



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA / IZTAPALAPA

8-760 M
12.5

THESES EN

BIOTECHNOLOGIE

CROISSANCE DE Aspergillus niger SUR MILIEU SOLIDE:

IMPORTANCE DE L'EAU ET DE L'ACTIVITE DE L'EAU

PRESENTEE PAR: Eric ORIOU

ORSTOM

INSTITUT FRANCAIS
DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION

No. 1

THESE

présentée

devant l'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

en vue de l'obtention

Du DIPLOME De DOCTEUR NOUVEAU REGIME

Spécialité : Microbiologie

par

Eric ORIOL

CROISSANCE DE ~~ASPERGILLUS NIGER~~ SUR MILIEU SOLIDE:

IMPORTANCE DE L'EAU ET DE L'ACTIVITE DE L'EAU

soutenue le : 27 Juin 1987 devant la commission d'examen

MM : G. DURAND

L. CHAVANT

G. GOMA

M. RAIMBAULT

Professeur INSA Toulouse

Professeur Pharmacie Toulouse

Professeur INSA Toulouse

Directeur de Recherches ORSTOM



122-58001

200-10

100-10

F 26.452 ex 1

Cette thèse a été réalisée au Département de Biotechnologies de la UNCT-Iztapalapa et au Département de Chimie Biochimique et Alimentaire de l'INRA Toulouse, dans le cadre de la Coopération Scientifique entre l'OPSTOM (France) et le CONACYT (Mexique). L'auteur de cette thèse remercie le CONACYT, l'INRA et la CEE pour leur aide financière ainsi que Mr. Boris PISOUZCO, Mr. Wilfredo RODRIGUEZ et Mr. Sébastien ROUSSEAU pour l'édition de cet ouvrage.



Universidad Autónoma
METROPOLITANA/ IZTAPALAPA.

Ax. Michoacán y La Paz, Iztapalapa,

Apertado postal 55-532, México 13, D.F.

Teléfono: 686-83-22, 686-16-11



INSTITUT FRANÇAIS
DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

MISSION OPSTOM-MEXIQUE

Calle Homero 1804-804
Colonia Los Morales
11510 México, D. F.

NOM : ORIOL

Prénom : Eric

COISSANCE DE ASPERGILLUS NIGER SUR MILIEU SOLIDE: IMPORTANCE DE L'EAU ET DE L'ACTIVITE DE L'EAU

pages, Thèse de Doctorat Nouveau Régime, Microbiologie, INSA de Toulouse, 1987

RESUME:

Un calcul théorique ayant montré que la culture de Aspergillus niger sur milieu solide d'amidon de manioc était limitée par la disponibilité de l'eau dans le substrat, l'introduction de 20% d'un support lignocellulosique à forte capacité de rétention d'eau a permis d'augmenter l'activité de l'eau du milieu et, ainsi, d'accélérer et améliorer le processus fermentatif. L'extension de la notion de support a ensuite conduit à pratiquer des cultures de A.niger sur un milieu liquide dissous absorbé sur une phase solide. Dans un tel système, l'activité de l'eau de la solution d'impregnation, la taille des particules du support et la quantité d'inoculum de spores ont été les paramètres importants de la croissance des champignons. Ce type de culture a permis d'utiliser des milieux liquides glucosés très concentrés (400 g/l) qui sont assimilés pour la croissance en 40 h. Une étude microcalorimétrique a mis en évidence l'existence d'une phase exothermique située entre la germination et la croissance exponentielle.

MOTS CLES :

Fermentation solide, Aspergillus niger, eau, activité de l'eau, manioc, support.

JURY:

Date de soutenance: 22 Juin 1987

Président : G. Durand

Professeur INSA Toulouse

Membres : L. Chavant

Professeur Pharmacie Toulouse

G. Goma

Professeur INSA Toulouse

M. Raimbault

Directeur de Recherches ORSTOM

a Josefina

a ma famille

a mis compaños mexicanos

Je tiens tout d'abord à remercier Mr le Professeur G. Durand pour avoir bien voulu présider ce jury et pour m'avoir accueilli dans le Département de Génie Biochimique et Alimentaire de l'INSA de Toulouse pendant la rédaction de la présente thèse.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Professeur G. Goma pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour les facilités qu'il m'a accordées afin de compléter et mettre en forme les recherches effectuées au Mexique.

Les travaux faisant l'objet de ce mémoire ont été réalisés en majeure partie au sein du département de Biotechnologie de l'Université Autonome Métropolitaine unité Iztapalapa de Mexico sous la responsabilité de Monsieur le Professeur O. Monroy. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Cette étude a été menée sous la direction conjointe de Monsieur le Professeur G. Viniegra-Gonzales, Chef du Laboratoire de Microbiologie de la UAM et de Monsieur M. Raimbault, Directeur de Recherche à l'ORSTOM, ils m'ont, grâce à leurs compétences et leurs qualités humaines permis de mener à bien ce travail et je tiens à les remercier chaleureusement.

J'exprime ma gratitude à Monsieur le Professeur L. Chavant pour avoir accepté de juger ce travail.

Je me dois d'associer à ce travail Monsieur S. Roussos dont l'aide m'a été précieuse dans l'accomplissement de mes recherches, et lui témoigne ici de ma plus vive sympathie.

Je tiens également à remercier Mmes M. Trejo, B. Schettino et T. Cruz pour leur collaboration efficace ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire de Microbiologie de la UAM pour leur amitié et leur soutien.

Je remercie l'OEА, l'ORSTOM et le CONACYT pour leur soutien financier.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	7
PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
LA FERMENTATION SOLIDE (FS)	
I. DEFINITION	10
II. APPLICATIONS DE LA FS.....	11
II-1. Préparation d'aliments fermentés traditionnels.....	11
II-2. Production d'aliments fermentés enrichis en protéines (AFEP).....	11
II-3. Production d'enzymes.....	15
II-3.1. Amylases.....	15
II-3.2. Protéases.....	16
II-3.3. Cellulases.....	16
II-3.4. Pectinases.....	17
II-4. Production d'acides organiques.....	18
II-5. Production de métabolites secondaires.....	18
II-6. Production de spores.....	19

III. REVUE CRITIQUE DES CARACTERISTIQUES DE LA FS.....	19
III-1. Particularités du développement mycélien.....	19
III-2. Humidité; Activité de l'eau (Aw).....	22
III-2.1. Généralités.....	22
III-2.2. Forme de l'eau dans les substrats solides.....	22
III-2.3. Influence sur la croissance et le métabolisme.....	23
III-2.4. Contrôle de l'humidité.....	25
III-3. Aération, échanges gazeux.....	28
III-4. Chaleur métabolique.....	29
III-5. pH.....	30
III-6. Estimation de la biomasse en FS.....	30
III-7. Conclusion.....	32
 DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES.....	 34
I. MATERIEL BRUT.....	35
II. CONSERVATION DES SOUCHES ET OBTENTION DE SPORES.....	35
III. METHODE DE CULTURE.....	36
IV. METHODES D'ANALYSE.....	37

IV-1. Gazométrie.....	37
IV-2. Analyse des échantillons de culture.....	38
IV-2.1. Poids sec.....	38
IV-2.2. Protéines.....	38
IV-2.3. Sucres.....	38
IV-2.4. Acides nucléiques.....	39
IV-2.5. Glucoamylases.....	39
IV-3. Mesure de l'activité de l'eau.....	40
IV-4. Microcalorimétrie.....	40
IV-5. Estimation de la croissance à partir des vitesses de consommation d'oxygène.....	40
TROISIEME PARTIE: RESULTATS.....	44
I. ETUDE DE L'EAU DANS LA CULTURE DE <u>A. NIGER</u> SUR AMIDON DE MANIOC.....	45
I-1. Sorption de l'eau sur la farine de manioc.....	45
I-2. Croissance de <u>A.niger</u> sur amidon de manioc.....	47
I-2.1. Cinétique de croissance.....	47
I-2.2. Evolution de l'eau et de l'Aw pendant la croissance.....	49
I-2.3. Conclusion.....	55

1-3. Croissance sur un mélange	
amidon de manioc/fibres de bagasse.....	55
1-3.1. Introduction.....	55
1-3.2. Sorption de l'eau sur la bagasse.....	56
1-3.3. Influence de la proportion de fibres.....	57
1-3.4. Influence de la teneur d'eau.....	58
* Croissance.....	58
** Synthèse de glucoamylases.....	64
1-4. Conclusion.....	65
II. CULTURES DE <u>A. NIGER</u> SUR SUPPORT.....	67
II-1. Introduction.....	67
II-2. Etude des paramètres de la croissance	
de <u>A.niger</u> sur bagasse imprégnée.....	69
II-2.1. Influence de la concentration	
d'une solution de glucose et de sels	
sur l'Aw initiale.....	69
II-2.2. Quantité d'eau.....	70
II-2.3. Concentration de glucose dans	
la phase liquide.....	71
II-2.4. Taille des particules de support.....	78

II-2.5. Quantité d'inoculum.....	81
II-3. Conclusion.....	84
III. MICROCALORIMETRIE.....	87
III.1. Introduction.....	87
III.2. Aspects méthodologiques.....	88
III.3. Analyse thermochimique de la croissance de <u>A.niger</u> sur farine de manioc.....	88
III-4. Analyse thermochimique de la croissance de <u>A.niger</u> sur support imprégné.....	90
III-4.1. Effet de la concentration de glucose dans la phase liquide.....	90
III-4.2. Effet de la quantité d'inoculum de spores.....	93
III-5. Conclusion.....	94
CONCLUSION GENERALE.....	100
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	103

INTRODUCTION

Les techniques de fermentation solide (FS) de champignons filamenteux employées depuis des centaines d'années en Extrême-Orient pour la préparation d'aliments, ont depuis la fin des années 60 connu un regain d'intérêt. Les faibles coûts d'investissement et de fonctionnement de l'appareillage mais aussi de traitement des produits obtenus ont fait qu'un certain nombre d'auteurs y ont vu une alternative séduisante pour la production de protéines unicellulaires à partir de substrats amylacés de faible valeur ou de déchets agricoles lignocellulosiques. Hélas, le plus souvent, les résultats encourageants obtenus au laboratoire ont été difficilement reproductibles lors de l'extrapolation et peu de procédés ont débouché sur des applications durables. Ces retards pris par la FS peuvent s'expliquer d'une part par un manque d'instrumentation adaptée, mais également par le faible niveau des connaissances relatives à la physiologie de croissance et au métabolisme des champignons en milieu solide.

La fermentation solide présente en effet des particularités par rapport à la fermentation liquide comme le mode de croissance du mycélium, les conditions de transfert de masse de l'oxygène et d'accumulation de la chaleur métabolique et la faible teneur en eau du substrat. En ce qui concerne le dernier point, une revue des travaux effectués sur le thème montrent que non seulement la quantité d'eau est importante mais aussi la disponibilité de celle-ci, concept représenté physiquement par l'activité de l'eau.

L'objet du présent travail a été dans un premier temps d'utiliser un modèle connu: la fermentation de la farine de manioc par *Aspergillus niger*, pour prédire dans les conditions normales de culture l'évolution de l'activité de l'eau du substrat. Ces études préliminaires ont montré l'intérêt qu'il y avait à introduire un support à forte capacité de rétention d'eau, lequel permet de doubler les quantités d'eau présentes et d'augmenter ainsi sensiblement l'activité de l'eau dans le substrat.

Les limites du modèle constitué par le manioc pour la fermentation solide nous ont conduits à étendre la notion de support, et à envisager un autre type de culture qui fait appel à des milieux nutritifs liquides absorbés sur un support solide biologiquement inerte. Ce type de culture étudié par gazométrie en colonne mais aussi par microcalorimétrie a fourni des résultats intéressants sur la physiologie de croissance des champignons en milieu solide et ouvre le champ à de nouvelles applications.

PREMIERE PARTIE :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

LA FERMENTATION SOLIDE (FS)

LA FERMENTATION SOLIDE (FS)

I. DEFINITION

Le terme fermentation solide, traduction de l'anglais solid state culture ou solid state fermentation a fait l'objet de nombreuses définitions: pour Hesseltine (1977) il décrit une fermentation dans laquelle le substrat n'est pas liquide, pour Moo-Young et col. (1982) il désigne un processus où le microorganisme utilise des matériaux insolubles pour sa croissance et son métabolisme. Dans le cadre de notre travail, la définition proposée par Aldoo et col. (1982) selon laquelle la fermentation en milieu solide englobe toute fermentation qui a lieu sur un substrat solide ou semi-solide ou sur un support solide nutritionnellement inerte, semble mieux adaptée.

En fait certaines de ces définitions n'excluent pas entièrement les procédés faisant appel à des substrats solides, par exemple cellulosiques, en suspension dense dans des milieux liquides (André et col. 1982) et nous proposons une définition plus précise où la fermentation solide désigne une culture microbienne en surface et à l'intérieur d'une matrice poreuse solide qui peut être substrat ou support et ce, en l'absence d'écoulements d'eau.

Le matériel solide est généralement sous une forme fragmentée, granulaire ou fibreuse qui permet de retenir l'eau par hygroscopie ou capillarité. Selon le type de matériel utilisé, la quantité d'eau présente varie énormément, les substrats amylacés (riz, manioc, orge, etc...) sont généralement fermentés entre 25 et 60% d'humidité initiale tandis que les substrats en majorité cellulosiques (sons, bagasses, pailles etc...) permettent de travailler dans des gammes d'humidité initiale de 60 à 80% sans apparition de drainages d'eau.

Les microorganismes cultivés en milieu solide sont dans la plupart des cas des champignons filamenteux. En effet ces milieux sont semblables à leurs milieux naturels (sols) et leur forme de développement végétatif constituée par des hyphes aériens ramifiés est propice à la colonisation de matrices solides poreuses. De plus les champignons filamenteux peuvent se développer avec des humidités aussi basses que 12% et supportent des pressions osmotiques élevées (Beuchat, 1983) caractéristiques que ne présentent pas en général les levures et les bactéries.

II APPLICATIONS DE LA FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE

II-1. Préparation d'aliments fermentés traditionnels

C'est en Extrême-Orient que furent développées voici quelques siècles des FS traditionnelles destinées à améliorer les qualités nutritives et organoleptiques d'un certain nombre de produits agricoles comme le riz, le soja, le blé ou la coprah.

Ces aliments dont un grand nombre sont encore élaborés artisanalement font appel à des cultures plus ou moins pures de champignons appartenant aux genres Aspergillus (Miso et Shoyu japonais), Rhizopus (Tempeh Indonésien), Mucor (Ragi) mais aussi parfois de levures et de bactéries.

Le procédé de fabrication le plus célèbre est le procédé "koji" où le substrat constitué de grains de riz ou de soja est cult à la vapeur, refroidi puisensemencé avec une solution de spores de A. oryzae. Il est ensuite disposé dans des plateaux de bois laissés à incubation 48 h dans une étuve tempérée et ventilée. Le produit pris en masse est ensuite extrait à l'eau pour l'obtention d'un jus à forte activité enzymatique utilisé ultérieurement dans l'élaboration d'autres aliments ou boissons tels le Miso et le Sake.

Les aliments fermentés orientaux et leurs procédés de préparation ont fait l'objet de monographies exhaustives (Hesseltine, 1965; Steinkraus, 1983) sur lesquelles nous ne reviendront pas.

On considère également comme faisant partie des FS traditionnelles, l'élaboration des fromages fermentés français de type camembert ou roquefort caractérisés par la croissance superficielle ou profonde de champignons du genre Penicillium.

II-2. Production d'aliments fermentés enrichis en protéines (AFEP)

Les années 70-80 ont vu se développer un grand nombre de travaux consacrés à la production d'AFEP par fermentation en milieu solide. La simplicité des procédés, la relative rudimentarité du matériel utilisé, l'obtention de produits concentrés sans génération de grandes quantités d'effluents liquides polluants et enfin la possibilité d'utiliser le produit fermenté tel quel pour l'alimentation animale ont représenté autant d'arguments pour le développement de la fermentation solide de moisissures.

Globalement on peut distinguer deux grands types de substrats: les substrats amylicés de faible valeur commerciale (manioc, déchets de banane) et les sous-produits agricoles lignocellulosiques (pailles, bagasses), le Tab. 1 résume les résultats obtenus durant les dernières années dans ce domaine.

En ce qui concerne l'enrichissement protéique de substrats agricoles amylicés, on rencontre de grandes différences dans les niveaux de protéines obtenus. Cela peut être dû premièrement à un manque d'uniformité dans l'expression des résultats, certains auteurs se rapportant au poids sec initial et d'autres au poids sec final certains parlant de protéine brute et d'autres de protéine vraie, tant il est vrai que les difficultés rencontrées pour mesurer la biomasse (cf. III-6.) n'aident pas à la standardisation des résultats. Quoiqu'il en soit 25% de protéines paraît être un maximum difficilement dépassable si l'on considère la faible teneur en protéines des champignons (25 à 40%) comparée par exemple à celle des bactéries ou des levures qui peut aller jusqu'à 60%. D'autre part un certain nombre de problèmes rencontrés lors de l'extrapolation de ces procédés, et décrits par ailleurs, ont empêché jusqu'alors leur application industrielle.

Tableau 1: Production d'aliments fermentés enrichis en protéines par fermentation en milieu solide.

Microorganisme	Substrat	Temps (h)	X (%)	n (%)	Y (%)	Référence
Substrats amylicés						
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Manioc	45	3	-	-	Stanton et col.(1969)
<i>Aspergillus niger</i>	Banane	72	17	-	-	Sethi et col.(1978)
<i>Aspergillus niger</i>	Manioc	25	11	60	18	Raimbault et col.(1980)
<i>Aspergillus niger</i>	Manioc	50	-	-	-	Carrizales et col.(1980)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Manioc	48	22	50	46	Ramos-Valdida et col.(1983)
<i>Aspergillus niger</i>	Banane	43	12	24	50	Baldensperger et col.(1985)
<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	Manioc	48	30	-	-	Smith et col.(1986)
Substrats divers						
<i>Aspergillus niger</i>	Déchets de manque	72	12	30	41	Sethi et col.(1981)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Cossette de betterave	60	6-10	-	-	Roussos et col.(1983)
<i>Aspergillus niger</i>	Déchets de citron	48	13	-	-	Rodriguez et col. (1985)
<i>Aspergillus niger</i>	Pulpe de café	43	6	21	28	Penaloza et col.(1985)
<i>Trichoderma viride</i>	Déchets d'ananas	120	14	30	46	Gonzales et col.(1985)
Substrats celluloliques						
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Paille d'avoine	48-72	11	21	52	Han et col.(1975)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Sciure de bois	480	7	64	11	Pamment et col.(1978)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Paille de blé	120	18	48	36	Chahal et col.(1981)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Paille de blé	168	12	33	36	Viesturs et col.(1981)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i> +levure	Paille de blé	144	13	43	32	Abdullah et col.(1985)
<i>Trichoderma reesei</i> +levure	Paille et son de blé	168	12	38	33	Laukevics et col.(1984)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Paille de blé	-	13	-	-	Hecht et col.(1985)

X: Enrichissement protéique, Pf - Po (% PS)

n: Consommation de substrat, So - Sf (% PS)

Y: Taux de conversion du substrat à protéine, X/n (%)

La valorisation des sous produits agricoles lignocellulosiques se heurte elle aussi à un certain nombre de barrières en majorité non spécifiques de la fermentation en milieu solide:

- Le degré de conversion du substrat en fermentation solide est plus bas qu'en milieu liquide et les coefficients de maintenance résultent plus élevés. Ceci peut être compensé par une productivité volumétrique deux fois plus importante (Laukevics et col., 1984).

- Un prétraitement alcalin, thermique et parfois combiné de la cellulose est indispensable pour faciliter l'accessibilité de la cellulose (Chahal et col., 1981; Ulmer et col., 1981; Abdullah et col., 1985) et ces opérations alourdissent considérablement le coût de revient final de l'AFEP.

- La faible teneur en protéines des champignons cellulolytiques et leur difficulté à assimiler tous les sucres libérés par l'action des cellulases sont deux inconvénients majeurs qui peuvent être contournés en pratiquant des fermentations mixtes champignon-levure ou champignon-bactérie (Abdullah et col., 1985). Ceci présente en outre l'avantage de faire disparaître immédiatement le glucose et de participer ainsi à la levée de l'inhibition de la synthèse de cellulases chez le champignon. Ainsi, les niveaux de protéines atteints lors des cultures mixtes sont bien supérieurs à ceux des cultures pures de champignons cellulolytiques.

La tendance actuelle dans le domaine de la production de protéines unicellulaires à partir de cellulose porte sur un procédé en deux étapes: une première étape de saccharification du substrat par des cellulases et une seconde proprement dite de fermentation sur l'hydrolysât (Laukevics et col., 1984; Tanaka et col., 1985). Dans ce cas la fermentation solide pourrait intervenir au niveau de la production de cellulases (cf. II-3.3.)

Enfin, en raison des particularités des procédés de dégradation de la lignine (pressions partielles de O₂ et CO₂ élevées, temps d'incubation prolongés) ne figurent pas dans le tableau 1 un grand nombre d'études récentes sur la transformation de substrats lignocellulosiques par fermentation solide à l'aide de pourritures blanches des genres Stropharia (Kamra et col., 1985), Phanerochaete et Polyporus (Levonen-Munoz et col., 1985).

11-3. PRODUCTION D'ENZYMES

11-3.1. Amylases

C'est en s'inspirant de la fabrication du "Koji", qui produit un jus à haute activité enzymatique que Takamine (1916) a développé le premier procédé industriel de production d'amylases. Le substrat était un mélange de son de blé et d'amidon, humidifié avec une solution saline et ensemencé avec des spores d'Aspergillus oryzae. Le fermenteur comportait des plateaux sur lesquels le substrat était distribué en couches. Après plusieurs jours d'incubation le produit était récolté et les enzymes extraites à l'eau puis précipitées. Ce procédé connu sous le nom de "Mouldy Bran Process" a été utilisé pendant des dizaines d'années pour la production de la Takadiastase, un complexe enzymatique amylolytique.

Plus récemment d'autres auteurs se sont intéressés à la production d'amylases et glucoamylases dans le procédé "koji" et notamment à l'importance de l'environnement gazeux sur les quantités d'enzymes synthétisées. Bajracharya et Mudgett (1980) rapportent un accroissement de production lorsque le milieu est soumis à une oxygénation intense et une réduction lorsque la pression partielle de CO_2 est importante. Narahara et al. (1982) rencontrent un maximum d'activité -amylasique dans les conditions suivantes: 35% d'humidité du substrat, pression partielle de CO_2 de 2% et température de 38°C.

L'attention de nombreux auteurs s'est également portée sur les caractéristiques cinétiques et biochimiques de la glucoamylase produite en fermentation solide dans le procédé "koji", ainsi Mitsue et col. (1979) mettent en évidence trois formes de glucoamylases (I, II et III) de poids moléculaires différents et de comportements cinétiques distincts selon le substrat de réaction utilisé. Pour Ueda (1981) les formes de glucoamylases II et III sont le résultat de la dégradation par des hydrolases des protéines ou de la partie glycosidique de la forme I et n'ont pas les mêmes propriétés vis à vis de l'amidon. Toutes ces recherches ont pour but d'isoler des enzymes capables d'hydrolyser l'amidon cru et dans cette optique, la capacité d'adsorption de l'enzyme à son substrat (Medda et col., 1982) et son activité débranchante (Ueda, 1981) semblent être les qualités recherchées. L'utilisation de telles enzymes aurait pour but d'éviter l'étape de gélatinisation de l'amidon, coûteuse en énergie, dans les procédés de saccharification de substrats amylics tels le riz et le manioc pour la production d'alcool (Sato et col. 1985).

Les amylases produites lors de la fermentation solide du manioc par A.niger ont également été étudiées et comparées avec celles issues de la fermentation liquide (Alazard et Rimbault, 1981, Alazard et Baldensperger, 1982). Ces résultats montrent la quasi-absence d' -amylases lorsque le champignon est cultivé en milieu solide mais aussi des caractéristiques différentes des glucoamylases: optimum de pH abaissé, optimum de température élevé de 10°C, thermotolérance accrue.

Les bons rendements de production de glucoamylases obtenus en FS ont amené Ghildyal et col. (1985) à effectuer une analyse économique comparant le procédé de FS avec la fermentation liquide. Il en ressort que la FS, grâce à son faible coût d'investissement et à la concentration élevée de l'enzyme produite est plus rentable, et ce en prenant les estimations les plus pessimistes pour le milieu solide.

II-3.2. Protéases

Comme nous l'avons vu précédemment les protéases jouent un rôle important dans l'élaboration des aliments fermentés orientaux traditionnels. L'action des protéases du "koji" sur les protéines végétales du soja ou des céréales libère des amino-acides à potentiel aromatique et donne au produit final ses caractéristiques organoleptiques. Fukushima (1982) a décrit avec précision le complexe protéolytique du "koji" et a montré que la gamme de protéases et peptidases produites par A. oryzae en milieu solide est beaucoup plus étendue qu'en milieu liquide.

Si l'on fait exception de la production de "koji", la littérature contient assez peu de références relatives à la production de protéases en milieu solide, seuls Hesseltine (1977) et Arima (d'après Aldoo et col., 1982) rapportent l'existence d'un procédé industriel de production de protéases de Mucor pusillus par FS, sans doute sur la base du procédé "koji".

II-3.3. Cellulases

La saccharification de la cellulose par voie enzymatique, si elle représente un enjeu considérable, n'a pas jusqu'alors débouché sur des applications industrielles à cause d'une part du coût de prétraitement des résidus lignocellulosiques et d'autre part du coût des enzymes, ce dernier représentant près de 60% du prix total de production. La nécessité de produire des cellulases moins chères a donc conduit un certain nombre de chercheurs à entreprendre des études sur les procédés de FS.

Toyama (1976) a le premier adapté le procédé "koji" à la production de cellulases par Trichoderma reesei sur un substrat constitué de paille et de son de riz (80/20). Ensuite un grand nombre de travaux ont suivi, ayant pour but d'optimiser les conditions de culture; les espèces utilisées appartiennent en majorité au genre Trichoderma (Vilela et col., 1977; Deschamps et col., 1985) mais aussi Talaromyces (Nishio et col., 1981), Pestalotiopsis (Rao et col., 1983) ou Sporotrichum (Hoe-Kim et col., 1985). Chahal (1985) travaillant avec T. reesei sur paille de blé fait état de rendements de FS supérieurs à ceux de la fermentation liquide. D'autres travaux ont visé à produire une enzyme spécifique du complexe cellulasique comme la α -glucosidase (Deschamps et col., 1984).

Dans les procédés de FS, la récupération des cellulases se fait le plus souvent par extraction à l'eau, ce qui dilue l'enzyme de 4 à 5 fois et fait perdre en partie un des avantages de la FS qui est l'obtention d'un produit concentré. Récemment, Roussos (1985) cultivant T. harzianum sur bagasse de canne à sucre, a mis un point un procédé d'extraction qui met à profit les propriétés "d'éponge" du matériau pour récupérer les cellulases par simple pressage du produit de fermentation. Cette technique a permis d'obtenir des jus concentrés (82 U.CMC/ml).

L'avenir de la FS pour la production de cellulases passe par une meilleure connaissance de la physiologie des champignons (mécanismes d'induction et de répression de la synthèse, absorption sur le substrat et diffusion dans la matrice solide) mais aussi par une amélioration des procédés d'extraction.

Enfin, nous ne ferons que mentionner la production par FS d'enzymes destinées au traitement des sous-produits du bois comme les xylanases (Kitpreechavanich et col., 1984).

II-3.4. Pectinases

La synthèse de pectinases par FS a été rapportée par Mushikova et col. (1978) avec A. awamori et un peu plus tard par Ghildyal et col. (1981), utilisant du son de blé ensemencé avec A. carbanerius et qui ont obtenu jusqu'à 120 U/g de substrat. Mais ces travaux isolés ne semblent pas avoir connu de suite.

11-4. Production d'acides organiques

En général, les procédés faisant appel à la FS pour la production d'acides organiques datent du début du siècle; il en est ainsi pour l'acide gallique, l'acide gluconique (Herrick et May, 1928) et l'acide kojique.

Le seul acide qui ait fait l'objet d'une étude plus soutenue en FS est l'acide citrique. Cahn en 1935 a eu une approche originale au problème en utilisant des cossettes de betterave ou de la bagasse de canne à sucre imprégnée d'une solution de sucres. La masse était ensemencée avec des spores de A. niger et après 4 jours de culture l'acide citrique était récupéré par extraction à l'eau. Le rendement de transformation des sucres en acide avoisinait 50% et une des grandes innovations de ce procédé était la réutilisation du support après extraction comme on le ferait d'une éponge.

Ces travaux ont été repris par Terui et col. (1947) d'après Aldoo et col. (1982) et plus récemment par Lakshminarayana et col. (1975); ces derniers utilisaient de la mélasse imprégnée sur de la bagasse et grâce à l'addition de méthanol, amélioraient les rendements qui avoisinaient 80%.

Lockwood (1974) rapporte l'existence d'un procédé industriel japonais calqué sur le procédé "koji" où des souches d'A. niger résistantes aux ions métalliques sont cultivées sur un milieu amylacé. L'acide citrique est extrait à l'eau après 8 jours d'incubation à température contrôlée. Selon cet auteur, les quantités d'acide produites industriellement de cette façon approcheraient les 2500 T annuelles.

11-5. Production de métabolites secondaires

Les principaux métabolites secondaires concernés par la FS sont les toxines fongiques: aflatoxines (Hesseltine, 1977) ou ochratoxines (Lindenfelser et Ciegler, 1975) produites respectivement par A. parasiticus et A. ochraceus. Les conditions de FS sont proches des conditions de contamination naturelle des aliments et les rendements rapportés sont plus élevés qu'en culture liquide ou de surface.

Wang et col. (1969) ont rapporté l'existence d'une substance à action antibactérienne dans le tempeh (aliment traditionnel indonésien fermenté par Rhizopus oligosporus). La production proprement dite d'antibiotiques par FS a sûrement fait l'objet d'études dans de nombreux laboratoires mais aucun résultat probant n'a été publié sur le sujet.

II-6. Production de spores

Les spores nécessaires à l'ensemencement des fermenteurs solides ou des fromages sont le plus souvent préparées par culture de surface dans des fioles de Roux. Leur production industrielle entraîne donc le maniement de milliers de fioles et par conséquent l'emploi d'une main d'oeuvre importante. La fermentation solide qui permet de multiplier la surface utile pour le champignon dans un moindre volume paraît être une alternative pour la production de spores.

Ainsi, ont été étudiées les souches impliquées dans la préparation des aliments fermentés orientaux : *R. oligosporus* par Wang et col. (1975) et *A. oryzae* par Sato et col. (1982), mais également les souches utilisées dans la fabrication des fromages : *P. roqueforti* par Larroche et col. (1986), ces derniers auteurs cultivant le champignon sur un support (pouzzolane) imprégné d'un milieu nutritif synthétique.

Des prototypes de réacteurs ont été conçus pour augmenter le volume utile, contrôler les conditions de production et faciliter la récupération des spores (Roussos (1985), Gervais et Bazelin (1986)). La mise en application de ces recherches pourrait avoir un impact outre dans l'industrie alimentaire, dans la lutte biologique par les champignons filamenteux, cette dernière requérant d'énormes quantités de spores.

III. REVUE CRITIQUE DES PARAMETRES DE LA FS

III-1. Particularités du développement mycélien

Dans la majorité des cas, les FS concernent les champignons filamenteux et le type de développement est différent de celui observé en fermentation liquide (fragmentation mycélienne ou "pellets") ou en culture de surface où la croissance est essentiellement apicale. En FS, la quasi-absence de liquide interstitiel fait que c'est la géométrie du substrat qui oriente le développement apical et les ramifications dans toutes les directions de l'espace. Les substrats solides se rapprochent ainsi des milieux naturels des champignons (terre, végétaux en décomposition).

D'autre part, chez les champignons filamenteux, les courants cytoplasmiques sont forts et les phénomènes de translocation jouent un rôle important lorsqu'ils colonisent des substrats solides.

Viesturs et al. (1981) travaillant avec Chaetomium cellulolyticum et Trichoderma lignorum et Aufeuve et Raimbault (1981) travaillant avec Aspergillus niger ont pu montrer, grâce à la microscopie électronique à balayage que dans un premier temps le mycélium se développe à partir des spores, fortement attaché à la surface du substrat, puis un peu plus tard forme de véritables ponts entre les particules donnant ainsi au produit fermenté sa compacité. De même, la configuration du substrat mais aussi les conditions d'aération déterminent plus tardivement le développement de conidiophores et la sporulation du champignon.

Ces particularités font qu'il n'existe pas de modèle mathématique réellement satisfaisant de la croissance sur substrat solide.

Les auteurs adoptent le plus souvent le formalisme exponentiel pour décrire la phase de croissance:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t}$$

où X est la biomasse à l'instant t
 X_0 est la biomasse initiale
 μ est le taux de croissance spécifique

Mais, en fin de croissance apparaissent des limitations d'ordre divers que le modèle exponentiel ne prend pas en compte. Pour Okazaki et col. (1980) c'est le modèle logistique qui s'adapte le mieux à la FS de A.oryzae sur riz ou son de blé:

$$X = \frac{X_f}{1 + K \cdot e^{-\mu t}}$$

avec $K = \frac{X_f}{X_0} - 1$

où X_f est la biomasse maximum

Ce modèle largement employé en biologie introduit un terme de vieillissement ou décès du mycélium.

Rimbault (1980) a élaboré un modèle mixte de la croissance de A.niger sur amidon de manioc. Ce modèle décrit une croissance exponentielle initiale tendant à se rapprocher du modèle logistique en fin de culture. Pour cet auteur, ce sont les quantités d'eau et de biomasse initiale qui sont les principaux facteurs limitants.

Pour Laukevics et col. (1985), une des points fondamentaux du développement mycélien en FS est l'occupation de l'espace. Il existe selon eux une densité critique de mycélium fonction bien sûr du microorganisme mais également de la configuration de la matrice solide et de la forme de l'eau dans le substrat. Sur la base de résultats antérieurs obtenus avec T. reesei, T.lignorum et Ch. cellulolyticum ils calculent que la quantité limite de biomasse sur paille de blé se situe entre 10 et 30 g/l.

Enfin récemment, Georgiou et Schuler (1986) ont mis au point un modèle de croissance radiale et différenciation de A.nidulans sur un milieu gélifié avec du glucose comme source de carbone. La prise en compte des variations des gradients bidimensionnels de substrat pour prévoir l'apparition et le déroulement de la conidiogénèse est un des aspects intéressants de ce modèle. Les conditions de croissance sur plaque sont toutefois sensiblement différentes des conditions de FS qui mettraient en jeu un modèle encore plus complexe.

III-2. Humidité, activité de l'eau

III-2.1. Généralités

A la différence des fermentations liquides où le substrat est dissous ou en suspension dans une phase aqueuse et où l'eau n'est pas un facteur limitant, dans les FS la quantité maximum d'eau présente dans le milieu est fonction de la capacité de rétention du substrat. Le liquide au sein de la matrice ne doit pas être trop abondant pour ne pas réduire la porosité et par conséquent les échanges gazeux (Moo-Young et col., 1982) mais doit être présent en quantité suffisante pour ne pas limiter la croissance du microorganisme.

III-2.2. Forme de l'eau dans les substrats solides

Suivant le matériel utilisé le pourcentage d'humidité oscille entre 30 et 80 % et l'activité de l'eau (A_w), pratiquement assimilable à l'humidité relative (H_r) dans la phase gazeuse entourant le substrat, varie de 0.90 à 1.00.

Il faut bien prendre en compte que toute l'eau n'est pas sous la même forme et également disponible à l'intérieur du substrat. Sur la Figure 1 on peut apprécier l'isotherme de sorption de l'eau et l'évolution de l'enthalpie de vaporisation sur amidon de manioc (tapioca) en fonction de l'humidité du milieu (Soekarto et Steinberg, 1981). On distingue trois zones:

- une zone monocouche où l'eau est fortement liée à la surface du solide et où l'enthalpie de vaporisation est très supérieure à celle de l'eau pure.
- une zone multicouche où les niveaux d'énergie diminuent et où l'eau est de moins en moins liée (enthalpie de vaporisation à peu près égale à celle de l'eau pure).
- une zone dite de condensation capillaire qui correspond à l'eau libre.

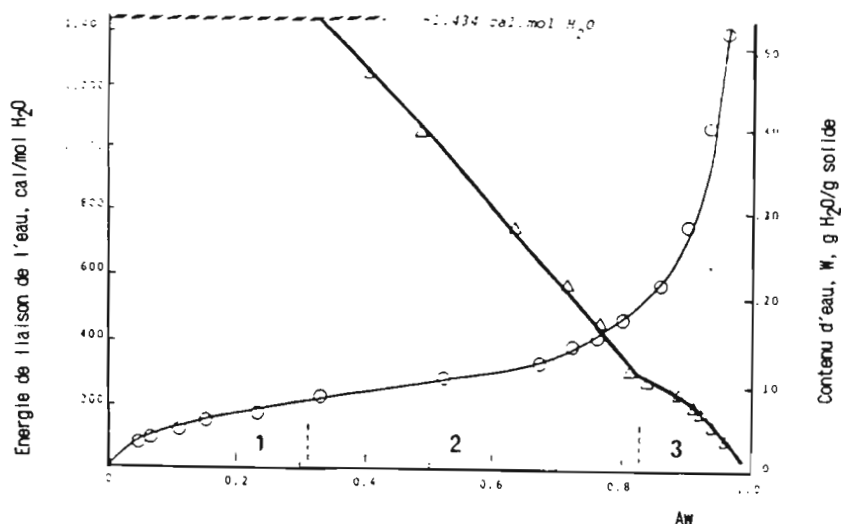


Figure 1: Isotherme de sorption et évolution de l'enthalpie d'évaporation de l'eau sur de l'amidon de manioc dextrinisé. (d'après Soekarto & Steinberg, 1981).

Même si la distinction entre la seconde et la troisième zone est difficile à établir en termes de contenu d'eau ou d'Aw, elle peut être estimée sur la Fig.1 aux alentours de 20 % d'humidité, correspondant à une Aw de 0.80 à 0.85. Ainsi, contrairement à ce qui est dit dans un certain nombre de définitions, il y a présence d'eau libre dans les substrats solides pour les humidités pratiquées en FS (Laukevics et col., 1984; Mudgett, 1986).

Pratiquement, seule l'eau correspondant en partie à la zone multicouche et à la zone de condensation capillaire peut participer du métabolisme du champignon.

III-2.3. Influence sur la croissance et le métabolisme

On peut définir trois rôles importants de l'eau dans le processus de FS:

- l'eau de réaction, nécessaire à la constitution du mycélium et au métabolisme et qui intervient dans la stoechiométrie de la croissance (Van den Berg et Bruin, 1981)

- l'eau en tant que véhicule des enzymes, des nutriments et des métabolites extra-cellulaires. Les techniques de RMN du proton permettent de définir ainsi un point de mobilisation d'un soluté, qui correspond à la quantité d'eau minimum présente dans un corps pour laquelle on commence à observer des phénomènes de solvatation (Ducksworth, 1981). Ainsi le point de mobilisation du glucose dans l'amidon de pomme de terre est de 22 g d'eau/ 100 g d'amidon. Une augmentation de l'humidité augmente de plusieurs ordres de magnitude les coefficients de diffusion des solutés.
- l'eau qui intervient dans la solubilisation de l'O₂ gazeux; ce dernier phénomène n'ayant pas été jusqu'alors mesuré en FS.

Un grand nombre d'auteurs ont mis en avant l'importance cruciale de l'eau et de l'Aw dans les FS même si les effets observés n'ont pas toujours reçu d'explications satisfaisantes.

Nishio et col. (1979) rapportent une augmentation de la vitesse spécifique de croissance, de la biomasse et de la synthèse d'enzymes (hydrolases de la peau d'orange) de A. niger sur son de blé lorsque l'humidité initiale (Hi) augmente de 32% jusqu'à un optimum situé à 56%.

Raimbault (1980) travaillant avec A. niger sur amidon de manioc note une augmentation de l'humidité de 10 à 15% après 25 h d'incubation. Au fur et à mesure de la croissance, l'eau s'incorpore au mycélium et des calculs théoriques montrent une diminution de l'eau libre qui ne représenterait plus que 13% de l'eau totale à la fin de la fermentation. Cette valeur est limite pour le métabolisme des champignons et cet auteur déduit donc que la croissance est arrêtée par faute d'eau disponible, alors qu'il reste encore de 25 à 30% de substrat.

Narahara et col. (1982) étudiant le procédé d'obtention du "koji" observent une augmentation de la biomasse produite et du taux spécifique de croissance avec une augmentation du contenu d'eau initial de 25.6 à 40.3% soit des Aw de 0.942 à 0.975. Pour ces auteurs le concept d'Aw est plus important que celui d'humidité initiale. Dans tous les cas, ils observent un arrêt de la croissance lorsque l'Aw atteint 0.90. Dans cette étude, l'abaissement de l'Aw est corrélé avec une accumulation de sucres libres, non assimilés, à l'intérieur du substrat. Enfin en ce qui concerne la production d'enzymes, une augmentation du contenu d'eau initiale améliore la synthèse d'amylases mais diminue celle de protéases. Pour cette raison, ces auteurs recommandent de maintenir une Aw élevée durant la phase de croissance puis de l'abaisser au début de la synthèse des protéases.

Sato et col. (1983) ont mis au point un modèle pour la croissance des microorganismes en FS en utilisant de la pulpe de bois imprégnée d'un milieu nutritionnel. Les résultats obtenus avec une levure, Candida lipolytica, ont montré que le taux spécifique de croissance augmente avec l'HI du milieu et avec l'humidité relative de l'air passant dans le fermenteur.

Sakurai et col. (1985), utilisant le pain comme substrat pour modéliser la croissance de A. oryzae en milieu solide notent une augmentation du taux spécifique de croissance quand l'Aw passe de 0.97 à 0.99.

Hoe-Kim et col. (1985) en diminuant l'Aw par ajout de sels ou de PEG observent que la vitesse de croissance apicale de T. reesei est affectée en dessous de 0.99 et mettent en évidence des effets croisés de l'HI et de la température sur la production de cellulases.

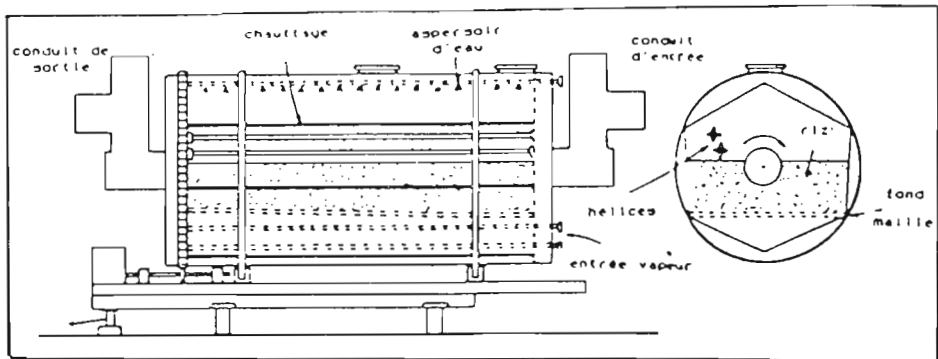
En général, les travaux concernant les FS sur substrats lignocellulosiques montrent qu'une augmentation de l'HI améliore la vitesse de croissance des champignons et la conversion de la cellulose et coïncident sur l'existence d'une HI optimum pour la production de cellulases (Abdullah et col., 1981, Nishio et col., 1981, Rao et col., 1983, Deschamps et col., 1985).

En ce qui concerne les métabolites secondaires, Hesseltine (1977) note que dans la production d'aflatoxines par A. flavus sur du riz, des HI supérieures à 40% se traduisent par une importante diminution du rendement. De même, Lindenfelser et Ciegler (1975) observent une relation entre la production d'ochratoxines et l'humidité au cours de la fermentation

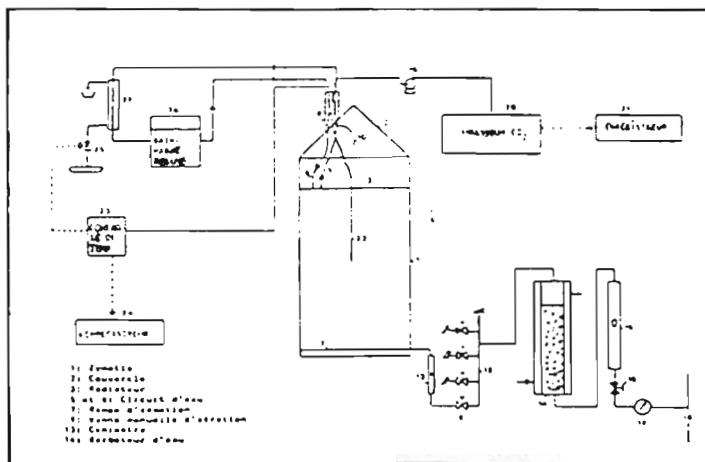
III-2.4. Contrôle de l'humidité

Tous ces résultats ont mis en évidence la nécessité de concevoir des procédés permettant de bien contrôler l'eau au cours de la fermentation. Il faut dans ce chapitre faire une parenthèse sur les réacteurs utilisés en FS.

Il existe des réacteurs "dynamiques" de type pétrin (Raimbault (1980), Deschamps et col. (1985)) ou tambour rotatoire (Lindenfelser et Ciegler (1975), Toyama (1976), Silman (1980)) qui permettent d'additionner de l'eau et d'homogénéiser en cours d'opération (cf. Fig. 2: réacteurs de FS). Ce dernier type de réacteur présente donc l'avantage de pouvoir contrôler l'humidité rapidement durant toute la fermentation mais aussi de permettre l'ajout de sels ou de substrat à l'état dissous. Les principaux inconvénients résident dans l'agitation de la masse, une homogénéisation trop forte pouvant provoquer une rupture des hyphes et nuire ainsi au développement mycélien.

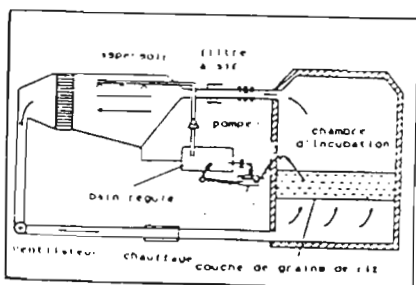


(2a) Fermenteur dynamique de type tambour rotatoire pour la préparation du koji. D'après Toyama (1976).

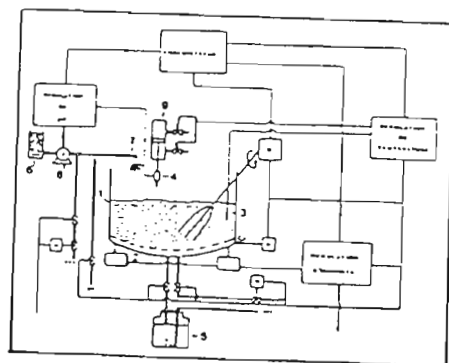


(2b) Fermenteur statique à plaques verticales de type "Zymotis". D'après Roussos (1985)

Figure 2: Différents types de fermenteurs utilisés en FS.



(2c) fermenteur statique de type "plateau" pour la préparation du koji. D'après Nunokawa (1974)



(2d) Fermenteur dynamique de type "pétrin". D'après Raimbault (1980).

Dans la majorité des cas les réacteurs sont "statiques" ou fermés tels le fermenteur à plateaux (pour la préparation du "koji": Nunokawa, 1972, Toyama, 1976), la colonne (Raimbault et Alazard, 1980), la "boîte" (Narahara et col., 1982), le fermenteur à plaques verticales "zymotis" (Roussos, 1985) (cf. Fig. 2: réacteurs de FS). Dans tous les cas, le matériel est introduit au début de la culture et les seules actions possibles sur l'humidité et l'Aw en cours de fermentation consistent:

- à changer l'hr de l'air entrant dans le fermenteur: des variations du degré de saturation de l'air provoquent une sorption ou une désorption d'eau sur le substrat (Laukevics et col., 1984; Gervais et col., 1986) mais suivant le mode d'aération, il faut veiller à ne pas créer des gradients d'humidité dans le substrat.
- à changer la température: Narahara et col. (1984) ayant observé des gradients longitudinaux d'humidité dans un réacteur de type "boîte" ont ainsi mis au point un procédé de contrôle basé sur une équation reliant les productions de CO_2 et de calories. A partir des données de température de l'air à l'entrée et à la sortie et de production de CO_2 , une simple régulation de la température de l'enceinte entourant le fermenteur permettait de maintenir l'humidité homogène au sein de celui-ci.

III-3. Aération, échanges gazeux

L'aération et les transferts de masse dans les fermentations solides sont assez mal connus, un critère équivalent au K_{La} des fermentations liquides étant difficile à mesurer en FS. Suivant les auteurs, la problématique de l'aération est abordée différemment; ainsi Moo-Young et col.(1982) distinguent les transferts de masse Inter et intra-particulaires:

- le premier paramètre concerne le transfert de l' O_2 dans le volume interstitiel de la masse solide et dépend donc de la nature du substrat, de la teneur d'eau mais aussi de l'état d'avancement de la fermentation.

- le transfert intra-particulaire est quant à lui assimilé par ces auteurs aux phénomènes de diffusion de l' O_2 dans les pellets en milieu liquide et ils développent un modèle semblable.

Dans le deuxième cas il faut tout de même considérer quelques différences importantes de la FS par rapport au pellet comme par exemple l'attachement substrat-mycélium et les conditions hydrodynamiques.

Lonsane et col. (1985) proposent la participation de deux phénomènes pour expliquer le transfert de l' O_2 dans les conditions de la fermentation solide, le premier étant un transfert direct de la phase gazeuse au microorganisme, comme par exemple dans les fermentations sur hydrocarbures et le second un transfert du gaz à la phase liquide comme c'est le cas dans les fermentations liquides. Mais, bien que séduisante, cette hypothèse n'est pas étayée par l'expérience.

Quoi qu'il en soit, l'importance de l'interface substrat/liquide/air observée en FS rend le problème d'aération moins critique que dans les fermentations liquides et par conséquent le coût énergétique de l'aération-agitation est beaucoup plus réduit.

C'est seulement lors des extrapolations de procédé que l'on se heurte à des problèmes d'hétérogénéité, ainsi Rathbun et Schuler (1984), utilisant un plateau à aération longitudinale avec une épaisseur de couche de 6.3 cm pour la fermentation du *Tempeh* ont observé des gradients importants dans la composition gazeuse de l'air, la pression partielle d' O_2 pouvant descendre à 2 % et celle de CO_2 pouvant atteindre 21 % dans la partie inférieure du réacteur. Pour cette raison, de nombreux auteurs recommandent une agitation intermittente de façon à assurer l'homogénéité du système.

En ce qui concerne la production d'enzymes ou de métabolites, l'aération mais aussi les pressions partielles (PP) d'O₂ et de CO₂ jouent des rôles importants.

Bajracharya et col. (1981) observent un effet bénéfique de la PP d'O₂ sur la production d'amylases par A.oryzae sur du riz et en concluent que la FS convient bien de ce point de vue là à la production d'enzymes. De la même manière, Narahara et col. (1982) obtiennent de meilleurs rendements d'amylases pour une PP de CO₂ de 2% lors de la phase exponentielle de croissance et de protéases pour une PP de 5 % durant la phase stationnaire.

III-4. Chaleur métabolique

Si lors des fermentations liquides dans les réacteurs infiniment mélangés, la chaleur produite par le microorganisme lors de la respiration est instantanément diluée et dissipée, dans les FS, la forte densité du mycélium, la faible teneur en eau et l'absence de mélange peuvent conduire à une accumulation de calories nuisible au développement du champignon.

Ainsi Raimbault (1980) et Huerta (1984) cultivant A.niger sur de la farine de manioc dans des réacteurs de type colonne placés dans un bain thermostaté, observent des phénomènes de surchauffe au centre de la masse lorsque le diamètre de la colonne dépasse 4 cm. Le gradient radial de température peut même atteindre 10°C pour des diamètres de 8 cm. Rathbun et Schuler (1984) travaillant la fermentation du grain de soja par Rhizopus oligosporus dans un fermenteur de type plateau à aération longitudinale mesurent un gradient de 3°C/cm lors de la phase exponentielle de croissance, l'épaisseur de la couche étant de 6.3 cm.

L'élimination des calories comme la nécessité d'une aération homogène sont les facteurs critiques dans la conception des réacteurs de FS. Pour le premier point, le contrôle peut s'exercer à différents niveaux:

- L'humidité: Une augmentation de l'humidité modifie la conduction thermique du substrat et du mycélium.

- L'aération: une augmentation de l'aération favorise l'élimination des calories par convection forcée. De même le contrôle de l'humidité relative de l'air peut permettre une élimination des calories par évaporation. Le refroidissement par

aération doit néanmoins être manoeuvré avec précaution si l'on ne veut pas provoquer de séchage du produit.

- La thermostatisation du réacteur: Elle favorise la dissipation de la chaleur par conduction à partir des parois du réacteur; celui-ci peut ainsi être placé dans une enceinte thermostatée (Narahara et col., 1984), posséder une jaquette (Laukevics et col., 1984) ou être immergé dans un bain thermostaté (Raimbault et Alazard, 1980). Dans le réacteur de type "Zymotis" (Roussos, 1985) des plaques de pasteurisation verticales compartimentent le réacteur et assurent le refroidissement de la masse (cf. Fig. 2: réacteurs de FS).

- L'agitation: une agitation intermittente augmente la surface de contact entre la masse et l'air ou entre la masse et les parois du réacteur et contribue ainsi à dissiper les gradients de température.

Jusqu'à maintenant, l'accumulation des calories a constitué un inconvénient sérieux dans l'extrapolation des réacteurs de FS et un grand nombre d'études d'ingénierie sont en cours pour résoudre ce problème.

III-5. pH

La forme de l'eau dans les substrats solides a toujours constitué un obstacle à une mesure satisfaisante du pH. Dans la majorité des cas on mesure le pH après mise en suspension d'une part d'échantillon solide dans 3 à 4 parts d'eau. Cette méthode si elle permet de mesurer un pH global n'est sans doute pas représentative des micro-pH locaux du film aqueux où se passent dans la réalité l'essentiel des réactions biochimiques.

Le contrôle du pH dans les FS est donc difficile et, en pratique, il est assez rarement entrepris. Le bon pouvoir tampon des substrats solides mais aussi du mélange salin initial (Raimbault et Alazard, 1980) font que pendant la croissance, le pH ne connaît pas de variations extrêmement brusques ni ne descend dans des zones critiques pour le métabolisme.

III-6. Estimation de la biomasse en FS

L'estimation de la biomasse et de la croissance des champignons filamenteux en FS a été et reste un point délicat. Du fait de la nature solide du substrat, les mesures

rapides comme la turbidimétrie ou la néphélométrie couramment pratiquées en fermentation liquide sont impossibles à appliquer en FS. On est obligé de procéder à un échantillonnage et à des dosages chimiques rendus difficiles par l'intrication existant entre le substrat et la biomasse. Ainsi les méthodes reportées dans la littérature ont toutes leur part d'inconvénients et d'imprécision.

Les japonais utilisent le plus souvent le dosage de la glucoasamine qui est un constituant de la paroi du champignon. Mais d'une part, la concentration de glucosamine continue à augmenter pendant la phase stationnaire (Sakurai et col.,

1985) et d'autre part, les résultats divergent énormément suivant le procédé d'extraction mis en oeuvre (Aldoo et col., 1981).

Sugama et Okazaki (1979) ont mis au point une méthode pondérale pour mesurer la biomasse du "koji", cette méthode fait appel à l'hydrolyse du riz résiduel par des glucoamylases puis à la détermination du poids sec de mycélium. Ce procédé n'est applicable qu'avec des substrats 100% amylacés

La majorité des auteurs dosent les protéines du champignon soit par la méthode de Lowry (1951), mais elle n'est fiable que sur des substrats ne contenant pas de lignines, soit par la méthode de Kjeldahl après précipitation des protéines à l'acide trichloracétique. Cette méthode qui est la plus couramment citée présente les inconvénients d'être longue et de piètre sensibilité. Enfin, une méthode alternative mais toute aussi lourde consiste à doser les acides aminés totaux après hydrolyse acide (Penaloza et col., 1985; Gregory et col. 1985).

On peut également suivre les acides nucléiques (principalement ARN) qui constituent un bon indicateur de l'état de la biomasse (-Arima et zumi 1967; bacharya mutt 1980). Les résultats restent toutefois difficilement comparables entre eux puisque le taux d'ARN est fonction non seulement de la quantité de biomasse mais aussi de la vitesse spécifique de croissance.

Parmi les méthodes d'analyse plus perfectionnées, Wissler et col. (1983) rapportent l'emploi de la spectrométrie de masse. Cette technique leur permet d'effectuer un bilan N_{13}/N_{14} sur différents échantillons précipités à l'acide trichloracétique et d'estimer ainsi l'incorporation de l'azote dans la biomasse.

Enfin de nombreux auteurs préconisent l'utilisation de la gazométrie qui est la seule méthode capable de fournir des données en ligne et de suivre les fermentations. A partir des mesures de CO_2 et d' O_2 on peut calculer avec une bonne précision la biomasse présente dans le réacteur et son taux de croissance (Sugama et Okazaki, 1979; Ralmbault, 1980; Carrizalez et col., 1981; Sato et col., 1983; Hoe-Kim et col., 1985).

III-7. Conclusion

Cette revue consacrée à l'étude des caractéristiques et paramètres importants de la FS montre qu'il reste un certain nombre de points à élucider sur la physiologie de croissance des champignons dans ces conditions, notamment en ce qui concerne l'eau, l'activité de l'eau et l'aération.

Comme nous avons pu le voir, la conception des réacteurs est soumise à des contraintes et des problèmes qu'une meilleure connaissance des processus physiologiques pourrait arriver à alléger voire à résoudre. La FS accuse un énorme retard technologique sur les fermentations liquides et une amélioration des réacteurs et de l'instrumentation est fondamentale pour son avenir.

DEUXIEME PARTIE:
MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL BRUT

La farine de manioc (*Manihot esculenta*) utilisée a été obtenue à partir du tubercule frais. Le processus de préparation a été le suivant: le tubercule a été pelé, découpé, gélatinisé à 120°C à l'autoclave durant 15 mn puis refroidi à 0°C une nuit pour favoriser la rétrogradation de l'amidon. Les morceaux de manioc ont ensuite été séchés, moulus et tamisés. La fraction comprise entre 20 et 50 mesh a été utilisée pour les cultures en milieu solide et les fines pour préparer les milieux d'obtention des spores. Cette farine contenait approximativement 80% d'amidon et 2% de protéines poids sec.

Le support utilisé a été de la bagasse de canne à sucre gracieusement fournie par la Sucrerie Emiliano Zapata de Zacatepec (Mor.) au Mexique. Les différentes fractions de la bagasse ont été séparées industriellement par cyclone et nous avons conservé la partie enrichie en moelle, moins ligneuse et de capacité d'absorption supérieure. Après tamisage, nous avons, sauf spécification conservé la fraction comprise entre 20 et 50 mesh. Cette bagasse contenait à peu près 10% de sucres résiduels lesquels furent éliminés à 90% par lavage à l'eau.

II. CONSERVATION DES SOUCHES ET OBTENTION DE SPORES

La souche utilisée est une souche de Aspergillus niger var. hennebergi N° 10 isolée et caractérisée par Raimbault (1980).

La souche a été repiquée tous les six mois sur un milieu "malt-agar" et conservée à 4°C.

La composition du milieu utilisé pour l'obtention de spores est la suivante:

Farine de manioc	40 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4 g
KH_2PO_4	2 g
Urée	1 g
Agar	15 g
Eau	qsp 1000 ml

La farine de manioc est gélatinisée en portant le mélange à ébullition durant 15 mn puis après refroidissement, le pH est ajusté à 5.6 avec de l'acide orthophosphorique et le milieu est réparti en Erlenmeyers de 250 ml à raison de 25 ml chacun. Les Erlenmeyers sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 110°C durant 25 mn. Les milieux refroidis jusqu'à une température de 40°C sont inoculés dans la masse avec 2 ml d'une solution de spores obtenue par resuspension à partir des tubes de conservation.

Les Erlenmeyers inoculés sont incubés à 25°C durant 7 jours, temps après lequel on peut observer une sporulation uniforme sur toute la surface du milieu. La récolte s'effectue à l'aide d'un agitateur magnétique par resuspension des spores dans de l'eau additionnée de 2 gouttes de Tween 80. La suspension ainsi obtenue est filtrée sur de la gaze pour éliminer les particules de milieu ou de mycélium puis diluée de façon adéquate dans de l'eau avant de procéder au comptage sur une cellule de Neubauer.

III. METHODE DE CULTURE

La méthode de culture utilisée est celle préconisée par Raimbault et Alazard (1980) adaptée aux particularités de notre étude.

Pour les cultures comportant du manioc et de la bagasse, la bagasse est humidifiée avec 50% de l'eau totale puis stérilisée à l'autoclave pendant 15 mn à 120°C pour éviter toute contamination ultérieure par la microflore de la bagasse. Les sels sont quant à eux dissous dans les 50% d'eau restants et après addition des spores, le pH de la suspension est ajusté à 2.7. Une fois la bagasse refroidie, elle est mélangée avec la farine de manioc puis inoculée avec les spores en suspension dans la solution saline. La quantité d'inoculum est de 2×10^7 spores par g de farine de manioc.

En ce qui concerne les cultures sur support imprégné, la bagasse est humidifiée avec 50% de l'eau totale contenant le ou les substrats à l'état dissous (la concentration de substrat de cette solution est donc double de la concentration finale) et le

mélange est stérilisé à l'autoclave durant 15 mn à 120°C. Les sels sont dissous dans les 50% d'eau restants et après addition des spores, le pH de la suspension est ajusté à 2.7. La bagasse imprégnée de la solution contenant le ou les substrats dissous est ensuite refroidie puis inoculée avec les spores en suspension dans la solution saline. Sauf spécification, la quantité d'inoculum est de 2×10^7 spores par g de support (bagasse).

La composition du milieu salin pour 100 g de substrat est la suivante:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9.8 g
KH_2PO_4	5.0 g
Urée	2.4 g

Le matériel inoculé est ensuite disposé dans des colonnes de verre cylindriques de 20 cm de hauteur et 2 cm de diamètre à raison de 10 à 20 g par colonne selon la densité du matériel considéré. Les colonnes sont placées dans un bain thermostaté à 35°C et connectées à un système d'aération, laquelle est fixée à 0.4 l d'air par heure pour 1 g de substrat sec.

IV. METHODES D'ANALYSE

IV-1. Gazométrie

La consommation d'oxygène et la production de CO_2 durant les fermentations ont été mesurées en continu par gazométrie. L'air effluent d'une colonne contenant 30 g de matériel humide est séché par passage au travers d'une colonne de condensation puis d'une colonne de Silicagel[®] montées en série. Un échantillon de l'air sec est ensuite pompé à un débit précis jusqu'à un analyseur d' O_2 de type paramagnétique Servomex[®] connecté à un enregistreur Cole Parmer[®]. Un autre échantillon de l'air effluent séché est pompée volumétriquement et sa composition déterminée dans un analyseur de CO_2 Infrarouge Beckman[®] (Medical CO_2 Analyzer) lui aussi connecté à l'enregistreur (cf Fig. 3: Schéma du dispositif)

Les deux analyseurs de gaz indiquent respectivement les variations des pourcentages d' O_2 et de CO_2 dans le gaz effluent; lesquels sont ensuite transformés en vitesse de consommation (VO_2) ou de production (VCO_2) en multipliant par le débit de l'air au travers du réacteur.

IV-2. Analyse des échantillons de fermentation

IV-2.1. Poids sec

Le poids sec a été mesuré à poids constant après 24 h dans une étuve thermostatée 105°C.

IV-2.2. Protéines

- Dans les fermentations faisant appel au manioc seul, la biomasse a été estimée à partir des protéines dosées par la méthode de Lowry (1951) sur des échantillons dilués entre 250 et 500 fois, homogénéisés tout d'abord à l'Ultraturrax[®] puis au Potter[®]. Le standard utilisé est l'albumine bovine (30 à 300 mg/l).

-La présence de lignines dans la bagasse produisant des interférences lors du dosage des protéines par la méthode de Lowry, les protéines présentes dans les échantillons provenant des fermentations contenant de la bagasse ont été dosées après hydrolyse acide par mesure des acides aminés totaux. Le processus analytique est le suivant:

- Les échantillons sont tout d'abord été séchés à 60°C pendant 24 h puis broyés et tamisés (40 mesh).
- 200 mg d'échantillon sont ensuite hydrolysés avec 6 ml de HCl 7 N en ampoules scellées à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn.
- Après refroidissement, on procède à une neutralisation à la soude puis les hydrolysats neutralisés sont centrifugés ou decantés.
- Le surnageant est ensuite dilué de façon adéquate pour la réaction colorimétrique avec la ninhydrine (Snell, 1956), le standard étant constitué par une solution de caséine de concentration connue.

IV-2.3. Sucres

Pour tous les dosages de sucres, les échantillons sont dilués à raison d'un gramme pour 25 ml d'eau puis homogénéisés avec un Ultraturrax[®] à 20,000 rpm pendant 1 mn.

- Pour le dosage de l'amidon résiduel, 1 ml d'homogénéisat est hydrolysé en présence de 5 ml d' HCl 1N à 90°C durant 3 h. l'hydrolysate est ensuite neutralisé avec 5 ml de soude 1 N et les sucres réducteurs résultants sont dosés après dilution par la méthode de Miller (1959) contre une solution standard de glucose.

- Pour le dosage du saccharose, un échantillon de l'homogénéisat est centrifugé et 1 ml de surnageant est mis en contact avec 1 ml de solution d'invertase à température ambiante pendant 1 h. Les sucres réducteurs sont dosés sur l'hydrolysat dilué par la méthode de Miller (1959).

- Pour le dosage du glucose, l'homogénéisat est centrifugé et le glucose est dosé directement par la méthode de Miller (1959) sur le surnageant convenablement dilué.

IV-2.4. Acides nucléiques

L'échantillon est dilué (25 fois) puis homogénéisé à l'aide d'un Ultraturrax[®], 5 ml de l'homogénéisat sont alors centrifugés et le surnageant est éliminé. On procède ensuite à une extraction acide des acides nucléiques en redispersant le culot de la centrifugation antérieure dans 5 ml d'acide perchlorique (HClO_4) et en le mettant 25 mn à incubation à 70°C avec une agitation intermittente. Après refroidissement, la suspension est centrifugée et la concentration d'acides nucléiques (principalement ARN) du surnageant est déterminée par lecture à 260 nm contre une solution standard d'ARN de levure (Sigma Labs.).

IV-2.5. Glucoamylases

Le milieu de réaction est le suivant:

Solution d'amidon (15 g/l)	2.5 ml
Tampon citrate pH 4.5, 0.1 M	2.0 ml
Solution enzymatique	0.5 ml

La réaction enzymatique se fait à 60°C et l'on prélève 1 ml d'échantillon au temps 0 (immédiatement après avoir ajouté la solution à activité enzymatique) et au temps 15. La réaction est arrêtée dans le réactif de DNS et les sucres réducteurs libérés sont dosés par la méthode de Miller (1959).

Une unité internationale (UI) d'activité glucoamylasique correspond à la quantité d'enzyme qui libère une micromole de glucose par mn dans les conditions données ci-dessus.

IV-3. Mesure de l'activité de l'eau (Aw)

Pour la mesure de l'activité de l'eau, nous avons utilisé un appareil Novasina[®] constitué d'un capteur modèle BS et d'un instrument de mesure Humidat IC 11. L'appareil a été étalonné dans une gamme d'humidités relatives (HR) de 0.750 à 1.000 avec des sels saturés d'Aw connues. Les mesures sont faites à 30°C avec un temps de stabilisation de l'instrument de 3 h, et la précision donnée par le fabricant est de 1% d'HR.

Expérimentalement, de 3 à 4 g d'échantillon sont si besoin découpés et introduits dans des coupelles fournies avec l'appareil. Pour les échantillons de fermentation, et afin que le produit n'évolue pas pendant les 3 h de la mesure, les échantillons sont exposés durant 10 mn à un rayonnement UV de 254 nm de longueur d'onde et 300 W de puissance, la coupelle étant placée à 11 cm de la source lumineuse.

IV-4. Microcalorimétrie

Pour ces études nous avons pu disposer d'un microcalorimètre différentiel LKB[®] appelé Thermal Activity Monitor (TAM) comportant 4 canaux tous doublés d'une référence. Ce microcalorimètre mesure l'énergie de refroidissement que doit apporter le système pour maintenir la température constante. Son seuil de détection est de 0.2 microWatts soit moins de 10^{-6} °C avec une précision supérieure à 5%.

Pour les expériences de croissance, le matériel solide est placé dans des flacons de 3 ml ensuite stérilisés puis inoculés avec une suspension de spores contenant les sels et éventuellement le glucose. Chaque expérience comporte un flacon témoin uniquement additionné de la solution nutritive sans les spores. Un courant d'oxygène est ensuite passé dans le flacon durant 1 mn pour en saturer l'atmosphère puis le flacon est scellé hermétiquement avant d'être placé dans le microcalorimètre.

Toutes les expériences ont eu lieu à 37°C, en double et les thermogrammes étaient enregistrés en continu.

V/ ESTIMATION DE LA CROISSANCE A PARTIR DES VITESSES DE CONSOMMATION D'OXYGENE

La biomasse peut être calculée à partir des vitesses de consommation d'O₂. On sait que la vitesse de consommation d'O₂ (rO₂) est proportionnelle à la vitesse de formation de biomasse (rX):

$$rO_2 = 1/YO_2 \cdot rX + mO_2 \cdot X \quad (1)$$

où YO_2 représente le rendement de biomasse par rapport à l'oxygène (g de biomasse/g d' O_2)
 mO_2 est le coefficient de maintenance pour l' O_2

L'intégration de l'équation (1) de 0 à t donne:

$$rO_2 dt = (1/YO_2) (X_t - X_0) + mO_2 X dt \quad (2)$$

Plusieurs méthodes d'intégration sont décrites dans la littérature (-Carrizales et col., 1980; Hoe-Kim et col., 1985) et nous avons choisi la méthode préconisée par Sato et col. (1983) pour estimer la croissance de levures sur support solide.

Si l'on considère un intervalle de mesure T de 1 h, l'équation est résolue avec une bonne approximation en posant:

$$rO_2 dt = T/2 (rO_{20} + 2(rO_{21} + rO_{22} + \dots + rO_{2t-1}) + rO_{2t}) \quad (3)$$

$$\text{et } X dt = T/2 ((X_0 + 2(X_1 + X_2 + \dots + X_{t-1}) + X_t)) \quad (4)$$

l'équation (2) devient donc:

$$X_t = YO_2 \times (1/2(rO_{20} + rO_{2t}) + rO_{21}) + (1-a/2)X_0 - a X_1 / (1+a/2) \quad (5)$$

$$\text{où } a = YO_2 \times mO_2$$

Les valeurs de YO_2 et mO_2 que nous avons utilisées sont celles calculées par Ralmbault (1980) pour la souche de *A. niger* qui sont respectivement de 1.55 g X/g O_2 et .007 g O_2 /g X/h.

Pour estimer X_0 , nous avons considéré les spores comme des cylindres de 3 microns de diamètre et 2 microns de longueur (Aufeuvre et Ralmbault, 1981). Sachant que la densité d de la spore se situe entre 1.0 et 1.1 (Hawker et Madelin, 1976) on peut calculer le poids d'une spore. En ce qui concerne le contenu d'eau des spores, les chiffres cités dans la littérature varient de 10 à 50% suivant la méthode

d'obtention prise en compte. Ayant produit les spores sur un milieu solide (cf. matériel et méthodes II.), nous avons considéré l'humidité comme négligeable.

La quantité d'inoculum l par gramme de substrat la plus couramment utilisée dans cette étude est de 2×10^7 spores ce qui représente une biomasse de:

$$X_0 = r^2 l \times d \times l = 0.0006 \text{ g/g de substrat poids sec}$$

Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles de 0.0012 et 0.0005 rapportées respectivement par Raimbault (1980) et Sato et col. (1983).

Sur la base de cette équation, un programme Basic d'intégration des vitesses de consommation d'O₂ a été mis au point sur Apple IIe, programme qui permet le calcul de X, rX et . Tous les résultats sont exprimés par colonne soit 30 g de matériel humide initial.

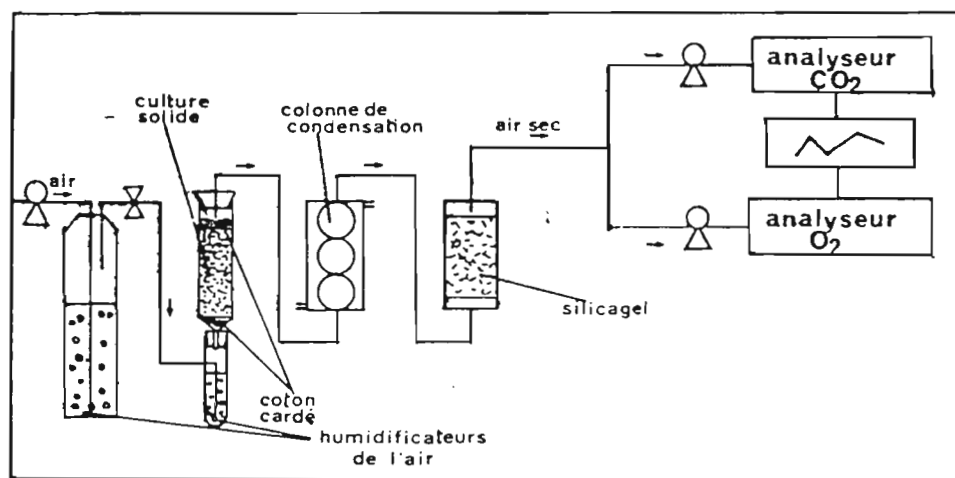


Figure 3: Dispositif utilisé pour l'analyse des gaz effluents des colonnes de fermentation solide.

TROISIEME PARTIE:

RESULTATS

RESULTATS

I. ETUDE DE L'EAU DANS LA CULTURE DE A.NIGER SUR AMIDON DE MANIOC

I-1. Sorption de l'eau sur la farine de manioc

Nous avons déterminé la partie de l'isotherme de sorption de l'eau sur la farine de manioc dans la zone d'humidité concernée par la FS, cette partie correspondant à des quantités d'eau de .1 à 1 g/g de farine sèche. L'isotherme représentant W (g d'eau/g de poids sec)

en fonction de A_w est porté sur la Fig. 4..

Pour pouvoir le manoeuvrer plus facilement, l'isotherme peut être linéarisé de la façon suivante (Fig. 5):

$$A_w = K_1 (W^*) + K_2 \quad (6)$$

où W^* est le contenu de solide par g d'eau = $1/W$

K_1 et K_2 sont des constantes dont les valeurs dans ce cas sont respectivement -.0237 / (g de solides/ g d'eau) et 1.0058.

Utiliser le terme W^* revient à utiliser la molalité du produit qui est la forme la plus employée dans les calculs de A_w (Ross, 1975).

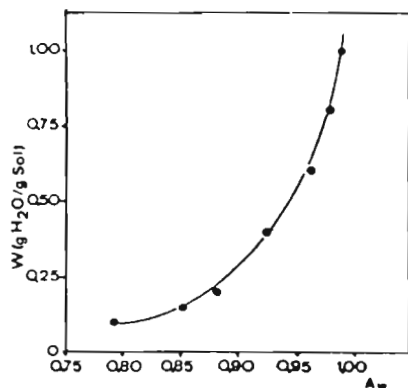


Figure 4: Isotherme de sorption de l'eau sur la farine de manioc.

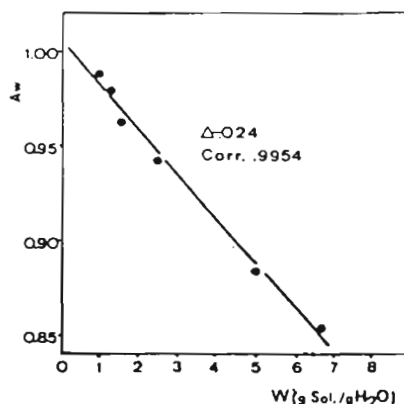


Figure 5: Isotherme de sorption de l'eau sur la farine de manioc linéarisée d'après l'équation (1).

Comme on peut le voir, pour une humidité de 50 % l'activité de l'eau dans la farine de manioc est proche de 1.00 (.988). Mais il faut aussi prendre en compte l'autre constituant essentiel du milieu de culture: le mélange salin. Nous avons donc déterminé l'isotherme de sorption de ce mélange (cf. composition dans le chapitre Matériel et Méthodes).

Cet isotherme linéarisé par l'équation (6) est représenté sur la Figure 6. La pente de cet isotherme est plus de 10 fois supérieure à la pente de l'isotherme de la farine et on peut donc penser que la solution saline aura une influence prépondérante sur l' A_w du substrat.

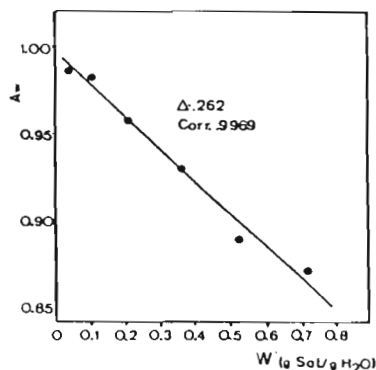


Figure 6: Représentation linéarisée d'après l'équation (1) de l' A_w en fonction de la concentration du mélange salin en solution (W^*).

Pour estimer l'Aw d'un mélange (Aw_f) l'équation la plus utilisée est l'équation de Ross (1975):

$$Aw_f = (Aw_1) (Aw_2) (Aw_3) \dots (Aw_n) \quad (7)$$

où (Aw_n) représente l'activité de l'eau de chacun des n constituants du mélange.

Cette équation a été adoptée par Narahara et col. (1982) pour expliquer l'évolution de l'Aw du milieu au cours de la fermentation du "koji".

Ainsi si nous appliquons cette équation avec les valeurs d'Aw des constituants calculées à partir des isothermes linéarisés, nous obtiendrons pour le substrat Initial (85 % de farine + 15 % de sels PS) humidifié à 50 % une Aw_f = (.982).(.957) soit .940. Or, la valeur expérimentale mesurée est de .937.

La première conclusion importante c'est donc que pour les humidités couramment pratiquées, l'Aw initiale du milieu de fermentation est basse et essentiellement dépendante de la quantité de sels.

1-2. Croissance de Aspergillus niger sur amidon de manioc

1-2.1. Cinétique de croissance

Sur la Figure 7 nous pouvons observer la cinétique de croissance, de consommation de sucres et de production d'amyloglucosidases de *A.niger* sur amidon de manioc. Ces résultats sont comparables à ceux décrits par Raimbault et Alazard (1980), à savoir un enrichissement protéique de l'ordre de 10% Poids Sec Initial (PSI) soit 0.25 g de mycélium/g de PSI, après 25 h d'incubation. La consommation de sucres est de 50% PSI et le rendement de transformation des sucres en biomasse est proche de 0.5. La cinétique légèrement plus rapide peut être attribuée à la qualité différente de la farine de manioc.

Sur la Figure 8 sont représentées les cinétiques de vitesse de production de CO₂ (VCO₂), de consommation d'O₂ (VO₂) et le coefficient respiratoire (Qr) quotient de ces deux vitesses. On peut vérifier que le Qr reste voisin de 1.0 durant toute la phase exponentielle de croissance pour diminuer ensuite.

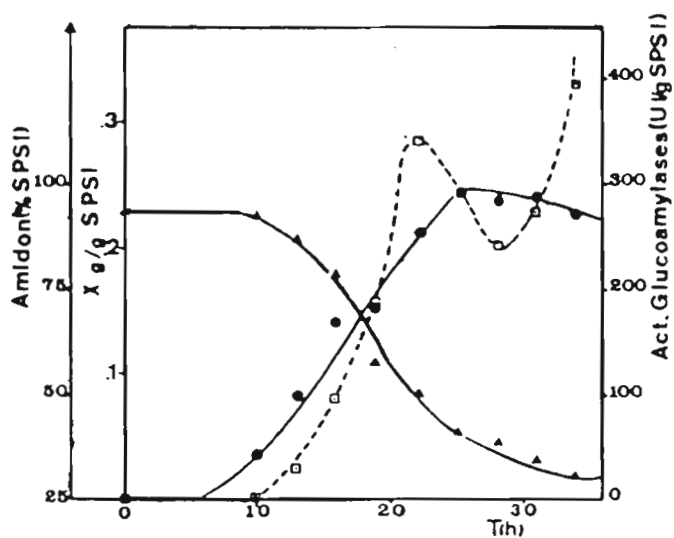


Figure 7: Cinétiques de croissance (●), consommation de sucres (▲) et production de glucoamylases (□) de *A. niger* sur amidon de manioc.

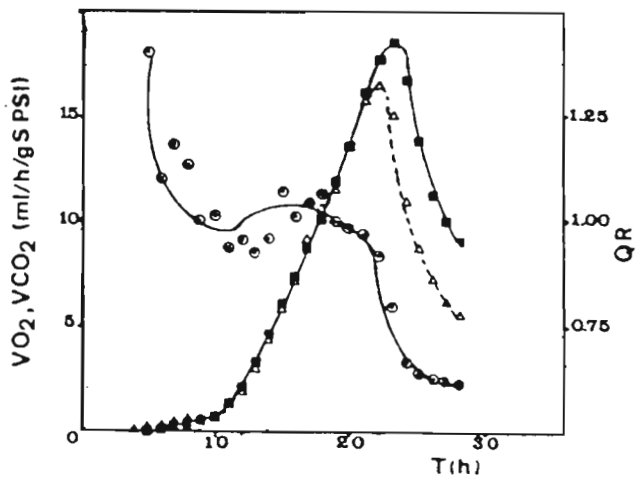


Figure 8: Evolution des vitesses de consommation de CO₂ (△), d'O₂ (■) et du quotient respiratoire, QR (⊙) durant la culture de *A. niger* sur amidon de manioc.

L'évolution des acides nucléiques (Figure 9) est durant la phase exponentielle semblable à la cinétique de VCO_2 ou VO_2 et si l'on peut observer un décalage de 2 à 3 h entre le temps d'activité respiratoire maximum et le temps où l'on atteint la biomasse maximum mesurée par les protéines (Fig. 7), ce décalage ne se remarque pas si l'on considère le temps du maximum d'acides nucléiques. La mesure de cette dernière variable est donc importante car elle donne une meilleure indication sur l'état physiologique du champignon lors de la croissance.

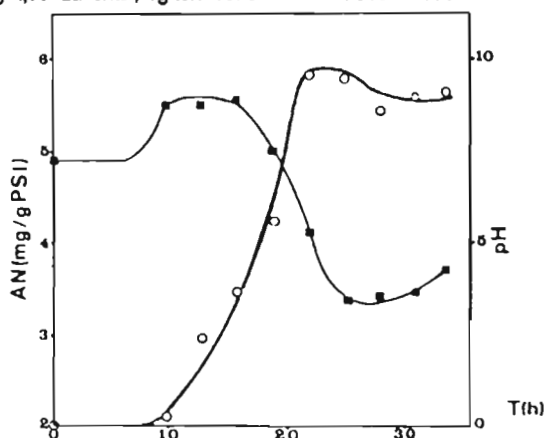


Figure 9: Evolution des acides nucléiques (○) et du pH (■) durant la culture de *A. niger* sur amidon de manioc.

Le profil de pH (Fig. 9) montre une légère alcalinisation durant les premières heures de la croissance, attribuable à l'hydrolyse de l'urée et la libération d'ions NH_4^+ , puis une acidification importante qui correspond à la phase de croissance exponentielle et à la production de CO_2 .

La concentration de protéines du produit après 25 h mesurée par la méthode des acides aminés totaux a fourni une valeur de 17.7 % PSI contre 12.0 % lors du dosage par la méthode de Lowry (1951). L'écart est important mais pas invraisemblable si l'on considère l'énorme variabilité des mesures de biomasse en fermentation solide. Ainsi Raimbault (1980) rapporte un écart de près de 50 % entre les résultats obtenus sur un échantillon dosé par la méthode de l'azote protéique de Kjeldahl et par la méthode de Lowry (1951).

1-2.2. Evolution de l'eau et de l'activité de l'eau durant la croissance.

* Quantité d'eau

D'après Raimbault (1980), au cours de la fermentation, la quantité d'eau totale (H_2O_T) à l'instant t peut être estimée par l'équation suivante:

$$H_2O_T = H_2O_I + H_2O_{RE} - H_2O_H + H_2O_S \quad (8)$$

où H_2O_I = quantité d'eau initiale.

H_2O_{RE} = quantité d'eau formée par respiration.

H_2O_H = quantité d'eau consommée pour hydrolyser l'amidon.

H_2O_S = quantité d'eau sorbée.

Comme on peut le constater sur la Fig.10 la teneur d'eau du produit déterminée expérimentalement augmente légèrement au cours de la fermentation passant de 1.00 à 1.12 g / g de milieu initial après 30 h. Il faut insister sur le fait que, contrairement à ce qui est reporté avec d'autres réacteurs (Narahara et col., 1982) notre système de culture n'entraîne pas de perte d'eau au cours du temps mais au contraire une légère sorption.

Si nous nous intéressons à l'eau résiduelle (H_2O_R), celle-ci peut être calculée en connaissant l'eau totale et l'eau consommée (H_2O_C):

$$H_2O_R = H_2O_T - H_2O_C$$

Toujours d'après Raimbault (1980), l'eau consommée (H_2O_C) peut être donnée par :

$$H_2O_C = 0.1 S_H + 3 X \quad (9)$$

où S_H est la quantité de sucres hydrolysés à l'instant t

X est la biomasse

3 est l'inverse du coefficient stoechiométrique de croissance par rapport à l'eau (0.33 g X/g H_2O)

L'eau consommée et l'eau résiduelle sont portées sur la Fig. 10 et l'on peut voir que cette dernière diminue jusqu'à atteindre 0.15 g/g de poids sec. Ainsi, il ne devrait pas théoriquement y avoir de limitation en eau puisqu'il en existe encore à la fin de la fermentation. On peut néanmoins se demander si cette eau résiduelle est disponible pour le champignon. Nous avons pour cela essayé de prédire l'évolution de l'Aw durant la croissance.

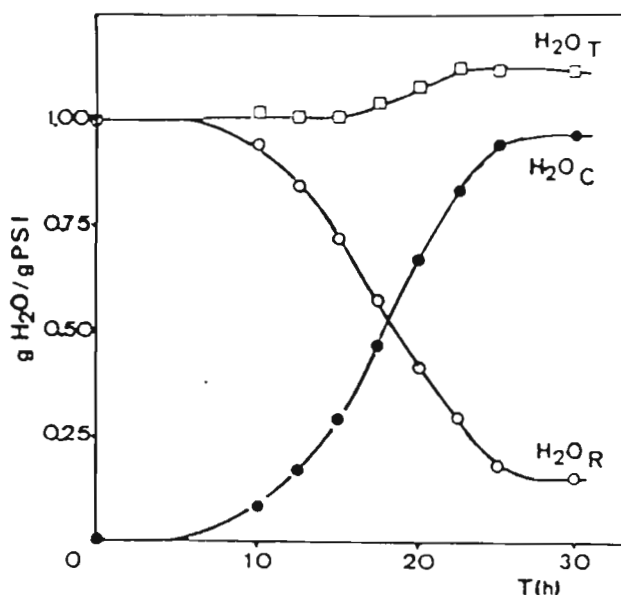


Figure 10: Evolution de l'eau lors de la croissance de *A. niger* sur amidon de manioc.
 H_2O_T = Eau totale
 H_2O_C = Eau consommée
 H_2O_R = Eau résiduelle

** Activité de l'eau

A partir des données de consommation d' O_2 , il est possible en s'aidant des coefficients stoechiométriques de la réaction (Raimbault, 1980), d'estimer la biomasse à l'instant t et, par là l'eau consommée (H_2O_C). Nous connaissons par l'expérience les quantités d'amidon, et d'eau résiduelle et en considérant que la vitesse de consommation des sels est égale à celle des sucres, on peut établir un bilan de chacun des constituants (Tableau 2.) . A partir des isothermes linéarisés on connaît l' A_w de chacun des constituants que l'on remplace ensuite dans l'équation de Ross (7). On peut de cette manière calculer l' A_w du substrat rémanent au cours du temps (Tableau 2). Cette A_w calculée est portée sur la Figure 11 et l'on voit qu'elle baisse régulièrement pendant la croissance, passant en dessous de .910 après 20 h et atteignant .840 à 30 h.

D'après Pitt et Hocking (1977), la vitesse de croissance de *A. flavus* et *A. ochraceus* subit une forte diminution quand l' A_w est inférieure à .900. On peut donc être tenté d'expliquer le ralentissement et la fin de la phase de croissance par une diminution de la disponibilité de l'eau. Cette hypothèse sera étayée par les résultats obtenus un peu plus loin.

Tableau 2: Paramètres de la culture de *A.niger*
sur farine de manioc avec une humidité initiale de 50 %

: Temps (h)	: Farine	: Sels	: X	: H_2O_T	: H_2O_C	: H_2O_R	: A_w sub.	: A_w réelle	: s_2
:	:	*	*	:	*	*	*	:	**
0	.850	.150	.001	1.000	0.000	1.000	0.944	0.937	-
10.0	.813	.145	.022	1.020	0.078	0.942	0.942	-	-
12.5	.773	.138	.044	1.008	0.164	0.844	0.939	0.959	- 2.8:
15.0	.708	.129	.080	1.009	0.290	0.719	0.933	0.970	- 3.4:
17.5	.616	.115	.131	1.043	0.469	0.574	0.926	0.981	- 4.2:
20.0	.516	.100	.187	1.081	0.665	0.416	0.912	0.995	-11.5:
22.5	.431	.087	.234	1.128	0.831	0.297	0.894	1.000	-
25.0	.373	.078	.266	1.121	0.941	0.180	0.845	-	-
30.0	.323	.071	.268	1.122	0.968	0.152	0.838	1.000	-
_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____

Tous les résultats sont exprimés en g/g de poids sec initial.

* Valeurs calculées

** s_2 est exprimé en HR/ (g de mycélium/g d'eau)

X: Biomasse ; H_2O_T : Eau totale ; H_2O_C : Eau consommée; H_2O_R : Eau résiduelle

Si l'on détermine l' A_w du produit en cours de fermentation, on va, contrairement à ce qui est reporté par ailleurs (Narahara et col., 1982), observer une augmentation pendant la phase de croissance (Figure 11). Cette évolution pouvait être prévisible dans la mesure où l' A_w apparente est la résultante de deux phénomènes: l'un étant l'augmentation de l'eau de constitution du mycélium et l'autre l'appauvrissement de l'amidon en eau résiduelle (H_2O_R). Or, le mycélium est constitué de 80% d'eau et son A_w est égale à 1.000.

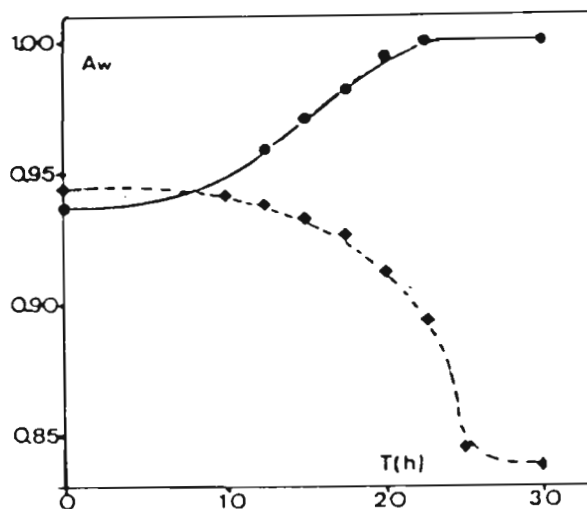


Figure 11: Evolution de l'Aw du substrat calculée (■) et de l'Aw mesurée expérimentalement (●) lors de la croissance de *A. niger* sur amidon de manioc.

Pour modéliser l'évolution de l'Aw apparente du produit durant la fermentation dans son entier, la formule de Ross (7) n'est pas utilisable. En effet, cette équation considère:

- que les différents constituants du mélange sont représentés dans des quantités du même ordre de grandeur.
- que toute l'eau est également disponible pour chacun des constituants.

L'appliquer au cas de la FS est donc délicat puisque d'une part, durant les 15 premières heures de la fermentation la quantité de mycélium est petite devant celle l'amidon et d'autre part l'eau attachée au mycélium n'est pas disponible pour les autres constituants (**Ross, 1975**).

L'autre équation largement utilisée pour le calcul des A_w des aliments à humidité intermédiaire est l'équation de alwin et lawson (1959):

$$A_{wf} = \frac{a_1 s_1 m_1 + a_2 s_2 m_2 + \dots a_n s_n m_n}{s_1 m_1 + s_2 m_2 + \dots s_n m_n} \quad (10)$$

où a_n est l' A_w de chacun des constituants du mélange
 s_n est la pente de l'isotherme de sorption pour l' A_w considérée
 m_n est la masse de poids sec de chacun des constituants

Dans le cas qui nous occupe, nous pouvons considérer deux constituants qui sont le milieu et le mycélium. Ainsi, m_1 et m_2 représentent respectivement le substrat (amidon + sels) et la biomasse exprimés en g/g de poids sec à l'instant t .

a_2 représente l'activité de l'eau du mycélium que l'on considère constante pendant toute la fermentation et égale à 1.000. a_1 est l'activité de l'eau dans l'amidon résiduel. Elle peut être déterminée, en connaissant la quantité d'eau résiduelle, la masse de substrat et en les remplaçant dans l'équation linéarisée représentant l'isotherme de sorption.

Cette équation introduit le terme s_n qui tient compte de la force de rétention d'eau de chacun des constituants dans la partie de l'isotherme considérée. Pour le milieu, s_1 peut être estimé par la pente de l'isotherme linéarisé de l'eau dans le mélange salin, ce dernier étant le constituant ayant la plus forte influence sur l' A_w . Pour le champignon, il est difficile d'établir un isotherme de sorption de l'eau dans le mycélium et donc de connaître s_2 .

Si l'on applique l'équation (10) à l'évolution de l' A_w du produit mesurée expérimentalement, il est possible connaissant tous les autres termes de déduire s_2 . Nous avons rapporté sur le tableau les valeurs de s_2 calculées pour différents temps d'incubation. Comme on peut le voir sur le tableau 2, cette valeur augmente avec le temps tendant vers l'infini en fin de fermentation.

En fait, le coefficient s_n significatif normalement de la force de liaison de l'eau à un corps prend ici en compte un phénomène d'un autre ordre qui est le mode de colonisation du substrat par le champignon. Comme cela a été montré en microscopie électronique de balayage, (Aufeuvre et Ralmbault, 1981) le champignon entoure littéralement le grain d'amidon. et l'Aw apparente mesurée est donc celle du champignon égale à 1.000. Le coefficient s_2 est donc dans ce cas uniquement représentatif du taux de recouvrement du substrat par le mycélium.

1-2.3. Conclusion

Grace à l'élaboration d'un bilan de l'eau au cours de la FS du manioc et à une estimation théorique de l'Aw du substrat résiduel par l'équation de Ross (1975), nous avons pu voir que s'il existait toujours de l'eau dans le milieu après 25 h de culture, l'Aw du substrat serait alors inférieure à 0.900 et que par conséquent cette eau résiduelle serait peu disponible pour le métabolisme du microorganisme. Pendant la croissance, le mode de colonisation du substrat et sa substitution par du mycélium font que l'Aw mesurée au cours du temps augmente pour devenir égale à celle du mycélium (1.000) en fin de culture.

Afin de vérifier la justesse des hypothèses formulées dans ce chapitre concernant l'importance de l'eau dans la FS, il était nécessaire de pouvoir travailler avec des quantités d'eau initiales plus importantes sans pour autant changer la méthode de culture.

1-3. Croissance de A. niger sur amidon de manioc et fibres de bagasse.

1-3.1. Introduction

Lors de la réhumectation de la farine, si l'humidité dépasse 50 à 55% (P/P), l'amidon de manioc commence à devenir pâteux ce qui le rend difficilement manipulable en FS. Afin d'étudier l'influence de l'activité de l'eau, deux alternatives sont possibles: on peut

- diminuer la quantité de sels par g de substrat ou changer la composition du mélange salin (les ions sulfate par exemple ont une activité ionique élevée et modifient considérablement l'Aw) mais il faut prendre garde à conserver un C/N constant.
- augmenter l'humidité initiale tout en conservant une texture du substrat satisfaisante.

Nous avons donc repris l'idée de Sato et col. (1983) qui préconisaient l'emploi d'un support à forte capacité de rétention d'eau, jouant un rôle de réservoir de liquide pour le développement du microorganisme. Cet auteur utilisait un produit lignocellulosique intermédiaire de l'industrie papetière: la pulpe de bois. Le manioc étant une culture tropicale, il nous paraissait plus intéressant de travailler avec la bagasse de canne à sucre, qui est un déchet lignocellulosique industriel disponible en abondance dans les pays chauds et humides, et qui a le mérite supplémentaire d'avoir déjà été étudié pour la production de cellulases par T.harzianum en FS (Roussos, 1985). La bagasse utilisée a été broyée et tamisée (cf. Matériel et Méthodes) de façon à obtenir une taille de particule équivalente à celle du manioc.

Dans un premier temps nous avons mesuré pour une HI constante, l'effet de la proportion de fibres sur la croissance puis ayant choisi les proportions du mélange, nous avons mesuré l'effet de l'HI sur la croissance.

1-3.2. Sorption de l'eau par la bagasse

Nous avons tout d'abord mesuré l'isotherme de sorption de l'eau dans la bagasse; celui-ci linéarisé par l'équation (6) est représenté sur la Figure 12 et le calcul nous donne une pente de -0.0234 / (g de solides/ g d'eau) identique à celle observée pour la farine de manioc (-0.0237 / (g de solides/ g d'eau)). La bagasse peut néanmoins accepter beaucoup plus d'eau que l'amidon sans provoquer de drainages, la limite pour notre matériau se situant à 4 g d'eau/ g de bagasse.

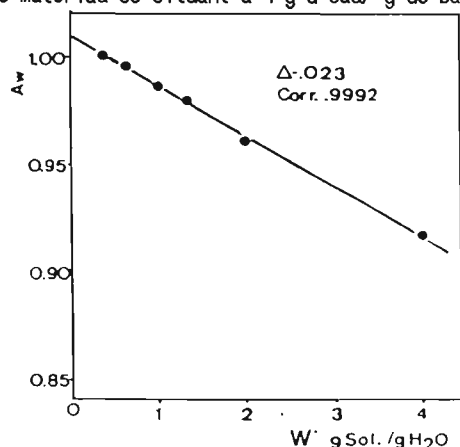


Figure 12: Isotherme de sorption de l'eau sur la bagasse de canne linéarisé d'après l'équation (1).

Nous avons ensuite pratiqué des essais préliminaires pour mesurer les capacités de rétention d'eau de différents mélanges farine/bagasse. Nous avons pour cela mélangé au mixer la bagasse prétraitée (cf. Matériel et Méthodes) avec la farine de manioc puis ajouté différentes quantités d'eau. Après 5 mn de repos, l'existence de gouttelettes à la surface du réceptacle nous indiquait des phénomènes de drainage. Nous avons ainsi fixé les limites supérieures d'humidité tolérables par les différents mélanges, elles sont de: 63% pour 10% de fibres, 70% pour 20%, 73% pour 30%, 75% pour 40% et 76% pour 50%.

1-3.3. Influence de la proportion de fibres

Cinq fermentations ont été pratiquées avec un pourcentage de fibres allant de 10 à 50% (P/P) et une humidité constante de 62% (P/P), les sels étant ajoutés en fonction de la quantité de substrat dans le milieu. Les résultats figurent sur le tableau 1 où l'on peut observer que logiquement la quantité de protéines et la perte de poids sec diminuent lorsque la concentration initiale de fibres augmente. Les Rx calculés sont inférieurs à celui obtenu sur l'amidon seul (0.71 g X/g S) mais on peut néanmoins observer dans tous les cas des taux de conversion supérieurs à 70%, élevés si on les compare avec le chiffre de 58% obtenu lors de la culture sur amidon uniquement.

Tableau 3: Paramètres des cultures de *A.niger* sur des milieux mixtes comportant différentes proportions de fibres.

Fibres	Perte de Poids sec (% PSI)	Biomasse (g X/ g PSI)	Consommation de substrat (g S/ g PSI)	Rx (g X/g S)	Ts* (%)
10	23.4	.375	.575	.652	73.9
20	22.0	.300	.551	.544	78.5
30	16.9	.238	.444	.536	71.2
40	15.2	.249	.384	.640	70.7
50	11.2	.235	.401	.585	87.2

* Ts représente le taux de conversion du substrat
(Substrat consommé/Substrat Initial)

PSI: Poids sec Initial; X: Biomasse ; S: Substrat (amidon)

Pour les études suivantes, nous avons choisi d'utiliser une proportion de bagasse de 20% qui permet de manoeuvrer une gamme d'humidités importante allant jusqu'à 70% sans perdre trop de substrat.

En ce qui concerne la production de glucoamylases (Tableau 4), l'introduction de fibres semble avoir indépendamment de l'humidité un effet favorable. Si l'on considère le rendement d'enzyme par gramme d'amidon, l'optimum se situe autour de 30% de bagasse.

Tableau 4: Production de glucoamylases
avec différentes proportions de fibres

:	:	:	:
Fibres	Activité	Activité spec.	:
(% PSI)	(UI/g PSI)	(UI/ g de manioc)	:
:	:	:	:
10	388.5	431.7	:
:	:	:	:
20	369.3	461.6	:
:	:	:	:
30	354.9	507.0	:
:	:	:	:
40	287.8	479.7	:
:	:	:	:
50	129.5	259.0	:
:	:	:	:

PSI: Poids sec initial

1-3.4. Influence de la teneur d'eau

* Croissance

Une fois fixée la proportion de fibres à 20% PSI, nous avons effectué cinq fermentations avec des humidités initiales de 42, 48, 55, 65 et 70% (P/P).

Sur la Figure 13 nous avons porté les A_w mesurées au temps 0 mais aussi les A_w calculées à partir de l'équation (7). La bonne adéquation des données expérimentales et calculées montre que le modèle de Ross (1975) est satisfaisant pour prédire l' A_w initiale d'un milieu complexe de fermentation solide.

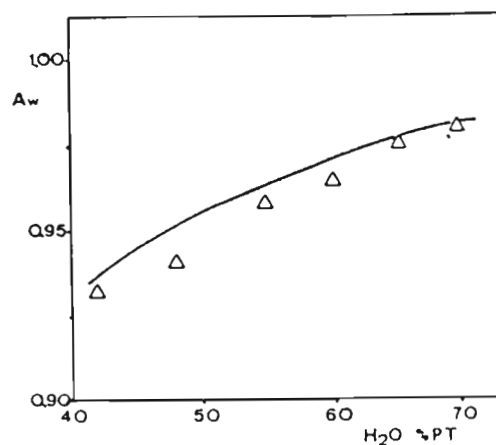


Figure 13: A_w en fonction de l'humidité du milieu initial contenant 80% de farine de manioc et 20% de fibres de bagasse: points expérimentaux (Δ), courbe calculée par l'équation (2) $\longleftrightarrow$.

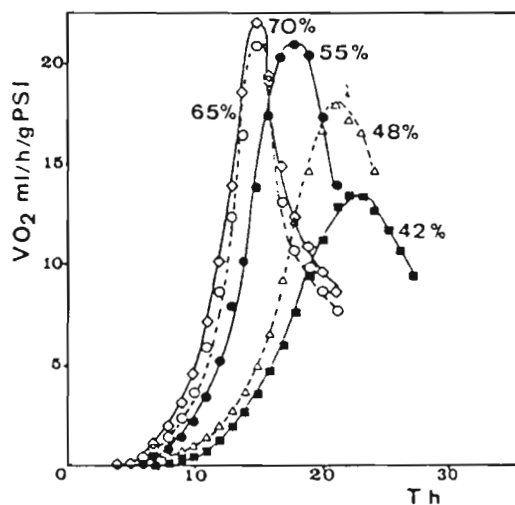


Figure 14: Cinétiques de vitesse de consommation d' O_2 obtenues lors de la croissance de *A. niger* sur amidon de manioc et bagasse (80/20 P/P) pour différents contenus d'humidité initiaux.

Sur la Figure 14 sont représentées les cinétiques de vitesses de consommation d' O_2 pour les différentes humidités concernées. On peut observer que la quantité d'eau et l' Aw du milieu affectent de manière drastique l'allure des courbes de croissance. Si l'on intègre les courbes de VO_2 on peut calculer le moyen (cf. matériel et Méthodes) qui a été porté contre l' Aw initiale du milieu (Figure 15), on voit que celui-ci augmente jusqu'à une Aw de 0.98. Le temps de germination (Fig. 15) est lui aussi affecté puisqu'il diminue de 4 h entre 0.94 et 0.98. En conséquence, la durée de la culture calculée à partir des VO_2 est raccourcie d'à peu près 8 h entre 42 et 70% d' Hi (cf. Tab. 5)

La disponibilité de l'eau est donc un critère important pour expliquer la vitesse de croissance de A. niger sur substrat solide. L'eau est le mobilisateur des réactifs de la croissance et une augmentation de la disponibilité de l'eau augmente les vitesses de diffusion des amylases vers l'amidon et du produit d'hydrolyse, le glucose vers le microorganisme. De même, une fois atteinte la phase stationnaire de développement, la chute de l'activité respiratoire (Fig 14) est d'autant plus prononcée que l' Hi est plus élevée. Ceci indique que les phénomènes de lyse sont eux aussi beaucoup plus rapides lorsque la diffusion est facilitée.

Outre un effet marqué sur la cinétique de croissance, une augmentation de la quantité d'eau initiale améliore de façon importante le taux d'utilisation du substrat (T_s) et la quantité de biomasse produite par g de matériel sec est supérieure (Tab. 5), les R_x restant semblables à ceux observés pour le manioc seul ou dans le paragraphe précédent.

Ces derniers résultats vérifient l'hypothèse de aimbault (1980) selon laquelle la croissance de A.niger sur amidon de manioc en FS est limitée stoechiométriquement par l'eau disponible. Nous touchons là au premier rôle de l'eau dans les FS qui est celui de réactif intervenant dans les réactions biochimiques et la constitution du mycélium. On peut voir sur le Tableau 5 qu'au delà de 65% il y a peu de variation dans la biomasse finale obtenue et l'on peut penser que l'eau n'est plus limitante en tant que réactif pour de tels contenus d'eau initiaux.

On peut constater sur le Tableau 6 que dans la fermentation contenant 65% d' Hi , Aw de la farine calculée à partir des humidités mesurées expérimentalement ne diminue pas et même augmente légèrement du fait de la consommation de sels et de bstrat. Ainsi, l'eau présente dans le milieu garde une bonne disponibilité pendant toute la durée de la fermentation. Ceci fournit une explication supplémentaire aux profils cinétiques différents et à l'utilisation plus poussée du substrat.

Tableau 6: Paramètres de la fermentation comportant 20% de bagasse, 80% de manioc et une humidité initiale de 65%.

	Temps	Amidon	Sels	X	H ₂ O _T	H ₂ O _C	H ₂ O _R	Aw	
									milieu
			*	*		*	*	*	
0	.680	.120	.001	2.250	0.000	2.250	.981		
7	.675	.120	.004	2.349	0.020	2.329	.982		
9	.657	.116	.014	2.447	0.058	2.389	.983		
11	.608	.107	.041	2.512	0.154	2.358	.985		
13	.513	.091	.094	2.552	0.310	2.242	.987		
15	.351	.062	.184	2.415	0.646	1.769	.989		
17	.214	.038	.260	2.220	0.908	1.312	.991		
19	.122	.022	.260	2.230	0.912	1.308	-		
21	.049	.010	.260	2.235	0.915	1.305	-		

Bien que le taux de conversion des sucres soit supérieur pour des Hi élevées, il reste toutefois un peu plus de 20 % (PSI) d'amidon résiduel, ce qui suppose l'existence en fin de croissance de facteurs limitants distincts de l'eau. Les transferts de masse intraparticulaires (Moo-Young et col. 1982) ou l'occupation de l'espace par le mycélium (Laukevics et col., 1985) pourraient alors être incriminés.

Si l'on s'intéresse maintenant à l'aspect pratique, les gains conjugués de la vitesse de croissance et du taux de transformation du substrat se reflètent dans la productivité (mg de protéines/g PSI/h) qui est presque triplée entre 48 et 70% d'Hi (cf. Tab. 5). Toutefois, la productivité obtenue avec l'amidon seul est de 15.70 mg/g PSI/h et la biomasse finale est plus élevée (0.392 g/g PSI), le substrat n'étant pas dilué avec de la bagasse non métabolisable par le champignon. De plus, l'introduction de support diminue la densité de la masse et donc la productivité volumétrique du système.

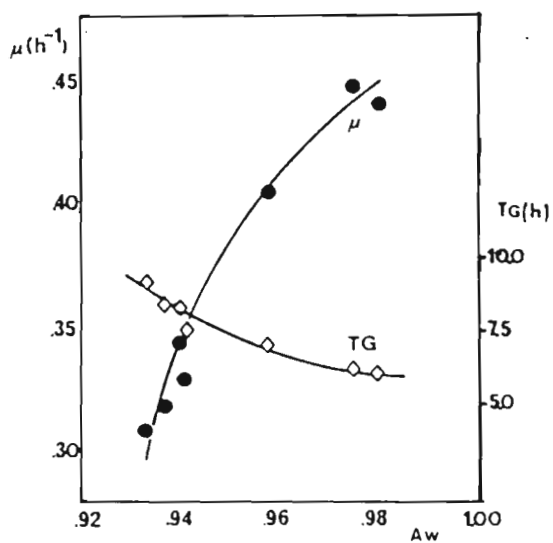


Figure 15: Représentation de μ et du temps de germination (TG) en fonction de l' A_w initiale du milieu de culture.

Tableau 5: Paramètres de la culture de A.niger sur
(Farine de manioc 80% (P/P), bagasse 20% (P/P))
initiales.

Hi	Aw	Aw	X f	So-Sf	Ts**	Rx	Productivité
: %	:(%HR)	:(%HR)	:(g/g PSI)	:(g/g PSI)	:(%)	:(g X/g S)	:(mg X/g PSI/h)
:	:	*	:	:	:	:	:
42	93.3	93.7	.123	.233	33.2	.528	4.8
48	94.0	95.0	.172	.344	48.9	.500	7.2
55	95.8	96.3	.251	.417	59.3	.602	12.5
65	97.5	97.7	.324	.477	68.0	.679	18.0
70	98.0	98.2	.339	.558	79.5	.607	18.8
:	:	:	:	:	:	:	:

* Valeur calculée d'après l'équation (7)

** Substrat consommé/substrat initial

Hi : humidité initiale ; PSI: poids sec initial; X: Biomasse;

So: Substrat initial (amidon); Sf Substrat final (amidon)

milieu mixte
avec différentes humidités

Comme dans le chapitre 1-2.2, il est possible à partir des données d'O₂ de calculer la biomasse. D'autre part, la concentration de substrat et l'humidité totale nous sont fournies par l'expérience et l'on peut donc déduire la quantité d'eau résiduelle (H₂O_R). Toutes ces données consignées dans le tableau 6 pour une HI de 65% nous ont permis de calculer l'évolution de l'Aw du milieu (farine + sels) tout au long de la fermentation (cf. 1-2.2).

**** Production de glucoamylases**

On peut observer sur la Fig. 16 que la production de glucoamylases apparait liée à la croissance pendant la phase exponentielle. Dans les expériences avec des HI de 65 et 70% on peut observer après 30 h de culture l'apparition d'une synthèse secondaire d'enzymes. Ce phénomène avait été décrit par Alazard et Raimbault (1980) lors des cultures de A.niger sur amidon de manioc uniquement en FS. Le fait que cette synthèse totalement découplée de la croissance n'ait pu être mise en évidence en fermentation liquide peut être du dans le cas de la FS à l'existence d'amidon résiduel.

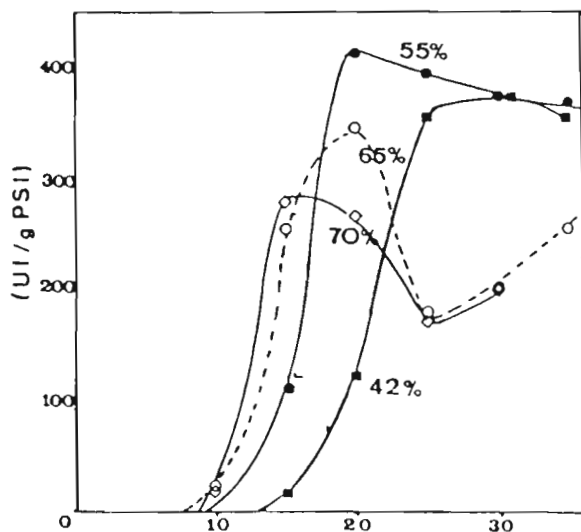


Figure 16: Cinétiques de production de glucoamylases obtenues lors de la croissance de A. niger avec différents contenus d'humidité initiaux.

Si l'eau a un effet clair sur la vitesse de production d'enzymes, son incidence sur les quantités synthétisées est moins évidente et l'on peut observer un optimum d'HI se situant aux alentours de 55%. Au dessus de cette valeur la production est moindre et l'enzyme paraît être moins stable. La diminution de l'activité durant la phase stationnaire est la résultante de deux phénomènes, l'un étant la perte de poids sec du milieu qui se poursuit après la fin de la croissance et l'autre étant la lyse des enzymes notamment sous l'action des protéases. Il semblerait que lorsque l'on augmente l'HI, on se rapproche des conditions de fermentation liquide où la lyse est importante passé les 35 h de culture (Alazard et Raimbault, 1981).

L'existence d'un optimum d'humidité pour la production d'enzymes en FS a été soulignée par de nombreux auteurs (Nishio et col., 1979, Narahara et col. 1982, Hoe-Kim et col. 1985) sans que d'explication ait été donnée. On peut penser qu'interviennent ici des phénomènes de répression de la synthèse de l'enzyme par le glucose qui peuvent être accélérés quand il y a plus d'eau et que donc les diffusions dans le milieu se font plus rapides.

1-4. Conclusion

Cette étude a montré l'importance de l'eau et, à travers l'Aw, de la disponibilité de celle-ci dans le processus de FS du manioc par un champignon filamenteux. Les effets de l'eau se font sentir tant du point de vue vitesse de croissance que taux de conversion du substrat.

L'équation de Ross (1975) s'est révélée satisfaisante pour estimer les Aw initiales des milieux mais aussi pour prédire l'évolution de celles-ci pendant la fermentation. Les calculs effectués par cette méthode ont montré une bonne adéquation avec les phénomènes observés.

L'utilisation d'un support, si elle recèle peu d'utilité pratique montre l'intérêt qu'il y a à augmenter l'Aw du substrat en début de culture et à la contrôler pendant la croissance. La notion de support jouant un rôle de réservoir d'eau pour le microorganisme permet de modifier les processus de FS et par la même leur ouvre de nouvelles perspectives comme nous allons le voir dans la partie suivante.

II. CULTURES DE A. NIGER SUR SUPPORT

II-1. Introduction

Dans la fermentation du manioc par A.niger, l'addition d'un support à forte capacité de rétention d'eau nous a permis d'améliorer la vitesse de croissance mais aussi l'utilisation du substrat. Nous avons montré d'une part que la FS est limitée par la disponibilité de l'eau et par conséquent par la vitesse de diffusion des nutriments et, d'autre part que quand l'HI et l'Aw augmentent on se rapproche des conditions de fermentation liquide.

Une des différences de base de la FS avec la fermentation liquide reste l'insolubilité du substrat et, dans cette optique, il nous a ainsi paru intéressant d'utiliser un substrat à l'état dissous directement absorbé sur un support inerte nutritionnellement. Ce type de fermentation sur support ouvrirait de nouvelles perspectives à la FS:

- la FS ayant jusqu'alors été limitée à l'utilisation d'oses polymérisés (amidon, cellulose) capables de retenir l'eau, la culture sur support élargirait le champ de la FS aux sucres simples et supprimerait certaines étapes limitantes, comme la diffusion des enzymes extracellulaires et l'attaque des substrats insolubles (Suga et col. 1976). On pourrait d'autre part employer dans les conditions de la FS des milieux décrits dans la littérature pour les fermentations liquides.

- jusqu'alors, dans la FS la matrice solide était indissociable du substrat et, au fur et à mesure que celui-ci était hydrolysé, la configuration de la matrice et donc les conditions de la culture changeaient. La culture sur support séparerait le substrat du support et permettrait ainsi un rapprochement avec les fermentations liquides mettant en jeu des champignons filamenteux immobilisés (Gbewonyo et Wang, 1983).

- d'un point de vue plus pratique, il existe une méthode simple de récupération de cellulases par pressage qui met à profit les propriétés "d'éponge" de la bagasse (Roussos, 1985). L'extension de ce moyen d'extraction aux cultures sur support permettrait d'obtenir des enzymes ou des métabolites produits jusqu'alors en fermentation liquide et d'autre part de disposer de meilleurs critères de comparaison des "jus" concentrés extraits des milieux solides avec ceux obtenus lors des fermentations liquides.

Des cultures faisant appel à des substrats solubles imprégnés sur des supports ont déjà été décrits dans la littérature.

Ainsi Meyrath (1966) utilisa un milieu liquide amylicé imprégné sur de la vermiculite pour la croissance de A.oryzae. Un peu plus tard, Fujishima et col. (1972) utilisèrent de l'éponge imprégnée d'un milieu glucose-peptone, pour la croissance et la production d'enzymes par Aspergillus et Penicillium sp.. Pour ces auteurs, ce système présentait en outre l'attrait de permettre l'ajout de substrat en cours de fermentation, ce qui est généralement difficile en FS. Aidoo et col. (1982) utilisèrent également ce type de support pour la production d'acide citrique par A.niger.

Lakshminarayana et col. (1975) reprenant l'idée de Cahn et col. (1935) mirent au point un procédé de production d'acide citrique par A. niger sur de la bagasse de canne imprégnée d'un milieu synthétique.

Plus récemment, Sato et col. (1983) utilisèrent la croissance de levures sur un support constitué de pulpe de bois imprégnée d'une solution de glucose comme un modèle qui fut ensuite étendu à la fermentation du "koji".

Il faut souligner que malgré qu'elles ont été appliquées à des fins de production d'enzymes ou de métabolites, ou ont servi de modèles pour d'autres fermentations, les FS sur support n'ont jamais fait l'objet d'une étude fouillée des paramètres de culture.

Nous avons donc, dans un premier temps, étudié le comportement d'un champignon filamenteux sur support imprégné en faisant varier les conditions expérimentales. Pour ces études nous avons gardé la souche de Aspergillus niger No 10, de vitesse de croissance rapide et déjà abondamment utilisée au sein de notre groupe. En ce qui concerne le support, l'antériorité du travail fait avec la bagasse nous a conduits à conserver ce support qui, du fait de sa nature biologique, n'est pas absolument Inerte mais qui présente une grande capacité d'absorption et qui est facile à manipuler. Nous avons ainsi travaillé avec de la bagasse imprégnée d'une solution de glucose et de sels (cf. Matériel et méthodes)

11-2. Etude des parametres de la croissance de A.Niger r bagasse imprégnée

11-2.1. Influence de la concentration d'une solution de glucose et de sels sur Aw initiale.

Nous avons vu (cf. 1-3.2.) que la bagasse possédait un A_w/W^* faible et l'on peut donc penser à priori que l'influence de la concentration de la solution nutritive sur l' A_w du milieu sera prépondérante. Nous avons donc fait varier la concentration de glucose et de sels (avec un rapport pondéral constant 85/15) en solution et avons suivi l'évolution de l' A_w .

L' A_w en fonction de la concentration de solides dans la phase aqueuse a été linéarisée par l'équation (6) et est représentée sur la Figure 17. La pente est élevée, -0.189 HR/ (g de solides/ g d'eau) mais inférieure à celle observée avec le seul mélange salin ce qui montre que le glucose a moins d'action sur l' A_w que les sels.

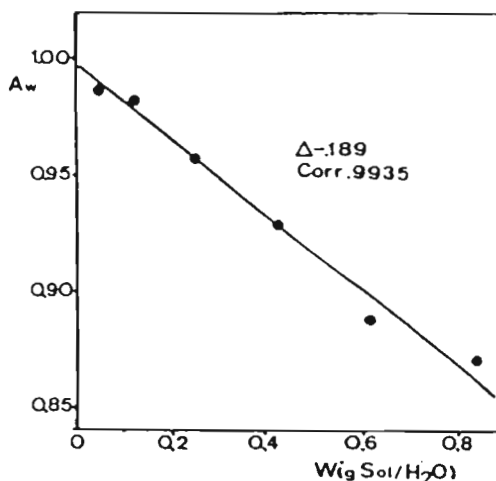


Figure 17: Représentation linéarisée d'après l'équation (1) de l' A_w en fonction de la concentration (W) d'une solution de glucose et de sels.

11-2.2 Quantité d'eau

Dans les cultures sur support, l'humidité doit être abordée d'un angle différent que dans les FS traditionnelles. En effet, le milieu possède trois constituants qui sont le support, le substrat et l'eau, et l'on peut changer l'humidité initiale en jouant sur un des constituants solides et sur l'eau indépendamment du troisième constituant.

Dans cette expérience nous avons décidé de ne pas changer la concentration de substrat dans la phase liquide (168 g/l) et avons fait varier l'humidité initiale en modifiant le rapport bagasse/eau. L'inoculum de spores a quant à lui été maintenu constant avec 2×10^7 spores par g de support.

Les cinétiques de consommation d'O₂ observées ont été très ressemblantes et leur intégration donne les mêmes résultats que ceux observés avec le manioc à savoir que diminue au fur et à mesure de la croissance. Les résultats consignés dans le tableau 7 ne montrent pas de réelle influence du rapport bagasse/eau sur le comportement du champignon. On peut seulement observer un raccourcissement de quelques 3 h du temps de fermentation et un légèrement supérieur pour les rapports bagasse/eau (P/P) de 0.36 et 0.50.

Tableau 7: Influence de l'humidité initiale sur les paramètres de croissance de *Aspergillus niger* sur support imprégné.

Rapport bagasse/eau: (P/P)	Humidité: initiale: (% PT)	Aw initiale:	mu h ⁻¹	Durée: (h)
1.30	40	.975	.453	18.0
0.83	50	.981	.388	17.5
0.50	60	.977	.429	15.5
0.36	65	.977	.473	15.0
0.25	70	.974	.464	17.0
0.19	75	.973	.429	17.5

Si l'on calcule par l'équation (7) de Ross (1975) l' A_w , on peut voir (Tab.7) que celle-ci varie extrêmement peu dans un intervalle d'humidité important (40 à 75 %). On peut penser que la faible variation de l' A_w initiale explique la similitude des profils de croissance obtenus, cette hypothèse trouvant sa confirmation dans le paragraphe suivant.

11-2.3. Concentration de glucose dans la phase liquide

Nous avons donc gardé une quantité de support de 0.36 g par g d'eau, un inoculum de 2×10^7 spores/g de bagasse, et fait varier la concentration de glucose dans la solution d'impregnation de 37 à 477 g/l. Il faut bien prendre en compte que les concentrations considérées se situent bien au-dessus du K_s et que l'"affinité" du microorganisme pour son substrat n'intervient donc pas dans nos mesures.

Sur la Fig. 18 sont reportées les courbes de vitesse de consommation d' O_2 par colonne de 30 g de matériel humide, ces courbes ont été intégrées (cf. matériel et méthodes) en supposant un coefficient de maintenance constant ($mO_2 = 0.07 \text{ g } O_2/\text{g } X/\text{h}$). Cet à priori est peut-être critiquable dans la mesure où la littérature fait état d'augmentations de mO_2 avec la salinité et donc l' A_w du milieu (Pirt, 1975), mais le manque de précision des méthodes de mesure de biomasse en FS ne permet pas une estimation sûre de ce coefficient. Les cinétiques de production de biomasse représentées sur la Figure 19 ont été analysées suivant la méthode de Kono (1968) et on peut observer plusieurs effets de la concentration de sucres sur la croissance:

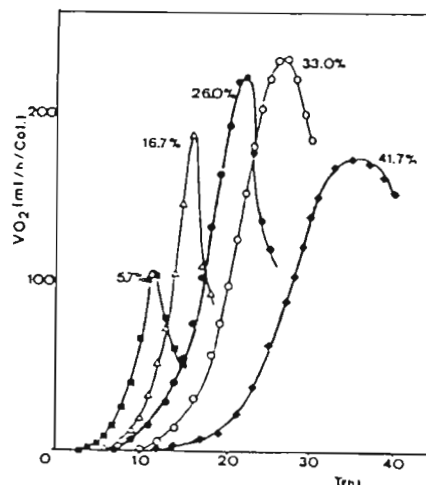


Figure 18: Evolution des vitesses de consommation d' O_2 (VO_2) observées lors de la croissance de *A.niger* sur support pour différentes concentrations de glucose dans la phase liquide.

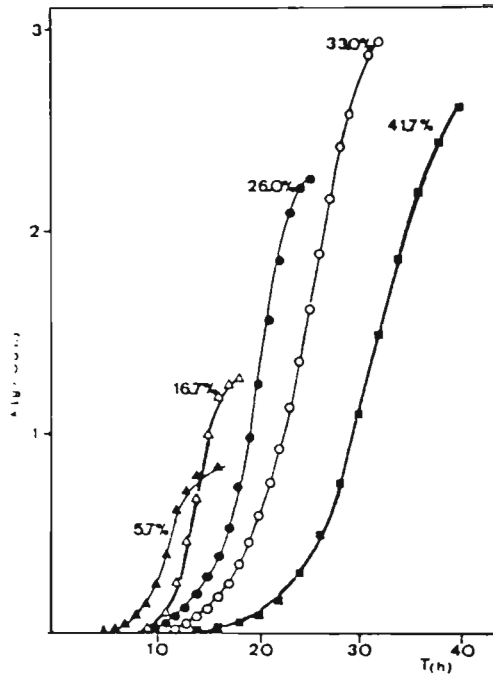


Figure 19: Cinétiques de production de biomasse calculées à partir des VO_2 de la Figure 17 pour différentes concentrations de glucose dans la phase liquide.

Effet sur le temps de germination

La figure 21 montre qu'une augmentation de la concentration de substrat dans la phase liquide allonge de manière importante le temps de germination qui passe de 3 à 17 h dans l'intervalle étudié.

Effet sur le taux spécifique de croissance moyen .

Si l'on porte la vitesse de production de biomasse rx en fonction de X (Fig. 20) on peut voir qu'il n'existe pas à proprement parler de phase linéaire où donné par la pente de la courbe serait constant. Si rx augmente, diminue régulièrement jusqu'à ce que l'on atteigne une biomasse critique X_c après laquelle rx chute. Le apparent moyen exprimé comme une fonction de l' A_w initiale du milieu (Fig.21) suit une évolution positive et l'examen des courbes de rx en fonction de X (Fig. 20) montre d'ailleurs que c'est la phase finale de la croissance qui est la plus affectée par la concentration et donc l' A_w du milieu . Ces résultats confirment ceux obtenus avec la

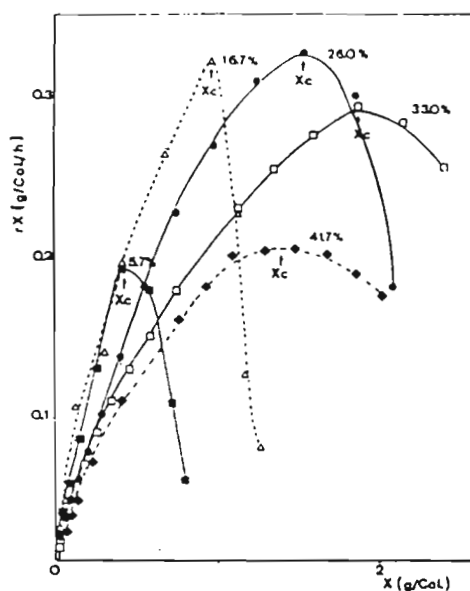


Figure 20: Représentation de la vitesse de formation de biomasse rX en fonction de X pour différentes concentrations de glucose dans la phase liquide.

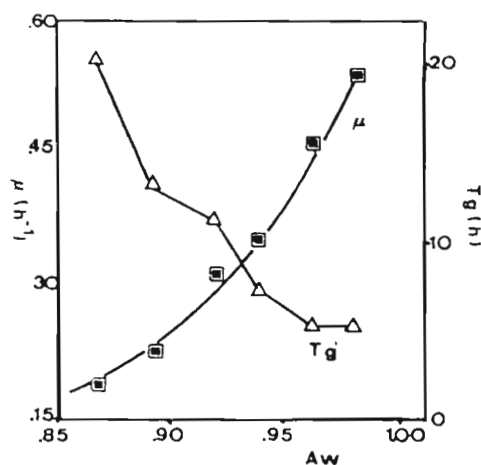


Figure 21: Représentation de μ et du temps de germination en fonction de l' A_w initiale du milieu

farine de manioc (cf. 1-3.4.) et dans le paragraphe précédent, à savoir que ce n'est pas la quantité d'eau qui importe autant que l' A_w du milieu et donc la disponibilité de cette eau.

On peut penser que la courbe du moyen en fonction de l' A_w du milieu est représentative de la xérophilie de la souche considérée, ce terme étant défini par Pitt et Hocking (1977) comme la capacité d'un champignon à croître dans des conditions d' A_w faible et donc de pression osmotique élevée.

Afin d'affiner l'analyse, plusieurs expériences complémentaires ont été effectuées avec des concentrations de glucose comprises entre 160 et 330 g/l et l'on a pu observer les phénomènes suivants:

Effet sur la vitesse de formation de biomasse maximum

En portant $r_x \text{ max}$ en fonction de la quantité de sucres présente dans la colonne (Fig. 22), on voit qu'il existe un optimum se situant aux alentours de 260 g/l. En deçà de cette valeur, $r_x \text{ max}$ est réduit par manque de substrat mais au dessus, la quantité de substrat n'est plus limitante et on peut penser que c'est alors la diffusion de celui-ci qui est ralentie par la faible activité de l'eau.

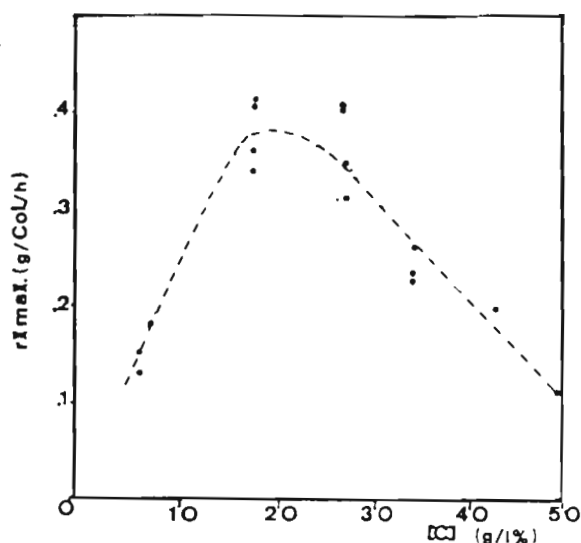


Figure 22: Représentation de la vitesse maximum de formation de biomasse $r_x \text{ max}$, en fonction de la concentration de glucose dans la phase liquide

Effet sur la biomasse critique (X_c)

Si le substrat était le seul facteur limitant de la croissance, X_c devrait augmenter avec la concentration de sucres dans le milieu (Kono, 1968). Or, on s'aperçoit (cf. Fig.23) que à gauche de la courbe, X_c augmente avec la quantité de sucres puis à partir d'une concentration de 260 g/l, X_c se maintient entre 1.5 et 1.9 g X/ 30 g de milieu initial. La biomasse critique, valeur à partir de laquelle on observe une diminution de r_x , apparaît donc, à droite de la courbe indépendante de la quantité de glucose dans le milieu.

On peut penser que X_c correspond à une certaine densité de mycélium à partir de laquelle des phénomènes d'encombrement stérique (Laukevics et col., 1985) ou de diminution de transfert d'oxygène ou de substrat deviendraient sensibles.

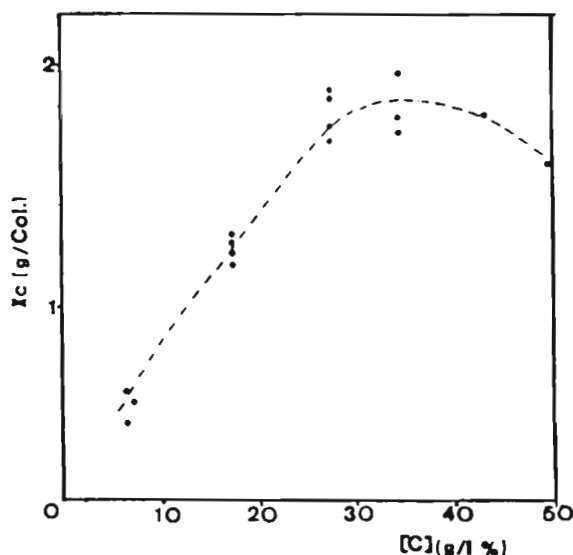


Figure 23: Représentation de la biomasse critique X_c en fonction de la concentration de glucose dans la phase liquide

Effet sur la biomasse maximum (X_{max})

La biomasse maximum X_m estimée à partir des V_{O_2} atteindrait son maximum pour 330 g/l dans la phase liquide. Ce résultat est en contradiction avec la valeur de biomasse finale obtenue par dosage des protéines totales sur l'échantillon de 417 g/l de glucose (tableau 8). Les autres X_{max} calculés à partir des V_{O_2} sont eux en accord avec les valeurs mesurées.

Tableau 8: Paramètres de la croissance de *A.niger* sur support avec différentes concentrations de glucose dans la phase liquide

: Conc. de : Aw : So : X max : X max : S cons.: Rx : Durée:							
: glucose : init.:mesuré :calculé: mesuré: mesuré :							
: (g/l) : (% HR): * : * : * : * : (g X/g S): (h) :							
57	98.6	1.67	0.85	0.58	1.10	.527	12
167	96.2	3.63	1.60	1.40	2.81	.498	16
260	93.9	5.88	2.30	2.39	5.08	.470	26
330	92.0	6.86	3.00	2.95	5.99	.492	31
417	89.3	8.46	2.71	3.82	7.53	.507	40

* Ces résultats sont exprimés en g / colonne soit 30 g de produit humide.

So: substrat initial; S cons.: substrat consommé; X max : biomasse maximum

Les cinétiques de consommation de glucose représentées sur la Fig. 24 montrent des profils ressemblants à ceux des cinétiques de production de biomasse calculées à partir des VO_2 . Même à des concentrations de glucose élevées, la dégradation des sucres est rapide; plus de 80% de ceux-ci sont en effet consommés après 40 h pour une concentration initiale de 417 g/l dans la phase liquide. Contrairement à la croissance sur manioc, dans la gamme d'Aw étudiée sur support, la conversion des sucres est quasi totale et l'eau ne semble donc pas être limitante stoechiométriquement.

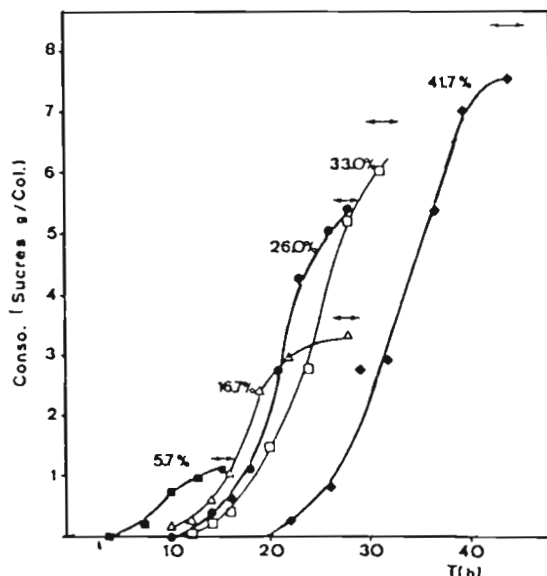


Figure 24: Cinétiques de consommation de sucres observées lors de la croissance de *A.niger* pour différentes concentrations de glucose dans la phase liquide.

Le système proposé a rendu possible des cultures avec des concentrations de 480 g/l de glucose dans la phase liquide, ce qui correspond à une A_w de 0.870. Néanmoins, à de telles concentrations, commencent à apparaître des gradients de croissance dans notre réacteur; les parties inférieures et supérieures de la colonne sont soumises à des phénomènes de condensation créant ainsi des zones où l' A_w augmente et où le microorganisme croît avec une plus grande facilité. Il est toutefois important de noter que de telles concentrations de glucose sont difficilement praticables lors de cultures batch en milieu liquide et à fortiori avec des champignons.

Les conditions spécifiques de la FS grâce notamment à l'importance de l'interface air/eau/microorganisme rendent possibles les transferts de masse dans des milieux visqueux, et peuvent fournir une explication à ces résultats. Les vitesses spécifiques de croissance observées sont élevées mais difficiles à comparer avec celles données dans la littérature pour des A_w comparables, puisque la plupart des études sont effectuées sur plaques d'agar.

11-2.4. Taille des particules de support

La concentration de glucose étant fixée à 280 g/l, le rapport pondéral bagasse/eau à 0.36 et la quantité d'inoculum à 2×10^7 spores/ g de support, nous avons fait cinq expériences avec différentes tailles de particules de bagasse de 10 à 150 mesh soit des diamètres moyens de fibres de 0.1 à 3.0 mm. Toutes les fractions de bagasse ont été auparavant lavées de façon à éviter des différences dans la composition en sucres du milieu.

Sur la Fig. 25 nous avons représenté les vitesses de consommation d' O_2 mesurées avec trois tailles de fibres différentes; on peut observer que les courbes sont très ressemblantes pendant la germination et le début de la phase exponentielle mais vers la fin de la croissance, les vitesses maximum augmentent et les profils deviennent plus aigus lorsque la taille de la particule diminue.

Ces courbes ont été intégrées pour estimer l'évolution de la biomasse (Fig. 26).

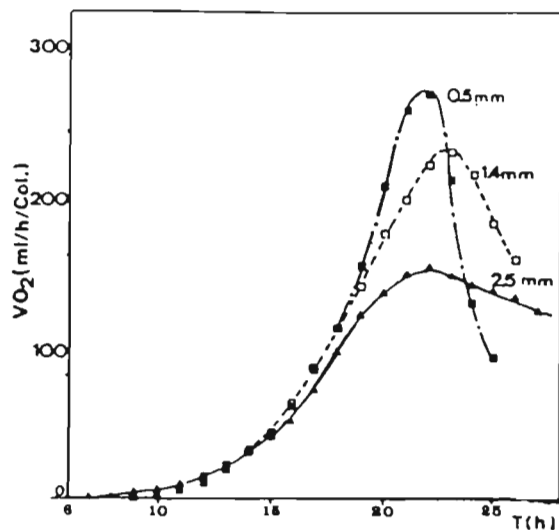


Figure 25: Evolutions des vitesses de consommation d' O_2 observées lors de la croissance de *A.niger* pour différents diamètres moyens de particules de support.

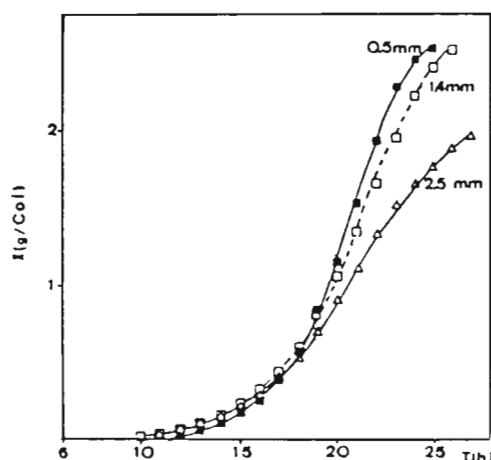


Figure 26: Cinétiques de production de biomasse calculées à partir des V_{O_2} de la Figure 24 pour différents diamètres moyens des particules de support.

Si l'on porte $r_{x \max}$ et X_c en fonction de la taille des fibres (Fig. 27), on peut observer que $r_{x \max}$ augmente lorsque les fibres sont plus finement réduites. La biomasse critique X_c se maintient aux alentours de 1.6 g X / colonne, sauf lorsque l'on emploie les fibres les plus grossières (diamètre moyen supérieur à 2 mm) où alors, X_c est significativement (20%) abaissée. Dans ce dernier cas, $X_{\max}$ est également plus bas, ce résultat ayant été corroboré par le dosage des acides aminés totaux (cf. Tab. 9).

Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer ces effets mais deux d'entre elles ont plus particulièrement retenu notre attention:

- Le développement du microorganisme est essentiellement superficiel (cf. photos de microscopie électronique) et une augmentation de la taille de la particule entraîne une diminution de la surface spécifique et donc de la surface accessible au mycélium. L'abaissement du X_c et du X_m pour des fibres de plus de 3 mm serait donc attribuable en partie à ce que l'on atteint plus rapidement la densité de mycélium critique.
- Pour expliquer l'effet sur le $r_{x \max}$, on peut supposer que plus le diamètre de la fibre est important, plus la vitesse de diffusion intraparticulaire du substrat devient limitante en fin de croissance.

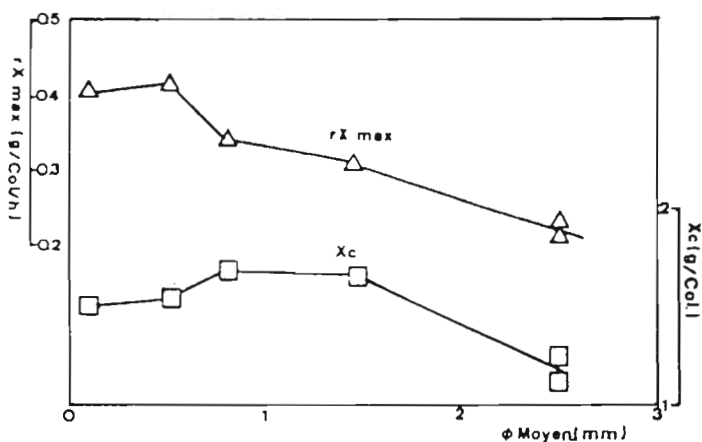


Figure 27: Représentation de la vitesse maximum de formation de biomasse rX_{max} et de la biomasse critique X_c en fonction du diamètre moyen des particules du support.

Tableau 9: Paramètres de la croissance de A.niger sur support avec différentes tailles des fibres du support.

Taille de fibres x (mm)	Densité (g/cm ³)	X _m calculé *	X _m mesuré *	S cons. mesuré *	Rx (g X/g S)	Durée (h ⁻¹)	Durée (h)
2.50	.230	2.05	2.16	4.75	.455	.323	27
1.43	.295	2.60	2.66	4.95	.537	.330	26
0.79	.295	2.40	2.52	5.42	.465	.348	26
0.51	.295	2.60	2.76	4.76	.580	.400	25
0.10	.485	2.33	2.53	4.58	.552	.375	25

* Résultats exprimés en g / 30 g de milieu humide initial

X_m : biomasse maximum; S cons. Substrat consommé

Pour des tailles moyennes de fibres de l'ordre de 100 μ m, la densité du milieu est considérablement augmentée sans que la quantité finale de mycélium produite soit affectée. Il est possible dans ces conditions d'obtenir plus de 40 g de biomasse/l de réacteur, concentration bien supérieure à la limite établie par Laukevics et col. (1985) de 30 g/l. Pour ces auteurs la faible utilisation de l'espace par les champignons filamenteux se traduirait par une densité critique qui conditionnerait les rendements de la FS. Les résultats précédents montrent que la surface spécifique du support accessible au champignon est un paramètre au moins aussi important, et que s'il existe une limite de densité des hyphes elle se situe à des valeurs plus élevées que celles avancées par ces auteurs.

11-2.5. Quantité d'inoculum

Pour les études précédentes nous avons travaillé avec une quantité d'inoculum de 2×10^7 spores par gramme de support. Dans cette expérience, nous avons voulu voir si la quantité d'inoculum était importante dans les fermentations sur support comme elle l'est dans les fermentations solides ou liquides normales. Nous avons donc maintenu constants les autres paramètres (0.36 g de support/ g d'eau, concentration de glucose dans la phase liquide de 168 g/l) et avons fait varier la quantité d'inoculum de 8×10^5 à 1×10^9 spores/ g de support ce qui correspond respectivement à 2.7×10^5 et 3.4×10^8 spores / ml de milieu liquide.

Sur la Figure 28 on peut apprécier les V_{O_2} mesurées lors des différentes fermentations. Ces vitesses ont été intégrées et les cinétiques d'apparition de biomasse sont représentées sur la Figure 29. Il apparaît que lorsque la quantité d'inoculum augmente, le temps de culture diminue drastiquement. Si l'on porte le temps de fermentation en fonction du logarithme de la quantité d'inoculum (cf. Fig. 30), on peut observer que celui-ci décroît quasi linéairement, passant de 26 à 11 h lorsque le nombre de spores est multiplié par 1250. Il est également remarquable que, comme on peut le voir sur le tableau 10, il n'y ait pas d'effet marqué de la taille d'inoculum sur la vitesse spécifique de croissance moyenne.

Le peu de variations observées pour des inoculums supérieurs à 1×10^8 spores/ g de support est important, la littérature faisant état de phénomènes d'inhibition pour ces quantités d'inoculum en fermentation solide (Raimbault et Alazard, 1980).

L'existence d'un auto-inhibiteur de la germination chez *A.niger* est connue depuis un certain temps (Krishnan et col., 1954) et des études récentes effectuées au sein de notre laboratoire, ont montré que l'effet d'inhibition est beaucoup moins prononcé quand on utilise du glucose comme substrat carboné plutôt que de l'amidon.

Quoi qu'il en soit, en fermentation liquide, du fait sans doute de la diffusion supérieure de l'inhibiteur, le seuil d'inhibition est beaucoup plus bas de l'ordre de 10^6 spores par ml (Macko et col., 1976).

Sur le Tableau 10 on observe peu de variations en ce qui concerne la biomasse produite et la consommation des sucres, le résultat légèrement supérieur obtenu avec 1×10^9 spores /g de support pouvant être attribué au peu d'avancement de la croissance et aux spores non germinées. Il est tout de même intéressant de noter que dans ce dernier cas, la consommation de sucres est quasi totale après seulement 10 h de culture, temps pour lequel le mycélium est peu développé. Le champignon n'a donc pas besoin de posséder des hyphes longs et ramifiés pour aller "chercher" le substrat, et on peut penser que les phénomènes de diffusion passive à l'intérieur de la matrice solide sont prédominants dans la nutrition du champignon. Cette hypothèse viendrait confirmer ce que nous avons supposé lors de l'étude consacrée à la taille de particule du support (11.2.4).

La taille d'inoculum ne paraît pas exercer d'influence significative sur le X_c et le $r_{x \max}$ et l'on peut en déduire que pour de faibles concentrations de sucres, ces derniers paramètres sont uniquement gouvernés par la quantité de substrat.

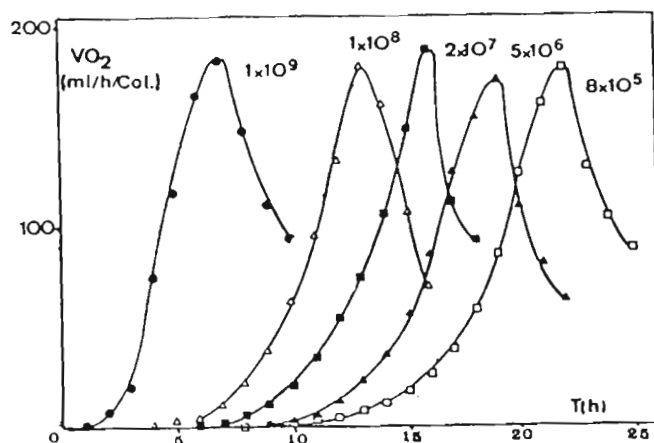


Figure 28: Evolutions des vitesses de consommation d'O₂ observées lors de la croissance de *A.niger* sur support avec différentes quantités d'inoculum de spores par g de support.

Tableau 10: Paramètres de la croissance de *A.niger* sur support avec différentes quantités d'inoculum (Substrat initial: 3.63 g/ colonne)

Quantité d'inoculum (Sp./g supp.):	Xo	Xm	Xm	Xc	S Cons.	Durée:
	:calculé:	:calculé:	:mesuré:	:calculé:	:mesuré:	
	*	*	*	*	*	(h ⁻¹) (h)
8 x 10 ⁵	0.0002	1.50	1.38	1.07	2.65	.415 26
4 x 10 ⁶	0.0008	1.31	1.38	1.02	2.85	.429 22
2 x 10 ⁷	0.0042	1.35	1.41	0.96	2.71	.433 19
1 x 10 ⁸	0.0208	1.40	1.35	0.84	3.41	.464 16
1 x 10 ⁹	0.2075	1.65	1.66	1.09	3.44	.420 11

* Ces résultats sont exprimés en g/colonne soit 30 g de produit humide initial.
Xo: Biomasse initiale; Xm: Biomasse maximum; Xc Biomasse critique

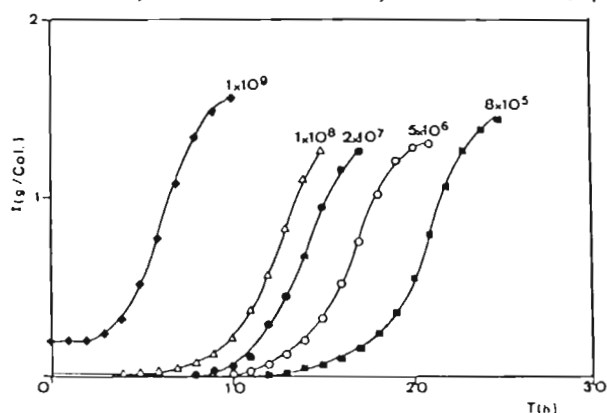


Figure 29: Cinétiques de production de biomasse calculées à partir des VO₂ de la Figure 27 pour différentes tailles d'inoculum de spores par g de support.

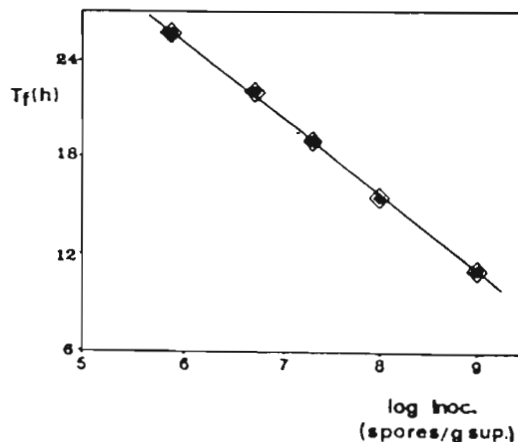


Figure 30: Representation du temps de culture donné par la VO_2 max. en fonction du logarithme de la quantité d'inoculum.

11-3. Conclusion

Cette étude des cultures de A.niger sur des milieux liquides absorbés sur un support solide nous a montré que la concentration de glucose dans la phase aqueuse, et à travers elle l'activité de l'eau du milieu exercent une influence importante sur la vitesse de croissance. Pour de fortes concentrations de saccharose, il a pu être mis en évidence une biomasse critique X_c à partir de laquelle la vitesse de croissance décroît, cette X_c se situerait entre 1.5 et 1.8 g de mycélium sec/ 30 g de matériel initial. Des variations de X_c comme de $r_{x \text{ max}}$ ont été observées lorsqu'on changeait la taille des particules de support ce qui suggère l'existence de résistances aux transferts de masse intraparticulaires du substrat ou de l' O_2 .

Il a été établi que l' A_w était plus importante que la quantité d'eau présente dans le milieu. On se rapproche donc par le biais des cultures sur support imprégné des phénomènes observés en fermentation liquide où l'eau n'est pas limitante stoechiométriquement mais où la disponibilité de l'eau peut tenir un rôle important. Les conditions uniques d'interface eau/air/microorganisme du milieu solide autorisent toutefois des cultures sur des milieux extrêmement concentrés d' A_w faibles (.870) trop visqueux pour être utilisés en batch en fermentation liquide. A l'instar des cultures confinées à des supports en milieu liquide (Gbewonyo et Wang, 1983), des concentrations de mycélium élevées (plus de 40 g/l de réacteur avec une densité de 0.5) peuvent être atteintes en milieu solide.

L'inoculation avec des suspensions denses de spores a permis d'écourter le temps de culture de manière importante et l'absence d'inhibition observée avec des inoculum très concentrés soulève des interrogations sur la physiologie de germination des champignons en milieu solide, certainement différente de celle prenant place en culture profonde où des retards de croissance sont observés avec 500 fois moins de spores.

La bagasse de canne à sucre constitue un modèle qui peut servir de base pour l'étude d'autres supports ou d'autres souches de champignons, dans le but notamment de produire des métabolites.

Ce travail basique a fait l'objet de plusieurs applications dont voici deux exemples:
- l'enrichissement protéique de la canne à sucre entière non prétraitée par culture de A.niger. Ces expériences ont été menées en collaboration avec le CENIC de La Havane.

- la production de pectinases par Aspergillus et Penicillium sp. cultivés sur de la bagasse imprégnée d'un milieu nutritif liquide. Ce travail effectué en collaboration avec la UNAM de Mexico fait appel à une technique d'extraction des enzymes par pressage du produit fermenté (Trejo, 1986).

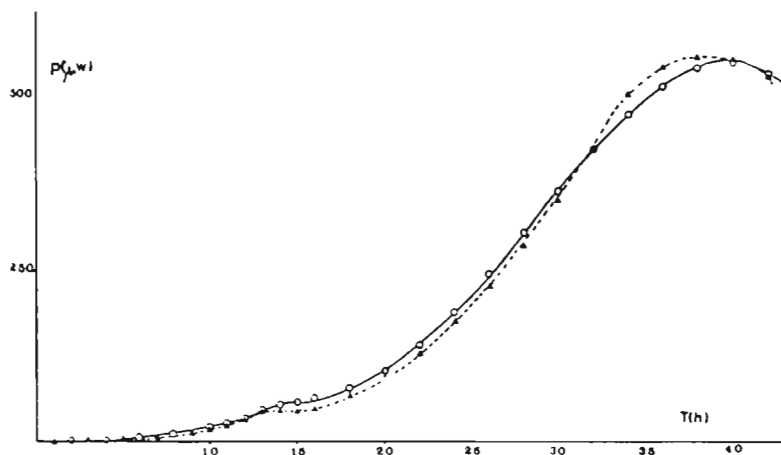


Figure 31: Thermogrammes obtenus lors de la croissance de A. niger sur amidon de manioc (10 mg)

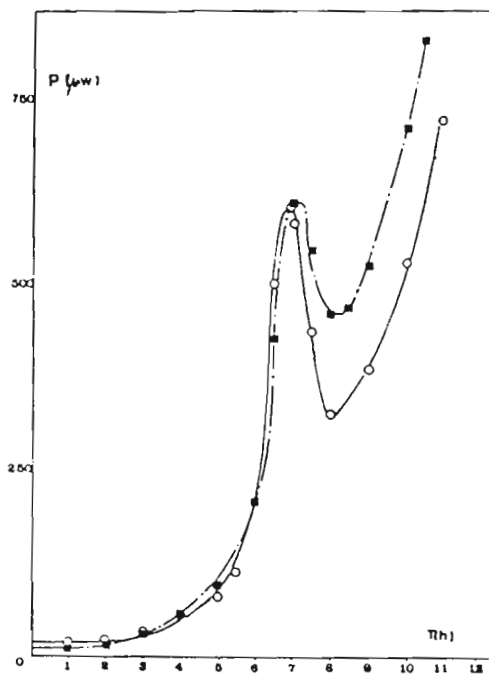


Figure 32: Détail des thermogrammes obtenus lors de la croissance de *A. niger* sur amidon de manioc (100 mg)

III. ETUDES DE MICROCALORIMETRIE

III-1. Introduction

Ce travail s'est déroulé dans le cadre d'un programme de coopération franco-cubain au Centro Nacional de Investigacion Cientifica (CENIC) de La Havane dans le laboratoire de Microbiologie Industrielle. Je remercie Mr R. Contreras, Directeur du Département, ainsi que tout le personnel pour leur aide précieuse.

La microcalorimétrie est une méthode de mesure de la chaleur dégagée par une réaction chimique, enzymatique ou dans le cas qui nous intéresse lors de la croissance d'un microorganisme. La grande sensibilité des appareillages disponibles permet de visualiser immédiatement des phénomènes physiologiques ou métaboliques plus difficilement accessibles par les méthodes d'analyse classique. Si la microcalorimétrie a été largement utilisée pour étudier les bactéries (Belaich, 1980) ou les levures (Lamprecht, 1980), il existe peu de publications concernant le métabolisme des champignons. On peut citer dans ce domaine les travaux de Jungholm et col. (1980) sur la germination de Fusarium roseum ou ceux de Contreras et col. (1986) caractérisant des mutants Cellulase (-) chez des pourritures blanches lignolytiques. Cette lacune peut être attribuée à des problèmes méthodologiques, les conditions critiques d'aération-agitation indispensables à la croissance des champignons filamenteux étant difficiles à maintenir dans les microcalorimètres classiques. De ce point de vue, les cultures solides qui peuvent être menées en réacteur statique, sont plus facilement adaptables aux conditions requises par ces instruments.

Après examen des antécédents, nous avons entamé notre étude avec les propos suivants:

- Obtenir des thermogrammes de croissance de A.niger sur farine de manioc et voir si la grande sensibilité de la méthode (0.2 watts soit 10^{-6}°C : cf. Matériel et Méthodes) nous permettrait de séparer les différentes phases de la croissance sur substrat solide uniquement accessibles par le calcul (Raimbault, 1980).
- Estimer les quantités de chaleur dégagées lors de la croissance de A.niger sur farine de manioc.
- Obtenir des thermogrammes de croissance de A.niger sur un support constitué de bagasse de canne imprégné d'une solution synthétique contenant du glucose et des sels, et observer l'influence de la concentration de substrat et de la taille d'inoculum sur ces derniers.

III-2. Aspects méthodologiques

Ce microcalorimètre n'étant pas équipé d'une cellule à flux continu, les flacons sont scellés au début de l'expérience. Dans ces conditions, la croissance des microorganismes aérobies peut devenir rapidement limitée par la concentration d'oxygène à l'intérieur du flacon, ce qui nous oblige à utiliser de faibles quantités de substrat.

Un flacon contient 3 ml soit 4.28 mg d'O₂ si l'on considère que la pression partielle (PP) d'O₂ est de 100%. Dans l'équation stoechiométrique de la réaction de croissance de *A.niger* sur manioc établie par Raimbault (1980), il faut 2.1 moles soit 67.2 g d'oxygène par mole de glucose consommée. Ainsi la quantité limite de substrat pouvant être présente dans le milieu est de:

$$4.28 \times 180/67.2 = 11.5 \text{ mg.}$$

La faible taille de l'échantillon concerné, la PP d'O₂ saturante et l'herméticité des flacons font que les conditions de culture diffèrent sensiblement de celles que nous utilisons en FS. Nous pensons néanmoins que le milieu solide restant exactement le même, les résultats obtenus peuvent nous fournir des indications sur la physiologie des champignons filamenteux en FS.

III-3. Analyse thermochimique de la croissance de *A.niger* sur farine de manioc.

Nous avons pratiqué une première expérience avec 10 mg de farine de manioc, cette quantité représentant à peine quelques grains au fond du flacon. Les thermogrammes obtenus lors de deux répétitions sont représentés sur la Fig. 30 où le parallélisme de leurs évolutions montre la bonne reproductibilité de la mesure. Le processus est plus lent que lors des fermentations en colonne qui, suivies par gazométrie durent à peu près 25 h.

On peut remarquer un accident dans la courbe de croissance, correspondant à un léger saut énergétique qui se produit entre 11 et 15 h de fermentation. Pour observer ce phénomène avec plus de précision, nous avons réalisé un essai avec 100 mg de substrat, l'O₂ n'étant pas limitant jusqu'à 20 h dans ces conditions. Le thermogramme partiel obtenu est représenté sur la fig. 31 où l'on peut observer avec beaucoup plus de netteté le saut énergétique; il a dans ce cas lieu entre 6 et 8 h contre 11 à 15 h dans l'expérience précédente. Cette différence peut s'expliquer par la très faible quantité de substrat et

d'inoculum présente dans le premier cas où il semble que l'on atteigne une des limites physiques du système.

Pour en revenir à la dernière expérience, une observation microscopique d'un échantillon prélevé au moment du pic montre des spores germées, en phase homogène à 90% et possédant un tube germinatif long de 4 à 5 fois la taille de la spore. Cette période comprise entre 6 et 8 h correspond à la fin de la phase de germination. La germination est une phase largement endogène (ussmann, 1965) tandis que la phase de croissance exponentielle est totalement exogène. Ces expériences de microcalorimétrie nous montrent que pendant cette période transitoire du métabolisme se mettent en place des mécanismes exothermiques. Cette exothermie ne semble pas liée à des processus respiratoires puisque cet "accident" n'a pas été détecté en respirométrie (cf. Fig.18). Les résultats suivants obtenus sur support permettent de préciser un petit peu mieux la nature de ce phénomène.

Si l'on s'intéresse au rendement calorifique global de la croissance au moyen du calcul de l'aire sous la courbe (cf Fig. 30), on obtient la quantité de 7.35 cal libérée en 43 h.

La chaleur Q_c dégagée pour la croissance et la maintenance ramenée à un gramme de biomasse est donnée par l'équation suivante:

$$Q_c = \frac{H_s}{R_x} - H_x \quad (1)$$

où H_s est l'enthalpie de combustion du substrat (Kcal/g substrat)

H_x est l'enthalpie de combustion des cellules (Kcal/g biomasse)

R_x est le rendement de transformation de substrat en
biomasse (g biomasse/g substrat)

Les valeurs de H_s et H_x ont été calculées par Wang et col.(1976) pour les levures cultivées sur glucose et sont respectivement de 3.74 et 4.70 Kcal/g. En se basant sur un R_x de 0.55, on obtient une quantité de chaleur Q_c de 2.10 Kcal/g de cellules.

La chaleur totale dégagée par flacon lors de la croissance est de 7.35×10^{-3} Kcal ce qui correspond à 3.5 mg de biomasse. Sachant que 60% des sucres initiaux sont consommés en fin de fermentation (cf. 1-2.1.) soit 6 mg par flacon, on obtient un R_x de $3.5/6 = .58$ très proche de celui sur lequel nous nous étions basés pour le calcul.

Les valeurs d'enthalpie proposées par Wang et col.(1976) pour la croissance de levures sur glucose semblent donc bien s'adapter à la croissance de A. niger sur amidon.

III-4. Analyse thermochimique de la croissance de A.niger sur bagasse imprégnée d'une solution saline de glucose.

III-4.1.Effet de la concentration de glucose dans la phase liquide.

Une série d'expériences a été montée utilisant 15 mg de bagasse lavée puis séchée imprégnée de 40 l d'une solution saline de glucose de concentration croissante. L'inoculum a été fixé à 3×10^5 spores pour chaque essai. Nous n'avons pas remarqué de différences significatives lors des répétitions et les thermogrammes obtenus sont reportés sur la figure 31. Dans trois des quatre thermogrammes, on peut observer le même saut énergétique que dans le cas de l'amidon de manioc mais ici, il apparaît plus tardivement et son importance augmente au fur et à mesure que le glucose en solution est plus concentré. A l'atténuation utilisée (3000 W) l'expérience avec la solution contenant 35.8 g/l n'a pas permis de déceler de pic dans cette zone.

Si l'on trace une courbe qui ne tient pas compte de ce saut énergétique (cf fig. 31, pointillés), il est possible de mesurer une aire comprise entre le premier pic et la courbe idéale qui correspond à une quantité de chaleur (cf. tab.1). Si l'on porte cette chaleur contre l'activité de l'eau initiale du milieu, on observe une évolution positive (cf. Fig. 32) qui montre que l'exothermie du premier pic est d'autant plus importante que le champignon est confronté à des Aw plus faibles et donc des forces osmotiques croissantes. Dans les trois cas où il apparaît, ce pic correspond à 5% de la chaleur totale produite.

L'expérience comportant 216 g/l de glucose dans la phase liquide a été refaite et complétée par des observations de microscopie électronique sur des échantillons prélevés toutes les heures pendant le premier pic (Planche 1). Les clichés montrent le processus de germination partant de la spore (a). On peut suivre le bourgeonnement du tube germinatif encore peu développé à t=7 h (b) puis mesurant déjà de 4 à 5 fois la taille de la spore après 8 h de culture (c). Ces clichés montrent à l'évidence que la sortie du tube germinatif a lieu en un court laps de temps correspondant à peu près au maximum d'intensité du premier pic. Sur la photographie suivante (d) prise à t=10 h on peut apprécier la croissance apicale. Enfin, le cliché (e) correspondant à la fin de la fermentation (t=20 h) montre un mycélium assez lâche qui tapisse la surface des particules de bagasse.

Comme lors de l'étude en colonne (cf. II-2.1), une augmentation de l'Aw du milieu allonge le temps de germination et ralentit la croissance.

En ce qui concerne la chaleur totale dégagée, si l'on effectue le même raisonnement que dans le chapitre précédent en considérant que 85% du glucose est consommé à la borne supérieure de l'aire (Tableau 11), on obtient des Rx à peu près similaires pour les trois dernières concentrations mais pour la première, le rendement est élevé. On peut supposer que bien qu'elle ait été lavée, la bagasse contient toujours du saccharose résiduel qui interfère dans les résultats quand la concentration de la solution d'imprégnation est faible.

Tableau 11: Paramètres calculés à partir des thermogrammes

:Concentration de:	Aw	:Aire sous:	Aire :	Glucose :	Biomasse :	Rx :
: glucose	:Initiale:	1er pic :	totale:	consommé :	calculée :	:
: (g/l)	: (%HR)	: (cal)	: (cal):	: *	: *	: (g X/g S):
: 35.8	: 99.1	: 0	: 2.80	: 1.43	: 1.00	: 0.70
: 82.2	: 98.1	: .167	: 3.95	: 2.78	: 1.42	: 0.51
: 127.0	: 97.2	: .384	: 6.65	: 4.32	: 2.39	: 0.55
: 216.5	: 95.1	: .673	: 11.35	: 7.66	: 4.08	: 0.55

* mg par flacon

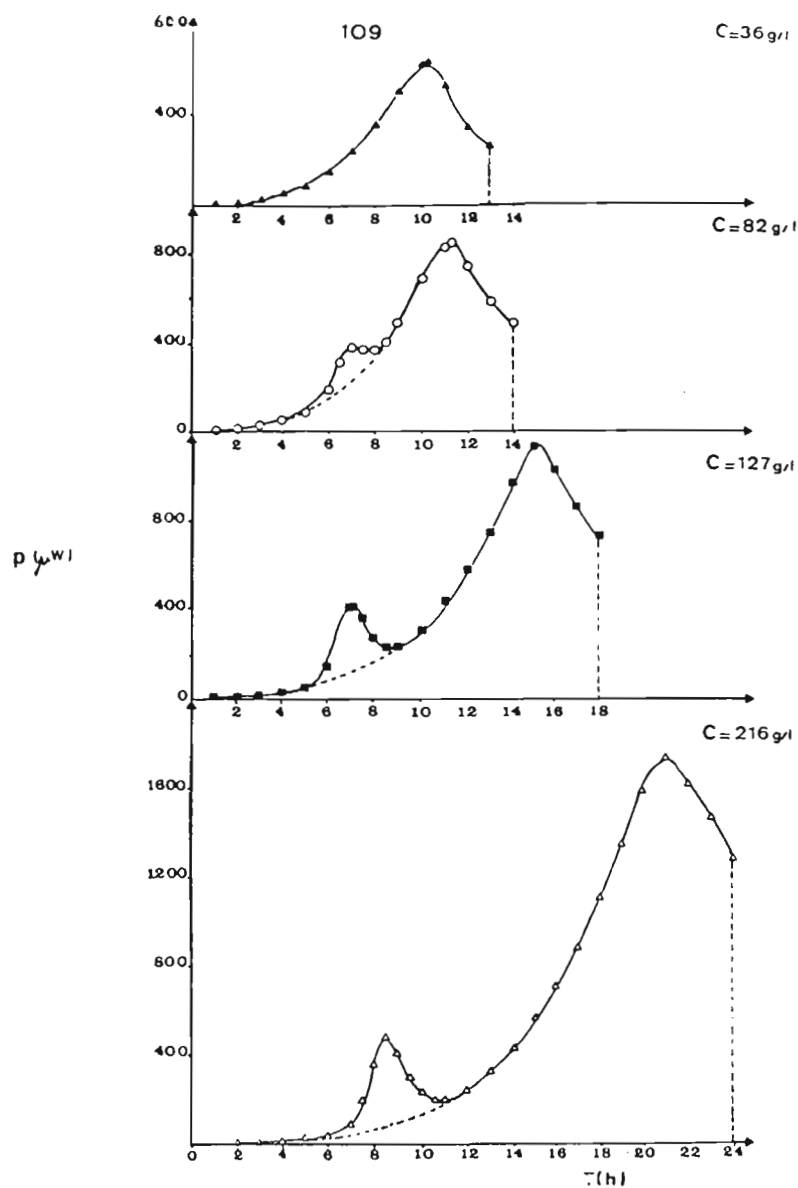


Figure 33: Thermogrammes obtenus lors de la croissance de *A. niger* sur support imprégné avec différentes concentrations de glucose dans la phase liquide.

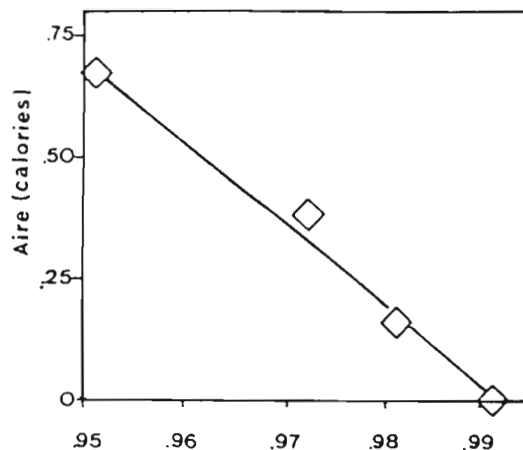


Figure 34: Représentation de l'aire sous le premier pic en fonction de la pression osmotique dans la phase liquide.

III-4.2. Effet de la quantité d'inoculum

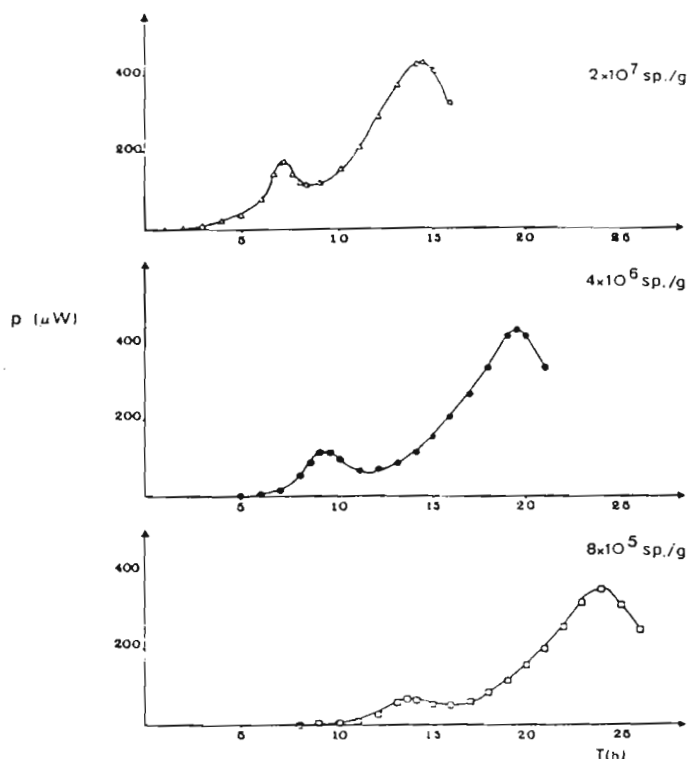
Trois expériences ont été montées avec des quantités d'inoculum différentes respectivement de 12×10^3 , 6×10^4 et 3×10^5 spores pour 15 mg de bagasse avec une concentration fixe de glucose de 89.5 g/l. :

Sur les thermogrammes représentés fig. 35, on peut observer que la quantité d'inoculum agit sur la taille du premier pic et sur son délai d'apparition. Ceci montre que lors des cultures sur support, le saut énergétique est proportionnel au nombre de spores et renforce donc l'hypothèse élaborée plus haut.

Le fait que ce pic soit décalé dans le temps montre que jusqu'à un certain point, la germination est plus rapide quand les spores sont en suspension plus dense. Il existe dans les spores de certaines espèces de champignons des auto-activateurs de la germination (Sussman, 1976) qui pourraient expliquer ce phénomène mais aussi les profils cinétiques observés sur support lors de l'étude consacrée à la taille d'inoculum (cf. II-2.5.)

Comme lors de l'étude menée en colonne (cf. II-2.5.) la durée de la culture est proportionnelle à la quantité d'inoculum, passant de 14 à 24 h quand le nombre de spores est divisée par 25.

Figure 35: Thermogrammes obtenus lors de la croissance de *A. niger* sur support imprégné avec différentes quantités d'inoculum.



III-5. Conclusion

L'ensemble de ces résultats montre que les cultures solides de champignons filamenteux se prêtent bien à des études calorimétriques.

La précision de cet instrument de mesure nous a permis de mettre en évidence lors des cultures de *A. niger* sur substrat ou support solide, un phénomène exothermique prenant place à la fin de la phase de germination.

L'existence de ce pic qui, rappelons-le, intervient à la fin d'une phase de germination majoritairement endogène, soulève plusieurs interrogations. Le petit nombre d'expériences effectuées ne permet pas de conclure mais seulement de formuler quelques hypothèses.

- Le phénomène peut être d'ordre purement physico-chimique: expulsion d'eau, concentration du milieu intracellulaire pour résister à la pression osmotique externe.

- On peut également soupçonner un phénomène structural: réarrangement de la paroi, du système de perméases, accumulation de polyols toujours pour s'adapter aux conditions externes.

- Enfin, une explication simplement mécanique comme la production de chaleur par poussée du tube germinatif n'est pas à écarter.

Lors du calcul de la chaleur totale dégagée pendant la croissance nous avons trouvé une bonne adéquation entre les valeurs d'enthalpie fournies par la littérature et les données calculées à partir des thermogrammes. Ces coefficients d'enthalpie sont très importants pour prévoir les phénomènes d'accumulation de chaleur dans les réacteurs de FS.

Les résultats observés sur support imprégné ont confirmé et précisé ceux obtenus par gazométrie dans les colonnes. La microcalorimétrie facile à mettre en oeuvre et rapide constitue donc un outil précieux pour des études paramétriques sur la croissance et le métabolisme des champignons filamenteux en culture solide.

Planche 1 - Observations en microscopie électronique à balayage de la croissance de *Aspergillus niger* sur bagasse imprégnée d'un milieu liquide glucosé. (Les clichés ont été réalisés au Laboratoire de Microscopie Electronique de la Faculté de Médecine de Rangueil à Toulouse)

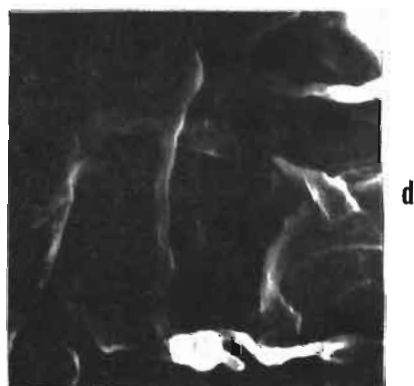
- (a) Spores de *A. niger* sur la bagasse
- (b) Début de germination (temps d'incubation: 7 h)
- (c) Développement du tube germinatif (temps d'incubation: 8 h)
- (d) Croissance apicale (temps d'incubation: 10 h)
- (e) Aspect du produit après 20 h d'incubation

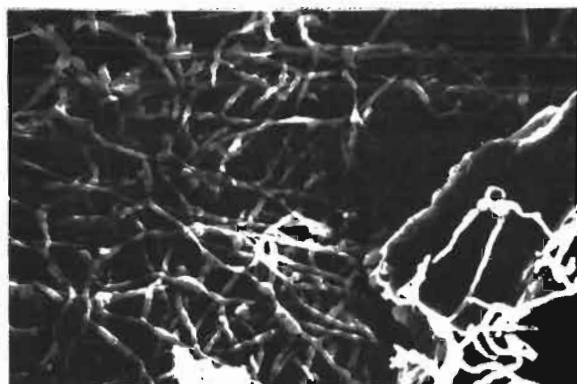
a



b







CONCLUSION GENERALE

Ce travail a été axé sur l'importance de l'eau et de l'activité de l'eau dans la fermentation solide et nous avons tout d'abord étudié un procédé déjà bien caractérisé: la fermentation de la farine de manioc par Aspergillus niger pour la production d'aliments fermentés enrichis en protéines. La détermination des isothermes de sorption de chacun des constituants du milieu et leur introduction dans l'équation de Ross (1975) nous a montré:

- que l' A_w initiale du milieu de culture comportant 50% d'humidité est basse (94%) essentiellement à cause du mélange salin utilisé.
- que l' A_w du substrat diminuait au cours de la fermentation passant en dessous de 90% après 20 h.

L'amidon ayant une faible capacité de rétention d'eau, pour pouvoir augmenter l'activité de l'eau initiale, nous avons été amenés à introduire un support lignocellulosique à forte capacité d'absorption comme la bagasse de canne à sucre. Après avoir déterminé un pourcentage de bagasse qui nous permette de travailler une gamme d'humidités importantes (de 40 à 70% soit des A_w de 0.93 à 0.98), nous avons mis en évidence différents effets de l'eau:

- sur la vitesse de croissance: une A_w supérieure provoquant un raccourcissement de la phase de germination et une augmentation de la vitesse de croissance spécifique. Cet effet est surtout lié à la diffusion plus rapide des enzymes, du substrat et peut être aussi de l' O_2 .
- sur l'utilisation du substrat: une augmentation de l'humidité initiale et de l' A_w augmentant l'utilisation du substrat et par conséquent la biomasse finale. Ceci confirme l'explication d'une limitation stoechiométrique de la croissance par l'eau disponible en FS.

- sur la production de glucoamylases: il existe un optimum d'HI pour la production de glucoamylases. Interviennent ici des phénomènes de repression de la synthèse d'enzyme par le glucose qui peuvent être accélérés quand il y a plus d'eau et que donc les diffusions sont plus rapides.

Cette étude a montré sans équivoque que l'activité de l'eau est un paramètre important de la culture solide de champignons filamenteux sur farine de manioc et que des gains de productivité et de rendement sont à attendre d'un bon contrôle de l'Aw du substrat pendant la croissance.

Le manioc ne fournit pas un modèle de fermentation solide très facile à manier, la texture et les propriétés de rétention de liquide de la matrice solide étant modifiées au cours de la dégradation de l'amidon. En approfondissant l'idée de support avancée dans le premier chapitre, nous avons pensé à dissocier substrat et matrice solide et avons ainsi utilisé des milieux liquides synthétiques (glucose et sels) directement absorbés sur un support solide (bagasse de canne) pour la croissance de A. niger.

Dans ce cas ce n'est pas la quantité d'eau initiale qui a une influence majeure sur la croissance, mais bien la concentration de solides dans la solution d'imprégnation et à travers elle l'Aw du milieu; ainsi de 60 à 480 g/l, la vitesse spécifique de croissance diminue avec l'Aw initiale du milieu comme cela avait été montré pour le manioc. Une analyse approfondie des cinétiques a montré que pour des concentrations de glucose dans la phase liquide supérieures à 250 g/l apparaît une biomasse critique qui varie peu lorsqu'on augmente la quantité de sucres. Une étude concernant la taille de particules du support a permis de supposer que les diffusions intraparticulaires de substrat ou d'oxygène pouvaient être limitantes de même que la surface utile de support accessible au champignon.

L'autre paramètre important des FS sur support s'est révélé être la concentration de l'inoculum, une relation linéaire ayant pu être mise en évidence entre inoculum et temps de culture. Une concentration très élevée (1×10^9 spores/ g de support) loin de provoquer une inhibition de la croissance conduit à un épuisement extrêmement rapide du substrat.

Des cultures sur support effectuées dans des conditions très proches de la colonne et suivies en microcalorimétrie ont montré l'existence d'une phase de transition entre la germination et le développement exponentiel, phase marquée par une exothermie dont l'intensité a pu être reliée à la concentration de glucose dans la solution d'imprégnation. Le fait que ce phénomène n'ait pu être mis en évidence par respirométrie semble indiquer que cette production de chaleur correspond à des changements structuraux ou à une réaction anaérobie. La microcalorimétrie a par ailleurs confirmé les résultats observés en colonne et a mis en évidence une activation de la germination lorsque l'inoculum est plus concentré.

Le système de culture sur support imprégné, de par les conditions uniques d'interrelation substrat/air/microorganisme, rend possible l'emploi de milieux nutritifs liquides très concentrés (400 g/l de glucose) et conduit à l'obtention de masses mycéliennes denses dans des délais relativement courts (40 h).

L'utilisation de supports synthétiques comme le polyuréthane, neutres biologiquement et bien définis quant à leur capacité d'absorption, taille de particules et porosité, devrait faciliter l'étude des paramètres de croissance et du métabolisme des champignons en milieu solide. On pourrait alors envisager l'utilisation de la biomasse fixée au support pour la synthèse de métabolites secondaires ou la biotransformation de molécules.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abdullah, A. L., Tengerdy, R. P., Murphy, V. G. (1985) Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 20-27.
- Aldoo, K. E., Hendry, R., Wood, B. J. B. (1981) Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 12, 6-9.
- Aldoo, K.E.; Hendry, R.; Wood, B. J. B. (1982) Solid substrate fermentations. *Adv. Appl. Microbiol.*, 28, 201-237.
- Alazard, D., Baldensperger, J. F. (1982) Amylolytic enzymes from Aspergillus hennebergi (A. niger group): purification and characterization of amylases from solid and liquid cultures. *Carbohydr. Res.*, 107, 231-241.
- Alazard, D., Raimbault, M. (1981) Comparative study of amylolytic enzymes production by Aspergillus niger in liquid and solid state cultivation. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 12, 113-117.
- Andre, G., Moo-Young, M., Robinson, C. W. (1981) Improved method for the dynamic measurement of mass transfer coefficient for application to solid-substrate fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1611-1622.
- Arima, K., Uozumi, T. (1967) A new method for estimation of the mycellal weight in koji. *Agr. Biol. Chem.*, 31 (1), 119-123.
- Aufeuve, A. M., Raimbault, M. (1982) Etude au microscope electronique a balayage du développement d'Aspergillus niger Van Tieghem sur milieu solide. *C. R. Acad. Sc. Paris, T. 294* (3), 949-956.

- Bajracharya, K., Mudgett, R. E. (1980) Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 2219-2235.
- Baldensperger, J., Le Mer, J., Hannibal, L., Quinto, P. J. (1985) Solid state fermentation of banana wastes. *Biotechnol. Letter.*, 7 (10), 743-748.
- Belaich, J. P. (1980) Growth and metabolism in bacteria. In "Biological Microcalorimetry", 1-42; A. E. Breezer Ed., Academic Press, New-York.
- Beuchat, L. R. (1983) Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. *J. Food. Prot.*, 46, 135-141.
- Brook, E. J., Stanton, W. R., Wallbridge, A. (1969) Fermentation methods for protein enrichment of cassava. *Biotechnol. Bioeng.*, 11, 1271-1284
- Cahn, F. J. (1935) *Ind. Eng. Chem.*, 27 (2), 201-204.
- Carrizalez, V., Rodriguez, H., Sardiña, I. (1981) Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 321-333.
- Chahal, D. S. (1985) Solid-state fermentation with Trichoderma reesei for cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 (1), 205-210.
- Chahal, D. S., Vlach, D., Moo-Young, M. (1981) Upgrading the protein feed value of lignocellulosic materials using Chaetomium cellulolyticum in solid-state fermentation. In "Advances in Biotechnology, vol. 11", 327-332, M. Moo-Young Ed. Pergamon Press, London.

- Contreras, O. R., Johnsrud, S. C., Eriksson, K.E. (1986) Direct monitoring of bagasse biodegradation by microcalorimetry. Proceedings of "Biotechnology in the pulp and paper industry" 3rd Int. Conf., Stockholm, June 16-19, 211-213.
- Deschamps, F., Giuliano, C., Asther, M., Huet, M. C., Roussos, S. (1985) Cellulase production by Trichoderma harzianum in static and mixed solid state fermentation reactors under non-aseptic conditions. Biotechnol. Bioeng., 27, 1385-1388.
- Deschamps, F., Huet, M. C. (1984) -Glucosidase production by Aspergillus phoenicis in solid state fermentation. Biotechnol. Letter., 6 (1), 55-60.
- Duckworth, R. B. (1981) Solute mobility in relation to water content and water activity. In "Water Activity: Influence on Food Quality", 295-318; L. B. Rockland & G. F. Stewart Eds, Academic Press, New-York.
- Fujishima, T., Uchida, K., Yoshino, H. (1972) Enzyme production by molds in sponge culture. J. Ferment. Technol., 50 (10), 724-730.
- Fukushima, D. (1982) Koji as an important source of enzymes in the Orient and its unique composite systems of proteinases and peptidases. In "Use of enzymes in Food Technology", 381-388; Proc. Symp. Int. Mai 1982 Versailles. P. Dupuy Ed., Lavoisier, Paris.
- Gbewonyo, K., Wang, D. I. C. (1983) Confining mycelial growth to porous microbeads: a novel technique to alter the morphology of non-newtonian mycelial cultures. Biotechnol. Bioeng., 25, 967-983.
- Georgiou, G., Shuler, M. L. (1986) A computer model for the growth and differentiation of a fungal colony on solid substrate. Biotechnol. Bioeng., 28, 405-416.
- Ghildyal, N. P., Lonsane B. K., Sreekantiah, K. R., Sreenivasa Murthy, V. (1985) Economics of submerged and solid state fermentations for the production of amyloglucosidase. J. Food Sci. Technol., 22, 171-176.
- Ghildyal, N. P., Ramakrishna, S. V., Nirmala Devi, P., Lonsane, B.K., Asthana, H. N. (1981) Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. J. Food Sci. Technol., 18, 244-257.

- Gonzalez H, E. E., Vernon C, E. J., Moctezuma Ch, A. R. (1985) Biotechnology for the processing of pineapple waste. UNEP Ind. & Environment, 8 (4), 19-20.
- Han, Y. W., Anderson, A. W. (1975) Semisolid fermentation of ryegrass straw. Appl. Microbiol., 30 (6), 930-934.
- Hawker, L. E., Madelin, M. F. (1976) The dormant spore. In "The Fungal Spore: Form and Function", 1-72; D.J. Weber & W. M. Hess Interscience, New-York.
- Hecht, V., Rosen, W., Schugerl, K. (1985) Conversion of cellulose into fungal cell mass in solid state culture. Appl. Microbiol. Biotechnol., 21, 189-191.
- Herrick, H. T., May, O. E. (1928) Production of gluconic acid by *Penicillium luteum-purpureogenum* group II, some optimal conditions for acid formation. J. Biol. Chem., 77, 185-195.
- Hesseltine, C. W. (1965) A millenium of fungi, food and fermentation. Mycologia, 57, 149-197.
- Hesseltine, C. W. (1977) Solid state fermentation. Process Biochem., 12, 8 & 9, 24-27 & 29-32.
- Hoe Kim, J., Hosobuchi, M., Kishimoto, M., Seki, T., Yoshida, T., Taguchi, H., Ryu, D. D. Y. (1985) Cellulase production by a solid state culture system. Biotechnol. Bioeng., 27, 1445-1450.
- Huerta, S. (1984) Efecto de la transferencia de masa y acumulacion del calor metabolico en la fermentacion de cultivos solidos. Tesis Maestria, C.B.I., Universidad Autonoma Metropolitana - Iztapalapa, Mexico 126 pp.
- Kamra, D. N., Zadrazil, F. (1985) Influence of oxygen and carbon dioxide on lignin degradation in solid state degradation of wheat straw with *Stropharia rugosoannulata*. Biotechnol. Letter, 7 (5), 335-340.
- Kitpreechavanich, V., Hayashi, M., Nagai, S. (1984) Production of xylan-degrading enzymes by thermophilic fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Humicola lanuginosa*. J. Ferment. Technol., 62 (1), 63-69.
- Kono, T. (1968) Kinetics of microbial cell growth. Biotechnol. Bioeng., 10, 105-131.

- Krishnan, P. S., Bajaj, V., Damle, S. P. (1954) Some observations on the growth of *Aspergillus niger* from spore inoculum. *Appl. Microbiol.*, 2, 303-309.
- Lakshminarayana, K., Chaudhary, K., Ethiraj, S., Tsuro, P. (1975) A solid state fermentation method for citric acid production using sugar cane bagasse. *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 291-293.
- Lamprecht, I. (1980) Growth and metabolism in yeasts. In "Biological Microcalorimetry", 43-112; A. E. Breezer Ed., Academic Press. New-York
- Larroche, C., Desfarges, C., Gros, J. B. (1986) Production de spores en fermentation solide sur substrat naturel et sur support artificiel. *Comptes-rendus du 4^{ème} congrès de la Société Française de Microbiologie*, Toulouse 3-4-5 Avril 1985.
- Laukevics, J. J., Apsite, A. F., Viesturs, U. E., Tengerdy, R. P. (1984) Solid state fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1465-1474.
- Laukevics, J. J., Apsite, A. F., Viesturs, U. S., Tengerdy, R. P. (1985) Steric hindrance of growth of filamentous fungi in solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1687-1691.
- Levonen-Munoz, E., Bone, D. H. (1985) Effect of different gas environments on bench-scale solid state fermentation of oat straw by white-rot fungi. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 382-287.
- Lindenfelser, L. A., Ciegler, A. (1975) Solid substrate fermentation for ochratoxin A production. *Appl. Microbiol.*, 30, 30-35.
- Ljungholm, K., Noren, B., Wadso, I. (1980) Microcalorimetric studies on spore germination of *Fusarium roseum*. *Oikos*, 34, 94-97.
- Lockwood, L. B. (1975) Organic acid production. In "The Filamentous Fungi, Vol. 1: Industrial Mycology", 140-157; J. E. Smith & D. R. Berry Eds., M. Arnold, London.
- Lonsane, B. K., Ghildyal, N. P., Budiataman, S., Ramakrishna, S. V. (1985) Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 258-265.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*,
193, 265-275.
- Macko, V., Staples, R. C., Yaniv, Z., Granados, R. R. (1976)
Self-Inhibitors of fungal spore germination. In "The Fungal Spore:
Form and Function", 73-100; D.J. Weber & W. M. Hess Eds., Wiley
Interscience, New-York.
- Medda, T., Chandra Saha, B., Ueda, S. (1982) Raw starch adsorption
and elution behaviour of glucoamylase I of black Aspergillus. *J.*
Ferment. Technol., 60 (3), 261-264.
- Meyrath, J. (1966) *Process Biochem.*, 1, 4, 234-238.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for
determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
- Mitsue, T., Saha, B. C., Ueda, S. (1979) Glucoamylase of
Aspergillus oryzae cultured on steamed rice. *J. Appl. Biochem.*,
1, 410-422.
- Moo-Young, M.; Moreira, A.R.; Tengerdy R.P. (1983) Principles of
solid-substrate fermentation. In "The Filamentous Fungi, vol IV:
Fungal Technology"; 117-144, D.E. Smith, D.R. Berry & B.
Kristiansen Eds, M. Arnold, London.
- Mudgett, R. E. (1986) Solid-state fermentations. In "Manual of
Industrial Microbiology & Biotechnology", 66-83; A. L. Demain & N.
A. Solomon Eds, A. M. C., Washington D.C..
- Mushikova, L. H., Loclakova, L. S., Jarovenko, V. L. (1978)
Pectinase production by Aspergillus awamori 16 by solid
substrate fermentation. *Microbial Synthesis*, 1, 25-28.
- Narahara, H.; Koyama, Y.; Yoshida, T., Pichangkura, S., Ueda, R.,
Taguchi, H. (1982) Growth and enzyme production in a solid-state
culture of Aspergillus.oryzae. *J. Ferment. Technol.* 69 (4),
311-319.
- Narahara, H., Koyama, Y., Yoshida, T., Atthasampunna, P., Taguchi,
H. (1984) Control of water content in a solid-state culture of
Aspergillus oryzae. *J. Ferment. Technol.*, 62 (5), 453-459.

- Nishio, N., Kurisu, H., Nagai, S. (1981) Thermophilic cellulase production by Talaromyces sp. in solid state cultivation. J. Ferment. Technol., 59, 5, 407-410.
- Nishio, N., Tai, K., Nagai, S. (1979) Hydrolase production by Aspergillus niger in solid-state cultivation. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 8, 263-270.
- Nunokawa, Y. (1972) Sake. In "Rice: Chemistry and Technology", 449-487; D. F. Huston Ed., American Society of Cereal Chemists, St Paul.
- Okazaki, N., Sugama, S., Tanaka, T. (1980) Mathematical model for surface culture of koji mold. J. Ferment. Technol., 58 (5), 471-476.
- Pamment, N., Robinson, C. W., Hilton, J., Moo-Young, M. (1978) Solid-state cultivation of Chaetomium cellulolyticum on alkali-pretreated sawdust. Biotechnol. Bioeng., 20, 1735-1744.
- Penaloza, W., Molina, M. R., Gomez Brenes, R., Bressani, R. (1985) Solid-state fermentation: An alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. Appl. Environ. Microbiol., 49 (2), 388-393.
- Pirt, S. J. (1975) Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. (1977) Influence of solutes and hydrogen ion concentration on the water relation of some xerophilic fungi. J. Gen. Microbiol., 101, 35-40.
- Raimbault, M. (1980) Croissance de champignons filamenteux sur substrats amylacés. Thèse de Doctorat, U.P.S. Toulouse, 291 p.
- Raimbault, M., Alazard, D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. European J. Appl. Microbiol., 9, 199-209.
- Ramos-Valdida, A., De La Torre, M., Casas-Campillo, C. Solid state fermentation of cassava with Rhizopus oligosporus NRRL 2710. (1983) Cost Workshop 83/84, Production and feeding of SCP; April 13-15 1983, Zurich.

- Rao, M. N. A., Mithal, B. M., Thakur, R. N., Sastry, K. S. M.
(1983) Solid-state fermentation for cellulase production by Pestalotiopsis versicolor. Biotechnol. Bioeng., 25, 869-872.
- Rathbun, B. L., Shuler, M. L. (1983) Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentations chambers. Biotechnol. Bioeng., 25, 929-938.
- Rodriguez, J. A., Echeverria, J., Rodriguez, F. J., Sierra, N., Daniel, A., Martinez, O. (1985) Solid state fermentation of dried citrus peel by Aspergillus niger. Biotechnol. Letter., 7 (8), 577-580.
- Ross, K. D. (1975) Estimation of water activity in intermediate moisture foods. Food Technol., 29, 26-34.
- Roussos, S., Garcia, J. L., Raimbault, M. (1983) Valorisation de la cossette de betterave par culture de Trichoderma harzianum en milieu liquide et solide. Ind. Aliment. Agric., 100 (7/8), 449-452.
- Roussos, S. (1985) Croissance de Trichoderma harzianum par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse d'Etat, Université d'Aix-Marseille I, 161 pp.
- Sakurai, S., Misawa, S., Shiota, H. (1985) Growth and respiratory activity of Aspergillus oryzae grown on solid state medium. Agric. Biol. Chem., 49 (3), 745-750.
- Salwin, H., Slawson, V. (1959) Food Technol., 13, 715.
- Sato, K., Nagatani, M., Nakamura, K., Sato, S. (1983) Growth estimation of Candida lipolytica from oxygen uptake in a solid state culture with forced aeration. J. Ferment. Technol., 61 (6), 623-629.
- Sato, K., Nagatani, M., Sato, S. (1982) A method of supplying moisture to the medium in a solid-state culture with forced aeration. J. Ferment. Technol., 60 (6), 607-610.
- Sato, K., Nakamura, K., Sato, S. (1985) Solid-state ethanol fermentation by means of inert gas circulation. Biotechnol. Bioeng., 27, 1312-1319.

- Sethi, R. P., Grainger, J. M. (1978) Solid fermentation of banana to produce animal feed. *J. Appl. Bact.*, 45.
- Sethi, R. P., Grainger, J. M. (1981) Conversion of mangostone into SCP for animal feed by Aspergillus niger using solid substrate fermentation. In "Advances in Biotechnology, vol II", 319-325; M. Moo-Young Ed., Pergamon Press, London.
- Silman, R.W. (1980) Enzyme formation during solid-substrate fermentation in rotating vessels. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 411-420.
- Smith, R. E., Osolthslip, C., Bicho, P., Gregory, K. F. (1986) Improvement in the protein content of cassava by Sporotrichum pulverulentum in solid state culture. *Biotechnol. Letter.*, 8 (1), 31-36.
- Snell, E. E. (1956) Colorimetric method of analysis. Vol IV, 3acd Van Nostrand Co, New-York.
- Soekarto, S. T., Steinberg, M. P. (1981) Determination of the binding energy for the three fractions of bound water. In "Water Activity: Influence on Food Quality", 265-280; L. B. Rockland & G. F. Stewart Eds, Academic Press, New-York.
- Solomons, G. L., (1975) Submerged culture production of mycelial biomass. "The Filamentous Fungi, Vol I: Industrial Mycology", 249-264; J. E. Smith & D. R. Berry Eds., M. Arnold, London.
- Steinkraus, K. E. (1983) "Handbook of Indigenous fermented foods"; Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker Inc., New-York.
- Suga, K., van Dedem, G., Moo-Young, M. (1975) Enzymatic breakdown of water insoluble substrates. *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 185-201.
- Sugama, S., Okazaki, N. (1979) Growth estimation of Aspergillus oryzae cultured on solid media. *J. Ferment. Technol.*, 57 (5), 408-412.
- Sussman, A. S.- (1965) Dormancy and spore germination. In "The Fungi Vol. II: The Fungal Organism", 733-764; G. S. Ainsworth & A. S. Sussman Eds., Academic Press, New-York.

- Sussman, A. S. (1976) Activators of fungal spore germination. In "The Fungal Spore: Form and Function", 101-132 ; D.J. Weber & W. M. Hess Eds., Wiley Interscience, New-York.
- Takamine, J. (1917) Enzymes of A. oryzae and the application of its amylolytic enzyme to the fermentation industry. Ind. Eng. Chem., 6, 824-828.
- Tanaka, M., Matsuno, R. (1985) Conversion of lignocellulosic materials to single-cell protein (SCP): recent developments and problems. Enzyme Microb. Technol., 7, 5, 197-206.
- Toyama, N. (1976) Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with Trichoderma viride cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp. No 6, 207-214.
- Trejo, M. (1986) Produccion de enzimas pecticas por fermentacion en cultivo solido. Tesis Profesional; U.N.A.M., Facultad de Quimica, 106 pp.
- Ueda, S. (1981) Fungal glucoamylases and raw starch digestion. Trends In Biochemical Sci., March, 89-90.
- Van den Berg, C., Bruin, S. (1981) Water activity and estimation in food systems. "Water Activity: Influence on Food Quality", 1-61; L. B. Rockland & G. F. Stewart Eds, Academic Press, New-York.
- Viesturs, U. E., Apsite, A. F., Laukevics, J. J., Ose, V. P., Bekers, M. J., Tengerdy, R. P. (1981) Solid-state fermentation of wheat straw with Chaetomium cellulolyticum and Trichoderma lignorum. Biotechnol. Bioeng. Symp. no 11, 359-369.

Vilela, L. C., Torillo, R., de Ocampo, A. T., del Rosario, E. J.

(1977) Cellulase production in semi-solid cultures of
Trichoderma viride. Agric. Biol. Chem., 41 (2), 235-238.

Wang, H. L., Ruttle, D. J., Hesseltine, C. W. (1969) Antibacterial

compound from a soybean product fermented by Rhizopus
oligosporus. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 131, 579-583.

Wang, H. L., Swain, E. W., Hesseltine, C. W. (1975) Mass production

of Rhizopus oligosporus spores and their application in tempeh
fermentation. J. Food Sci., 40, 168-170.

Wang, H. Y., Moo, D. G., Swartz, J. R. (1976) Thermodynamic

evaluation of microbial growth. Biotechnol. Bioeng., 18,
1811-1814.

Wissler, M., Tengerdy, R. P., Murphy, V. G. (1983) Biomass

measurement in solid-state fermentations using ¹⁵N mass
spectrometry. Development in Industrial Microbiology, 24, 527-538.