la 15 ème heure et des valeurs minimales ont été atteintes après 28 h. de culture. Celles-ci restent faibles par la suite.

Lorsque les valeurs minimales de pH se stabilisent il y a production et libération de cellulases dans le milieu de culture. Cette production est linéaire en fonction du temps. A la fin de la fermentation nous avons obtenu les activités enzymatiques suivantes :

- 1 517 U.I. APF / 100 g SPS
- 11 988 U.I ACMC / 100 g SPS

Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues à partir de la fermentation en milieu liquide de la cellulose microcristalline ou de la paille de blé (ROUSSOS, 1981).

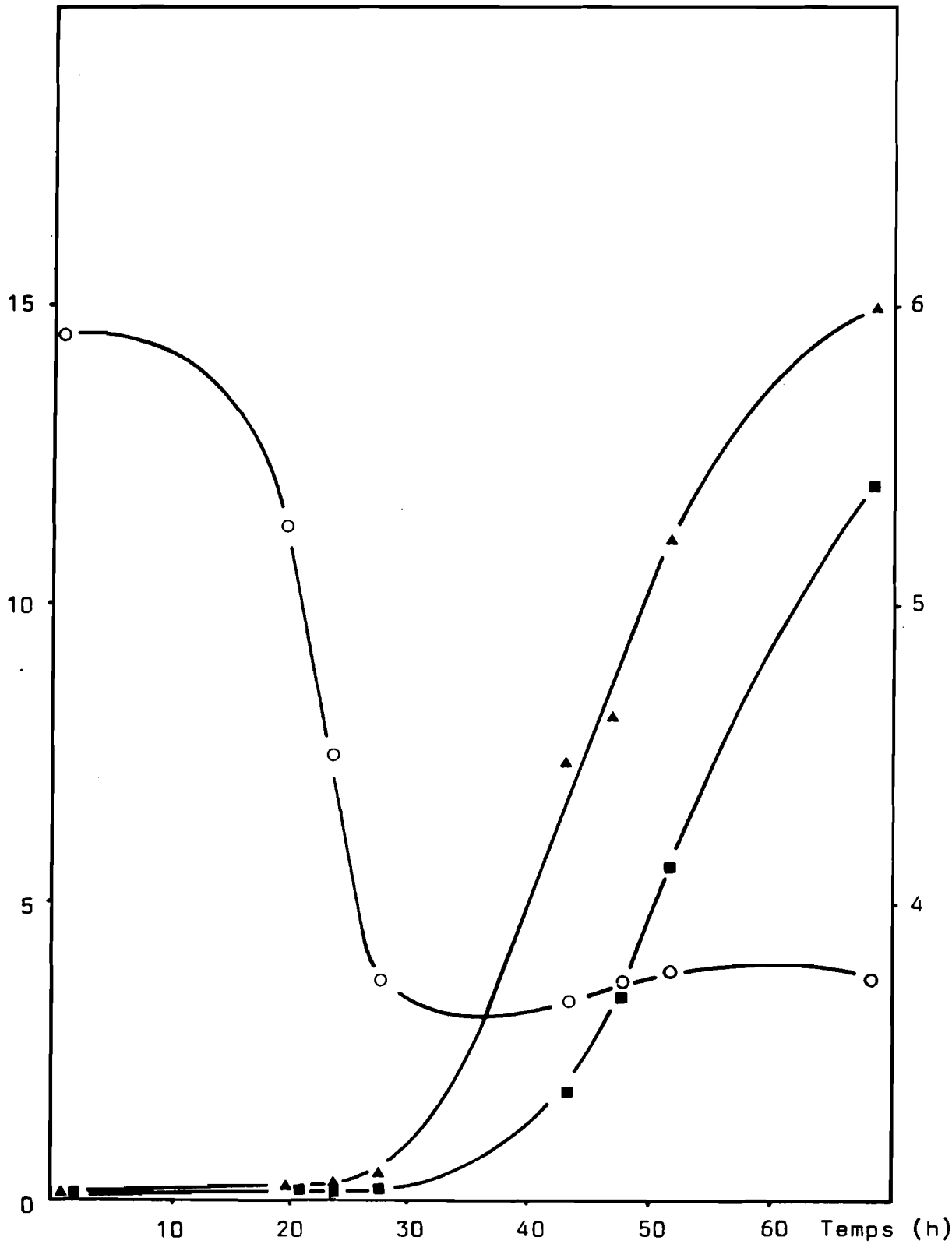


Fig. 15 : Cinétique de production de cellulases (▲—▲ APF x 100 et ■—■ ACMC x 1000 UI) et de l'évolution du pH (○—○) en fonction du temps au cours de la fermentation en milieu liquide de la bagasse .

Nous pensons qu'un prétraitement du substrat favoriserait la croissance de T.harzianum et augmenterait ainsi les rendements de production de cellulases.

7.3. Production de cellulases en colonne

Le principe ainsi que la préparation des colonnes pour réaliser les fermentations en milieu solide ont été développés dans le Matériel et Methodes (& 6.3.2.a.). Nous avons utilisé pour cette étude, les substrats suivants : Bagasse, son de blé, mélange de bagasse (80 g) et son de blé (20 g).

7.3.1. Culture sur bagasse uniquement

La fermentation en milieu solide de la bagasse seule en colonne a duré 68 heures. Un certain nombre de prélèvements faits au cours de la fermentation nous ont permis de suivre l' évolution de l'inoculum et la biosynthèse de cellulases. Sur le Tableau VIII les résultats obtenus sont représentés.

Tout d'abord l'humidité du produit reste stable pendant 24 heures. Elle augmente légèrement après cette période. De même les valeurs du pH restent stables tout au long de la fermentation malgré l'évolution de l'inoculum.

En effet les conidiospores commencent à germer après 10 heures de culture.La phase de germination est terminée après 20 h de culture. A ce stade de la fermentation, il y a eu 100 % de conidiospores germées. Le mycélium commence à envahir le substrat après 30 h. de culture. Pour cela il développe un certain nombre de branchement afin d'explorer et coloniser l' environnement immédiat.

Cependant, les premières activité cellulasiques apparaissent après 24 h pour les APF et après 40 h pour les ACMC. La production de cellulases augmente en fonction du temps et se stabilise après 50 h de culture. A ce stade, il y a eu production de :

- 1 422 U.I. APF / 100 g SPS
- 11 854 U.I.ACMC / 100 g SPS

TABLEAU VIII Evolution de différents paramètres (Humidité, pH, Cellulases) au cours de la croissance de Trichoderma harzianum . Cultures en milieu solide, colonne, sur de la bagasse uniquement.

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
0	0	70,8	29,2	6,00	74	0
1	20	70,5	29,5	5,88	103	0
2	24	70,7	29,3	6,10	264	0
3	44	71,5	28,5	5,98	866	8.361
4	48	72,1	27,9	6,32	1.234	10.573
5	52	72,0	28,0	6,26	1.422	11.854
6	68	72,9	27,1	6;88	1.386	11.982
7	68	72,5	27,5	6,94	1.390	12.090

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

L'humidité finale du produit a été de 72 % et les valeurs du pH on été proches de celle de départ.

Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus en milieu liquide l'on observe que la production de cellulases de T.harzianum pour les deux milieux a été après 68 h de fermentation très proche.

7.3.2. Culture sur son de blé uniquement

L'évolution de différents paramètres mesurés au cours de la croissance de T.harzianum cultivé sur son de blé uniquement est donnée sur le Tableau IX. La fermentation a duré 68 h.

L'analyse des échantillons montre une évolution importante de l'humidité du produit. Elle a été de 53,1 % au départ et proche de 61 % à la fin de la fermentation. Les valeurs du pH sont restées stables pendant 40 h., elles ont diminué légèrement et à la fin de la fermentation il y a eu une légère augmentation du pH.

Lorsque le pH a diminué il y a eu apparition de cellusases dans le milieu. Cependant la production ce celles-ci a été tardive et en même temps faible. Après 60 h de culture il y a eu production de:

- 935 U.I d' APF / 100 g SPS
- 6 813 U.I. d'ACMC / 100 g SPS

Cette production tardive de cellulases est liée à la croissance lente du mycélium . En effet, les conidiospores de T. harzianum ont mis 30 h pour germer. L'humidité initiale du produit, étant relativement faible, a freiné la germination de l' inoculum. Cependant, même lorsque le mycélium a envahi le substrat il n'y a pas eu de production importante de cellulases, car T.harzianum utilise les sucres simples et l'amidon pour sa croissance et bien tardivement la cellulose.

7.3.3. Culture sur un mélange bagasse et son de blé

Sur le tableau X nous avons donné les résultats d'analyses obtenus à partir des échantillons prélevés au cours de la croissance de T.harzianum cultivé sur un mélange bagasse (80g) et son de blé (20g). La fermentation en milieu solide a duré 68 h.

TABLEAU IX Evolution de différents paramètres (Humidité, pH, Cellulases) au cours de la croissance de Trichoderma harzianum . Cultures en milieu solide colonne, sur du son de blé uniquement.

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
0	0	53,1	46,9	6,44	106	0
1	20	53,1	46,9	6,50	105	0
2	24	53,4	46,6	6,66	3	0
3	44	55,9	44,1	6,06	115	77
4	48	56,7	43,3	5,70	123	455
5	52	57,9	42,1	5,34	204	1.513
6	68	60,9	39,1	5,80	935	6.813
7	68	61,2	38,8	5,70	855	6.377

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

L'humidité du produit augmente régulièrement. Elle passe de 68,3 % en début de fermentation à 73,9 à la fin. Les valeurs du pH restent stables pendant 20 heures; elles diminuent rapidement entre 20 et 30 heures de culture puis elles remontent pour se stabiliser aux environs de 6,28 .

La production de cellulases a été importante. Les premières activités enzymatiques sont apparues dans le milieu de culture après 28 h de fermentation. Cette production a augmenté en fonction du temps pour atteindre un seuil. Après 48 h de fermentation en milieu solide il y a eu production de :

- 1 605 U.I. d' APF / 100 g SPS
- 20 443 U.I. d' ACMC / 100 g SPS

Cette production importante de cellulases a été obtenue après deux jours seulement de culture de T.harzianum. elle est dûe principalement à un développement important de cette souche . En effet, les conidiospores de T.harzianum germent après 16 h de culture. Le mycélium très rapidement, envahit les brins de bagasse et le son de blé, développant de nombreux branchements . A 48 h de fermentation, le mycélium est foisonnant. Après cette période il y a apparition de phialides qui donneront plus tard des conidiospores. Les conidiospores sont libérées dans le milieu après 60 h de culture.

Cependant il faut noter que les activités cellulasiques apparaissent dans le milieu au moment même où les valeurs minimales de pH sont atteintes. Cette constation est valable pour la fermentation en milieu solide plutôt qu'en milieu liquide.

Nous avons également observé que le seuil maximum de production de cellulases a été atteint après 50 h de culture. Après cette période, la quantité des ACMC restait stable alors que celle des APF diminuait légèrement.

7.3.4. Optimisation de la solution minérale

Lors des études précédentes sur l'hydrolyse de la cellulose par les moisissures (ROUSSOS;1981) et la production de cellulases de T.harzianum (ROUSSOS et SEDHA; 1983) nous avons utilisé une solution minérale contenant 17 g de sels pour 100 g de substrat. Il nous a semblé que cette quantité était trop importante. Nous avons donc utilisé les dilutions au 1/2 et au 1/3 de cette solution minérale (Tableau V) et un mélange de bagasse et de son de blé pour

TABLEAU X Evolution de différents paramètres (Humidité, pH, Cellulases) en fonction du temps au cours de la croissance de Trichoderma harzianum . Cultures en milieu solide, colonne, sur un mélange de bagasse et de son de blé.

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
0	0	68,3	31,7	5,80	30	573
1	20	70,7	29,3	5,56	215	658
2	24	71,0	29,0	4,86	142	624
3	28	71,4	28,6	4,50	398	2.162
4	44	72,8	27,2	6,26	1.431	17.464
5	48	73,5	26,5	6,28	1.605	20.443
6	52	72,7	27,3	6,28	1.533	20.551
7	68	73,9	26,1	6,28	1.308	20.536

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

la culture en milieu solide de T.harzianum .

Tout d'abord, l'évolution de différents paramètres au cours de la croissance de T.harzianum en utilisant la solution minérale 2 a été donnée sur le Tableau XI. La fermentation a duré 44 h .

L'humidité du produit a augmenté légèrement au cours de la fermentation. Le pH a diminué dès les premières heures. Cette diminution a été constante en fonction du temps. Les activités enzymatiques ont été très faibles et sont apparues dans le milieu aaprès 44 h de fermentation en milieu solide il y a eu production de :

- 345 U.I. d' APF / 100 g SPS

- 8 556 U.I. d' ACMC / 100 g SPS

Cependant, la croissance du microorganisme a été abondante. En effet les conidiospores ont germé après 16 h de culture en donnant naissance à un type germinatif.Après 20 h de culture le mycélium présentait 6-7 branchements. Il avait également envani le substrat après 30 h de culture. Il y a eu apparition de phialides très tôt avec libération de conidiospores après 40 h de culture.

Sur le Tableau XII, nous avons donné l'évolution de l'humidité, du pH et des cellulases au cours de la croissance de T.harzianum cultivé su bagasse et son de blé en utilisant la solution minérale 3. La fermentation a duré 68 h.

Nous formulons les mêmes observations que précédemment sur l'évolution de l'humidité et du pH. Par contre, les activités cellulasiques ont été différentes. Elles ont été libérées dans le milieu assez rapidement (24 h) et en quantité faible .
Il y a eu une production de :

- 277 U.I. d'APF / 100 g SPS

- 3 559 U.I. d'ACMC / 100 g SPS

Après 30 h de fermentation en milieu solide cette production est restée stable pendant 20 h environ.

TABLEAU XI Evolution de différents paramètres(Humidité, pH, Cellulases) au cours de la croissance de T.harzianum Cultures en milieu solide, colonne, sur un mélange de bagasse et de son de blé industriel en utilisant la solution minérale 2 .

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
0	0	69,8	30,2	6,10	274	0
1	6	69,9	30,1	6,04	273	0
2	20	69,8	30,2	5,80	136	0
3	24	69,8	30,2	5,22	136	0
4	30	70,6	29,4	5,12	330	6 467
5	44	72,0	28,0	4,80	345	8 556

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

TABLEAU XII Evolution de différents paramètres(Humidité, pH, Cellulases) au cours de la croissance de T.harzianum. Cultures en milieu solide, colonne, sur un mélange de bagasse et de son de blé industriel en utilisant la solution minérale 3.

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
0	0	70,1	29,9	5,70	109	0
1	20	70,3	29,7	5,20	134	0
2	24	70,7	29,3	4,72	160	722
3	30	71,4	28,6	4,12	277	3 559
4	44	71,9	28,1	4,46	305	2 704
5	48	72,7	27,3	4,76	346	3 141
6	49	72,9	27,1	4,86	306	3 352
7	68	73,4	26,6	5,12	212	3 658

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

L'évolution de l'inoculum a été très différente de celle observée précédemment. En effet les conidiospores ont germé normalement. Le mycélium a bien colonisé le substrat. Par contre, très rapidement, il y a eu production de conidiospores qui ont été libérées dans le milieu donnant une coloration du produit après 44 h de culture.

Il nous a paru donc évident qu'il ne fallait pas diluer la concentration de la solution minérale principalement pour deux raisons :

- maintenir la production élevée en cellulases
- retarder la sporulation.

7.4. Production de cellulases en Zymotis

7.4.1. Mise au point de la fermentation

Avant l'utilisation du nouveau fermenteur pour les cultures en milieu solide, il fallait résoudre un certain nombre de problèmes posés par le passage de l'expérimentation au niveau Laboratoire à celui du pilote.

La bagasse à la sortie des moulins a été de nouveau broyée à l'aide d'un broyeur à marteaux puis séchée. Par la suite elle a été stockée dans des sacs en plastique (1,6 kg /sac) fermés. Le son de blé a été également stocké de la même façon (0,4 kg par sac). Nous avons défini ainsi une unité de base qui correspond donc à 2 kg de substrat Poids Sec.

A cette unité de base nous avons ajouté la solution minérale suivante :

$(NH_4)_2SO_4$: 194 g; urée : 48 g ; KH_2PO_4 : 100 g; Eau : 2 700 ml; pH: 4,00.

Pour l'addition de la solution minérale nous avons placé dans un pétrin le substrat (1 UB) puis, par aspersion de la solution minérale et agitation du bras du pétrin, un mélange homogène a été obtenu.

TABLEAU XIII Evolution de différents paramètres (Humidité, pH, cellulases) au cours de la croissance de T. Harzianum. Cultures en milieu solide, Zymotis, sur un mélange de bagasse et de son de blé industriel non traités (7, 5 kg SPS)

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
Z 20	0	72,9	27,1	6,20	114	98
Z 21	6	72,6	27,4	6,20	114	66
Z 22	21	74,3	25,7	4,84	279	3
Z 23	24	74,1	25,9	4,58	443	492
Z 24	30	75,2	24,8	5,88	705	4 594
Z 25	44	75,9	24,1	7,38	541	3 544
Z 26	48	76,2	23,8	7,68	345	1 410
Z 27	54	76,5	23,5	8,08	295	885
Z 28	67	76,0	24,0	8,30	279	755
Z 29	67	77,7	22,3	8,26	262	722

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

Le prétraitement à la chaleur du mélange ainsi obtenu a été réalisé par autoclavage de 2 UB à 110°C pendant 1 h.

L'inoculation a été réalisée sur le substrat prétraité par aspersion d'une suspension de conidiospores de T.harzianum . Pour se faire 1 UB de substrat prétraitée a été placée dans le pétrin. Nous avons donc par aspersion ajouté 2 400 ml d'une suspension contenant 6×10^{10} conidiospores.

Le substrat inoculé a été par la suite introduit dans le Zymotis et une faible partie a servi pour la préparation des colonnes.

Sur le Tableau XIII, nous avons donné les résultats obtenus au cours de cette première expérimentation. La fermentation a duré 67 h.

Des cellulases ont été libérées dans le milieu de culture très tôt (24 h). Cependant la production de ces enzymes a été très vite arrêtée. Effectivement après 30 h de fermentation de la bagasse en Zymotis le maximum de cellulases a été produit. Après cette période les activités cellulasiques diminuaient en fonction du temps.

Par contre l'humidité du produit étant de 72,9 % au départ, n'a pas cessé d'augmenter. Après 72 h le produit était à 77,7 % d'humidité (Tableau XIII).

L'évolution du pH a été tout à fait différente . Après un temps de latence (6 h) le pH a diminué pour atteindre les valeurs les plus faibles après 24 h. Après cette période il n'a cessé d'augmenter pour atteindre en fin de fermentation des valeurs très élevées. (8,30).

Les examens microcospiques nous ont confirmé ces résultats. L'inoculation du produit avec les conidiospores de T.harzianum a été abondante. Malheureusement dès le départ il y avait beaucoup de bactéries sur le substrat. Après 20 h de culture toutes les conidiospores avait germé et le mycélium présentait de très nombreux branchements, mais il y avait également une prolifération de bactéries, ainsi que de levures anormalement élevée.

Cette population a pris le dessus dès que l'humidité du produit a dépassé le seuil de 75 %. C'est donc après 30 h de fermentation que le mycélium a commencé à être lysé et l'odeur ammoniacale du produit témoignait d'une activité intense des bactéries. Il y a eu alcalinisation rapide du milieu de culture et lyse complète du mycélium après 40 h de fermentation en zymotis.

TABLEAU XIV Evolution de différents paramètres (Humidité, pH, Cellulases) au cours de la croissance de T.harzianum Culture en milieu solide, colonne sur un mélange de bagasse et de son de blé industriel.

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
CZ 30	0	67,0	33,0	5,58	163	0
CZ 31	16	66,8	33,2	5,58	321	0
CZ 32	20	66,8	33,2	5,56	312	0
CZ 33	24	66,4	33,6	5,41	395	0
CZ 34	40	68,6	31,4	5,72	1 817	11 088
CZ 35	44	69,2	30,8	6,10	1 620	12 280
CZ 36	48	69,5	30,5	6,33	1 608	13 136
CZ 37	64	69,2	30,8	6,52	1 750	13 196
CZ 38	68	69,7	30,3	6,56	2 113	13 374

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

TABLEAU XV Evolution de différents paramètres (Humidité, pH, Cellulases) au cours de la croissance de T.harzianum. Cultures en milieu solide, Zymotis, sur un mélange de bagasse et de son de blé industriel (4 kg SPS).

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
Z 30	0	66,8	33,2	5,50	273	0
Z 31	16	66,0	34,0	5,52	273	0
Z 32	20	67,0	33,0	5,52	763	0
Z 33	24	65,8	34,2	5,32	763	0
Z 34	40	67,6	32,4	5,46	1 771	11 446
Z 35	44	68,1	31,9	5,98	1 826	13 354
Z 36	48	68,6	31,4	6,25	1 908	13 354
Z 37	64	68,8	31,2	6,45	1 744	13 765

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

Pour éviter cette prolifération intense de bactéries et de levures, nous avons agît sur deux niveaux :

- prétraitement à la chaleur de 3 h / 2 UB à 110 ° C

- humidité de produit ne dépassant pas 73 %

Pour les expériences suivantes le substrat a été autoclavé à 110 ° C pendant 3 h. De même l'humidité du substrat inoculé au départ a été inférieure à 72 %.

Nous avons également étudié l'effet de la charge du Zymotis sur l'évolution du mycélium de T.harzianum . Le Zymotis a été chargé avec 2 UB ; 4 UB; 5 UB et 6 UB. Ce qui correspondait à une hauteur de 18 cm; 36 cm; 45 cm; et 54 cm.

7.4.2. Zymotis chargé avec 4 kg SPS

L'aération a été réglée à 300 l/h/compartiment. La hauteur du produit dans le fermenteur a été de 18 cm environ. Nous avons également préparé des colonnes contenant 18 g du produit inoculé. Les colonnes ont été aérées à 5/l/h par colonne. Les résultats sont présentés sur les Tableau XIV pour les colonnes et XV pour le Zymotis.

Les premières activités cellulasiques apparaissent dans le milieu après 20 h de culture. La production maximale est obtenue après 44 h en Zymotis et après 48 h de culture en colonne. Le pH évolue normalement. Aux valeurs les plus faibles correspond l'apparition de cellulases dans le milieu. L'humidité du produit a été relativement basse.

Les conidiospores ont germé très vite en Zymotis (16 h) alors qu'en colonne ce n'est qu'après 20 h de culture que la germination a été terminée.

Dans les deux cas il y a eu une croissance abondante du mycélium et une absence totale de bactéries et de levures dans le milieu . La production de cellulases après 48 h de culture , en Zymotis, a été de :

- 1 908 U.I. d' APF /100 g SPS
- 13 354 U.I. d' ACMC /100 g SPS

TABLEAU XVI Evolution de différents paramètres (Humidité, pH, Cellulases) au cours de la croissance de T. harzianum. Cultures en milieu solide, colonne, sur un mélange de bagasse et de son de blé.

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
CZ 50	0	69,9	30,1	5,76	0	0
CZ 51	13	69,1	30,9	5,65	178	0
CZ 52	18	69,0	31,0	5,70	0	0
CZ 53	24	69,3	30,7	5,40	256	0
CZ 54	37	71,6	28,4	5,00	862	8.922
CZ 55	42	71,5	28,5	5,76	1.468	12.622
CZ 56	48	73,0	27,0	5,95	1.160	13.164
CZ 57	61	72,0	28,0	6,03	1.480	14.357

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

TABLEAU XVII Evolution de différents paramètres (Humidité, pH, Cellulases) au cours de la croissance de T.harzianum.

Cultures en milieu solide, Zymotis, sur un mélange de bagasse et de son de blé (8 kg SPS).

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
Z 50	0	69,6	30,4	5,62	0	0
Z 51	13	68,2	31,8	5,56	0	0
Z 52	18	68,9	31,1	5,53	0	0
Z 53	24	69,2	30,8	4,81	0	0
Z 54	37	70,4	29,6	5,44	648	8.105
Z 55	42	70,5	29,5	6,00	884	10.611
Z 56	48	69,9	30,1	6,30	1.032	12.526
Z 57	61	73,5	26,5	6,53	958	12.025

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

7.4.3. Zymotis chargé avec 8 kg SPS

Le Zymotis a été chargé avec 4 UB de substrat inoculé et les colonnes avec 17 g du même substrat. La fermentation a duré 61 h. Les résultats sont donnés sur les Tableaux XVI et XVII.

Nous avons observé une germination précoce de conidiospores après 13 h de culture en Zymotis , alors qu'en colonne aucun n'avait germé . Un fait nouveau est apparu:lorsque le Zymotis est ainsi chargé (4 UB), le produit fermenté chauffe beaucoup. Le produit en l'espace de quelques heures atteint une température supérieure à 40 ° C. Nous avons donc augmenté le débit d'aération et branché le système de refroidissement.

L'aération du produit a été de 360 l/h par compartiment au cours des 13 premières h, il a été de 600 l/h/compartiment par la suite.

Les activités enzymatiques produites ont été légèrement plus importantes pour les cultures en colonne, du fait que la température est mieux régulée. En effet, en Zymotis la température n'a pas été suffisamment régulée et le produit après 25 h de culture était à 39°C. Cette température est bien loin de la température optimale (29°C).

Après 48 h de culture en Zymotis il y a eu une production de :

- 1 032 U.I. d' APF / 100 g SPS
- 12 526 U.I. d' ACMC / 100 g SPS

7.4.4. Zymotis chargé avec 10 kg SPS

Nous avons placé 5 UB dans le Zymotis et 18 g de substrat inoculé dans les colonnes. La fermentation a duré 48 h. Les résultats sont donnés sur les Tableaux XVII et XVIII.

La croissance et le développement du mycélium a été identique pendant les 30 premières heures à celui obtenu avec une charge de 4 UB. Cependant lorsque la température du produit était de 35°C, nous l'avons refroidi pendant une nuit entre 33 et 45 h de fermentation . De ce fait il y a eu une stimulation de sporulation et le produit à la fin de la fermentation (48 h) avait une couleur verdâtre.

TABLEAU XVIII Evolution de différents paramètres (Humidité, pH; Cellulases) au cours de la croissance de T.harzianum, Cultures en milieu solide, colonne, sur un mélange de bagasse de son de blé.

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
CZ 80	0	70,7	29,3	5,38	0	0
CZ 81	8	70,5	29,5	5,41	0	0
CZ 82	21	70,5	29,5	5,27	0	0
CZ 83	26	71,9	28,1	4,18	0	0
CZ 84	30	71,2	28,8	4,28	338	3.162
CZ 85	32	72,3	27,7	4,57	745	8.397
CZ 86	45	72,0	28,0	5,10	1.088	12.450
CZ 87	48	72,2	27,8	5,08	1.276	12.581
CZ 88	71	73,4	26,6	5,49	1.120	12.842

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

TABLEAU XIX Evolution de différents paramètres (Humidité, pH, Cellulases) au cours de la croissance de T.harzianum. Cultures en milieu solide, Zymotis, sur un mélange de bagasse et de son de blé (10 kg SPS).

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
Z 80	0	72,0	28,0	5,45	68	0
Z 81	8	71,7	28,3	5,38	96	0
Z 82	21	72,2	27,8	4,70	96	0
Z 83	26	72,6	27,4	4,16	96	0
Z 84	30	72,7	27,3	4,91	86	0
Z 85	33	72,8	27,2	5,23	432	4.577
Z 86	45	72,0	28,0	5,63	1.344	11.011
Z 87	48	72,3	27,7	5,73	1.344	12.803

APF : Activité Papier Filtre

ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales

SPS : Substrat Poids Sec

La production de cellulases après 48 h de fermentation en Zymotis a été de :

- 1 344 U.I. D' APF / 100 g SPS
- 12 803 U.I. D' ACMC / 100 g SPS

7.4.5. Zymotis chargé avec 12 kg SPS

Il y a eu 6 UB dans le Zymotis et 17 g de substrat inoculé dans les colonnes. La fermentation a duré 40 h. La température du produit a été maintenue aux environs de 32°C. L'aération a été de 400l/h par compartiment pendant les 10 premières h et ensuite augmentée à 780 l/h/compartiment. Les résultats sont présentés sur les Tableaux XX et XXI.

Les activités enzymatiques apparaissent dans le milieu après 30 h de fermentation en Zymotis et après 33 h en colonne. Cependant ces activités restent faibles par rapport à celles obtenues lors de l'expérience précédente. Les valeurs du pH évoluent normalement avec une phase de latence, une chute rapide suivie d'une remontée du pH. L'humidité du produit aussi bien en Zymotis qu'en colonne suit le même évolution.

Cependant, la culture de T.harzianum a été affaiblie par la présence de levures. Cela explique les rendements faibles obtenus. En effet, étant donné qu'il fallait, pour remplir le Zymotis, autoclaver 3 fois 2 UB de substrat, nous avons réduit le temps d' autoclavage de 3 h à 2 h. De ce fait, une grande partie des levures thermorésistantes a proliféré lorsque les conditions de culture étaient plus favorables.

Après 48 h de culture nous avons obtenu les rendements suivant en cellulases :

- 803 U.I. d' APF / 100 g SPS
- 7416 U.I. d' ACMC / 100 g SPS

Ces résultats ne mettent pas en cause les résultats précédents étant donné que la production de cellulases en Zymotis a été très voisine de celle obtenu en même temps en colonne.

TABLEAU XX Evolution de différents paramètres (humidité, pH, Cellulases) au cours de la croissance de T.harzianum. Cultures en milieu solide, colonne, sur un mélange de bagasse et de son de blé.

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
CZ 70	0	71,3	28,7	5,56	0	0
CZ 71	9	70,5	29,5	5,50	0	0
CZ 72	21	70,4	29,6	5,25	0	0
CZ 73	25	71,5	28,5	4,74	0	0
CZ 74	29	71,6	28,4	4,41	75	0
CZ 75	33	72,1	27,9	4,74	322	1.503
CZ 76	45	73,1	26,9	5,58	442	6.219
CZ 77	49	72,6	27,4	5,77	550	7.185

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

TABLEAU XXI Evolution de différents paramètres (Humidité,pH, Cellulases) au cours de la croissance de T.harzianum. Cultures en milieu solide, Zymotis, sur un mélange de bagasse et de son de blé (12 kg SPS).

N° Echantillon	Temps Heures	Humidité %	Poids sec %	pH	APF UI/100g SPS	ACMC UI/100g SPS
Z 70	0	71,0	29,0	5,50	124	0
Z 71	10	72,6	27,4	5,62	108	0
Z 72	22	71,5	28,5	4,84	124	0
Z 73	26	71,4	28,6	4,19	124	0
Z 74	30	72,4	27,6	4,47	124	927
Z 75	34	72,6	27,4	4,96	340	2.997
Z 76	46	73,3	26,7	5,70	556	7.416
Z 77	48	72,7	27,3	5,77	803	7.416

APF : Activité Papier Filtre ACMC : Activité CarboxyméthylCellulase

UI : Unités Internationales SPS : Substrat Poids Sec

Le produit obtenu après fermentation a été partagé en lots de 500 g et pressé pour séparer la fraction soluble de la fraction insoluble. Le conditionnement du produit fermenté a été développé dans la partie suivante : Extraction et conditionnement des cellulases .

8. C O N C L U S I O N S

La bagasse est un substrat lignocellulosique qui pourrait être valorisé par des procédés de Biotechnologie. Sa composition, riche en cellulose, favorise le développement de microorganismes cellulolytiques qui utilisent la cellulose ou les autres composés de la bagasse comme source de Carbone pour leur croissance.

De nombreux champignons filamenteux participent à l'hydrolyse de la cellulose et des substrats lignocellulosiques. Les plus étudiés à l'heure actuelle sont :

Trichoderma reesei, Trichoderma viride, T. koningii, T. harzianum, Sporotrichum pulverulentum, Chaetomium cellulolyticum ainsi que quelques Aspergillus ou Penicillium.

La dégradation enzymatique de la cellulose par les champignons est un processus complexe qui exige la participation d'au moins trois types d'enzymes.

- endoglucanases (Cx)
- exoglucanases (C_1)
- β-glucosidases

Le mécanisme d'action des cellulases est le suivant : tout d'abord l'endoglucanase attaque les régions amorphes des fibres de la cellulose et ouvre ainsi la chaîne glucidique. L'exoglucanase attaque les extrémités des chaînes auparavant ouvertes pour libérer du cellobiose. Ces deux enzymes agissent synérgiquement pour produire du cellobiose, lequel est ensuite dégradé en glucose par la β-glucosidase.

Les cellulases sont des enzymes adaptatives. Leur synthèse est contrôlée par un mécanisme inducteur-represseur. Le cellobiose et la cellulose induisent la synthèse de cellulase alors que le glucose réprime cette biosynthèse.

En Martinique les distilleries et la sucrerie après traitement de la canne à sucre, disposent de quantités importantes de Bagasse. La production de bagasse excédentaire varie entre 15 et 30 % du tonnage de canne broyée. Pour une production annuelle de 200 000 T de canne à sucre, il y a 20 000 T de bagasse excédentaire. Actuellement la presque totalité de cette bagasse excédentaire est brûlée sur place.

Dans notre Laboratoire en Martinique, nous avons mis au point un nouveau procédé Biotechnologique pour la valorisation de de la bagasse par culture d'un champignon filamenteux cellulolytique. Il s'agit de la fermentation en milieu solide de la bagasse avec . à T.harzianum pour produire des cellulases.

Le procédé ORSTOM de la valorisation Biotechnologique de la bagasse par la production d'enzymes de champignons filamenteux cellulolytiques a été d'abord mis au point au niveau du Laboratoire , en utilisant des incubateurs de 20 g, et ensuite extrapolé au niveau pilote expérimental, en utilisant un Biofermenteur nouveau : le ZYMOTIS.

Nous avons analysé la microflore hétérotrophe naturelle de la bagasse. Cette microflore est très importante,de l'ordre de 2,5 millions de bactéries par gramme bagasse Poids Sec.

Afin de maîtriser la croissance préférentielle de T.harzianum et en même temps faire subir un prétraitement de la cellulose contenue dans la bagasse, nous avons autoclavé la bagasse à 110°C pendant 3 h avant d'inoculer le substrat avec les conidiospores de T. harzianum.

La bagasse étant très pauvre enAzote nous avons apporté sous forme de sels ou de son de blé la quantité nécessaire d' Azote pour la croissance du microorganisme. Nous avons également expérimenté trois concentrations différentes de cette solution.

Pour la première fois dans notre Laboratoire un fermenteur statique, de grande capacité, a été utilisé pour la production de cellulases de T.harzianum cultivé sur bagasse de canne à sucre.

Le Zymotis a été chargé progressivement avec 4 , 8, 10 et 12 kg SPS de substrat prétraité et inoculé afin d'explorer les capacités de cet appareil ainsi que le comportement des microorganismes.

Nous avons étudié en parallèle le comportement de T.harzianum cultivé sur bagasse en colonne et en Zymotis. Nous avons obtenu des résultats très proches pour l'ensemble des expériences en colonne et Zymotis.

Le bilan global de production de cellulases en Zymotis chargé avec 4,8 et 10 kg SPS a été le suivant :

- 4 kg : 534 000 U.I. ACMC / Zymotis
- 8 kg : 1 002 080 U.I. ACMC / Zymotis
-10 kg : 1 280 300 U.I. ACMC / Zymotis

Ces résultats très prometteurs, nous autorisent à envisager l'utilisation de ce nouveau Biofermenteur pour la production de celluases de T.harzianum et valoriser ainsi la bagasse de canne à sucre.

9. B I B L I O G R A P H I E

AIDOO, K.E., HENDRY, R. et B.J.B. WOOD. 1982
Solide substrate fermentation. Adv. Appl. Microbiol. 28 : 201-236.

AIT, N., CREUZET, N. et P. FORGET. 1979.
Partial purification of cellulase from Clostridium thermocellum J. gen. Microbiol. 113 : 399-402.

ALLEN, A.L. et R.E. ANDREOTTI. 1982. Cellulase production in continuous and fed batch culture by Trichoderma reesei MCG 80. Biotechnol. Bioeng.

ANDER, P., ERIKSSON, K.E. et H.S. YU. 1983.
Physiological requirements for degradation lignin and lignin-related substances by Sporotrichum pulverulentum. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18 : 374.380

AYERS, A.R., AYERS S.B. et K.E., ERIKSSON. 1978.
Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from Sporotrichum pulverulentum Eur. J. Biochem. 90 : 171-181.

BACCHI, O.O.S. 1983. A vinhaça e sua aplicaçao. Seminorio apresentee au cours Microbiologica et Biochimica do sol. ESALQ USP. Piracicaba, Brasil, 28 p.

BECKHORN, E.J., LABBEE, M.D. et L.A. UNDERKOFLER. 1965.
Production and use of microbial enzymes for food processing. J. Agric. fD. Chem. 13. 30-34.

BHATAWADEKAR, S.P. 1981. Clarification of lime juice by cellulase of Penicillium funiculosum J. Food Scien. Technol. 18 : 207-208.

CANEVASCINI, G., COUDRAY, M.R., REY, J.P., SOUTHGATE, R.J.G. et H. MEIER. 1979. Induction and catabolite repression of cellulase synthesis in the thermophilie fungus Sporotrichum thermophile . J. Gen. Microbiol. 110 : 291-303.

CANNEL, E. et M. MOO- YOUNG. 1980. Solide state fermentation systems. Process Biochem. 15 : 2-7

CERRI, C. 1973. Utilisation Agricole des résidus des industries du sucre et de l'Alcool au Brésil. Conférence présentée au C.T.C.S. (Martinique). 6.12.83.

COUDRAY, M.R., CANEVASCINI, G. et H. MEIER. 1982 Characterization of a cellobiose dehydrolase in the cellulolytic fungus Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile . Biochem. I. 203 : 277-284

DESHPANDE, V., ERIKSSON, K.E. et B. PETTERSSON. 1978. Production, purification and partial characterization of 1, 4-o-glucosidase enzymes from Sporotrichum pulverulentum. Europ. J. Biochem. 90 : 191-198.

D'SOUZA, J. et O. VOLFOVA. 1982. The effect of pH on the production of cellulases in Aspergillus terrens. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16: 123-125.

E.K.,M. et K.E. , ERIKSSON. 1980. Utilisation of the white-rot fungus Sporotrichum pulverulentum for water purification and protein production on mixed lignocellulosic wastewaters. Biotechnol. Bioeng. 22 : 2273-2284.

ERIKSEN, J. et K. GOKSOYR. 1976. The effect of Temperature on growth and cellulase (o-1,4-endoglucanase) production in the compost fungus Chaetomium thermophile var. Dissitum. Arch. Microbiol. 110 : 233 -238.

ERIKSSON, K.E. et B. PETTERSSON. 1975. Extracellular enzyme system utilized by the fungus Sporotrichum pulverulentum (Chrysosporium lignorum) for the break-down of cellulose 1. separation, purification and physico-chemical characterization of five endo-a-1,4-glucanases. Eur. J. Biochem. 51: 193-213.

ERIKSSON, K.E. 1978. Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus Sporotrichum pulverulentum . Biotechnol. Bioeng. 20 : 317-332.

ERIKSSON, K.E. et S.G. HAMP. 1978. Regulation of endo-1,4-o-glucosidase production in Sporotrichum pulverulentum Europ. J. Biochem. 90 : 183-190.

FAHNRICH,P. et K. IRRGANG. 1982 (a) Conversion of Cellulose to sugars and cellobionic acid by the extracellular enzyme system of Chaetomium Cellulolyticum . Biotechnol. 4 : 775-780.

FAHNRICH, P. et IRRGANG. 1982 (b) . Some characteristics of the cellulolytix enzyme System Chaetomium cellulolyticum. Biotechol. Letters 4. : 519-524

FAUCONNIER, R. et D. BASSEREAU. 1970. La canne à sucre. MAISONNEUVE et LAROSE eds. Paris 468. p.

FLIESS;A. et SCHUGERL.1983. Characterization of cellulases by HPLC Separation. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17 : 314-318.

GHOSE, T.K. et V.S. BISARIA. 1979. Studies on the mechanism of Enzymatic Hydrolysis of cellulosic substances. Biotechnol. Bioeng. 21 : 131-146.

GIULIANO, C., ASTHER,M. et A.W. KHAN. 1983. Comparative degradation of cellulose and sugar formation by three newly isolated anaerobes and Clostridum thermocellum. Biotechn. Letters. 5 : 395-398.

GOLDSTEIN, I.S. 1976. Chemicals from lignocellulose. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 : 293-301.

GOMEZ, R. J.H.C. et Y.K. PARK. 1983.Conversion of cane bagasse to compost and its chemical characteristics. J. Ferment. Technol. 61 : 329-332.

GONG, C.S., LADISH, M.R. et G.T. TSAO. 1977. Cellobiase from Trichoderma viride : Purification, properties, kinetics , and mechanism. Biotechnol. Bioeng. 19 : 959-981.

GONG, C.S et G.T. TSAO. 1979. Cellulase and biosynthesis regulation. Annal reports on fermentation processes, vol.3. Academic Press, New-York pp. 111-140.

HALLIWELL, G. et M. GRIFFIN. 1978. Affinity chromatography of the cellulase System of Trichoderma Koningii. Biochem. J. 169 : 713-715.

HALLIWELL, G. et R. VINCENT 1981. The action on cellulose and its derivatives of a purified 1,4-o-glucanase from Trichoderma koningii. Biochem. J. 199 : 409-417.

HARRER,W., KUBICEK, C.P., ROHR,M., WURTH, H. et J. MARIHART. 1983. The effect of Carboxymethylcellulose addition on extracellular enzyme formation in Trichoderma pseudokoningii. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17 : 339-343.

HESSELTINE, C.W. 1965.. A millenium of fungi, food and fermentation Mycologia 57 : 149_157.

IKEDA, R., YAMAMOTO,T. et M. FUNATSU. 1973. Purification and some physical properties of acid-cellulase from Aspergillus niger . Agr. Biol. Chem. 37 : 1153. 1159.

JEFFRIES, T.W., CHOI, S. et T.K. KIRK.1981. Nutritional regulation of lignin degradation by Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 42 : 290-296

KIUCHI, A. et Y. TANAKA. 1975. Process for preparing o-galactosidase U.S. Patent N° 3.919.049

KUBICEK, C.P. et D.E. PITT.1982. Effect of dilution rate on o-glucosidase secretion and cell wall metabolism in Trichoderma aureoviride cultivated in a continuous air lift fermentor. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16 : 189-196.

KUNDU, S., GHOSE, T.K. et S.N. MUKHOPADHYAY. 1983. Bioconversion of cellulose into ethanol by Clostridium thermocellum . Product inhibition. Biotechnol. Bioeng. 25 : 1109-1126.

LAMBERT et MEERS. 1983. The production of industrial enzymes Phil. Trans.R. soc. Lond. 300 : 263-282

MANDELS, M. et E.T. REESE. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. J. Bacteriol. 79: 816-826.

MANDELS, M et J. WEBER. 1969. The production of cellulases In cellulases and their applications. Advanc. Chem. Ser. 95 : 391-414.

MANDELS, M., ANDREOTTI. R. et C. ROCHE. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp. N° 6: 21-33.

MANDELS, M. 1982. CELLULASES in Annual Reports on Fermentation Processes. TSAO,G.T., FLICKINGER, M.C. et R.K. FINN (eds) Vol. 5 : 35-78.

MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylie acid reagent for determination of reducing sugar. Analyt. Chem. 31 : 426-428.

MONTENECOURT, B.S. et D.E.EVELEIGH. 1979. Production and characterization of high yielding cellulase mutants of Trichoderma reesei TAPPI. Annual Meeting Proc. New-York : 12-14 mars 1979. pp. 101-108.

MUINDI, P.J. et J.F. HANSSE. 1981. Nutritive value of cassave root meal enriched by Trichoderma harzianum for chickens. J.Sci. Food. Agric. 32 : 647-654.

MUINDI, P.J. et J.F. HANSSEN.1981. Protein enrichment of cassava root meal by Trichoderma harzianum for animal feed. J. Sci. Agric. 32 :655-661.

NYSTROM,J.M. et A.L. ALLEN. 1976. Pilot scale investigations and economics of cellulase production. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 :55-74.

OGAWA, K., TOYAMA, H. et N. TOYAMA.1982. Cellulase system of Trichoderma reesei QM 9414 Bull. Agric. Miyazaki University 29 : 191-202.

PAMMENT, N., ROBINSON,C.W., HILTON,J. et M. MOO-YOUNG. 1978. Solid state cultivation of Chaetomium cellulolyticum on alkali pretreated sawdust . Biotechnol. Bioeng. 20 : 1735.

PETTERSSON, L.G. 1975. The mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulose by Trichoderma viride . In Symp. on Enzymatic Hydrolysis of cellulose. BAILEY,M., ENARI, T.M. et M. LINKO (eds.) SITRA, HELSINKI, 1975.pp. 255-261.

RAIMBAULT, M.1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation Europ. J.Appl. Microbiol. Biotechnol. 9 : 199-209.

RAIMBAULT, M., PREBOIS, J.P. et S. ROUSSOS. 1982. Biofermenteur pour la culture de champignons filamenteux en milieu solide . Demande de Brevet d'invention IRCHA-ORSTOM.

RAIMBAULT, M. et D. ALAZARD. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation Eurp. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9 : 199-209.

REESE. 1976. History of the cellulase program at the U.S. Army Natick development center. Biotechnol. Bioeng. Symp. N°6 : 9-20.

RIFAI, M.A.. 1969. A revision of the genus Trichoderma . Mycology Papers 116 : 1-56.

ROSEMAIN, R. 1983. Les sous produits de la canne. Note interne CTCS. Martinique 5 p.

ROUSSOS, S. 1981. Etude de l' hydrolyse de la cellulose par des moisissures cultivées en milieu solide . Rapport d' élève ORSTOM. 80 p.

ROUSSOS; S. et R.K. SEDHA. 1983. Production comparée de cellulases de Trichoderma harzianum et de Chaetomium cellullyticum cultivés eur bagasse prétraitée en fermentation en milieu solide et liquide. Colloque Int. Biotechnol." Biosciences 83 " Paris 6-9 Sept. 1983.

ROUSSOS, S. et M. RAIMBAULT. Hydrolyse de la cellulose par les moisissures.I. Screening des souches cellulolytiques. Annal. Microbio. 133 : 455-464.

SIDHU, M.S. et D.K. SANDHU. 1980. Single cell protein production by Trichoderma longibranchiatum on treated sugar-cane bagasse. Biotechnol. Bioeng. 22 : 689-692.

SIMBSON, M.E. et P.B. , MARSH. 1964. Cellulose decomposition by the Aspergilli, with special reference to Aspergillus niger . Techno. Bull. 1303. U.S. Dept. of Agric. 1-53.

STERNBERG, D. 1976. Production of cellulase by Trichoderma : Biotechnol. Bioeng. Symp. N°6 : 35-53.

STERNBERG, D. 1976. A method for increasing cellulase production by Trichoderma viride. Biotechnol. Bioeng. 18 : 1751-1760.

STERNBERG,D. et S. DORVAL. 1979. Cellulase production and ammonia metabolism in Trichoderma reesei on high levels of cellulose Biotechnol. Bioeng. 21 : 181-191.

STEWART, J.C., LESTER, A. , MILBURN ,B. et J.B. PARRY. 1983. Xylanase and cellulase production by Aspergillus fumigatus Biotechnol. Letters 5 : 543-548.

THOMKE, S. , RUNDGREN,M. et K.E., ERIKSSON. 1980. Nutritional evaluation of the white-rot fungus Sporotrichum pulverulentum as a feedstuff to rats, pigs and sheep. Biotech. Bioeng. 22 : 2285-2303.

TOYAMA, N. 1976. Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with Trichoderma viride cellulase Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 : 207-219.

ULMER, D.C. et R.P. TENGERDY.1981. Solid state fermentation of steam-treated feedlot waste fibers with Chaetomium cellulolyticum . Biotechnol. Bioeng. Symp. 11 : 449-461.

VIDAUD, C. ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., et F. DESCHAMP.1982. Effet de divers prétraitements sur l'accessibilité de la cellulose de la paille de blé aux cellulases de Trichoderma harzianum . Cah. ORSTOM sér. Biol. 45 : 17-23.

WASE, D.A.J. et A.K. VAID.1983. Isolation and mutation of a highly cellulolytic strain of Aspergillus fumigatus Prc. Biochem. Decem. 1983: 35-37.

WEBER, M., FOGLIETTI, M.J. et F. PERCHERON. 1980. Fonctionnement d'une préparation cellulasique de Trichoderma viride par chrometographie d'affinité sur cellulose réticulée. J. Chromatograph. 188 : 377-382.

WOOD, T.M. et S.I. ,Mc CRAE. 1975. The cellulase complex of Trichoderma koningii . In Symp. on Enzymatic Hydrolysis of cellulose. BAILEY ,M. ENARI,T.M. et M. LINKO (eds) SITRA ,Helsinki,1975. pp 231-254.

YOSHIDA,F. et E.I. CHISHIMA. 1964. Method of producing a proteolytic enzyme by use of black Aspergillus type moulds U.S. Patent nº 3.149.051.

A N N E X E II

EXTRACTION ET CONDITIONNEMENT DES CELLULASES

1. INTRODUCTION II-1

2. MATERIEL ET METHODES II-3

2.1. Extraction des cellulases II-3

2.1.1. Conditionnement de la bagasse fermentée II-3

2.1.2. Caractéristiques de la presse II-3

2.1.3. Pressage du produit fermenté II-4

2.2. Conditionnement des cellulases II-4

2.2.1. Conservation à + 4°C II-4

2.2.2. Congélation à - 18°C II-5

2.2.3. Lyophilisation II-5

2.3. Dosage des cellulases II-5

2.4. Conditionnement de la Fraction Insoluble II-5

2.4.1. Congélation II-5

2.4.2. Lyophilisation II-6

2.4.3. Ensilage II-6

3. RESULTATS II-6

3.1. Mise au point de la méthode II-6

3.1.1. Bilan pondéral des différentes fractions II-6

3.1.2. Concentration des cellulases des Fractions Solubles II-8

3.1.3. Stabilisation des cellulases par lyophilisation II-8

3.2. Utilisation normale de la presse II-10

3.2.1. Conditionnement du produit fermenté II-10

3.2.2. Durée de pressage à 230 bar II-10

3.2.3. Conditionnement de la galette II-10

3.2.4. Conditionnement du concentré d'enzymes II-10

3.2.5. Bilan de récupération de cellulases II-11

4. CONCLUSION II-13

5. BIBLIOGRAPHIE II-15

EXTRACTION ET CONDITIONNEMENT DES CELLULASES

1. INTRODUCTION

L'un des pionniers en Technologie Enzymatique a été le Japonais TAKAMINE , lequel en 1894 a eu l'idée d'utiliser un mélange enzymatique comme aide digestif. La Takadiastase a été la première enzyme microbienne produite délibérement et de manière sophistiquée (LAMBERT et MEERS, 1983).

Au cours de la dernière décennie,de très nombreux travaux scientifiques ont été menés sur la bioconversion des substrats cellulosiques. De nombreux articles, revues, livres et congrès ont été consacrés à l'hydrolyse enzymatique des substrats lignocellulosiques.

Ainsi, la régulation et la production de cellulases (ROSS et Coll., 1983; GONG et TSAO, 1979; MANDELS et Coll. 1981), les propriétés et le mode d'action de cellulases (PETTERSSON, 1975, ERIKSSON et PETTERSSON, 1972; WOOD et Mc CRAE, 1972; REESE,1976), l'hydrolyse et la saccharification des substrats cellulosiques (COWLING et KIRK,1976; ANDREN et Coll. 1976 ; OOSHIMA et Coll., 1982) et les applications industrielles des cellulases ont ete l'objet principal de ces recherches (MANDELS, 1982; TOYAMA,1976).

Toutes ces etudes fondamentales ont été réalisées sur des cellulases provenant des cultures en milieu liquide des différentes espèces de Trichoderma . Ces champignons filamenteux, utilisent la cellulose comme source de carbone pour leur développement et synthétisent des enzymes extracellululaires au cours de leur croissance. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser les dérivés solubles de la cellulose comme la Carboxyméthylcellulose, mais également la cellulose brute , substance insoluble dans l'eau.

Les cellulases sont solubles dans l'eau et sont présentes dans les filtrats des cultures de ces microorganismes. Les solutions de cellulases de Trichoderma sont stables et peuvrent être conservées pendant des mois au réfrigérateur ou être lyophilisées sans pertes significatives de leur activité (STERNBERG; 1976) .

Pour la production industrielle de cellulases deux méthodes de culture sont utilisées. La culture en milieu solide (TOYAMA, 1975) et la culture en milieu liquide (NYSTROM et ALLEN, 1976; MANDELS et Coll. 1981).

L'extraction des enzymes est différente suivant le mode de culture. Pour les fermentations en milieu liquide la séparation des particules insolubles (cellulose, cellules mycéliennes) de la phase liquide est obtenue principalement par trois méthodes (LAMBERT et MEERS,1983; LAMBERT, 1983)

- Centrifugation
- Filtration
- Ultrafiltration

Pour les fermentations en milieu solide jusqu'à présent il y avait la Technique de KOGI modifiée (TOYAMA et OGAWA, 1975 et TOYAMA, 1976). Ces auteurs ont utilisé de la paille de riz comme substrat pour la culture de T.viride en plateaux. A la fin de la culture, le produit fermenté a été lavé avec 3 volumes d'eau et les cellulases ont été extraites par filtration.

Lors d'une étude sur la production de cellulases de T.harzianum cultivé sur un mélange de paille et de son de blé , GIULIANO (1982) a expériménté deux méthodes pour l'extraction des cellulases:

- Centrifugation
- Filtration

Au cours de cette étude il a été démontré que 15 volumes d'eau étaient nécessaires pour extraire 80 % de cellulases présentes dans le substrat fermenté en milieu solide.

Il est évident que pour obtenir des concentrés enzymatiques à partir des produits fermentés en milieu solide il faut, soit sécher ce produit pour avoir un mélange de substrat plus de l'enzyme, soit presser à pression élevée le produit pour récupérer la quantité maximum de l'eau libre ainsi que les métabolites hydrosolubles et les séparer ainsi des particules solides.

Nous avons donc mis au point un nouveau procédé d'extraction des cellulases par pressage à 230 Bar du produit fermenté en milieu solide. Dans le jus d'extraction,nous obtenons une solution hautement concentrée en cellulases et cette technique peut éventuellement être utilisée pour l'extraction de métabolites secondaires de champignons filamenteux.

Dans ce chapitre nous avons développé cette nouvelle technique d'extraction de cellulases. Nous avons ensuite expérimenté des techniques de conservation et de conditionnement des fractions solubles obtenues après pressage des produits fermentés provenant de plusieurs fermentations en milieu solide.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Extraction des cellulases

2.1.1. Conditionnement de la bagasse fermentée

La totalité du produit fermenté a été récupérée à la fin de la fermentation. Après une homogénéisation sommaire par malaxage, il a été immédiatement réparti en lots de 500 g dans des sacs en plastique.

L'ensemble des lots ainsi confectionnés a été transporté par la suite à la presse où ces lots ont été traités quelques heures après l'arrêt de la fermentation.

2.1.2. Caractéristiques de la presse

La presse que nous avons utilisé a été grâcieusement mise à notre disposition par le Directeur du Centre Technique de la Canne et du Sucre (CTCS) de la Martinique.

C'est une presse hydraulique de fabrication française (RINETTE EMIDECAU S.A. 71 CHALON / SAONE) de type 45 T. Cette presse est couramment utilisée dans les sucreries pour déterminer la concentration en saccharose de la canne à sucre broyée. Elle peut exercer une pression maximale de 250 Bar pendant quelques minutes.

Le fonctionnement de cette machine est, soit manuel, soit automatique. La durée de pressage est réglée automatiquement par un chronomètre incorporé.

Le produit à presser est placé dans une cuve cylindrique ouverte qui repose sur un piston. Cette cuve est munie de nombreux orifices de 1 mm de diamètre. La cuve ainsi chargée avec la bagasse fermentée est positionnée sous un deuxième piston. Lors de la mise en marche de la presse les pistons exercent une pression de 220 Bar sur le produit pendant la durée de temps choisie.

2.1.3. Pressage du produit fermenté.

Le produit fermenté (500 g) placé à l'intérieur de la cuve a été pressé pendant 2' 30" à 220 Bar. Nous avons obtenu ainsi deux fractions :

Tout d'abord la fraction soluble (jus) contenant les cellulases ainsi que les protéïnes solubles et les sels minéraux non utilisés. La fraction insoluble composée essentiellement par le substrat non utilisé par le microorganisme ainsi que les cellules mycéliennes.

La fraction soluble sous l'effet de la pression passe à travers les petits orifices de la cuve. Elle est par la suite collectée directement dans un récipient.

La fraction insoluble se présente sous forme de galette. Après la durée de pressage la cuve contenant cette galette est retirée de son socle et positionnée sur une table de travail afin de récupérer le produit pressé. A l'aide d'un piston la galette est chassée de la cuve. Cette galette a été par la suite lavée une fois avec une quantité d'eau égale à la quantité de la fraction soluble récupérée et de nouveau le produit lavé a été pressé.

La quantité de la fraction soluble ainsi que le poids de la fraction insoluble ont été mesurés.

Par la suite,pour le pressage,des quantités importantes de produit fermenté nous avons simplifié au maximum cette opération. En général, la durée de pressage a été de 1 mn. à 230 bar pour 500 g de produit fermenté à 72,5 % d'humidité.

2.2. Conditionnement des cellulases

La fraction soluble a été directement récupérée dans un récipient de 20 litres. Afin d'éliminer les particules solides en suspension dans la fraction soluble,nous l'avons filtrée et et mesuré ensuite son volume total.

2.2.1. Conservation à + 4°C

De faibles quantités de la fraction soluble ont été conservées au réfrigérateur à + 4°C pendant quelques semaines. Sur ces échantillons les analyses de routine ont été faites.

2.2.2. Congélation à - 18°C

Pratiquement toute la quantité de la Fraction Soluble (F.S.) récupérée a été congelée le même jour qu'el'extraction de cellulases. Pour se faire, nous avons utilisé des barquettes hautes de 1,5 l en aluminium dans lesquelles nous avons introduit 500 ml de la F.S.Le conditionnement de la F.S. était destiné également à la lyophilisation.

2.2.3. Lyophilisation

Nous avons utilisé un lyophilisateur DURA DRING à deux plateaux d'une capacité d'élimination de 3,8 l d'eau. Afin de diminuer la durée de la lyophilisation nous avons toujours introduit dans cet appareil 7 barquettes contenant donc 3,5 l de la F.S. déjà congelée. Le produit était sec après 6 jours de lyophilisation.

La poudre a été soigneusement récupérée et placée dans des récipients à fermeture étanche. Les récipients ont été stockés dans le compartiment bas du réfrigérateur. De même nous avons toujours pesé la quantité de la poudre obtenue correspondant à 1 litre de F.S.

2.3. Dosage des cellulases

Les dosages des enzymes cellulolytiques ont été réalisés sur les échantillons frais conservés à + 4°C et sur les échantillons lyophilisés. Les activités papier filtre et Carboxymethylcellulases ont été dosées suivant la Méthode de MANDELS et Coll. (1976). Les activités enzymatiques ont été exprimées en Unités Internationales U.I.

2.4. Conditionnement de la Fraction Insoluble

La fraction Insoluble (F.I.) obtenue sous forme de galettes après pressage du produit fermenté a été conditionnée de trois façons : congelée, lyophilisée et ensilée.

2.4.1. Congélation

Une faible quantité , 3 à 4 galette, a été congelée à - 18°C.

Sur ces galette des parties aliquotes ont été prélevées pour les analyses de routine (P.S., pH, cellulases), le reste a été lyophilisés.

2.4.2. Lyophilisation

Les F.I. placées dans des barquettes en aluminium et préalablement congelées ont été disposées sur les plateaux du Lyophilisateur. La Lyophilisation de la F.I. était terminée après 3 jours.

2.4.3. Ensilage

L'ensilage de la fraction insoluble de la bagasse fermentée a été développé au chapitre suivant. Pour la confection des silos nous avons utilisé quatre conservateurs(Mélasse, Ensipron, Protéïnor, A.I.V.) et l'humidité du produit ensilé a été ramenée à 65 et 55 % par addition d'eau.

3. RESULTATS

3.1. Mise au point de la Méthode

Afin de mettre au point la méthode d'extraction de cellulases, nous avons utilisé de la bagasse fermentée par culture de T.harzianum en colonne pendant 60 heures. Le produit fermenté était à 28,3 % de Matière sèche; 500 g de ce produit ont été pressés à 220 Bar pendant 2 minutes 30.

3.1.1. Bilan pondéral des différentes fractions

Sur la Fig. 1 nous avons porté les résultats obtenus au cours de l'extraction de cellulases avec une presse hydraulique.

Par cette méthode d'extraction, dans première fraction il y a une récupération de 80 % de l'eau libre du produit, ce qui entraîne une grande partie de cellulases qui sont présentes. Au cours

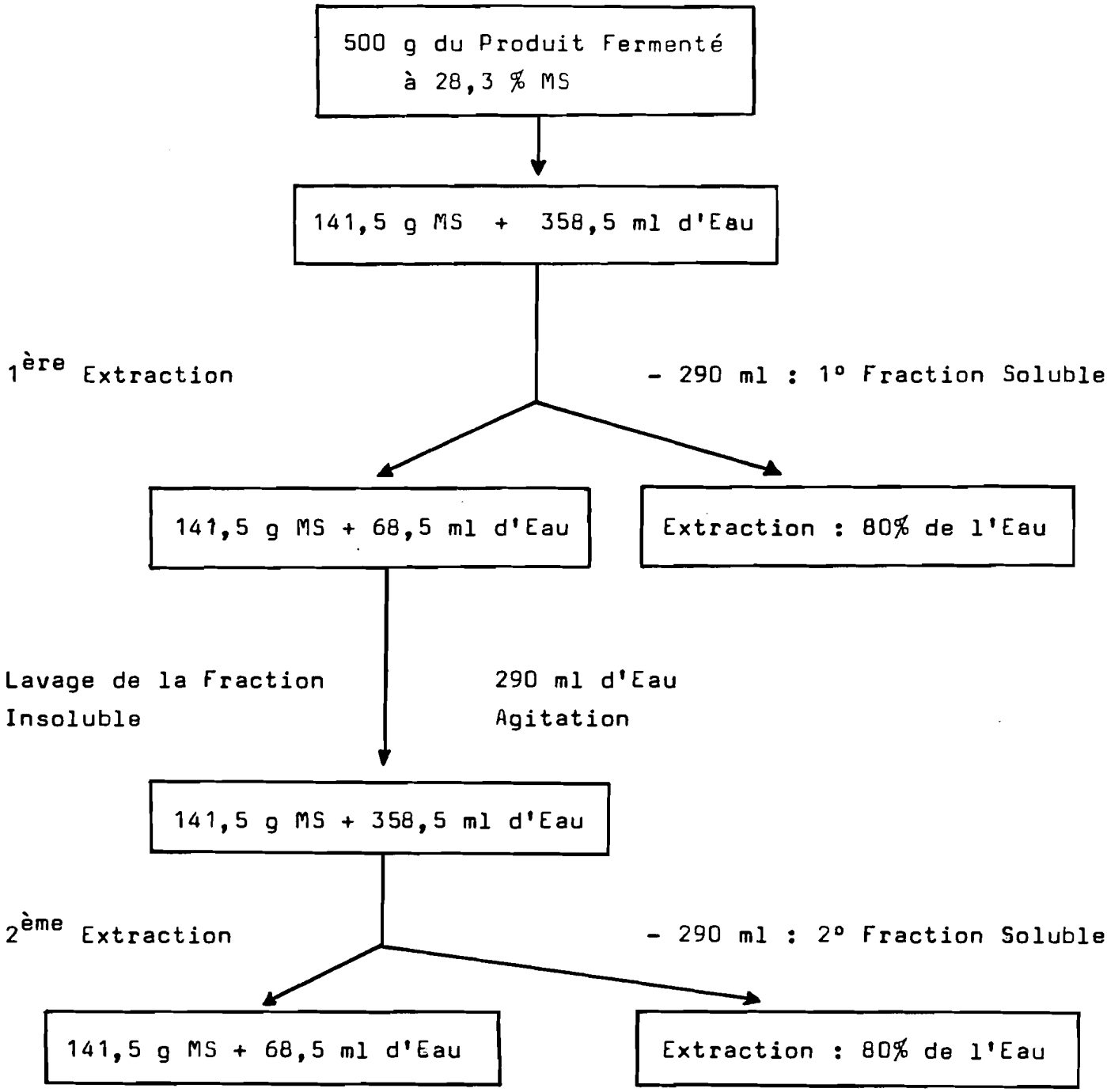


Fig. 1 Bilan pondéral des différentes fractions obtenues au cours de l'extraction de cellulases avec une presse hydrolique.

du lavage à l'eau il y a réhydratation de la Fraction Insoluble. Avec le deuxième traitement il y a récupération de 80 % d'eau, entraînant une grande partie des protéïnes solubles qui n'ont pu être extraites au cours du premier traitement.

Globalement nous avons obtenu une fraction insoluble lavée de 210 g contenant 141,5 g de Matière sèche et deux fractions solubles n° 1 et n° 2 de 290 ml chacune contenant des cellulases.

Cependant il faut noter que la plus grande partie de la fraction soluble est récupérée au moment de la montée de la pression exercée par les pistons. Une fois que la valeur de 220 Bar est atteinte l'extraction de la fraction soluble continue mais avec des rendements très faibles. Nous avons donc pensé qu'il serait préférable d'augmenter la pression et de diminuer sa durée.

3.1.2. Concentration des cellulases des Fractions Solubles

Sur le Tableau I sont portées les quantités de cellulases présentes dans les deux fractions solubles avant et après Lyophilisation pour 500 g de produit fermenté à 28,3 % de Matière sèche (M.S.).

Tout d'abord, par le premier pressage 67,5 % des cellulases biosynthétisées ont été extraites. Le second pressage permet d'extraire les 80 % de cellulases des 32,5 % qui n'ont pas été récupérées lors du premier. Au total, 93,5 % des cellulases produites au cours de la croissance de T.harzianum ont été récupérées par les deux traitements. Cependant les cellulases contenues dans la deuxième fraction soluble sont 3 fois plus diluées que celles de la première.

Globalement nous avons obtenu 23.780 U.Id'ACMC et 1.626 U.I. d'APF pour la fraction soluble n° 1 et 7.720 U.I. d'ACMC et 722 U.I d'APF pour la deuxième fraction soluble.

3.1.3. Stabilisation des cellulases par Lyophilisation

Le conditionnement par lyophilisation de ces solutions concentrées en enzymes paraît être un bon choix. Outre la conservation de ces enzymes, une concentration supplémentaire est obtenue pour ces produits. Cette concentration est voisine de 13 fois pour la fraction soluble n° 1 et de 28 fois pour la fraction n° 2. D'autant plus que par ce mode de conditionnement les activités enzymatiques ne se détériorent point.

TABLEAU I Quantités de cellulases présentes dans les deux fractions solubles avant et après lyophilisation pour 500 g de produit fermenté à 28,3 % M.S.

	Quantité	Poids	Activités Enzymatiques exprimées en U.I.			
Avant Lyophilisation	ml	g	APF ml	ACMC ml	APF totales	ACMC totales
1° Fraction soluble	290		5,61	82	1.626	23.780
2° Fraction soluble	290		2,49	26,6	722	7.720
Après Lyophilisation						
1° Fraction soluble	250	18,5	63/g	1.110/g	1.165	20.535
2°° Fraction soluble	250	18,5	52/g	758/g	461	6.723

Sur le Tableau I on remarque cependant que les concentrations totales des activités enzymatiques présentes dans le produit lyophilisé sont inférieures à celles contenues dans les fractions insolubles avant la lyophilisation. Cette différence est dûe au fait que nous n'avons pas lyophilisé les quantités totales des fractions solubles (290 ml). En effet, nous avons conservé 40 ml de ces fractions à + 4°C pour les différentes analyses.

3.2 Utilisation normale de la presse

3.2.1. Conditionnement du produit fermenté

Pour l'extraction des cellulases produites au cours de la fermentation en milieu solide, des quantités importantes de bagasse ; nous avons donc pressé dans la journée, suivant la charge du Zymotis, de 20 à 100 unités de 500 g.

3.2.2. Durée de pressage à 230 Bar

Afin de diminuer le temps de pressage, nous avons augmenté la pression à 230 Bar et diminué la durée à 1 mn. C'est dans ces conditions que nous avons par la suite, traité les produits fermentés provenant des fermentations en milieu solide (en Zymotis).

En général nous avons extrait dans ces conditions 77 % de la fraction soluble contenue dans le produit fermenté. Afin qu'il n'y ait pas de grand décalage entre les échantillons traités au cours de l'extraction, nous n'avons pas lavé les galettes récupérées. De ce fait, les galettes contenaient 23 % de la fraction soluble non extraite.

3.2.3. Conditionnement de la galette

Les galettes ont été pesées pour connaître leur poids moyen. Une partie aliquote a été prélevée pour les analyses de routine. Le reste a servi pour la confection des silos. Pour cela , à une quantité connue de galette (3 ou 4 kg environ) le conservateur d'ensilage était ajouté.en même temps que la quantité d'eau nécessaire pour amener l'humidité du produit ensilé aux environ de 35 et 45 %.

3.2.4. Conditionnement du concentré d'Enzymes

La fraction soluble contenant les cellulases a été directement récupérée à la sortie de la presse dans un bidon de 20 litres. Par la

suite, le jus a été filtré pour éliminer les particules solides en suspension et son volume mesuré.

La plus grande quantité du jus a été congelée dans des barquettes en aluminium avant Lyophilisation.

3.2.5. Bilan de récupération de cellulases

Sur le Tableau II nous avons donné un bilan détaillé de la quantité de produit fermenté traité à la presse hydraulique pour obtenir la séparation de la F.S. contenant les cellulases et la F.I. contenant le substrat non utilisé par le microorganisme.

Le produit fermenté provenait de 7 fermentations différentes en Zymotis. Pour ces fermentations la charge du fermenteur était comprise de 11 à 48 kg (Tableau II). Une quantité totale de 225,7 kg de produit fermenté a été conditionnée et traitée à la presse pour en extraire les cellulases. Nous avons pu ainsi obtenir des solutions hautement concentrées en cellulases d'un volume (F.I.) d'un poids total de 93,19 kg.

La presse hydraulique a fonctionné 514 mn. à la pression de 230 Bar. Cependant cette pression maximale est atteinte au bout d'une minute après la mise en marche. Par conséquent, le temps réel d'occupation de la presse a été de 17 heures.

Il paraît évident que l'extraction de cellulases se fait à un stade tout à fait artisanal. Outre la manutention du produit fermenté en lots de 500 g, l'extraction de cellulases par pressage dure très longtemps. Il serait préférable, lors du développement de ce procédé, de disposer d'une presse 100 fois supérieure en capacité et qui pourrait traiter 50 kg du produit fermenté à la fois, ceci à 230 Bar. Cette capacité correspond également à celle du Zymotis et permettrait de traiter l'ensemble du produit fermenté immédiatement après l'arrêt de la fermentation.

En effet, nous avons remarqué que toutes les opérations de conditionnement du produit fermenté et d'extraction de cellulases duraient 6 heures en moyenne pour 45 kg de produit fermenté. Pendant cette période dans le produit non traité les microorganismes présents évoluent dans des conditions non contrôlées et le traitement immédiat de l'ensemble du produit fermenté stopperait cette évolution.

Tableau II Bilan détaillé de la quantité de produit traité à la presse hydraulique afin d'obtenir la séparation de la fraction Insoluble (galette) de la fraction Soluble(jus).

PRODUIT FERMENTE			GALETTES				VOLUME	JUS	DUREE
N°	Quantité kg	Poids sec %	Nombre	Poids g	poids total kg	poids sec %	total l	/galette ml	Pression mn
Z 28	31,0	23,2	62	170	10,54	56,5	19,84	320	2
Z 37	11,4	31,2	23	210	4,83	56,3	6,67	290	1
Z 48	24,5	29,4	49	218	10,68	59,0	13,52	276	1
Z 58	30,0	26,5	60	201	12,06	53,2	17,74	296	1
Z 68	45,0	27,8	90	211	19,03	52,4	23,58	262	1
Z 77	48,0	27,3	96	215	20,64	54,0	26,21	273	1
Z 87	35,8	27,7	72	214	15,41	55,7	19,37	269	1
Total	225,7	/	452	/	93,19	/	126,9	/	514

Sur le Tableau II nous n'avons pas porté faute de place les concentrations de cellulases extraites lors des différents traitements de la bagasse fermentée. Dans les fractions solubles nous avons obtenu des concentrations très élevées en cellulases. En moyenne le jus de pression contenait 3 U.I. d'Activité Papier Filtre(APF) et 35 U.I. d'Activité Carboxyméthylcellulase (ACMC) par ml1. Au total, pour la fraction soluble de 126,9 l. nous avons donc obtenu 4.441.500 U.I. d'ACMC et 380.700 U.I d' A.P.F.

4. CONCLUSION

Les enzymes du système cellulasique, impliquées dans l' hydrolyse de la cellulose en unités glucose, sont des protéïnes exocellulaires et solubles dans l'eau. De ce fait au fur et à mesure de leur biosynthèse elles sont transportées à l'extérieur de la cellule pour transformer les macromolécules de la cellulose en molécules simples (cellobiose, glucose).

Partant de cette constatation, nous avons utilisé une technique originale pour obtenir des solutions hautement concentrées en cellulases : l'extraction de cellulases par pressage du produit fermenté; pour se faire, nous avons utilisé de la bagasse fermentée en milieu solide avec un champignon filamenteux cellulolytique T. harzianum . Le produit fermenté a été récupéré et pressé pendant 2'30" à 220 Bar.

Ce traitement nous a permis de récupérer 80 % de la fraction soluble (F.S.) contenue dans le produit. Cette F.S. contient des protéïnes solubles, des cellulases des sels minéraux mais également une grande variété de métabolites. La fraction insoluble composée essentiellement de la bagasse non utilisée par le microorganisme, contient une faible partie de la fraction soluble et sa matière sèche passe de 27,7 % à 61,8 %.

Le conditionnement pour la stabilisation de ces deux fractions a été différent. Tout d'abord l'ensilage de la fraction insoluble a été envisagé et ensuite la lyophilisation a été expérimentée pour la fraction soluble.

Avant lyophilisation, la fraction soluble contenait 5,6 U.I. d'Activité Papier Filtre et 82 U.I. d'Activité Carboxyméthylcellulese. Ces activités étaient concentrées dans un millilitre. Nous avons retrouvé dces valeurs après lyophilisation de la fraction soluble. Les enzymes étaient sous forme de poudre sèche à très haute activité enzymatique de l'ordre de 1.110 U.I. d'ACMC et de 63 U.I. d'APF par gramme de poudre lyophilisée.

Pour le développement futur de ce procédé d'extraction de cellulases par pressage du produit fermenté enrichi en cellulases il est conseillé de disposer d'une presse capable de traiter 50 kg de produit fermenté à la fois, à 230 Bar. Dans ces conditions 80 % de la fraction soluble est récupérée après 2 mn. de pressage.

5. B I B L I O G R A P H I E

ANDREN, R.K., ERICKSON, R. J. et J.E. MEDEIRO. 1976. Cellulosic Substrates for Enzymatic Saccharification. Biotechnol. Bioeng. Symp. n° 6 : 177- 203

COWLING, E.B. et T.K. KIRK. Properties of cellulose and lignocellulosic Materials as substrates for Enzymatic Conversion processes. Biotechnol. Bioeng. Symp. n° 6 : 95 - 123.

ERRIKSSON, K.E. et B. PETTERSSON. 1972. Extracellular enzyme system utilized by the fungus Chrysosporium lignorum for the break-down of cellulose. in Biodegradation of materials Vol. 2. Appl. Scienc . Publishers Ltd;London p. 116.

GIULIANO, C. 1982. Production de cellulases par fermentation en milieu solide. D.E.A. de Microbiologie. Université d'Aix-Marseille II 45 p.

GONG , C.S., LADISH, M.R. et G.T. TSAO. 1977. Cellobiase from Trichoderma viride: purification, properties, kinetics, and mechanism. Biotechnol. Bioeng. 19 : 959-981.

LAMBERT, P.W. 1983. Industrial Enzyme production and recovery from Filamentous Fungi. in The Filamentous Fungi IV pp.210-237 SMITH,J.E., BERRY,D.R. et B. KRISTIANSEN. Eds. London : Edward Arnold.

LAMBERT, P.W. et J.L. MEERS. 1983. The production of industrial enzymes. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 300 : 263 - 282

MANDELS, M. , ANDREOTTI, R. et C. ROCHE. 1976. Measurement of Saccharifying cellulose Biotechnol. Bioeng. Symp. N° 6 : 21 - 23

MANDELS, M. et D. STERNBERG. 1976. Recent Advances in Cellulase Technology. J. Ferment. Technol. 54: 267-286

MANDELS, M., MEDEIROS, J.E., ANDREOTTI, R.E. et F.M. BISSET. 1981. Enzymatic hydrolysis of cellulose : Evaluation of cellulase culture filtrates under use conditions. Biotechnol. Bioeng. 23 : 2009 - 2026

MANDELS, M. 1982. Cellulases. in " Annal Reports on Fermentation Processes " Vol. 5 : 35 - 78. TSAO, G.T., FLICKINGER, M.C. et R.K. FINN,Eds.

NYSTROM, J.M. et A.L. ALLEN. 1976. Pilot Scale investigations and economics of cellulase production. Biotechnol. Bioeng. Symp. N° 6 : 55 - 74

OOSHIMA, H., OHMINE, K., ISHITANI, Y. et Y. HARANO. 1982. Applicability of an empirical rate expression to enzymatic hydrolysis of cellulosic materials. Biotechnol. Letters 4 : 729 - 734

PETTERSON, L.G. 1975. The mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulose by Trichoderma viride . SITRA Symposium on enzymatic Hydrolysis of cellulose. BAILEY, M., ENARI, T.M. et M. LINKO. Eds. Aulanko, Finland p. 225 - 261

REESE, E.T. 1976. History of the cellulase program at the U.S. Army Natick development Center. Biotechnol. Bioeng. Symp. N° 6 : 9 - 20

ROSS, A., SCHUGERL, K. et W. SCHEIDING. 1983. Cellulase production by Trichoderma reesei . Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18 : 29- 37

STERNBERG, D. 1976. Production of cellulase by Trichoderma . Biotechnol. Bioeng. Symp. N° 6 : 35 - 53

TOYAMA, N. et K. OGAWA. 1975. Saccharification of Agricultural cellulosic Wastes with Trichoderma viride cellulase. SITRA Symposium on enzymatic Hydrolysis of cellulose. BAILEY, M. ENARI, T.M. et M. LINKO eds. Aulanko, Finland- P. 375 - 387

TOYAMA, N. 1976. Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with Trichoderma viride cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp. N° 6 : 207 - 219

WOOD, T.M. et S.I. Mc CRAIE. 1972. The purification and properties of the C_1 component of Trichoderma koningii cellulase. Biochem. J. 128 : 1183 - 1192

O.R.S.T.O.M.

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE

POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION

. = . = . = . = . = .

Laboratoire de Biotechnologie

et de Microbiologie Appliquée

O.R.S.T.O.M. - BP 81

97201 - FORT DE FRANCE
Martinique

VALORISATION BIOTECHNOLOGIQUE DE LA BAGASSE PAR LA PRODUCTION AU NIVEAU PILOTE D'ENZYMES DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX CELLULOLYTIQUES

Annexe 3 & 4

Par

ROUSSOS S. L. HANNIBAL

Compte Rendu Final
d'une Recherche financée
par le CORDET 83.

Date : Juillet 1984.

Commission CORDET. Projet C.100.

A N N E X E III

ENSILAGE DE LA FRACTION INSOLUBLE DE LA BAGASSE FERMENTEE

1. INTRODUCTION III-1

2. MATERIEL ET METHODES III-2

2.1. Les Traitements III-4

2.2. Le produit à conserver III-4

2.3. La confection des silos III-4

2.3.1. Melasse..... III-4

2.3.2. Ensipron III-4

2.3.3. Protéïnor III-4

2.3.4. A.I.V. III-5

2.4. Fermeture des sacs III-5

2.5. Mesures III-7

3. RESULTATS III-7

4. CONCLUSION III-10

5. BIBLIOGRAPHIE III-13

Fonds Documentaire ORSTOM
Cote: A x 6068 Ex: 1

ENSILAGE DE LA FRACTION INSOLUBLE DE LA BAGASSE FERMENTEE

1. INTRODUCTION

L'ensilage est une méthode de conservation anaérobie des fourrages qui favorise l'action d'une catégorie de microorganismes appartenant au grand groupe des Bactéries lactiques. Ces ferments lactiques conduiront, grâce à des modifications biochimiques à la formation d'un produit qui conserve toute sa valeur alimentaire. Ce produit obtenu garde cependant son état physique initial.

Le terme d'ensilage désigne aussi bien la technique de conservation que le produit obtenu (BESSE, 1969).

Au cours de ce procédé de conservation par voie humide il est important de favoriser le développement des bactéries lactiques et empêcher la croissance des autres microorganismes. En particulier des bactéries aérobies ou des bactéries anaérobies sporulées butyriques. Pour cela il faut chasser l'oxygène de la masse du produit et créer un milieu acide.

Différentes techniques peuvent être utilisées pour améliorer la qualité des ensilages (CELANIE, 1982). Elles concernent l'addition d'adjuvant au fourrage à ensiler. D'une manière générale on les regroupe en trois catégories:

- les acides
- les bactériostatiques
- les stimulants de la fermentation lactique.

Les acides: Pour assurer une bonne conservation, un grand nombre d'additif a été ajouté à la mise en silo, en particulier le mélange d'acides A.I. VIRTANEN (1937) , ou mélange A.I.V.

Les Bactériostatiques : Afin d'empêcher la prolifération de bactéries indésirables telles que les clostridium , un additif peut être utilisé au cours de l'ensilage.

Les stimulants de la fermentation lactique : Ce sont des produits riches en sucres fermentescibles, comme la mélasse de canne à sucre, le lactosérum ou autres qui sont mélangés au fourrage,à la mise en silo.

De même, l'inoculation du produit par des ferments lactiques à base de bactéries lactiques homofermentaires contribue à la stabilisation de l'ensilage. Cette dernière technique permet tout d'abord de limiter les quantités d'alcool et d'acide acétique produites, ensuite d'acidifier rapidement et intensivement le milieu et, enfin, de limiter de façon importante la protéolyse.

Durant ces dernières décennies, l'ensilage a connu un développement grâce à l'extension des cultures du maïs, dans les pays tempérés. Par contre, il a été peu pratiqué en milieu tropical. Quelques essais infructueux sont pour une part à l'origine de ce peu d'intérêt sur les climats tropicaux.

Cependant, dans les régions tropicales, à une saison pluvieuse, hivernage, succède une saison sèche, au cours de laquelle la production de fourrage est largement déficitaire. Récemment une étude de l'évolution microbiologique et des caractéristiques fermentaires des ensilages de canne à sucre, de sorgho et de pangola en climat tropical humide a été réalisée (CELANIE,1982). De cette étude,il ressort que le sorgho constitue le meilleur support au développement de l'activité lactique. Quant à la canne à sucre, bien qu'elle présente une bonne aptitude à l'ensilage elle ne remplit pas les conditions favorables à la mise en place d'une conservation stabilisée. Ceci est dû principalement à la fermentation du saccharose par les levures avec une production importante d'alcool.

Notre étude porte sur l'ensilage de la fraction insoluble de la bagasse fermentée. Ce substrat est pauvre en sucres libres et enrichi en Azote. Sa composition chimique est donc différente de la composition de la canne à sucre brute. Nous avons testé principalement 4 conservateurs d'ensilage, pour obtenir une bonne conservation, en protégeant particulièrement la fraction protéique et la stabilisation de l'ensilage.de ce "sous-produit" provenant d'une fermentation en milieu solide de bagasse de canne à sucre, par un champignon filamenteux cellulolytique.

2. MATERIEL ET METHODES

Les ensilages ont été réalisés sur 5 kg de produit fini.

Des sacs en matière plastique assez résistants ont été utilisés pour obtenir des silos étanches.

La durée de conservation sera d'environ 60 jours à la température ambiante.

TABLEAU I Traitement de la Fraction Insoluble (FI) de la Bagasse de canne à sucre Fermentée avec les conservateurs d'ensilage.

Concentrations g ‰	CONSERVATEURS SANS Témoin	MELASSE MELA	ENSIPRON ENSI	PROTEINOR PROT	A.I.V AïI.V
0	++	+	-	-	-
2	-	-	-	++	-
3	-	-	++	++	-
4	-	-	++	++	-
10	-	-	-	-	+
50	-	++	-	-	-

2.1. Les traitements

Les différents traitements ont été réalisés sur la fraction insoluble obtenue après fermentation en milieu solide de la Bagasse en utilisant un champignon filamenteux cellulolytique Trichoderma harzianum. Cette fraction insoluble était obtenue après extraction de cellulases.

La nature ainsi que les concentrations des différents conservateurs utilisés ont été données sur le Tableau I

2.2. Le produit à conserver

La fraction insoluble du produit obtenu après extraction de cellulases provenait d'une fermentation en milieu solide d'un mélange bagasse-son de blé. Les détails de cette fermentation ont été développés dans un chapitre précédent.

Généralement après pressage du produit fermenté, la fraction insoluble était caractérisée par une matière sèche de 55 %. Pour les études d'ensilage nous avons ramené la matière sèche (M.S.) aux environs de 45 et 35 % par addition d'eau avant la fermeture des silos.

2.3. Confection des silos

Au produit à ensiler à 45 et 35 % de M.S., nous avons ajouté les différents conservateurs de la manière suivante :

2.3.1. Mélasse; Nous avons calculé et pesé la quantité de mélasse en fonction de la quantité de produit à ensiler. A cette mélasse nous avons ajouté le même poids d'eau et bien mélangé. Le produit à ensiler a été placé dans un pétrin, puis la mélasse diluée a été brassée pendant 5 mn..Il a été par la suite ensaché.

2.3.2. Ensipron(Mélange d'Acide formique et de formol)- Le produit à ensiler a été placé dans de l'eau pour ramener la matière sèche à 35 ou 45 % puis il a été additionné au produit par aspersion. L'ensemble a été mélangé pendant 5 mn. et mis en sac.

2.3.3. Protéïnor (Bioconservateur à base de ferments lactiques). Le produit à ensiler placé dans un Pétrin a été ramené à 35 et à 45 % de matière sèche. La poudre a été répartie uniformément par agitation. Le mélange ainsi obtenu a été mis en sac.

2.3.4. A.I.V. (mélange d'acide chlorhydrique concentré 7 volumes et d'acide sulfurique concentré 1 volume). Nous avons opéré de la même façon que pour l'Ensipron (& 2.b.) .

2.4. Fermeture des sacs

Le produit à conserver a été bien tassé. Le principe étant de piéger le minimum d'air afin de réduire au maximum les fermentations aérobies, nous avons donc fermé les sacs au plus près de la masse solide.

2.5. Mesures

Nous avons pesé les quantités ensilées ainsi que les quantités désilées.

Les analyses chimiques qui seront faites au Laboratoire de Zootechnie de l'INRA Guadeloupe sur les produits frais et les produits conservés pendant 60 jours sont données sur leTableau II.

TABLEAU II Analyses chimiques pour déterminer les produits frais avant et après fermentation de la bagasse ainsi que les produits ensilés.

Composition chimique	Produits frais		Produit conservé
	FERMENTATION AVANT	APRES	
Matière sèche	+	+	+
Matière organique	+	+	+
Matière Azotée Totale	+	+	+
Azote soluble	+	+	+
A D F	+	+	+
N D F	+	+	+
Sucres solubles	+	+	+
Amidon	+	+	+
Caractéristiques fermentaires			
P.H.	-	-	+
N - NH_3	-	-	+
A G V	-	-	+
Alcools	-	-	+
Acide lactique	-	-	+

3. RESULTATS

Etant donné que l'ouverture des silos va être faite deux mois après le fermeture des sacs, nous n'avons pas eu la possibilité d'analyser les ensilages confectionnés. Les analyses chimiques pour déterminer les produits frais avant et après fermentation de la bagasse, ainsi que les produits ensilés (Tableau II) seront réalisées ultérieurement.

Cependant, un certain nombre de mesures ont été faites pendant la confection des silos. Toutefois, avant de présenter ces résultats, il convient de donner un certain nombre de précisions à propos du produit à ensiler (Fraction Insoluble).

La fraction insoluble(F.I.) provient de la fermentation en milieu solide de la bagasse de canne à sucre. La fermentation a été effectuée dans un fermenteur statique, Zymotis, et a duré 48 ou 60 heures. Lorsque la fermentation a été terminée, le produit fermenté a été partagé en lots de 500 g; il a été ensuite pressé à l'aide d'une presse hydrolique à la température ambiante. Deux fractions ont été ainsi obtenues. La fraction soluble, "Jus", produit principal de la fermentation contenant en particulier les cellulases fongiques. La fraction insoluble,"Galette", qui contient également une faible partie ,25 % de la fraction soluble, mais qui est essentiellement constituée de la bagasse (cellulose, hémicelluloses, lignine) et de son de blé non utilisés par le champignon cellulolytique.

La charge maximale du Zymotis ne dépassant pas 12 kg SPS, nous avons été amenés à utiliser ce fermenteur quatre fois pour obtenir 160 kg de produit fermenté à 28 % de matière sèche.

De ce fait, le produit à ensiler (Fraction Insoluble) provient de quatre fermentations différentes (Z58, Z68, Z77 et Z87). De même, la confection des silos a été réalisée dans la journée au cours de laquelle le produit fermenté était traité pour séparer les cellulases de la fraction insoluble.

Sur les Tableaux III et IV, nous avons donné des précisions sur la confection des silos à partir de la bagasse fermentée pour obtenir une matière sèche voisine de 35 et 45 % respectivement.

Sur ces tableaux nous avons mentionné l'origine du produit, la nature ainsi que la concentration du conservateur, la quantité de la F.I. introduite dans le mélangeur, la quantité d'eau, contenant le conservateur, qui a été ajoutée à la F.I. pour ramener l'humidité du produit aux environs de 65 et 55 %. Nous avons ensuite

TABLEAU III Confection des silos à partir de la Fraction Insoluble (F.I.) de la bagassefermentée pour obtenir une Matière Sèche (M.S.) voisine de 35 % .

Produit	Conservateur	Quantité Produit F.I. kg	Quantité Eau l	Poids total kg	Matière Sèche %	Date mise en silo
Z 68	PROT. 2 ‰	3,1	1,9	5,1	32,7	28/5/84
Z 68	PROT. 3 ‰	3,1	1,9	5,1	32,5	28/5/84
Z 68	PROT. 4 ‰	3,1	1,9	5,1	30,6	28/5/84
Z 68	ENSI. 3 ‰	3,1	1,9	5,1	30,2	28/5/84
Z 68	ENSI. 4 ‰	3,1	1,9	5,1	33,0	28/5/84
Z 77	A.I.V.10 ‰	3,1	2,0	5,2	34,1	13/6/84
Z 87	MELA. 50 ‰	3,1	2,0	5,1	36,2	20/6/84
Z 87	Témoin °	3,1	2,0	5,1	31,8	20/6/84

TABLEAU IV Confection des silos à partir de la Fraction Insoluble (FI) de la bagasse Fermentée pour obtenir une Matière Sèche (M.S.) voisine de 45 %.

Produit	Conservateurs	Quantité Produit F.I. Kg	Quantité Eau l	Poids total kg	Matière sèche %	Date mise en silo
Z 58	PROT. 2 %.	3,9	1,1	5,1	41,5	24/5/84
Z 58	PROT. 3 %.	3,9	1,1	5,0	41,6	24/5/84
Z 58	PROT. 4 %.	3,9	1,1	5,1	41,6	24/5/84
Z 77	ENSI. 3 %.	3,9	1,1	5,2	41,9	13/6/84
Z 77	ENSI. 4 %.	3,9	1,1	5,1	43,4	13/6/84
Z 77	A.I.V. 10%.	3,9	1,1	5,1	42,9	13/6/84
Z 87	MELA. 50%.	4,0	1,0	5,0	46,2	20/6/84
Z 87	Témoin	4,4	1,1	5,5	44,9	20/6/84

mélangé dans un Pétrin le produit ainsi confectionné et introduit l'ensemble de celui-ci dans des sacs en plastique. Avant la fermeture des sacs, une partie aliquote a été prélevée pour mesurer la Matière Sèche; celle-ci a été proche des valeurs auparavant fixées.

Nous avons fait deux séries d'ensilage en utilisant principalement quatre conservateurs différents (PROTEINOR, ENSIPRON, MELASSE, A.IV.) : une série à 35 % de M.S. et l'autre à 45 % de M.S. Ceci afin de pouvoir comparer par la suite l'influence de l'humidité sur la qualité de l'ensilage.

De même, nous avons porté sur les Tableaux III et IV les dates de la mise en silo, étant donné qu'il y a un décalage de 4 semaine entre les premiers et les derniers silos. L'ouverture des silos se fera après deux mois d'ensilage.

Sur le Tableau V nous avons porté quelques caractéristiques de la fraction insoluble avant l'ensilage. Les produits Z58 et Z68 provenaient d'une fermentation de 60 h, les produits Z77 et Z87 provenaient d'une fermentation de 48 heures. De ce fait, le pH des deux premiers est plus élevé que celui des deux derniers. Nous avons décrit et commenté dans un chapitre précédent (Production de cellulases de T.harzianum par fermentation en milieu solide) que les valeurs du pH augmentent après 40 h de culture.

Les valeurs moyennes, du poids sec des F.I. obtenues sont proches de 53,8 %. De ce fait une quantité non négligeable de la fraction soluble reste sur la galette. Cette fraction soluble résiduelle contient en particulier 25 % des cellulases produites au cours de la croissance de T.harzianum .

Nous allons doser également les activités cellulases après ensilage afin de suivre l'évolution de l'activité de ces enzymes au cours de la conservation.

4. CONCLUSION

La valorisation Biotechnologique de la bagasse de canne à sucre par culture d'un champignon filamenteux cellulolytique a été envisagée pour la production de métabolites à haute valeur ajoutée. Le métabolite principal produit au cours de ce procédé étant les cellulases, est récupéré après conditionnement et extraction à partir du produit fermenté.

TABLEAU V Caractéristiques de la fraction insoluble et de la fraction soluble résiduelle obtenues à partir de 500 g du produit fermenté avant ensilage.

Produit Fermenté	Temps de Fermentation Heures	FRACTION INSOLUBLE		FRACTION SOLUBLE Résiduelle			
		Quantité g	Matière sèche %	Quantité ml	pH	Cellulases APF	UI/100gFI ACMC
Z 58	61	201,0	53,2	94,0	6,23	206	3091
Z 68	60	211,5	52,4	100,7	5,90	301	3409
Z 77	48	215,0	54,0	98,9	5,45	164	1928
Z 87	48	214,0	55,7	94,8	5,46	272	3289

Les cellulases sont récupérées dans la fraction soluble. La fraction insoluble contenant le substrat non utilisé par le microorganisme, est enrichie en Protéïne fongiques. De plus, elle contient une faible partie (25 %) de cellulases biosynthétisées.

Ces cellulases pourraient éventuellement agir au cours de l'ensilage en hydrolysant lentement la cellulase résiduelle et libérer ainsi des sucres réducteurs en particulier, du cellobiose et du glucose.

D'autre part cette fraction insoluble est caractérisée par une quantité d'azote bien supérieure à celle de la bagasse, et une concentration en sucres réducteurs (saccharose) très faible.

Des études précédentes ont démontré que la canne à sucre ne remplit pas les conditions favorables à la mise en place d'une conservation stabilisée. A cause de sa teneur en glucides solubles (saccharose) élevée et son pouvoir tampon faible, il y a prédominance de l'activité des levures au dépens des bactéries lactiques.

Notre modèle est tout à fait différent étant donné que la quantité de sucres réducteurs est faible, la quantité d'' Azote est importante, de plus, le pouvoir tampon est plus stable.

A la fin de la période de conservation un certain nombre d'Analyses nous permettra de connaître si le produit fermenté est apte pour l'alimentation des ruminants et choisir également la concentration et la nature du conservateur pour la réalisation des ensilages de la fraction insoluble.

5. BIBLIOGRAPHIE

BESSE , J. 1969. L'alimentation du bêtail. Collection d'enseignement Agricole. J.B. BAILLIERE Ed. Paris.

CELANIE, E. 1962. Etude de l'évolution microbiologique et des caractéristiques fermentaires des ensilages de canne à sucre, de sorgho et de pangola en climat tropical humide. Thèse 3ème Cycle. Université Pierre et Marie CURIE, Paris. 114 pp.

VIRTANEN, A.I. 1937 "The Microbiology of ensilage production (Microbiologie de l'ensilage)" dans : comptes-rendus des journées d'études sur la conservation des fourrages- Association Française de Zootechnie, 1952 p.119-132.

A N N E X E IV

PRODUCTION DE CONIDIOSPORES DE TRICHODERMA HARZIANUM DANS UN FERMENTEUR A DISQUES

1. INTRODUCTION IV-1

2. MATERIEL ET METHODES IV-4

2.1. Microorganisme IV-4
2.2. Milieux de culture IV-6

2.2.1.a. Malt Agar IV-6

2.2.1.b. Patate Dextrose Agar IV-6

2.2.2. Milieux de production de Conidiospores IV-6

2.3. Description du Fermenteur à disques IV-6
2.4. Inoculation des Milieux IV-8
2.5. Température d'incubation IV-8
2.6. Aération des cultures IV-8
2.7. Récolte des conidiospores IV-10
2.8. Méthodes d'Analyse IV-10
2.9. Expression des Résultats IV-10

3. RESULTATS ET DISCUSSION IV-11

3.1. Production de conidiospores en erlen IV-11

3.1.1. Influence du mode d'inoculation IV-11

3.1.2. Influence de la quantité de la source de Carbone IV-13

3.1.2.a. Culture de 7 jours IV-13
3.1.2.b. Culture de 15 jours IV-15

3.1.3. Influence de la quantité de la source d'Azote IV-17

3.1.3.a. Culture de 7 jours IV-19
3.1.3.b. Culture de 20 jours IV-19

3.1.4. Cinétique de Production de Conidiospores en fonction du temps IV-25

3.1.4.a. Effets de la concentration de la source de Carbone IV-27
3.1.4.b. Effets de la concentration de la source d'Azote IV-29

3.2. Production de conidiospores dans le Fermenteur à disques IV-33

3.2.1. Influence de la quantité de la source de Carbone IV-33

3.2.2. Influence de la quantité de la source d' Azote IV-34

3.3. Production comparée de conidiospores en erlen et en Fermenteur à disques IV-39

3.3.1. Effets de la concentration de la source de Carbone ...IV-39

3.3.2. Effets de la concentration de la source d' Azote IV-41

3.3.3. Effets du rapport surface aérienne libre sur la quantité du milieu IV-42

3.3.4. Effets des ions Ca^{++} sur la conidiogénèse.....IV-47

4. CONCLUSION IV-53

5. BIBLIOGRAPHIE IV-55

PRODUCTION DE CONIDIOSPORES DE TRICHODERMA HARZIANUM DANS UN FERMENTEUR A DISQUES

1. INTRODUCTION

La conidiogénèse est une étape physiologique très importante pour les champignons imparfaits. Au cours de cette étape, il y formation de conidiophores et libération de conidiospores. Les conidiospores sont la forme de résistance et de reproduction de ces micro-organismes. Il est admis que son déclenchement est induit par un facteur limitant qui apparaît dans le milieu de culture, lorsque le mycélium est âgé. La nature de ce facteur est diverse. On suppose que l'épuisement de la source de carbone ou d'azote est généralement le facteur limitant. Cependant il ne faut pas écarter d'autres facteurs physicochimiques capables de déclencher la conidiogénèse (pH, CO_2, oxygène, température, humidité, apparition de métabolites secondaires).

Un développement normal du mycélium et une bonne conidiogénèse, sont des conditions préalables à la production importante de conidiospores. Le nombre de conidiospores produites pour un champignon filamenteux est principalement fonction de la quantité de la source de Carbone et d'Azote présente dans le milieu de culture.

C'est ainsi que lorsqu'on change le type ou la quantité de la source de Carbone ou d'Azote du milieu de culture optimisé pour A. nidulans, il y a généralement une diminution de production de conidiospores (MARTINELLI; 1976). Le même phénomène a été observé pour A. ochraceus, Fusarium moniliforme, Septomyxa affinis et Stachylidium theobromae (VEZINA et al. 1965).

L'effet d'inhibition-induction par la source d'Azote au cours de la conidiogénèse d' A.niger a été clairement mis en évidence (GALBRAITH et SMITH; 1969). A faible concentration d'Azote (2.16 mg atom N/l) il y a production de conidiospores alors que pour des concentrations d'Azote supérieures (60 mg atom N/l) il y a inhibition de la sporulation pour les cultures d'une durée de 4 jours.

Les sels minéraux à concentration élevée, peuvent avoir des effets opposés sur la croissance, la sporulation et la pigmentation des Trichoderma (GINDRAT; 1977).

En effet, en milieux gélosés contenant NaCl (5 %), plusieurs espèces de Trichoderma présentent une extension mycélienne ralentie, une sporulation réduite et une coloration verte, typique des colonies de Trichoderma très faible.

De la même façon KCl à cette concentration provoque le même effet . Par contre $CaCl_2$ (1 %) annule l'effet anti-sporulant provoqué par NaCl (5 %) et stimule la conidiation en milieux dépourvus de NaCl. Ces sels minéraux agissent sur le potentiel osmotique des milieux utilisés. Lorsque ce potentiel osmotique est de - 32 bars (NaCl) ou - 41 bars (KCl) il n'y a pas de conidiation. La sporulation est intense en milieu ajusté à - 31 bars par $CaCl_2$. De plus les ions Na^+ sont toxiques pour les Trichoderma à haute concentration (GINDRAT; 1977) et ne sont pas essentiels pour le développement des champignons (SLAYMAN et TATUM; 1964, LILLY; 1965).

L'induction du rythme endogène de sporulation chez Aspergillus niger est influencée par le rapport glucose/potassium et les oligo-éléments présents dans le milieu de culture (JEREBZOFF et al. 1976). Ces auteurs ont démontré l'importance du rôle essentiel des ions K^+ sur la manifestation du rythme endogène de zonation chez A.niger . A un effet inhibiteur (JEREBZOFF et al. 1970) , à partir de 0,5 mM K^+, s'ajoute un effet inducteur entre 0,06 et 0,4 mM K^+, l'induction du rythme étant en fait sous la dépendance étroite du rapport glucose / K^+ du milieu.

En général, la source de Carbone et d'Azote ainsi que la présence d'oligoéléments des milieux de culture induisent la conidiogénèse pour les champignons filamenteux. Un milieu de culture pour la production de conidiospores peut être optimum pour une espèce et n'est pas l'idéal pour une autre (VEZINA et al.;1965). Cependant un équilibre entre la composition du milieu et la nature physico-chimique de l'environnement reste à dresser pour chaque espèce.

L'utilisation de plus en plus croissante de champignons filamenteux dans des domaines aussi variés que les fermentations alimentaires, l'industrie pharmaceutique et la Bio-industrie (production d'enzymes ou de molécules biologiques par biosynthèse ou hémisynthèse) nécessite la disponibilité de quantités importantes de conidiospores.

Ces conidiospores constituent le point de départ de toutes ces applications puisqu'elles peuvent servir de forme de conservation et de lancement de l'opération, mais également intervenir de façon massive dans le processus lui-même soit en tant qu'inoculum ou en tant que spores elles-mêmes pour réaliser les transformations de bio-conversion souhaitées.

Différentes techniques sont connues pour la production de ces conidiospores. La plus ancienne consiste à cultiver le micro-organisme à la surface d'un milieu solidifié par la gélose, soit en boîte de Petri au Laboratoire, soit en fioles de Roux pour les applications pratiques.

La technique de production de conidiospores en plateaux fait appel à la culture du champignon sur des substrats végétaux tels que son de blé, paille et divers produits ou résidus amylacés disposés en couche de quelques centimètres d'épaisseur et placés dans des étuves d'incubation (TOYAMA , 1976).

Plus récemment on a montré la possibilité de produire des conidiospores de champignons filamenteux dans des cultures liquides en utilisant des fermenteurs stérilisables et extrapolables industriellement (BRODERICK et GREENSHIELDS ; 1982). Sans doute il s' agît là d'un progrès réel, mais cela n'est possible que dans des conditions particulières et avec un nombre limité de champignons. D'autre part, la suspension recueillie contient non seulement les spores, mais également une quantité importante de métabolites et tous les débris cellulaires qui peuvent être gênants par la suite.

Parmi les nombreux dispositifs de fermenteurs qui ont été proposés pour la culture des microorganismes en milieu liquide , on trouve des fermenteurs à disques rotatifs (MEANS et Coll. 1962) dont le principe d'utilisation est basé essentiellement sur la rotation permanente des disques tout au long de l'incubation et qui plongent alternativement dans le milieu nutritif liquide et dans l'atmosphère.

Pour la présente étude nous avons utilisé un nouveau procédé pour la production de conidiospores de Trichoderma harzianum. Ce procédé allie l'avantage de la culture de surface sur un milieu solidifié avec l'utilisation d'un fermenteur à disques rotatifs particulier (RAIMBAULT et ROUSSOS ; 1981). Le principe d'utilisation de ce fermenteur à disques permet d'obtenir une très grande surface de sporulation, une répartition homogène du milieu de culture stérilisé dans le fermenteur, une aération régulée tout le long de la croissance de T. harzianum , une récolte aisée de conidiospores par simple lavage des surfaces. La Biomasse mycélienne reste emprisonnéé dans le milieu solidifié. Toutes ces opérations se font dans le même appareil stérilisable, assurant ainsi une grande simplicité d'utilisation et une aseptie stricte.

L'optimisation des conditions de culture et de production de conidiospores de T. harzianum a été réalisée en vue d'utiliser ce type de fermenteur à disques. Les cultures ont été faites sur milieu solidifié et la production de conidiospores a été obtenue par culture en surface. Les différents milieux de culture utilisés ont été inoculés dans la masse. Nous avons ainsi étudié la production de conidiospores de T. harzianum en fonction du temps, en fonction de la concentration de la source de Carbone et d'Azote. Ces études ont été réalisées en erlen de 250 ml contenant 20 g de milieu de culture,en fermenteur à disques contenant 600 g de milieu.

Les résultats ont été exprimés en nombre de conidiospores produits/erlen ou par fermenteur. Nous avons également utilisé, pour l'expression de ces résultats, le nouvel indice de sporulation (ℜ) proposé par BRODERICK et GREENSHIELDS (1982). Cet indice représente le nombre de conidiospores produites par gramme de substrat carboné utilisé. Cependant dans notre cas il a été légèrement modifié étant donné que ℜ représente le nombre de conidiospores produites par gramme de substrat carboné initialement présent dans le milieu de culture. De même, nous avons utilisé un indice de sporulation ℜN pour représenter le nombre de conidiospores produites par m Mole d'Azote et ℜC pour représenter le nombre de conidiospores produites par m Mole de Carbone initialement présent dans le milieu de culture.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Microorganisme.

La souche que nous avons selectionnée pour la valorisation de la bagasse par fermentation en milieu solide est Trichoderma harzianum . Elle provient de la Czechoslovak Collection of Microorganisms. Actuellement elle porte le n° Th 15 à la Collection de Microorganismes de notre Laboratoire. Son numéro d'origine est : CCMF - 470. La conservation de cette souche est obtenue par repiquages réguliers sur Malt Agar ou sur Patate Dextrose Agar (Merieux n°5.141.1). La température optimale de croissance est 29°C. La culture sur milieu gélosé est conservée à + 4°C pendant plusieurs mois.

Le mycélium de T. harzianum est septé et d'aspect hyalin. Les cellules mycéliennes sont fines et longues (1,5 µ - 12 µ). Les chlamydospores, lorsqu'elles sont produites sont hyalines de 6 - 12 µ de diamètre. L'appareil de reproduction asexué (conidiophores), est très simple et disposé en forme ramifiée de type pyramidal. Les conidiospores ou phyalospores sont globuleuses, à surface lisse, de forme ovoïde et de petite taille (2,5 µ x 3,2 µ). Généralement, les conidiospores sont isolées, en paire ou en amas, rarement en courtes chaînes. Elles sont pigmentées en vert, ce qui donne une couleur verte à la surface de culture de T. harzianum après 4 jours de croissance, cette couleur s'intensifie pour atteindre la couleur définitive après 4 jours de culture.

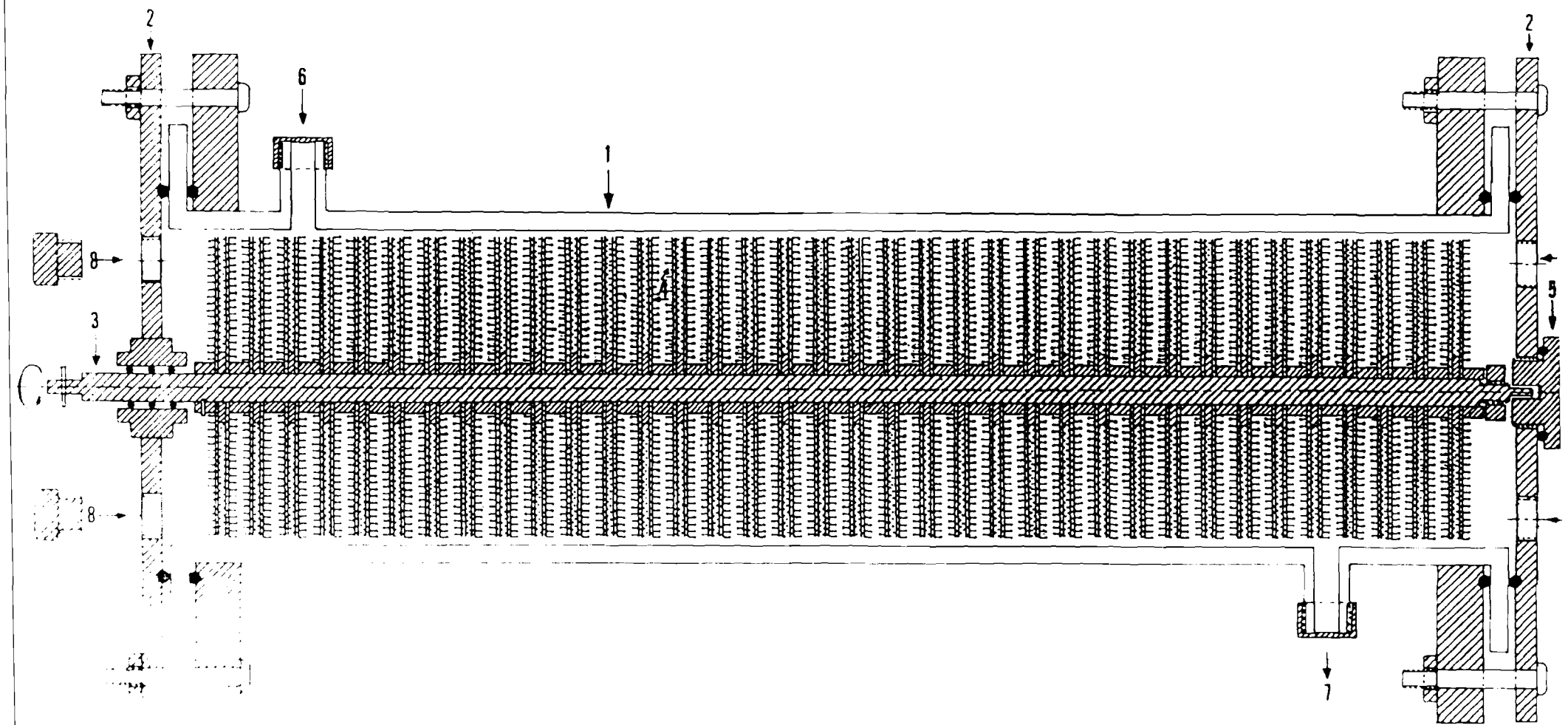


Fig. 1a : Schéma détaillé du fermenteur à disques .

2. 2. Milieux de Culture

2.2. 1. a. Malt Agar

Malt	15 g
Gélose	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH : 5,6
Stérilisation : Autoclavage 30 mn à 110°C

2.2. 1. b. Patate Dextrose Agar

Formule en g/l d'eau distillée

Infusion de pomme de terre	200
Glucose	20
Gélose	15

pH : 5,6
Mettre en suspension 39 g de poudre dans 1 l.d'eau
Stérilisation : Autoclavage 30 mn. à 11°C

2.2.2. Milieux de Production de Conidiospores

La composition de différents milieux de culture utilisés pour étudier l'influence de la concentration de la source de carbone est reportée sur le Tableau I. Ces milieux ont été répartis dans des erlens de 250 ml à raison de 25 ml/erlen et stérilisés à l'autoclave à 110°C pendant 30 mn. Pour l'ensemble des milieux nous avons utilisé comme source de carbone de la farine de manioc.

Sur le Tableau II est mentionné la composition des milieux de culture qui ont éte utilisés pour l'étude cinétique de la production de conidiospores en fonction du temps. Un litre de chaque milieu a été prepare et introduit dans le fermenteur à disques. Le fermenteur contenant le milieu de culture a été autoclavé à 110°C pendant 45 mn. Des erlens de 250 ml vides, ont été également stérilisés en même temps que le fermenteur à disques.

2.3 . Description du Fermenteur à disques

Le fermenteur à disques que nous avons utilisé est décrit sur la figure 1a.Il est de forme cylindrique et réalisé en matériaux pouvant supporter la stérilisation par autoclavage. Ce fermenteur est constitué d'une cuve cylindrique (1) munie aux deux extrémités d'une platine (2 et 2'). La platine 2 est munie d'un axe rotatif (3) supportant un empilement de disques rigides (4) d'un diamètre légèrement inférieur au diamètre interne de la cuve.

TABLEAU I. Composition des différents milieux de culture utilisés (1 - 10) pour la production de conidiospores de T. harzianum.

Composition des Milieux de sporulation (g/l)						
n° Milieux	Farine Manioc	KH_2PO_4	$(NH_4)_2SO_4$	Urée	Agar	pH
1	1	0,04	0,08	0,02	15	5,6
2	5	0,20	0,40	0,10	15	5,6
3	10	0,40	0,80	0,20	15	5,6
4	15	0,57	1,14	0,29	15	5,6
5	20	0,80	1,60	0,40	15	5,6
6	25	1,00	2,00	0,50	15	5,6
7	33	1,33	2,66	0,66	15	5,6
8	40	1,60	3,20	0,80	15	5,6
9	50	2,00	4,00	1,00	15	5,6
10	100	4,00	8,00	2,00	15	5,6

La platine 2' est munie d'un dispositif (5) pour recevoir l' extrémité inférieure de l'axe rotatif. La cuve est munie d'une entrée haute (6) et d'une sortie basse (7). Des dispositifs de contrôle (entrées et sorties) peuvent équiper ce fermenteur (8) en les fixant sur les platines (2 et 2').

Le fermenteur a été équipé de 35 disques de 5 mm représentant une surface utile 4. 960 cm^2 . Les disqes sont constitués de deux grilles d'acier de 6 mm d'épaisseur et de maille de 2 mm. L' espacement entre les disques a été de 10 mm.

Le fonctionnement de ce fermenteur a été décrit par ailleurs (RAIMBAULT et ROUSSOS; 1981).

2.4. Inoculation des Milieux

Sauf indication contraire, les milieux gélosés ont été inoculés dans la masse. Pour se faire, les milieux, préalablement stérilisés dans le fermenteur ou dans les erlens, ont été ramenés à 50 °C et inoculés avec une suspension de conidiospores de T. harzianum de concentration connue. Nous avons toujours utilisé pour l'inoculation une concentration de 3 x 10^7 conidies par gramme de substrat carboné (ROUSSOS et RAIMBAULT; 1982). Le milieu a été agité pour obtenir une inoculation homogène.

Pendant que le milieu était en surfusion, nous avons éliminé les parties aliquotes d'environ 25 g du fermenteur en les introduisant stérilement dans des erlens de 250 ml, préalablement stérilisés. Après élimination de ces parties aliquotes, il restait environ 600 ml de milieu par fermenteur.

2.5. Température d'incubation

Les erlens contenant le milieu de culture inoculé ont été placés dans une pièce du Laboratoire non climatisée. Les variations nyctémérales de température pendant la période de l'expérimentation, ont été faibles (22° - 29 °C). Les cultures n'ont pas été éclairées, cependant, elles ont été placées devant une fenêtre.

2.6. Aération des cultures.

Pour les cultures en erlen, il n'y a pas eu d'aération. Par contre, les cultures en fermenteur ont été aérées pendant la période d'incubation, par balayage forcé du fermenteur par un flux d'air stérile, humidifié par barbotage. Le débit d'aération a été

TABLEAU II . Composition des différents milieux de culture utilisés (A-H) pour l'étude de la production de conidiospores de T.harzianum.

Composition des Milieux de sporulation (g/l)								
Milieux	A	B	C	D	E	F	G	H
Manioc	100	40	20	40	40	40	40	40
KH_2PO_4	4	2	1	1	1	0,5	4	2
$(NH_4)_2SO_4$	8	4	4	2	1	0,5	8	4
Urée	2	1	1	1	1	1	2	1
$CaCl_2$	0	0	0	0	0	0	0	1
Agar	20	15	15	15	15	15	15	15
Eau(ml)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
pH	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6

maintenu constant . Il a été de 100 l/h.

2. 7. Récolte des conidiospores

Après 8, 13 ou 18 jours d'incubation, la récolte des spores a été faite en introduisant dans le fermenteur 2.000 ml d'eau additionnée de tween 80 (1 ml) et en maintenant une rotation rapide des disques pendant 10 mn. La suspension de spores a été ensuite récupérée pour compter le nombre des conidiospores.

Pour les cultures en erlen, les cultures ont été arrêtées à des temps différents (3, 5, 7, 9, 12, 14, 20 et 25 jours) en introduisant 100 ml d'eau additionnée de tween 80 (0,1 ml). A l'aide d'un barreau aimanté et par agitation pendant 10 mn, les conidiospores produites en surface ont été mises en suspension pour les compter.

2. 8. Méthodes d'Analyse

Deux millilitres d'une suspension homogène de conidiospores ont été convenablement dilués afin d'obtenir entre 30-60 conidiospores par unité de carrés d'un hématimètre type MALLASSEZ. Nous avons compté chaque fois 20 unités de carrés pour obtenir le nombre moyen (n) de conidiospores contenus dans une unité de carrés. Le nombre de conidiospores contenus par ml d'une suspension était ensuite calculé en utilisant la formule suivante :

$$n \times \text{inverse de la dilution} \times 10^5 \text{ conidiospores/ml.}$$

2.9. Expression des Résultats

Nous avons exprimé les résultats de quatre façons : Tout d'abord, nous avons donné le nombre total de conidiospores produites par erlen ou par fermenteur. Ce résultat est suivi par l'indice de sporulation (Ω) qui représente le nombre de conidiospores produites par gramme de substrat carboné initialement présent dans le milieu de culture. Dans certains cas, nous avons utilisé l'indice de sporulation (ΩN) qui représente le nombre de conidiospores produites par m Mole d'Azote initialement présent dans le milieu de culture, ainsi que l'indice de sporulation (Ωc) qui exprime le nombre de conidiospores produites par m Mole de Carbone.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Production de conidiospores en erlen

3.1.1. Influence du mode d'inoculation

Avant d'entreprendre cette étude sur la production de conidiospores de T.harzianum cultivé sur différents milieux de culture, il a été nécessaire de standardiser la manière dont les milieux de culture allaient être inoculés. Pour cela, nous avons expérimenté deux modes d'inoculation.

Tout d'abord, une quantité déterminée d'une suspension de conidiospores (3 x 10^7 spores/g de substrat carboné) était introduite dans les erlens contenant le milieu G. Ce milieu était maintenu en surfusion à 50°C. Après inoculation les milieux étaient homogénéisés et refroidis rapidement pour les gélatiniser et obtenir ainsi une inoculation homogène dans la masse du milieu de culture.

Par ailleurs, nous avons utilisé un deuxième mode d' inoculation en surface. Pour se faire, nous avons introduit une quantité déterminée d'une suspension de conidiospores à la surface du milieu G déjà solidifié. A l'aide d'une pipette Pasteur, dont l'extrémité était incurvée, nous avons étalé cette suspension à la surface du milieu pour obtenir un étalement uniforme.

Le Tableau III quantifie la production comparée de conidiospores de T. harzianum en fonction du mode d'inoculation en Surface ou dans la Masse du milieu G. Cette étude a duré 30 jours. Nous avons fait 16 comptages à des temps différents. Les résultats sont exprimés en nombre x 10^9 conidiospores produites par erlen et par gramme de substrat initialement présent dans le milieu (Ω). Ces résultats sont accompagnés du Rapport de l'indice de sporulation (Ω) pour les deux modes d'inoculation (MASSE / SURFACE).

Tout d'abord on observe une différence significative des résultats obtenus selon le mode d'inoculation. L'écart des valeurs obtenus entre deux mesures est faible pour l'inoculation dans la masse , alors que pour l'inoculation en surface, cet écart est important.

TABLEAU III Production comparée de conidiospores de T.harzianum en fonction du mode d'inoculation en surface ou dans la Masse du milieu de culture G en erlen. Les résultats sont exprimés en Nombre (x 10^9) de conidiospores produites par erlen et par gramme de substrat (Ω).

TEMPS Jours	SURFACE erlen	SURFACE Ω	MASSE erlen	MASSE Ω	RAPPORT MASSE / SURFACE Ω
5	3,29	4,51	5,00	7,04	1,56
7	4,00	5,48	5,63	7,71	1,41
9	5,19	7,11	6,27	8,25	1,16
12	4,57	6,26	5,08	7,15	1,14
14	2,96	4,05	5,40	6,92	1,71
20	5,53	7,58	7,70	10,27	1,35
25	4,72	6,47	8,20	10,51	1,62
30	6,17	8,46	8,45	10,83	1,28

L'indice de sporulation pour l'inoculation dans la masse est toujours supérieur à celui de l'inoculation en surface. D'ailleurs, les rapports des indices de sporulation (Ω) MASSE / SURFACE, montrent qu'en moyenne il y a + 30 % de conidiospores formées lorsque l'inoculation se fait dans la masse du milieu de culture. Pour les deux cas, il y a une chute du nombre de conidiospores après 14 jours de culture et une stabilisation de production de conidiospores après 20 jours. Ce phénomène est principalement dû à la composition du milieu de culture qui est riche en Azote. Nous reviendrons sur ce point dans un chapitre suivant.

Nous avons donc choisi, pour la suite de cette étude d' inoculer dans la masse tous les milieux de culture utilisés.

3.1.2. Influence de la quantité de la source de Carbone

La composition des différents milieux de culture utilisés pour cette étude, est donnée sur le Tableau I. Nous avons utilisé 10 concentrations différentes pour la source de Carbone qui a été de la farine de manioc. Cependant il faut mentionner que le rapport, source de Carbone / sels minéraux, a été maintenu constant pour les différentes concentrations de la source de Carbone.

Les numérations de conidiospores de T.harzianum produites en fonction de la quantité croissante de la source de Carbone, ont été réalisées à partir des cultures âgées de 7 et 15 jours.

3.1.2.a. Culture de 7 jours

Le tableau IV quantifie l'évolution de cette production. Tout d'abord, pour les cultures âgées de 7 jours, les valeurs obtenues sont faibles et varient de 0,80 à $10,39 \times 10^9$ spores, alors que la concentration de substrat varie de 1 à 100 g/l. De plus, l'écart des valeurs de l'indice de sporulation est très important. Il est proche de 25. Les meilleurs rendements sont obtenus avec des concentrations faibles de substrat. Ce qui confirme l'hypothèse de l'inhibition de la conidiogénèse par des concentrations élevées de la source de Carbone. Ceci est vérifié si l'on compare les indices de sporulation obtenus avec des concentrations faibles de substrat (1 à 10 g) à ceux obtenus pour des concentrations supérieures (15 à 100 g/l).

TABLEAU IV . Production comparée de conidiospores de T.harzianum en fonction de la quantité croissante de la source de carbone pour une culture en erlen de 7 et 15 jours.

Manioc g/l	Manioc g/erlen	nb. spores après 7j. x 10^9 erlen	nb. spores après 7j. x 10^9 g manioc Ω	nb. spores après 15j. x 10^9 erlen	nb. spores après 15j. x 10^9 g/manioc Ω	Rapport Ω 15 j / Ω 7 j
1	0,03	0,80	26,66	0,58	19,33	0,73
5	0,13	1,69	13,00	3,43	26,38	2,03
10	0,25	4,05	16,20	5,42	21,68	1,34
15	0,38	2,66	7,00	6,92	18,21	2,60
20	0,50	2,31	4,62	11,40	22,80	4,94
25	0,63	3,75	5,95	13,00	20,63	3,47
33	0,83	5,81	7,00	15,00	18,07	2,58
40	1,00	9,12	9,12	18,40	18,40	2,02
50	1,25	10,30	8,24	20,50	16,40	1,99
100	2,50	3,36	1,34	18,40	7,36	5,49

3.1.2. b. Culture de 15 jours

Par contre, après 15 jours de culture la production de conidiospores par erlen est plus stabilisée et suit l'accroissement du substrat, exception faite pour la dernière valeur de celui-ci (100 g/l). D'ailleurs, la valeur de l'indice de sporulation obtenu pour 100 g de substrat est nettement différente des autres.

Sur le Tableau IV est porté également le rapport de l'indice de sporulation obtenu après 15 jours de culture sur celui de 7 jours. Nous pouvons faire deux remarques à propos des chiffres ainsi obtenus.

Tout d'abord, pour des concentrations en substrat supérieures à 5 g/l, ce rapport est supérieur à 1. En règle générale, après 15 jours de culture, le nombre de conidiospores est doublé pour les concentrations de 5, 15, 33, 40 et 50 g/l de substrat. Pour les concentrations faibles (1 g/l) le substrat devient facteur limitant très rapidement, étant donné que l'indice de sporulation obtenu après 15 jours est inférieur à celui obtenu après 7 jours. De même, pour des concentrations élevées en substrat (100 g/l), l'indice de sporulation reste faible, même après 15 jours de culture. A cette concentration le rendement de sporulation est le plus faible obtenu pour l'ensemble des milieux de culture.

Sur le Tableau V nous avons porté la comparaison des rapports du nombre de conidiospores obtenues par erlen sur l'indice de sporulation (Ω) et inversement, pour des cultures de 7 et 15 jours de T.harzianum pour des concentrations croissantes de la source de Carbone. Les valeurs obtenues sont identiques pour les cultures de 7 et 15 jours. Pour des concentrations faibles en substrat, le rapport du nombre total des conidiospores produites par erlen sur l'indice de sporulation (Ω) est inférieur à 1. Pour des concentrations plus élevées (40 g/l ou plus) il est égal ou supérieur à 1. En d'autres termes, le nombre total de conidiospores produites après 15 jours de culture, est directement proportionnel à la concentration de substrat. Lorsque les valeurs de celles-ci sont inférieures à 50 g/l, la production de conidiospores de T.harzianum se fait avec des rendements supérieurs à 18×10^9 spores par gramme de substrat. Au contraire, lorsque les concentrations en substrat carboné sont supérieures ou égales à 50 g/l, même si le nombre total de conidiospores produites reste supérieur dans l'ensemble, les rendements commencent à diminuer.

TABLEAU V. Relations comparées entre les rapports Surface et Indice de Sporulation (Ω) et inversement Ω / Surface pour des cultures de 7 et 15 jours de T.harzianum en erlen pour des concentrations croissantes de la source de carbone ($\times 10^9$).

N° Milieu	Manioc	7 jours		15 jours	
		erlen/Ω	Ω/erlen	erlen/Ω	Ω/erlen
1	1	0,03	33,33	0,03	33,33
2	5	0,13	7,69	0,13	7,69
3	10	0,25	4,00	0,25	4,00
4	15	0,38	2,63	0,38	2,63
5	20	0,50	2,00	0,50	2,00
6	25	0,63	1,59	0,63	1,59
7	33	0,83	1,20	0,83	1,20
8	40	1,00	1,00	1,00	1,00
9	50	1,25	0,80	1,25	0,80
10	100	2,50	0,40	2,50	0,40

Nous avons donc choisi pour la suite de nos travaux d' utiliser un milieu de culture contenant 40 g/l de farine de manioc.
A cette concentration, le rapport du nombre de conidiospores produites après 7 ou 15 jours est le plus élevé, avec un indice de sporulation également élevé.

3.1.3. Influence de la quantité de la source d'Azote

La composition des différents milieux de culture utilisés pour cette étude est donnée sur le Tableau II. Nous avons utilisé 6 milieux différents (G, B, H, D, E et F), dans lesquels la source d'Azote a été sous forme d'Urée et de $(NH_4)_2SO_4$ à des concentrations différentes. Le milieu B est proche du milieu H, excepté le fait que pour ce dernier nous avons ajouté 1 g/l de $CaCl_2$. Pour l'ensemble de ces milieux, la concentration de la source carbonée a été maintenue constante (40 g/l).

Cependant avant de présenter les résultats, il faut préciser que cette étude a été faite en même temps que celle de la production de conidiospores dans un fermenteur à disque afin de comparer ces deux méthodes de culture. De ce fait, nous avons stérilisé, puis inoculé dans la masse ces milieux de culture contenus dans le fermenteur. Des parties aliquotes de ce milieu inoculé ont été par la suite introduites stérilement dans des erlens de 250 ml. Il résulte de cette opération que la quantité du milieu de culture contenue dans les erlens est variable. Pour palier à cette différence nous utiliserons pour l'expression des résultats, outre l'indice de sporulation (Ω) et le nombre de conidiospores formées par erlen, deux nouveaux indices de sporulation Ω C et Ω N. Ces nouveaux indices de sporulation exprimeent le taux de sporulation en fonction du nombre de conidiospores formées par m Mole d'Azote (Ω N) et par m Mole de Carbone (Ω C) réellement présentes dans les différents erlens.

Les numérations de condiospores de T.harzianum produites en fonction de la quantité d'Azote , ont été ralisées à partir de cultures âgées de 7 et 20 jours.

TABLEAU VI Production de conidiospores de T.harzianum en fonction de la quantité d'Azote présent dans le milieu de culture en erlen après 7 jours d'incubation.

Milieux de culture par erlen					Résultats ($x10^9$) conidiospores			
Milieux	Milieu g	Manioc g	Azote m Mole	Carbone m Mole	erlen	Ω	ΩC .	ΩN
G	31,04	0,73	5,40	38,33	5,63	7,71	0,15	1,04
B	27,35	1,03	2,40	33;99	7,60	7,38	0,22	3,17
H	15,56	0,54	1,36	19,32	14,14	26,20	0,73	10,40
D	18,22	0,69	1,08	22,71	10,20	14,80	0,45	9,44
E	13,00	0,49	0,59	16,22	3,52	7,18	0,22	5,97
F	25,31	0,96	0,97	31,61	0,16	0,16	0,005	0,16

3.1.3.a. Culture de 7 jours

Le Tableau VI quantifie l'évolution de la production de conidiospores de T.harzianum produites en fonction de la concentration de la source d'Azote initialement présente dans les milieux de culture.

Sur les cinq premières colonnes des Tableaux VI et VII est donnée la quantité des milieux de culture G, B, H, D, E et F, ainsi que la composition pondérale de ces milieux (quantité de la farine de manioc, concentrations d'Azote et de Carbone) réellement présente dans les erlens au temps zéro. Sur les quatre dernières colonnes de ces deux Tableaux sont portés les résultats obtenus après 7 et 20 jours de culture. Ces résultats sont exprimés en nombre total ($\times 10^9$)conidiospores produites.

Tout d'abord, les résultats obtenus sont assez différents. Le nombre de conidiospores produites après 7 jours de culture, semble être influencé par la quantité d'Azote initialement présente dans ces milieux.

Nous ne discuterons pas ici des résultats obtenus sur le milieu H. En effet ,la composition en Azote de ce milieu est identique à celle du milieu B. Dans une chapitre suivant nous comparerons les résultats obtenus sur les milieux B et H.

Si l'on compare par contre les valeurs de l'indice de sporulation Ω N , on constate que pour le milieu F (très pauvre en Azote) cet indice est très faible; de même pour le milieu G (très riche en Azote) cet indice Ω N reste bas après 7 jours de culture.

D'autre part, nous avons décrit précédemment, que lorsque la source de Carbone est fournie dans un milieu de culture à 40 g/l, le nombre de conidiospores produites évolue en fonction du temps. Nous allons donc discuter de l'influence de la source d'Azote sur des cultures âgées de 20 jours, afin d'éliminer l'influence de la source de Carbone sur la production quantitative de conidiospores.

3.1.3.b. Culture de 20 jours

Nous avons volontairement poursuivi les cultures jusqu'au 20 ème jour; en effet, nous avons constaté que les

TABLEAU VII Production de conidiospores de T. harzianum en fonction de la quantité d'Azote présent dans le milieu de culture en erlen après 20 jours d'incubation.

Milieux de culture / erlen					Résultats (x 10^9) conidiospores			
Milieux	Milieu g	Manioc g	Azote m Mole	Carbone m Mole	erlen	Ω	ΩC	ΩN
G	20,82	0,75	3,62	25,71	7,70	10,27	0,30	2,13
B	29,81	1,12	2,61	37,05	27,30	24,40	0,74	10,46
H	13,57	0,47	1,19	16,85	13,30	28,30	0,79	11,18
D	22,97	0,87	1,37	28,63	18,20	20,90	0,64	13,28
E	14,69	0,56	0,67	18,33	11,20	20,00	0,61	16,72
F	26,83	1,02	1,03	33,51	12,00	11,80	0,36	11,65

cultures sur le milieu F ne présentaient aucun signe de sporulation après 15 jours. Alors que cette inhibition était levée à partir du 17 ème jour. Nous avons donc arrêté les cultures après 20 jours, afin de comparer les résultats .

Sur le Tableau VII nous avons porté les résultats des différentes numérations après 20 jours de culture. Exception faite des milieux G, H et F, pour les autres milieux , B,D et E, le nombre de condidiospores produites par erlen est fonction de la quantité du milieu initialement présent dans les erlens. De même, les indices de sporulation Ω et Ω C sont très proches pour ces trois milieux de culture.

Par contre, les milieux G (riche en Azote) et F (pauvre en Azote) présentent un certain nombre de similitudes communes. Tout d'abord, le nombre total de conidiospores produites par erlen est faible par rapport aux milieux B et D. D'autre part, les indices de sporulation Ω et Ω C sont proches. Il y aurait donc une inhibition de la sporulation exercéepar la concentration de la source d' Azote initialement présente dans le milieu de culture. Lorsque l' Azote est fournie à faible quantité dans le milieu il est utilisé essentiellement pour le métabolisme primaire par le champignon. Par la suite, lorsque d'autres facteurs interviennent, (épuisement du substrat carboné, pH ...) il y aurait reconversion de cet Azote fixé par T.harzianum pour son métabolisme secondaire.

Par contre, lorsque l'Azote est fourni en quantité pléthorique (milieu G), l'inhibition de la sporulation est faible. Cependant, cette inhibition reste relativement stable entre 7 et 20 jours de culture.

Afin de comparer ces résultats avec la quantité d'Azote initialement présente dans les milieux de culture, nous avons utilisé l'indice de sporulation Ω N. Sur la dernière colonne du Tableau VII sont portés les différentes valeurs obtenues.

En régle générale, lorqu'il n'y a pas d'inhibition, les valeurs de cet indice sont inversement proportionnelles à la quantité d'Azote présente dans le milieu de culture. Aussi lorsque les concentrations d'Azote initialement présentes dans le milieu de culture sont proches (milieux D, E), il n'y a pas de conséquences importantes sur les valeurs de l'indice de sporulation (Ω), alors que celles de l' indice de sporulation Ω N suivent des variations qui sont inversement proportionnelles à la quantité d'Azote des milieux (B,D, et E).

Pour le milieu F, l'indice Ω N est faible du fait que la sporulation n'est pas encore achevée après 20 jours. Par contre,

TABLEAU.VIII . Production comparée de conidiospores de T.harzianum en fonction de la quantité décroissante de la source d'Azote pour des cultures en erlen de 7 et 20 jours.

Milieux	Milieu de culture Rapports Molaires N/C	C/N	Résultats : Rapports de rendement(x 10^9 conidiospores) 7 jours Ω	Ω_C	Ω_N	20 jours Ω	Ω_C	Ω_N
G	0,141	7,10	7,71	0,15	1,04	10,27	0,30	2,13
B	0,070	14,20	7,38	0,22	3,17	24,40	0,74	10,46
H	0,070	14,20	26,20	0,73	10,40	28,30	0,74	11,18
D	0,048	20,90	14,80	0,45	9,44	20,90	0,64	13,28
E	0,037	27,36	7,18	0,22	5,97	20,00	0,61	16,72
F	0,031	32,53	0,16	0,005	0,16	11,80	0,36	11,65

pour le milieu G (pléthorique en Azote) l'indice de sporulation ΩN est environ 5 fois plus faible. Ceci démontre clairement l'effet inhibiteur exercé par la concentration élevée en Azote du milieu sur la sporulation.

Les relations qui existent entre la composition chimique du milieu de culture et les rendements de sporulation obtenus après 7 et 20 jours de culture en erlen de T.harzianum sont portées sur le Tableau VIII.

La composition des milieux de culture a été donnée sous forme de rapports molaires Azote/Carbone et Carbone/Azote. Les résultats expriment les différents taux de rendement de sporulation obtenus après 7 et 20 jours de culture (Ω , ΩC et ΩN).

Lorsque dans les milieux de culture la concentration de la source de Carbone est maintenue stable et que l'on fait varier la concentration de la source d'Azote, on constate que la sporulation est influencée par trois facteurs principalement.

Tout d'abord la source de Carbone agit sur la sporulation étant donné que l'indice ΩC est nettement supérieur, après 20 jours de culture de celui obtenu après 7 jours.

La concentration de la source d'Azote agît également sur la sporulation. Lorsque cette concentration est très faible, la sporulation est inhibée pendant 16 jours environ, par contre, pour des concentrations élevées en Azote, les indices de sporulation Ω , ΩC et ΩN restent les plus faibles même après 20 jours de culture.

De ce fait, nous pouvons constater que la concentration de la source d'Azote agit différemment de la concentration de la source de Carbone sur la régulation de sporulation de T. harzianum .

Nous avons décrit précédemment que les faibles concentrations en Carbone induisent une sporulation précoce pour T. harzianum . De même, les concentrations élevées en Carbone, inhibent la conidiogénèse pendant les 7 Premiers jours. Or, nous constatons que le phénomène inverse se produit pour les concentrations d'Azote. Lorsque celles-ci sont faibles, la conidiogénèse est inhibée pendant 16 jours, par contre , pour des concentrations élevées en Azote, il y a production de conidiospores assez rapidement. Cependant les

les indices de sporulation restent faibles. Il y aurait donc une inhibition partielle exercée par des concentrations élevées en Azote sur la sporulation de T.harzianum .

A ce stade d'étude, nous pouvons constater également que lorsque les valeurs du rapport molaire N/C du milieu de culture sont comprises entre 0,070 et 0,040 il n'y a pas de différences importantes sur les valeurs de l'indice de sporulation Ω C. En dehors de ces valeurs du rapport N/C il y a un phénomène d'induction-inhibition qui se manifeste . Le même phénomène d'induction-inhibition provoqué par la source d'Azote ou au cours de la conidiogénèse d'A.niger a été déjà décrit (GALBRAITH etSMITH ; 1969).

On constate également que lorsque le rapport molaire N/C du milieu de culture est égal à 0,070 on obtient les valeurs les plus élevées de l'indice de sporulation Ω C. De plus, pour ce rapport molaire, l'indice de sporulation Ω N est 5 fois supérieur à celui obtenu pour le milieu G. Nous avons donc utilisé par la suite, un rapport molaire N/C de 0,070 pour la composition des milieux de culture pour la production de conidiospores de T.harzianum en quantités élevées.

Un troisième facteur qui influence la sporulation est la durée du temps d'incubation des cultures de T.harzianum. Une étude cinétique de la production de conidiospores de T.harzianum va nous permettre d'optimiser ce facteur.

3.1.4. Cinétique de Production de conidiospores en fonction du temps

Pour cette étude nous avons utilisé les milieux de culture A, B, C, D, E, F et G, dont la composition est portée sur leTableau II. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de figures 1,2, 3, 4, 5, 6 et 7 pour ces milieux respectifs.

Cependant, avant de commenter ces résultats, il convient de préciser que cette étude a été faite en parallèle à celle de la production de conidiospores dans une fermenteur à disque; ceci, afin de déterminer le temps optimal d'incubation nécessaire à T.harzianum pour produire le maximum de conidiospores dans un fermenteur à disque avec des taux de sporulation élevés pour chaque milieu de culture utilisé.

Nous formulons donc les mêmes précisions sur les quantités de milieux de culture contenus dans les erlens de 250 ml que celles données pour le chapitre précédent. A savoir que ces quantités étaient variables suivant les erlens et que les résultats seront présentés sous deux formes. Tout d'abord la première colonne des figures correspond au nombre total de conidiospores produites par erlen au temps choisi; elle est suivie de l'indice de sporulation (Ω) pour chaque dénombrement.

Les numérations de conidiospores de T.harzianum produites en fonction du temps ont été réalisées en général à partir des cultures âgées de 3, 5, 7, 9, 12, 14, 20, 25 et 30 jours. Cependant sur les figures suivantes, nous avons porté uniquement les résultats relatifs aux numérations obtenues jusqu'au 20 ème jour de culture.

En effet, nous avons constaté qu'après cette période, un seuil était atteint pour les valeurs maximales de l'indice de sporulation (Ω). De plus, dans le cadre de cette étude, à savoir l'optimisation du temps d'incubation des cultures de T.harzianum pour produire de grandes quantités de conidiospores en fermenteur à disque, il est impératif d'immobiliser ce fermenteur le minimum de temps.

D'autre part, nous avons volontairement choisi d'utiliser des milieux de culture contenant de la gélose. Ceci pour deux raisons.

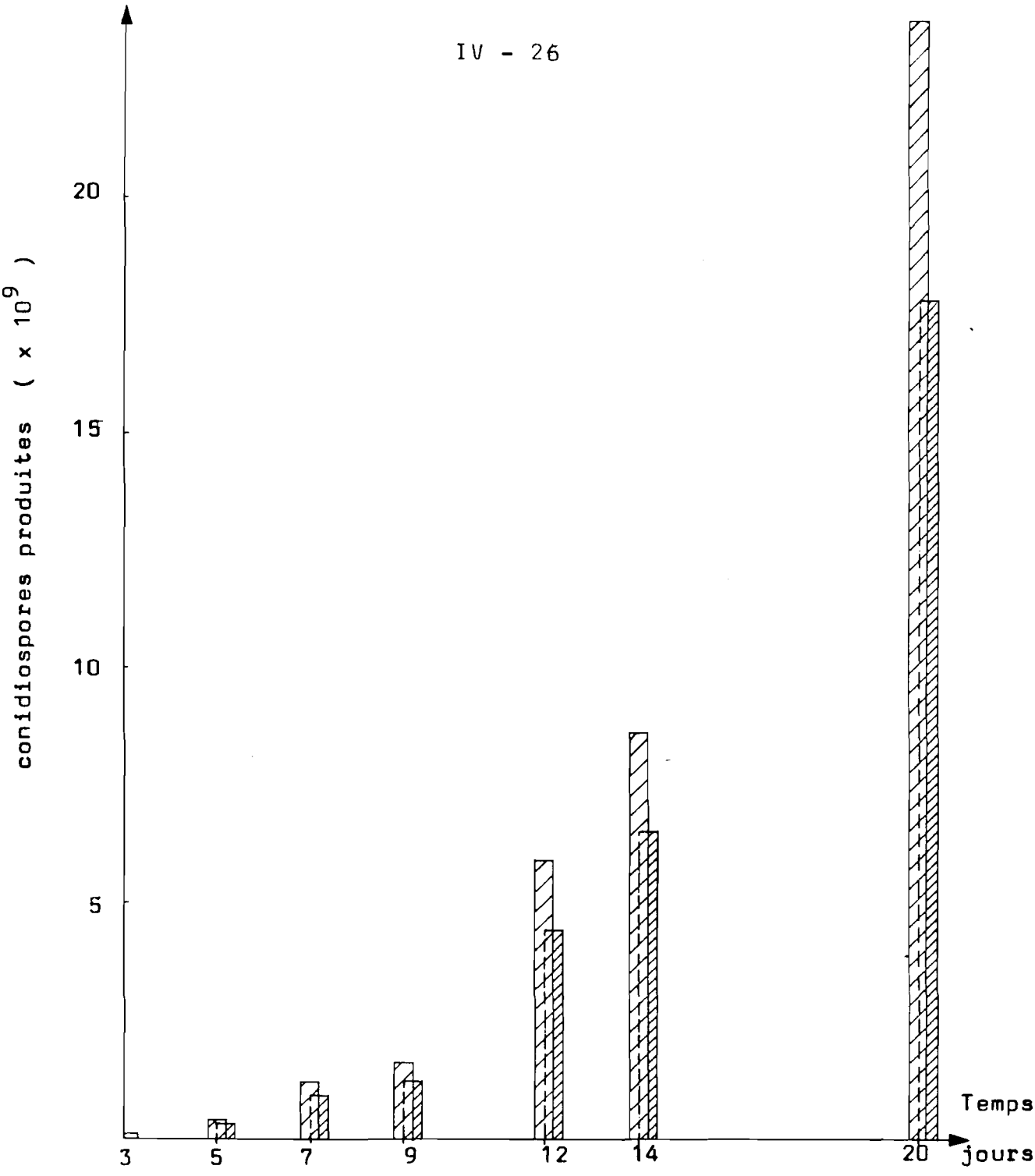


Fig. 1 : Production de conidiospores de <u>T. harzianum</u> , cultivé sur le milieu A , en fonction du temps. La première colonne représente le nombre Total de conidiospores produites par erlen , la seconde représente l'indice de sporulation (Ω).

Tout d'abord l'humidité du milieu de culture reste assez stable dans le temps, ce qui permet au microorganisme de disposer d'une quantité importante d'eau libre pour son métabolisme et de maintenir la pression osmotique du milieu, à peu près constante tout le long de sa croissance. Ensuite, la gélose incorporée dans le milieu permet de maintenir le même rapport surface/volume pour les différents milieux de culture utilisés.

3.1.4. a. Effets de la concentration de la source de Carbone

Si l'on compare la cinétique de production de conidiospores de T.harzianum cultivé sur les milieux A et C (figures 1 et 3), on constate que lorsque la source de Carbone est disponible en quantité pléthorique (100 g/l) , le processus de conidiogénèse est inhibée pendant les premiers jours de culture (3, 5, 7 et 9 jours). Alors que c'est le phénomène inverse qui se produit lorsque la même source de Carbone est fournie en quantité limitée (fig. 3). En effet, après 3 jours de culture sur le milieu C (20 g), la conidiogénèse a déjà été induite. Après 5 jours de croissance de T. harzianum sur les milieux A et C, l'indice de sporulation (Ω) est pour le milieu C 21 fois supérieur à celui du milieu A. Des valeurs maximales pour l'indice de sporulation sont rapidement atteintes, 7 jours pour le milieu C, alors que pour le milieu A, il faut attendre plusieurs semaines avant que l'indice n'ait atteint des valeurs maximales.

Suivant ces résultats, il semble que la concentration du substrat utilisé comme source de Carbone influence la conidiogénèse de T.harzianum . Lorsque cette concentration est faible, il y a induction précoce de la conidiogénèse. Les conidiospores sont produites dès les premiers jours de culture. Il en est de même pour l'indice de sporulation. Le palier maximum de production de conidiospores est atteint à la fin de la première semaine de culture. Par contre lorsque la concentration du substrat est pléthorique, il y a inhibition de la conidiogénèse pendant la même période; après une semaine de culture, il apparaît une induction tardive de la conidiogénèse qui s'exprime par une production croissante de conidiospores à partir du 7 ème jour. Le palier maximum de l'indice de sporulation est atteint au delà de 30 jours de culture.

Par conséquent, il suffit de faire varier la concentration de la source de Carbone du milieu de culture, entre ces deux valeurs, pour obtenir non seulement une conidiogénèse précoce ou tardive, mais également une production quantitative de conidiospores de T.harzianum.

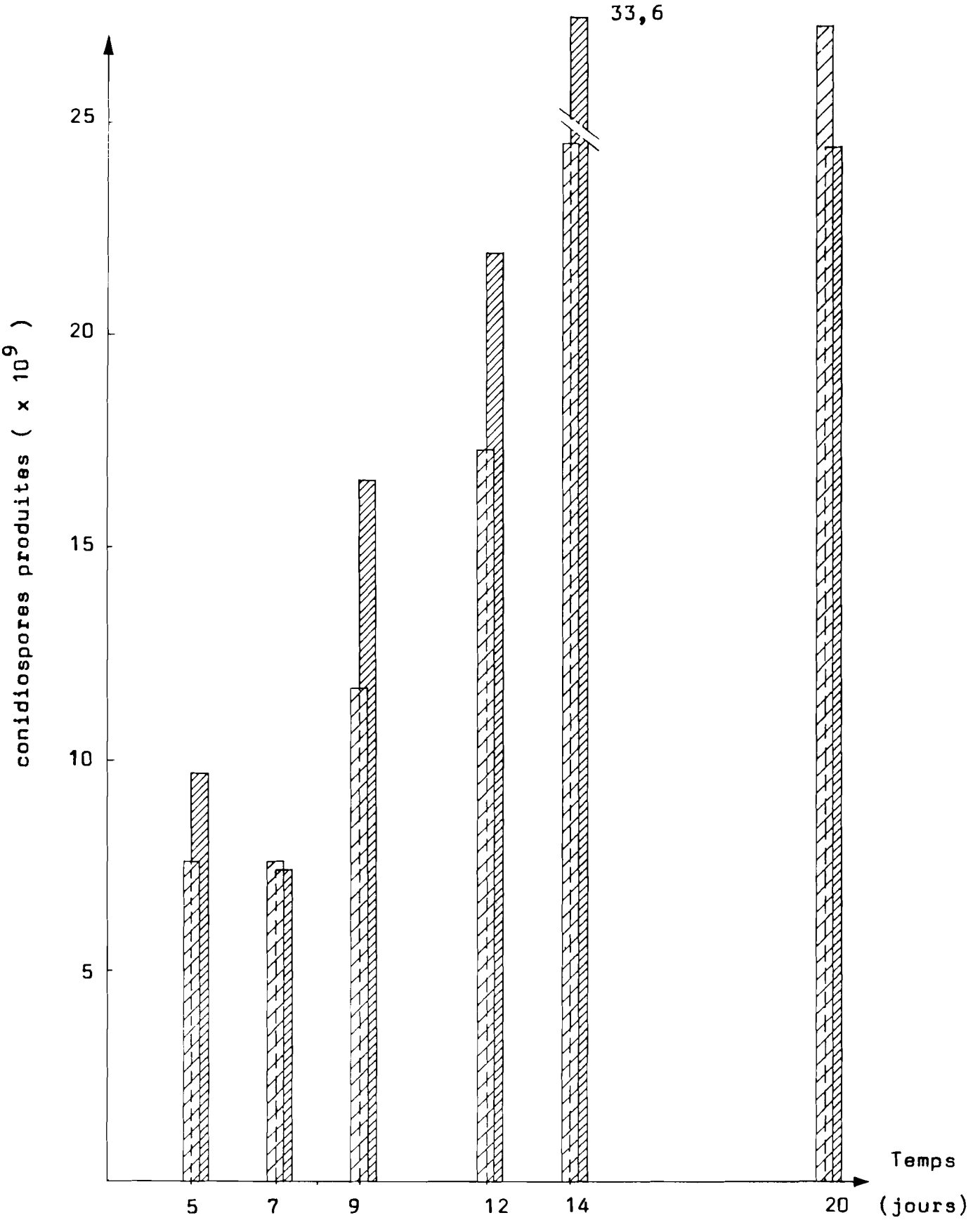


Fig. 2 : Production de conidiospores de T.harzianum , cultivé sur le milieu B, en fonction du temps. La première colonne représente le nombre Total de conidiospores produites par erlen, la seconde représente l'indice de sporulation (Ω).

Cette hypothèse est confirmée par les resultats obtenus sur le Milieu B, dont la composition est intermédiaire entre celle des Milieux A et C. On constate en effet une conidiogénèse précoce obtenue après 5 jours de culture, une production de conidiospores croissante et l'indice de sporulation suit un accroissement linéaire à partir du 7ème jour pour atteindre des valeurs maximales à partir du 14 ème jour.(Fig. 2).

3.1.4.b. Effets de la concentration de la source d'Azote

Un autre facteur qui, comme nous l'avons décrit précédemment influence également la conidiogénèse de T.harzianum , est la concentration de la source d'Azote présente dans les milieux de culture. Nous allons donc suivre la production cinétique de conidiospores de T.harzianum , en fonction du temps sur différents milieux de culture.

Lorsque la concentration en Azote du milieu de culture est élevée (Milieux A, B et C , figures respectives 1, 2 et 3), la conidiogénèse est principalement influencée par la source de Carbone. Cependant, lorsque la quantité de substrat carboné est maintenue fixe et que l'on fait varier la concentration de l'Azote total disponible dans le milieu de culture (B, D, E et F), on observe deux phénomènes (Figures 2, 4, 5 et 6):

Tout d'abord il se produit une baisse sensible de la production de conidiospores. Cette diminution suit la diminution de la concentration de l'Azote total disponible dans le milieu de culture. C'est le cas notamment pour les milieux D et E pour lesquels la production de conidiospores est diminuée par rapport à celle obtenue pour le milieu B (fig. 2). D'autre part, l'indice de sporulation atteint un palier maximum à des temps variables (12 éme jour pour le milieu D, 20ème jour pour le milieu E).En d'autres termes, lorsqu'on diminue la concentration d'Azote contenue dans un milieu de culture dont la quantité de Carbone reste stable, il y a un phénomène d'inhibition de la conidiogénèse qui apparaît.

Cette hypothèse est également confirmée par les résultats obtenus en utilisant le milieu F (fig. 6). En effet, lorsque dans un milieu de culture la quantité de la source de Carbone est élevée et la concentration d'Azote très faible, il y a inhibition de la conidiogénèse. Cette inhibition dure environ 15 jours (fig. 6). Après cette période, il y a production massive de conidiospores en l'espace de quelques jours.

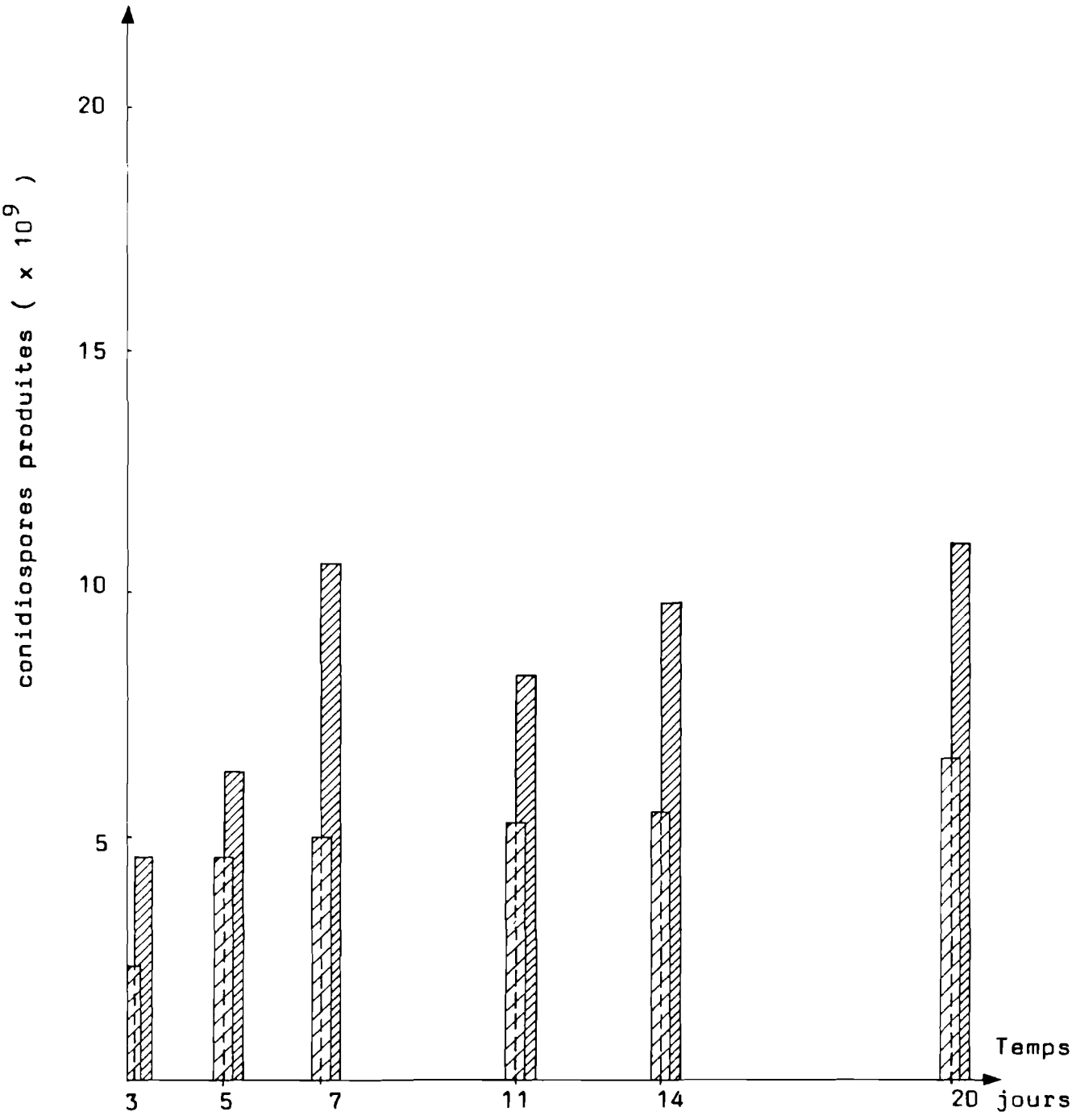


Fig.3 : Production de conidiospores de T. harzianum , cultivé sur le milieu C , en fonction du temps. La première colonne représente le nombre Total de conidiospores produites par erlen , la seconde représente l'indice de sporulation (Ω).

Cependant il est important de signaler que la quantité de conidiospores produites après 25 et 30 jours de culture sur les milieux B, D, E et F , est très proche. Pour ces quatre milieux l'indice de sporulation est proche de 20 x 10^9 spores.

Cette dernière observation nous amène à formuler une nouvelle hypothèse :

Lorsque dans un milieu de culture, la source de Carbone est fournie à une concentration moyenne (40 g/l) et que dans ce milieu la concentration d'Azote total disponible est très faible , il y a inhibition de la conidiogénèse pour plusieurs semaines. L'Azote disponible serait d'abord utilisé pour la croissance exclusive du mycélium. La conidiogénèse intervient très tardivement et pour se faire il y aurait utilisation d'une grande partie de l'Azote déjà fixé par les cellules mycéliennes.

Enfin, lorsque l'Azote est fourni en quantité pléthorique dans le milieu de culture (milieu G), la conidiogénèse n'est pas inhibée, par contre l'indice de sporulation maximum est vite atteint. Les valeurs de cet indice sont cependant faibles et restent stables en fonction du temps (fig. 7).

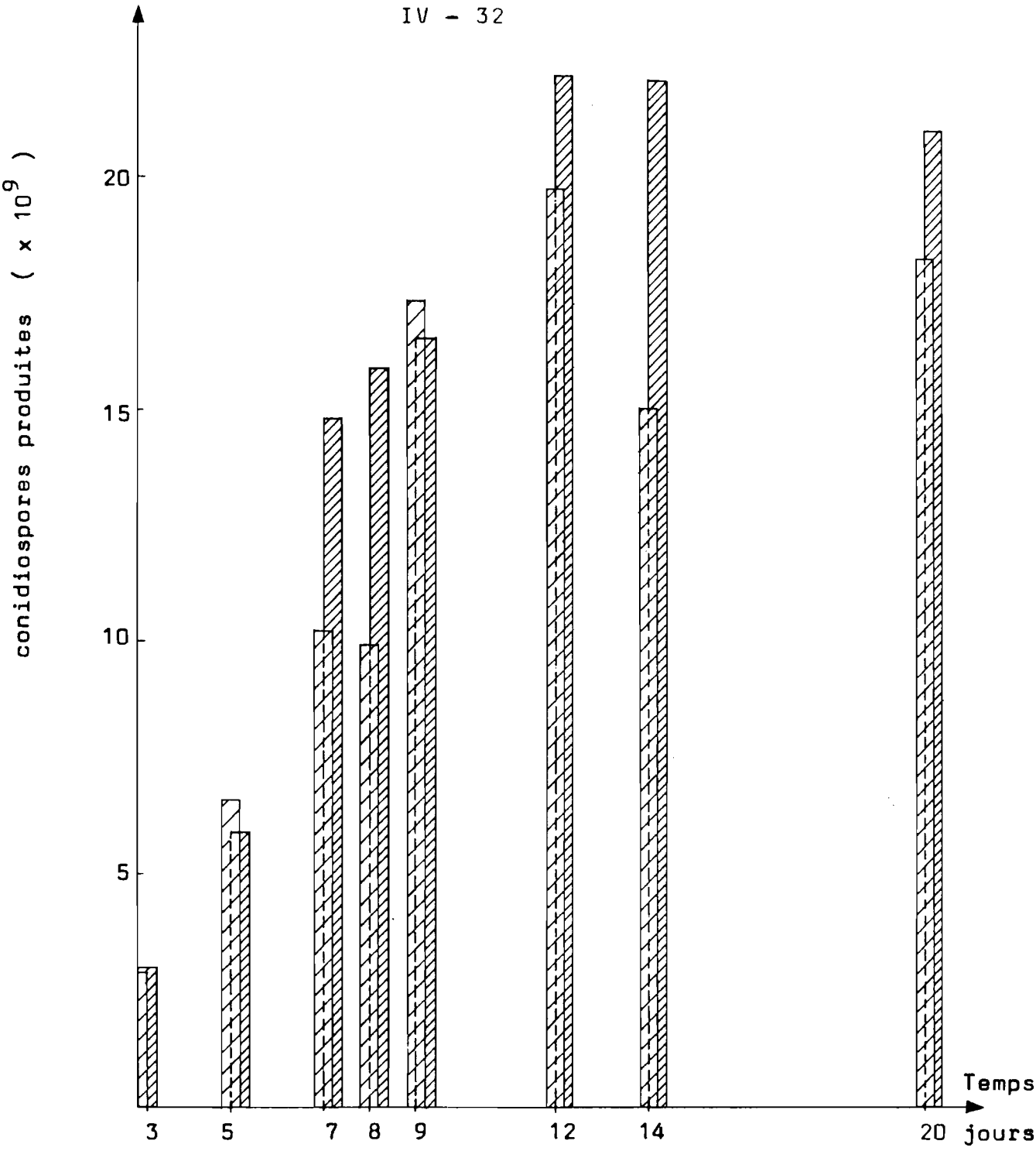


Fig. 4 : Production de conidiospores de T. harzianum , cultivé sur le milieu D , en fonction du temps. La première colonne représente le nombre Total de conidiospores produites par erlen , la seconde représente l'indice de sporulation (Ω).

3.2. Production de conidiospores dans le Fermenteur à disques

Le principe d 'utilisation d'un fermenteur à disques, en vue de produire des conidiospores de T. harzianum en grande quantité, a été développé dans l'Introduction. De même, le mode d' utilisation de ce fermenteur particulier a été donné dans le Matériel et Méthodes.

Cependant, avant de présenter les résultats obtenus en utilisant le fermenteur, nous allons rappeler brièvement les particularités de cet appareil, afin de mieux comprendre les différences qui vont apparaître au niveau des résultats.

Tout d'abord, dans chaque fermenteur il y avait des quantités de milieux de culture variables. Cependant, le volume de milieu de culture contenu dans le fermenteur était compris entre 500 et 600 g de milieu par fermenteur.

D'autre part, la durée d'incubation des différentes cultures était généralement de 8 jours. Exception faite pour les milieux A (13 jours) et le milieu C (18 jours).

Le fermenteur ainsi chargé avec le milieu de culture approprié et inoculé dans la masse était placé dans une pièce non climatisée à proximité des erlens qui ont servi pour l'étude d'optimisation de la composition du milieu de culture. A la différence de ceux-là, qui n'ont pas été aérés, le fermenteur, lui l'a été, tout le long de la culture, par balayage forcé du fermenteur par un flux d'air stérile, humidifié par barbotage. Le débit d'aération a été maintenu constant à 100 l/h.

Tous les milieux de culture, dont la composition figure au Tableau II, ont été utilisés pour cette étude de production de conidiospores de T. harzianum cultivé dans un fermenteur à disques.

Les résultats de cette étude, ont été présentés sous forme d'histogramme sur les figures 8, 9 et 10.

3.2.1. Influence de la quantité de la source de Carbone

Le nombre total de conidiospores de T.harzianum produites dans le fermenteur à disques a été de 57, 44 et 15,5 x 10^{10} pour 100, 40 et 20 g de farine de manioc présents dans les milieux A, B et C respectivement (Fig. 8).

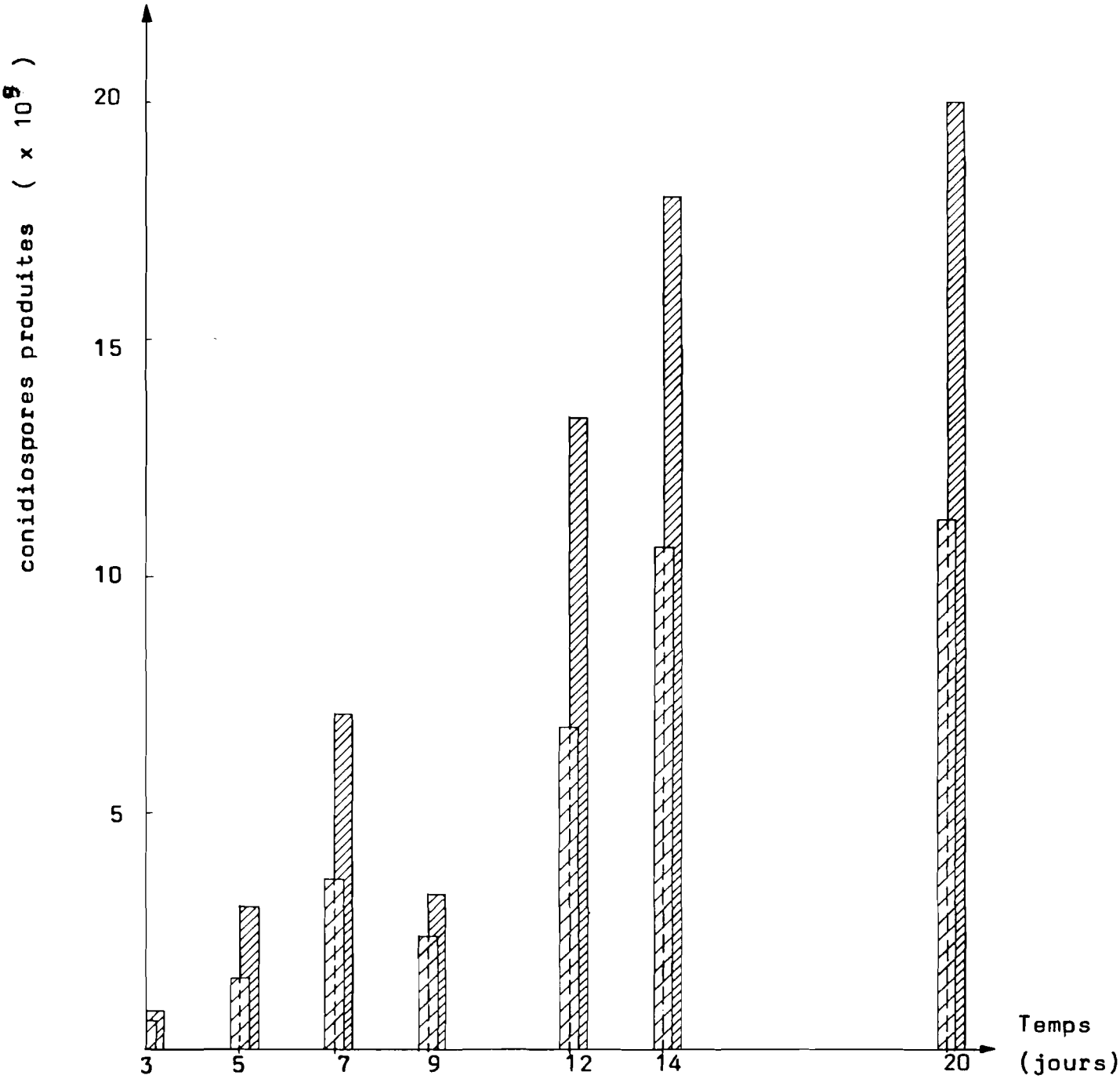


Fig. 5 : Production de conidiospores de T.harzianum, cultivé sur le milieu E , en fonction du temps. La première colonne représente le nombre Total de conidiospores produites par erlen et la seconde représente l'indice de sporulation (Ω).

Cette production élevée en conidiospores a été obtenue avec des rendements différents. En effet, les valeurs des indices de sporulation Ω ont été de 11,4, 18,6, et 15,5 (x 10^9) pour les milieux respectifs A, B et C (Fig. 9).

Cependant, malgré les effets d'induction-repression dûs principalement à la concentration de la source de Carbone, la production globale de conidiospores de T. harzianum dans un fermenteur à disques est proportionnelle à la quantité du substrat carboné du milieu de culture.

3.2.2. Influence de la quantité de la source d'Azote

Les milieux utilisés pour cette étude ont été les suivants : B, D, E, F et G , dont la composition a été donnée au Tableau II.

La production globale de condidiospores de T.harzianum par fermenteur a été importante avec des valeurs très proches. Ces valeurs ont été comprises de 33 à 44 x 10^{10} conidiospores pour ces 5 milieux (Fig. 8).

Les indices de sporulation Ω obtenus sur ces milieux imposent la même remarque (Fig. 9); à savoir que ces indices sont caractérisés par des valeurs élevées (de 15,7 à 18,6 x 10^9) de conidiospores produites par gramme de farine de manioc.

Au vu de ces résultats , il semble donc que lorsque T. harzianum est cultivé dans un fermenteur à disques, sur des milieux différents, le nombre de conidiospores produites après 8 jours d'incubation est étroitement lié à la quantité de la source de Carbone initialement présente dans les milieux de culture.

En effet, lorsque la quantité de la source de Carbone est la même pour les milieux B, D, E, F et G et lorsque pour ces mêmes milieux la quantité de la source d'Azote varie de 1 à 6, les indices de sporulation obtenus (Ω) ne reflètent pas cette évolution.

Cependant, il faut remarquer que les effets d'inhibition dûs à des concentrations élevées d'Azote (milieu G) existent mais ils sont très atténués. De même, les effets d'inhibition dûs à des concentrations très faibles d'Azote (milieu F) qui ont été observés lors des cultures en erlen de T. harzianum

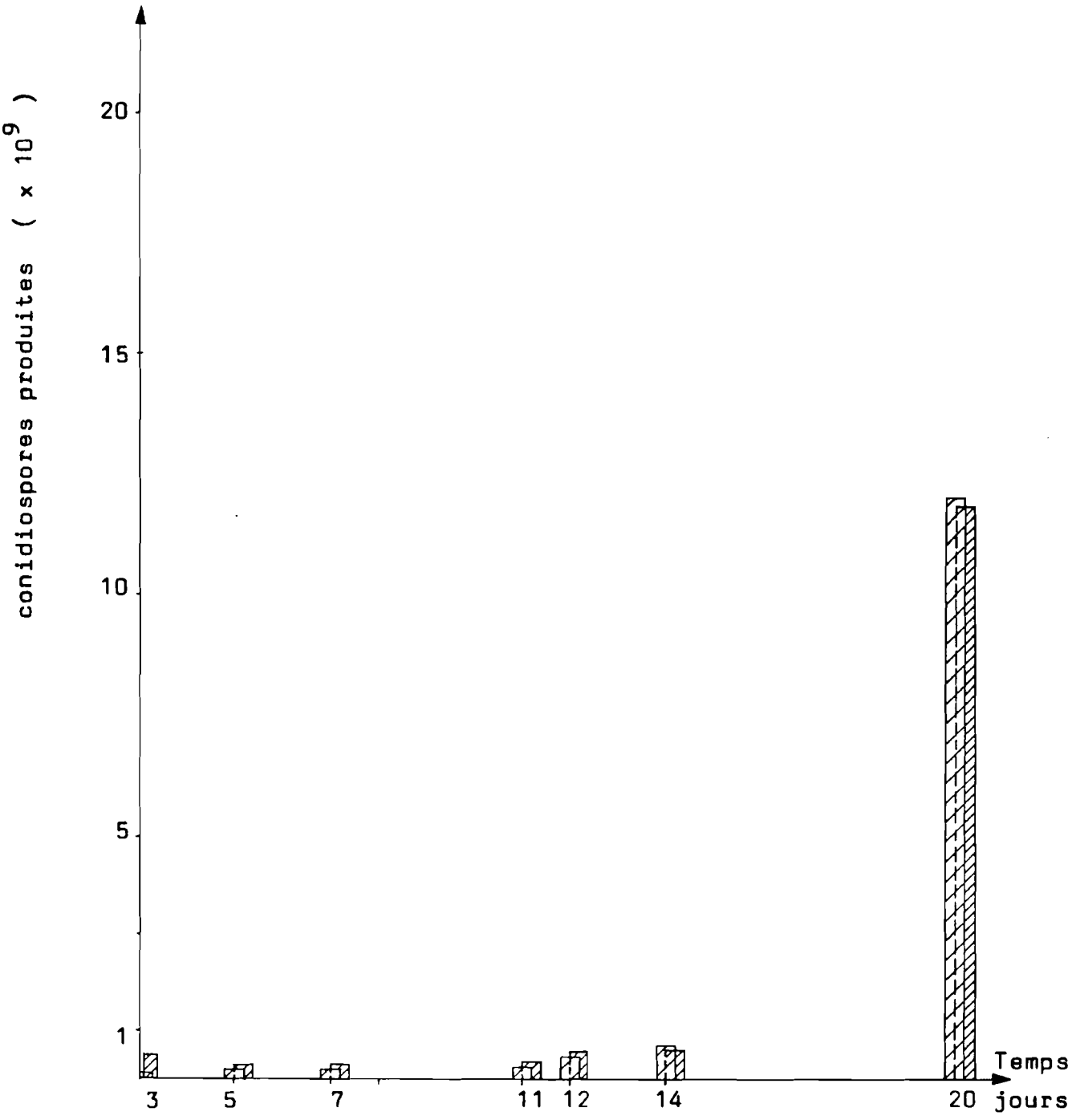


Fig. 6 : Production de conidiospores de T. harzianum ,cultivé sur le milieu F , en fonction du temps. La première colonne représente le nombre Total de conidiospores produites par erlen , la deuxième colonne représente l'indice de sporulation (Ω).

ont disparu pour les cultures dans un fermenteur à disques. Pour le milieu F, en effet, la production est de 33 x 10^{10} conidiospores/ fermenteur avec un indice de sporulation Ω comparable à celui du milieu B. Cependant, le milieu B contient 3 fois plus d'Azote! De plus l'indice de sporulation Ω_N du milieu F est le plus élevé de l'ensemble des milieux testés (Fig.10).

Nous pouvons avancer une explication à ce phénomène. Il semblerait que l'aération des milieux de culture au cours de la croissance de T.harzianum est le seul paramètre qui différencie les cultures en erlen de celles réalisées dans le fermenteur à disques. De ce fait, lorsque les cultures sont aérées dans le fermenteur à disques, le développement du mycélium est beaucoup plus rapide. Cette croissance rapide masquerait les effets d'induction-inhibition qui ont été observés sur des cultures en erlen. Cependant nous venons de voir que ces phénomènes d'inhibition existent mais ils sont très atténués (Milieu G fig.9).

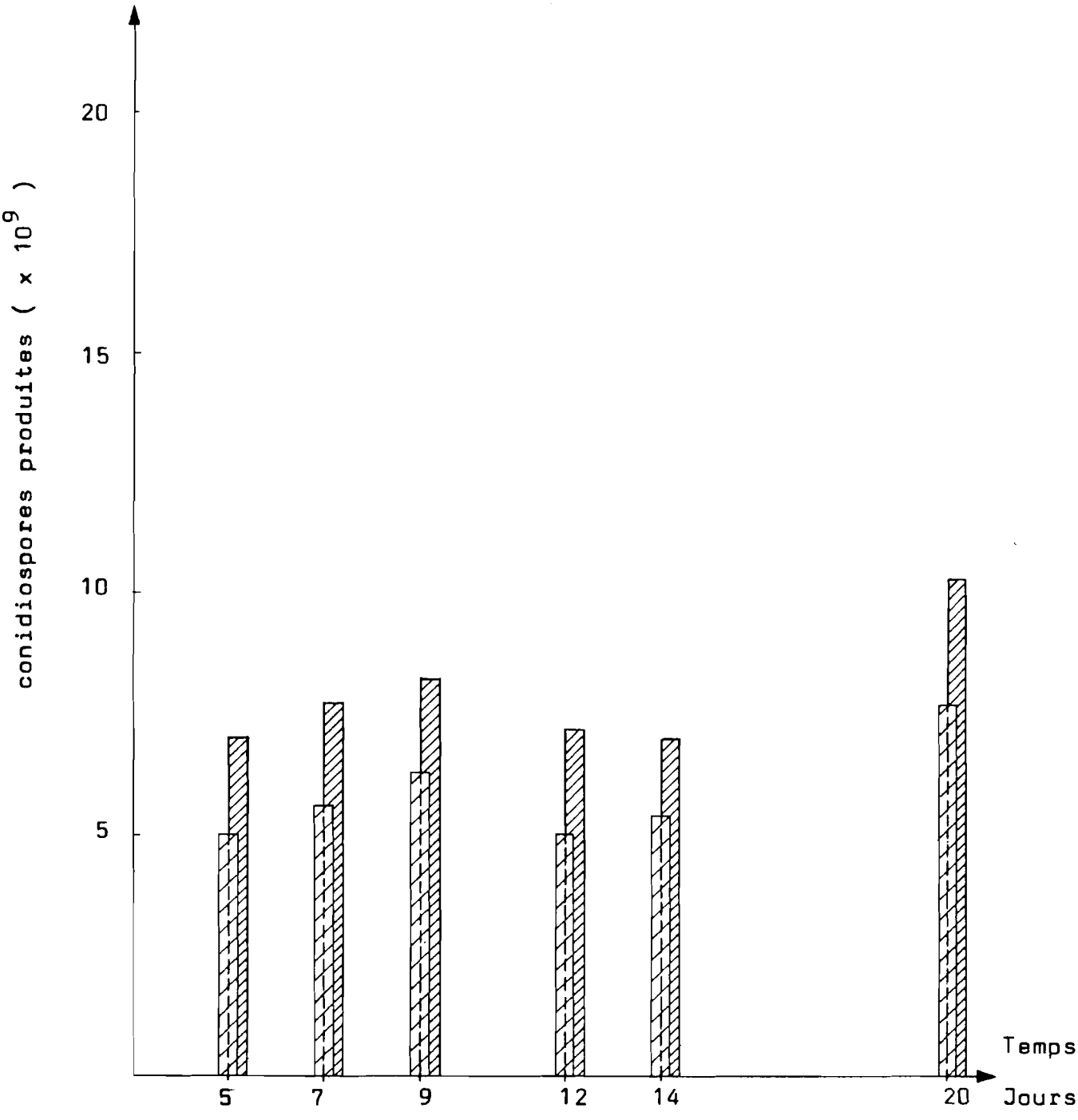


Fig. 7 : Production de conidiospores de T. harzianum , cultivé sur le milieu G en fonction du temps. La première colonne représente le nombre total de conidiospores produites par erlen , la seconde représente l'indice de sporulation (Ω).

3.3. Production comparée de condidiospores en erlen et en fermenteur à disques

Nous allons,dans ce chapitre,faire une synthèse de tous les résultats obtenus en erlen et en fermenteur à disques, afin d'optimiser et de définir ainsi un milieu et des conditions de culture pour la production de condiospores de T.harzianum .

Les principaux facteurs qui influencent la sporulation des champignons filamenteux, sont la source de Carbone et d' Azote du milieu de culture (SMITH; 1978). Cependant, nous venons de voir que l'aération des milieux de culture, en accélérant la croissance de T.harzianum ,influence la sporulation.

De même, le mode d'inoculation en Surface ou dans la Masse du milieu de culture influence ce phénomène.

Nous n'avons pas évoqué l'effet du rapport surface aérienne libre sur la quantité du milieu et les conséquences de ce rapport sur la sporulation de T.harzianum.

D'autre part, les milieux de culture que nous avons utilisé pour cette étude contenaient tous du KH_2PO_4 à des concentrations variables afin d'apporter dans le milieu du Phosphate et du Potassium. Or, une étude de GINDRAT (1977) a clairement démontré que les ions K^+ à concentration élevée inhibent la sporulation des Trichoderma. Cet auteur préconise l' utilisation de $CaCl_2$ pour annuler cet " effet anti-sporulant".

Nous allons donc développer tous ces points dans ce chapitre .

3.3.1. Effets de la concentration de la source de Carbone

Sur le Tableau IX nous avons donné les résultats de la sporulation obtenus sur les milieux A, B et C pour des cultures de T.harzianum en erlen et en fermenteur à disques. La composition de ces trois milieux a été portée sous forme de rapports molaires C/N et N/C . La durée d'incubation en fermenteur a été différente pour les trois milieux;nous avons donc choisi des temps d'incubation proches de celles-ci pour les cultures en erlen.

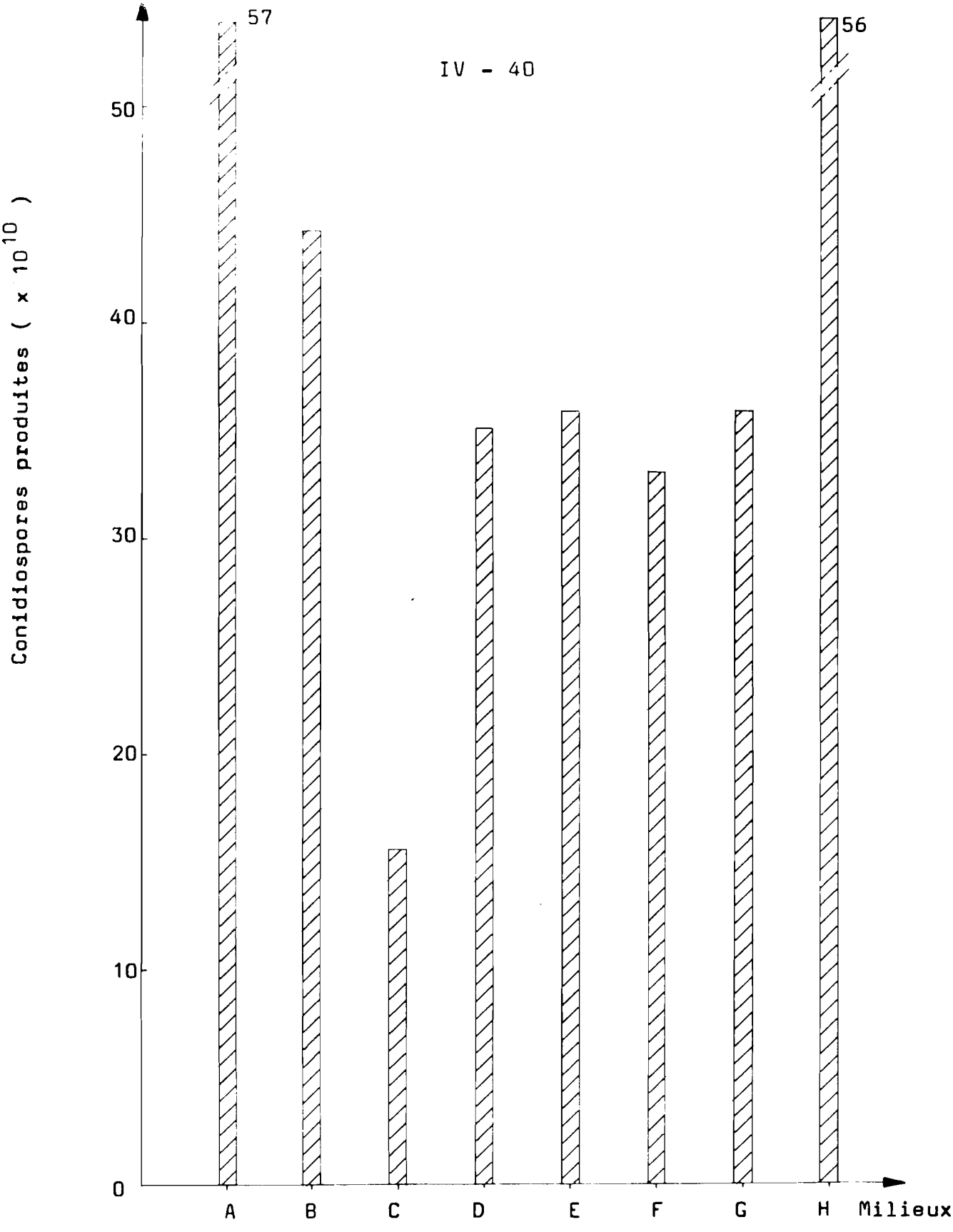


Fig. 8 : Production de conidiospores de T.harzianum cultivé sur différents milieux de culture dans un fermenteur à disques. Les résultats expriment le nombre total de conidiospores produites par fermenteur.

C'est sur le milieu B que le nombre de conidiospores produits en erlen après 7 jours d'incubation est le plus élevé des trois milieux, alors que pour les cultures en fermenteur c'est sur le milieu A. L'inhibition précoce exercée par la concentration élevée de la source de Carbone (Milieu A) s'exprime lorsque les cultures ne sont pas aérées. Le même phénomène d'inhibition précoce a été observé pour des cultures en erlen d'A. niger cultivé sur farine de manioc (AUFEUVRE, 1980).

En fermenteur les cultures sont aérées en permanence. De ce fait, le développement du microorganisme est plus rapide qu'en erlen. Cette croissance accélérée de T.harzianum dans le fermenteur à disques s'exprime au niveau de la production de conidiospores par des indices de sporulation qui sont 2,5 fois supérieurs à ceux obtenus pour les cultures en erlen.

Cependant, c'est sur le milieu B que l'indice de sporulation a été le plus élevé pour les cultures en fermenteur. Cette différence est dûe principalement aux phénomènes d'induction-inhibition exercés par la concentration élevée de la source de Carbone (Milieu A) et par la concentration élevée de la source d'Azote (Milieu C).

En effet, nous avons décrit précédemment ce phénomène (§ 3.1.2.b et 3.1.4.a.)pour les effets de la concentration élevée de la source de Carbone sur la sporulation de T.harzianum. De même, nous avons constaté que lorsque les valeurs du rapport molaire N/C d'un milieu de culture étaient comprises entre 0,07 et 0,04 , il n'y avait pas d'inhibition exercée par la concentration d'Azote du milieu sur la production de conidiospores (§ 3.1.3.b.).

Or, pour le milieu C, le rapport molaire N/C est égal à 0,14 et dépasse largement les valeurs limites au delà desquelles il y a inhibition de la sporulation exercée par la concentration d'Azote. Probablement ceci expliquerait le faible indice de sporulation obtenu pour le milieu C par rapport au milieu B dont le rapport molaire N/C est égal à 0,07.

3.3.2. Effets de la concentration de la source d'Azote

Pour cette étude nous avons selectionne cinq milieux de culture G, B, D, E et F dont le rapport molaire N/C varie de

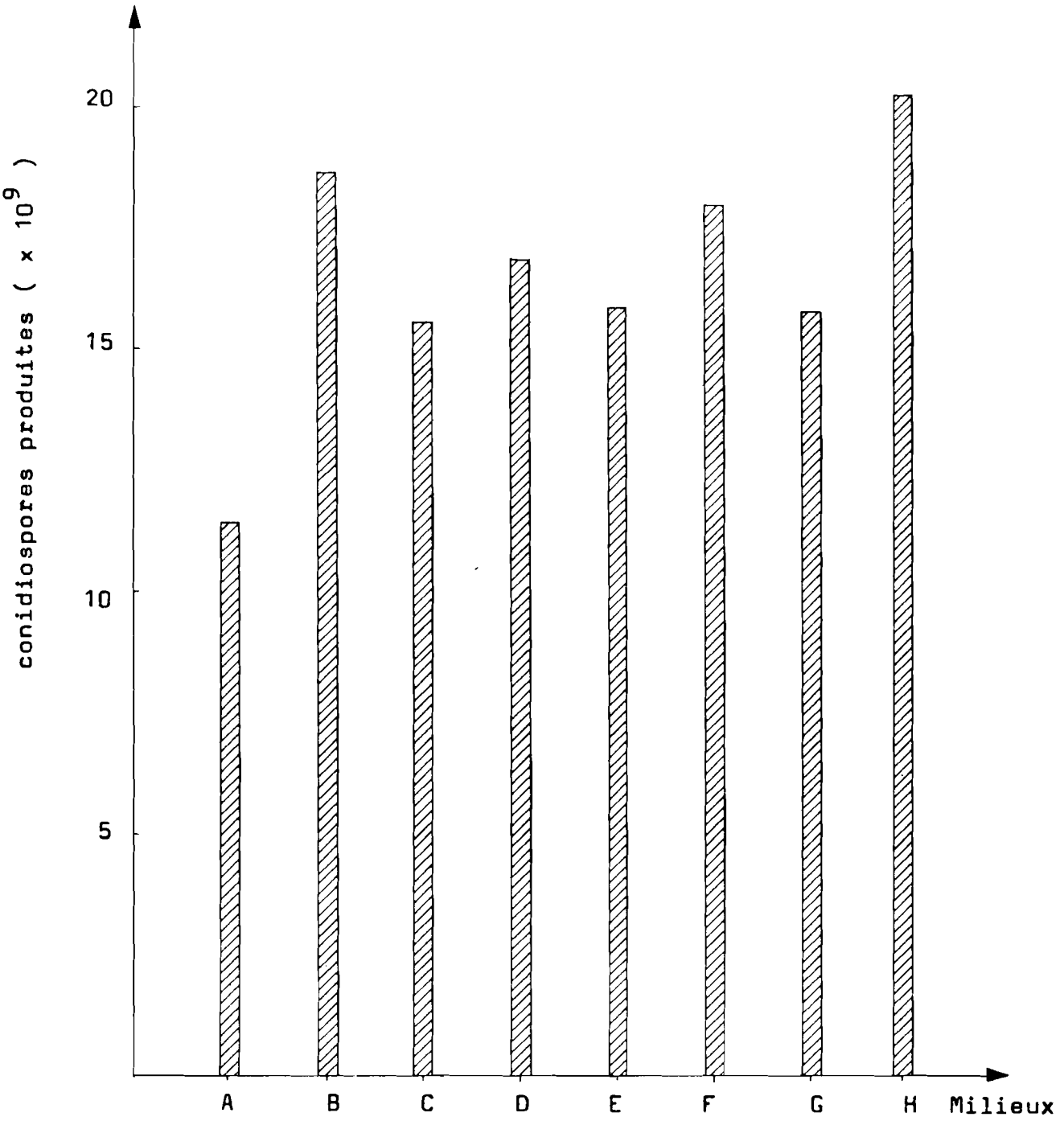


Fig. 9 : Production de conidiospores de T.harzianum ,cultivé sur différents milieux de culture dans un fermenteur à disques. Les résultats sont exprimés en nombre de conidiospores produites par gramme de substrat (Ω).

0, 141 à 0,031 (Tableau X), et pour lesquels la quantité de la source de Carbone a été constante (40 g/l).
Les numérations de conidiospores ont été réalisées après 7 jours pour les cultures en erlen et après 8 jours pour celles en fermenteur.

Tout d'abord pour les cultures en erlen, le nombre total des conidiospores produites et par conséquent, l'indice de sporulation (Ω) a été différent pour chaque milieu. Les valeurs de l'indice de sporulation évoluent de 0,16 à 14,8 x 10^9 conidiospores.

Ce résultat est très intéressant étant donné qu'il confirme tout d'abord que les effets d'induction-inhibition sur la sporulation dues à la concentration de l'Azote, présente dans le milieu de culture disparaissent lorsque la culture est aérée pendant 8 jours. D'autre part, il est démontré clairement que la production quantitative de conidiospores de T.harzianum est directement liée à la concentration de la source de Carbone. La source d'Azote, quand à elle, lorsqu'elle n'est pas fournie en quantité trop élevée, ni trop faible, influence peu la production quantitative de conidiospores de T.harzianum.

En effet, pour les cultures en erlen, après 7 jours, il y a une inhibition de la sporulation lorsque la concentration en Azote est trop faible ou trop forte. Ceci a été développé précedemment (§ 3.1.3.a.). De plus, on remarque pour le milieu D que la production de conidiospores après 7 jours de culture en erlen est la plus élevée avec un indice de sporulation de 14,80 x 10^9 conidiospores. Alors que pour le milieu B, dont le rapport molaire N/C est de 0,070, l'indice de sporulation est deux fois inférieur. Cela est dû principalement à l'effet d'inhibition de la sporulation des ions K^+ présents dans le milieu B à une concentration deux fois supérieure à celle du milieu C. Nous y reviendrons dans un chapitre suivant (§ 3.3.4.).

3.3.3. Effets du rapport quantité du milieu de culture sur la surface aérienne libre à la sporulation

La production comparée de conidiospores de T.harzianum en erlen et en fermenteur à disques en fonction du rapport quantité de milieu de culture sur la surface aérienne libre à la sporulation a été rapportée sur le Tableau XI.

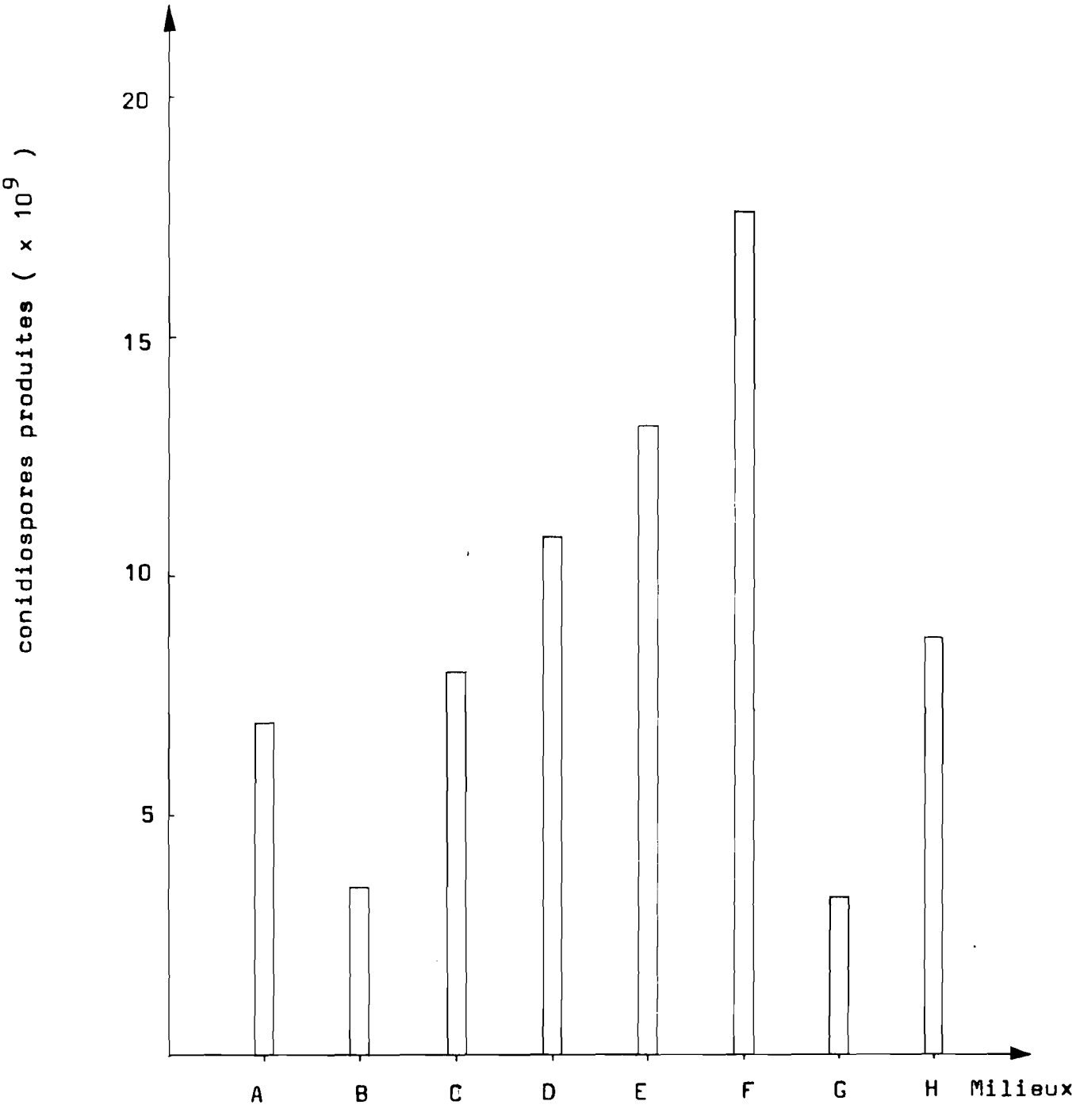


Fig. 10 : Production de conidiospores de T.harzianum cultivé sur différents milieux de culture dans un fermenteur à disques. Les résultats expriment le nombre de conidiospores produites par m molé d'Azote (N) initialement présent dans le milieu (Ω_N).

L'ensemble des cultures en erlen a été fait en utilisant des erlens identiques de 250 ml dont la surface interne à la base était de 45,36 cm^2 environ. De même les cultures en fermenteur ont été ralisées en utilisant un fermenteur à disques à 35 plateaux développant une surface aérienne libre à la sporulation de 4.960 cm^2.

Nous n'avons pas pris en considération, pour le calcul de la surface développée, la surface interne du fermenteur , ni la surface interne des erlens. Etant donné que lors de l'introduction des différents milieux de culture dans les erlens, nous avons pris un soin particulier pour que les milieux soient déposés au fond des erlens, en évitant les projections du milieu sur les parois internes de l'erlen. De même, dans le fermenteur, le milieu était réparti sur les disques. Lorsque ce milieu était en excès il était éliminé du fermenteur avant gélatinisation.

D'autre part, le rapport (Ψ) correspond à la quantité en grammes de milieu de culture présente dans l'erlen ou le fermenteur sur la surface interne de l'erlen (45,36 cm^2). Les résultats ont été présentés de trois manières.

Tout d'abord, le nombre total de conidiospores produites par erlen ou en fermenteur a été donné. Il est suivi du rapport du nombre de conidiospores produites par cm^2 de surface aérienne libre à la sporulation. Enfin, le rapport de l'indice de sporulation sur le rapport a été calculé afin de palier aux variations des quantités des milieux de culture réellement présentes dans les erlens et le fermenteur à disques.

Tout d'abord, on remarque que les valeurs du rapport de la quantité des milieux de culture sur la surface (Ψ) sont très variables pour les cultures en erlens, alors qu'elles sont relativement plus stables pour les cultures en fermenteur. Il faudra par conséquent, interpréter ces résultats avec prudence.

Néanmoins, nous avons obtenu des valeurs pour la production de conidiospores de T.harzianum ramenées au cm^2 de surface aérienne de sporulation en erlen supérieures à celles obtenues en fermenteur. Il semble donc, au vu de ces résultats, que la quantité du milieu de culture, contenue dans les disques du fermenteur, soit faible.

TABLEAU IX . Production comparée de conidiospores de T.harzianum en erlen et en fermenteur à disques. Effets de la concentration de la source de Carbone.
(x 10^9 conidiospores).

Milieux	CULTURE EN ERLEN			CULTURE EN FERMENTEUR		
	A	B	C	A	B	C
Rapport Molaire N/C	0,056	0,070	0,140	0,056	0,070	0,140
Rapport Molaire C/N	17,742	14,194	7,096	17,742	14,194	7,096
Durée d'incubation en jours	12	7	14	13	8	18
Nombre total conidiospores	5,89	7,60	5,5	569	442	155
Ω	4,43	7,38	9,82	11,40	18,60	15,50
Ω_C	0,13	0,22	0,30	0,39	0,57	0,49
Ω_N	2,39	3,17	2,13	6,90	8,00	3,50

Nous pouvons donc envisager d'espacer un peu plus les deux grilles de chaque disque afin de charger les disques d'une quantité supérieure en milieu de culture. En effet, en erlen, pour le milieu H dont le rapport milieu de culture/Surface de sporulation est de 0,34 g/cm^2 , il y a une production de conidiospores de 312 x 10^6 /cm^2 .
Alors qu'en fermenteur lorsque ce rapport est de 0,15 g de milieu/cm^2 , il y a 3 fois moins de conidiospores produites au cm^2 (112 x 10^6 conidiospores/cm^2).

3.3.4. Effets des ions Ca^{++} et K^+ sur la Conidiogénèse

Nous allons examiner d'abord les effets des ions K^+ contenus dans les milieux de culture, sur la production de conidiospores de T.harzianum .

Sur le Tableau XII nous avons porté les concentrations molaires des ions K^+ contenues par litre de milieu de culture. Les milieux de culture ont été divisés en 3 séries. Dans la première série les concentrations en ions K^+ sont proches de 30 m Moles/l, dans la seconde elles sont proches à 15 m Moles de K^+ /l et dans la troisième les concentrations en ions K^+ sont inférieures à 10 m Moles/litre.

Les résultats obtenus à partir de cultures en erlen ou en fermenteur ont été exprimés soit en nombre total de conidiospores produites, soit en utilisant les différents indices de sporulation Ω , ΩC et ΩN.

L'effet " anti-sporulant ", terme déjà employé par GINDRAT (1977), des ions K^+ présents à concentration élevée dans les milieux de culture sur la sporulation, apparaît lorsque l'on compare les résultats obtenus sur les milieux A et G à ceux obtenus sur les milieux B, D et F.

En effet, pour les deux premiers milieux de culture, il y a une inhibition de la sporulation dûe principalement à la concentration élevée de Carbone et d'Azote. Maintenant il faut ajouter également un troisième facteur qui est la concentration élevées des ions K^+.

TABLEAU X. Production comparée de conidiospores de T. harzianum en erlen et en fermenteur à disques. Effets de la concentration de la source d'Azote -(x 10^9 conidiospores).

Milieux	Rapport Molaire N/C	Culture en ERLEN 7 jours nb. total	Ω	Ω_C	Ω_N	Culture en FERMENTEUR 8 jours nb. total	Ω	Ω_C	Ω_N
G	0,141	5,63	7,71	0,15	1,04	357	15,7	0,46	3,3
B	0,070	7,60	7,38	0,22	3,17	442	18,6	0,57	8,0
D	0,048	10,20	14,80	0,45	9,44	350	16,8	0,51	10,8
E	0,037	3,52	7,18	0,22	5,97	358	15,8	0,48	13,1
F	0,031	0,16	0,16	0,005	0,16	330	17,9	0,54	17,6

Pour ces milieux l'indice de sporulation obtenu à partir des cultures en fermenteur est le plus faible de l'ensemble des milieux expérimentés.

De plus, si l'on compare les indices de sporulation obtenus sur les milieux D et F , l'on constate que cet indice est de 16,8 x 10^9 conidiospores pour le milieu F. Alors que ce dernier est plus pauvre en Azote que le précédent. Par contre le milieu F contien 2 fois moins d'ions K^+ .

Nous avons donc utilisé le milieu H dont la composition est très proche de celle du milieu B pour vérifier si les ions Ca^{++} pouvaient annuler cet effet " anti-sporulant" provoqué par les ions K^+ . Le milieu H contient 1 g/l de $CaCl_2$ (9 m Moles de Ca^{++} /l.).

Les résultats ont été spectaculaires aussi bien pour les cultures en erlen qu'en fermenteur.

Tout d'abord pour les cultures en erlen lorsque l'on compare les résultats de sporulation obtenus à partir des milieux B et H on observe quele nombre total de conidiospores produites est doublé. De même les différents indices de sporulation suivent cette évolution.

Pour des cultures en fermenteur les résultats sont moins spectaculaires étant donné que la croissance de T.harzianum est plus avancée. Néanmoins le nombre total de conidiospores obtenu sur le milieu H est 25 % plus élevé que pour le milieu B. De plus, l'indice de sporulation pour le milieu H a été le plus élevé pour l'ensemble des milieux de culture utilisés pour la production de conidiospores dans un fermenteur à disques.

Le même phénomène d'inhibtion de la sporulation dû à des concentrations élevées d'ions K^+ dans le milieu de culture a été obtenu par MICHOUD (1983) en utilisant une souche de Trichoderma album . Il a constaté que lorsque dans le milieu de culture (composé essentiellement de glucose 45 g/l, de KNO_3 21 g/l et de KH_2PO_4 6 g/l) le rapport C/N était égal à 6 , il obtenait 5,5 x 10^3 conidiospores/cm^2. Par contre en utilisant un deuxième milieu contenant seulement 10 g/l de KNO_3 et dont le rapport C/N était de 12, il obtenait 100 fois plus de conidiospores de T. album.

TABLEAU XI. Production comparée de conidiospores de T.harzianum en erlen et en fermenteur à disques. Effets du rapport quantité du milieu de culture/ Surface aérienne libre à la sporulation.

Milieux	CULTURE EN ERLEN Rapport Milieu / Surface Ψ	nb.Total condidio-spores $\times 10^9$	$\frac{\text{nb.spores}}{\text{cm}^2}$ $\times 10^6$	$\frac{\Omega}{\Psi}$ $\times 10^9$	CULTURE EN FERMENTEUR Rapport Milieu / Surface	nb. Total spores $\times 10^9$	$\frac{\text{nb. spores}}{\text{cm}^2}$ $\times 10^6$	$\frac{\Omega}{\Psi}$ $\times 10^9$
A	0,33	5,89	130	2,8	0,11	569	114	104
B	0,60	7,6	167	12,3	0,13	442	89	143
C	0,64	5,5	121	16,6	0,10	155	31	155
D	0,40	10,20	225	37,0	0,11	350	71	153
E	0,29	3,52	78	24,8	0,12	358	72	132
F	0,56	0,16	4	0,3	0,10	330	67	179
G	0,68	5,63	124	11,3	0,13	357	72	121
H	0,34	14,14	312	77,0	0,15	558	112	135

Cet auteur a utilisé un fermenteur à disques et des milieux gélosés pour la production en grande quantité de conidiospores de T. album . Si l'on compare les résultats obtenus en fermenteur à disques pour T.harzianum il y a eu production de $1,12 \times 10^8$ conidiospores par cm^2 . Alors que pour T.album MICHOUD (1983) a obtenu 5×10^5 conidiospore/ cm^2. Il semble donc que la composition du milieu de culture pour la production de conidiospores joue un rôle primordial. Un équilibre Carbone/Azote et K^+ / Ca^{++} reste à déterminer pour chaque microorganisme avant d'utiliser des appareils sophistiqués pour la production en grande quantité de conidiospores à des fins bioindustrielles.

L'effet d'induction de la sporulation de Pennicillium notatum par Ca^{++} a été également démontré par PITT et POOLE (1981). Ces auteurs, ont mis en évidence le phénomène d' induction de la sporulation de P.notatum lorsque dans le milieu de culture la source d'Azote est fournie sous forme de $NaNO_3$ (6,0 g/l) et qu'il y a du KH_2PO_4 (1,5 g/l) et du $CaCl_2$ (10 m Moles Ca^{++}). A cette concentration d'ions Ca^{++} l' indice de sporulation pour P.notatum est 20 fois supérieur à celui obtenu sur un milieu dépourvu de $CaCl_2$.

L'addition d'ions Ca^{++} dans un milieu de culture contenant des ions Na^+, K^+ et Mg^{++}, contribue à rétablir l'équilibre osmotique nécessaire à la sporulation de P. notatum et fortement abaissé par l'apport d'ions Na^+, K^+ et Mg^{++} (PITT et POOLE, 1981).

TABLEAU XII .Production comparée de conidiospores de T.harzianum en erlen et en fermentateur à disques. Effets des ions Ca^{++} et K^{+} sur la conidiogénèse de T.harzianum ($x10^9$ conidiospores).

Milieux	m Moles K^+/l	Culture en erlen 7 jours				Culture en Fermenteur			
		Nombre Total	Ω	Ω_C	Ω_N	Nombre Total	Ω	Ω_C	Ω_N
A	29,40	1,22	0,92	0,03	0,50	569	11,4	0,39	6,9
G	29,40	5,63	7,71	0,15	1,04	357	15,7	0,46	3,3
B	14,70	7,60	7,38	0,22	3,17	442	18,6	0,57	8,0
H	14,70	14,14	26,20	0,73	10,40	558	20,2	0,61	8,7
C	7,35	5,00	10,60	0,32	2,28	155	15,5	0,49	3,5
D	7,35	10,20	14,80	0,45	9,44	350	16,8	0,51	10,8
F	3,67	0,16	0,16	0,005	0,16	330	17,9	0,54	17,6

4. CONCLUSION

Lors des études sur la conidiogénèse de T.harzianum cultivé en erlen et en fermenteur a disques, les principaux paramètres capables d'influencer la production quantitative de conidiospores ont été examinés : mode d'inoculation, quantité de la source de Carbone et d'Azote, addition de Calcium, concentration de Potassium dans les milieux de culture, aération, durée d'incubation.

Ces paramètres ont été étudiés séparément afin d'apprécier la contribution de chacun d'eux au niveau de la sporulation de T. harzianum .

Tous ces paramètres considérés jouent un rôle important au niveau de la croissance végétative du champignon et les variations observées au niveau de la conidiogénèse reflètent l'importance de ces facteurs.

Il a été démontré que suivant le mode d'inoculation employé pour ensemencer les milieux de culture, la production de conidiospores était différente. Cette production était augmentée de 50 % pour l'inoculation dans la masse des milieux de culture par rapport à l'inoculation en surface de mêmes milieux.

Le paramètre qui influence le plus la production quantitative de conidiospores de T.harzianum est la concentration de la source de Carbone des milieux.

Il a été démontré que le nombre total de conidiospores produites est proportionnel à la concentration de la source de Carbone. Cependant, lorsque les valeurs de celles-ci sont inférieures à 50 g/l, la production de conidiospores se fait avec des rendements élevés. Au contraire, lorsque les concentrations en substrat carboné sont supérieures ou égales à 50 g/l, même si le nombre total de conidiospores produites reste supérieur dans l'ensemble, les rendements commencent à diminuer.

Par contre le nombre de conidiospores produites n'est pas proportionnel à la quantité d'Azote présente dans les milieux de culture. Cependant la concentration d'Azote influence beaucoup la conidiogénèse.

Une étude cinétique de production des conidiospores de T.harzianum a révélé les phénomènes d'induction-inhibition exercés par la concentration d'Azote . Pour des concentrations faibles en Azote d'un milieu de culture la production de conidiospores est inhibée pendant 15 jours; de même pour des concentrations élevées en Azote les rendements de sporulation obtenus étaient plus faibles.

Des phénomènes d'induction-inhibition exercés par la concentration de la source de Carbone ont été mis en évidence lors de l'étude cinétique de production de conidiospores de T.harzianum . Pour des concentrations faibles en Carbone, il y a une induction précoce , pour des concentrations élevées il y a par contre inhibition de la conidiogénèse pendant plusieurs jours.

Les sels minéraux à des concentrations élevées, produisent des effets opposés sur la croissance et la sporulation de Trichoderma. Le Potassium provoque une diminution du potentiel osmotique et de ce fait inhibe la sporulation . Le calcium annule cet effet et induit la sporulation.

A la suite de cette étude, nous avons défini un milieu et des conditions de culture optimales pour produire dans un fermenteur à disques le maximum de conidiospores de T.harzianum dans un minimum de temps avec des rendements de sporulation élevés.

5. BIBLIOGRAPHIE

AUFEUVRE, M.A.. 1980. Augmentation de la production de spores par la souche Aspergillus niger n° 10. Rapport interne ORSTOM 43 pp.

BRODERICK, A.J. et R.N. GREENSHIELDS. 1982. Semi-continuous and continuous production of Aspergillus niger spores in submerged liquid culture. J. gen. Microbiol. 128 : 2639 - 2645.

GALBRAITH, J.C et J.E. SMITH. 1969. Sporulation of Aspergillus niger in submerged liquid culture. J. Gen. Microbiol. 59 : 31-45

GINDRAT, D. 1977 . Effets des concentrations élevées de sels sur la croissance, la sporulation et la pigmentation de Trichoderma spp. Can. J. Microbiol. 23 : 607-616.

JEREBZOFF, S., JEREBZOFF-QUINTIN, S. et F. NYSTERAKIS. 1970 Rôle de l'équilibre K^+ - Na^+ et de l'isolencine dans le déclenchement du rythme interne de zonation chez Aspergillus niger Van Tieghem. C.R. Acad. Sci. (Paris) 271 Sér. D : 1522 - 1525.

JEREBZOFF, S., JEREBZOFF-QUINTIN, S. et E. LAMBERT. 1976 L'induction du rythme endogène de sporulation chez Aspergillus niger : Rôles du rapport glucose/ potassium et de micro-éléments. Physiol. Plant. 36 : 279 - 286

LILLY, V.G. 1965. Chemical constituents of fungal cells. The Fungi, Vol. I, (AINSWORTH and SUSSMAN, A., eds) Ch. 8 : 163-177

MARTINELLI; S.D.. 1976 . Conidiation of Aspergillus nidulans in submerged culture. Trans. Br. Mycol. Soc. 67 :121-128

MEANS, C.W., SAVAGE; G.M., REUSSER, F. et H.J. KOEPSELL. 1962. Design and operation of a pilot plant fermentor for the continuous propagation of filamentous micro-organisms. Biotechnol. Bioeng. 4 : 5-16.

MICHOUD, L. 1983. Production de spores de Trichoderma album en culture de surface; Mise au point de Bioréacteurs; Etude de la germination. Mémoire de 5ème année. 25 p. ENSBANA, Université de Dijon.

PITT, D. et P.C. POOLE. 1981. Calcium-induced conidiation in Penicillium notatum in submerged culture. Trans. Br. Mycol. Coc. 76 : 219-230.

RAIMBAULT, M. et S. ROUSSOS. 1981. Procédé de production de spores de champignons filamenteux. Demande de Brevet d'invention à l'A.N.V.A.R.

ROUSSOS, S. et M. RAIMBAULT. 1982. Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. I. Screening des souches cellulolytiques Ann. Microbiol. 133 : 455-464.

SLAYMAN, C.W et E.L. TATUM. 1964. Potassium transport in Neurospora. I Intracellular sodium and potassium concentrations and cation requirements for growth. Biochim. Biophys. Acta. 88 : 578-592.

SMITH, J.E. 1978. Asexual sporulation in Filamentous fungi in: The filamentous Fungi Vol. III. Developmental Mycology (J.E. SMITH and D.R. BERRY eds.) E. Arnold Press. London.

TOYAMA, N. 1976. Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes Trichoderma viride cellulases. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 : 207-219

VEZINA, C., SINGH, K. et S.N. SEHGAL. 1965. Sporulation of filamentous fungi in submerged culture . Mycologia 57 : 722-736.