

HYDROLYSE DE LA CELLULOSE PAR LES MOISSURES

1. — « SCREENING » DES SOUCHES CELLULOLYTIQUES

par S. Roussos et M. Raimbault (*)

Laboratoire de Microbiologie ORSTOM,
Centre de Recherche IRCHA BP n° 1,
91710 Vert-le-Petit (France)

SUMMARY

CELLULOSE HYDROLYSIS BY FUNGI

1. — Screening of cellulolytic strains

Trichoderma harzianum was selected from 30 strains of cellulolytic fungi with the aim of producing cellulases by solid state fermentation of lignocellulosic substrates. Special attention was paid to cellulase production (*i. e.* carboxymethylcellulase and filter paper activity), apical growth and conidia production. Under the conditions of our experiments, *T. harzianum* exhibited the highest cellulasic activities with 1,315 IU/l of carboxymethyl cellulose and 80 IU/l of filter paper activity. Apical growth (1 mm/h) and yield of conidial production (3.25×10^{10} conidia/g of substrate dry weight) were also valuable characteristics of this strain in the use of solid state fermentation.

KEY-WORDS : *Trichoderma harzianum*, Cellulose, Sporulation; Apical growth.

INTRODUCTION

Parmi les moisissures cellulolytiques (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Sporotrichum*) les espèces du genre *Trichoderma* sont le plus fréquemment utilisées pour l'hydrolyse

Manuscrit reçu le 12 décembre 1981, accepté le 19 juin 1982.

(*) Adresse Actuelle : Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, A. P. 55.535 Mexico 13, D. F.

28 NOV. 1983

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 3965ex1

Cote B

B3965 ex 1

de la cellulose et des produits lignocellulosiques [2, 3, 10]. Au cours de leur croissance ces *Trichoderma* produisent des quantités importantes d'exoenzymes capables d'hydrolyser complètement la cellulose en glucose [13, 15].

Dans le cadre des recherches sur la production d'aliments fermentés enrichis en protéines, des chercheurs à l'ORSTOM [8] ont mis au point une nouvelle technique de fermentation en milieu solide. Appliquée aux substrats lignocellulosiques, cette technique ouvre d'intéressantes perspectives dans le domaine des bioconversions et de la valorisation des résidus agricoles.

Le présent travail a été réalisé dans le but de sélectionner les souches de moisissures cellulolytiques les mieux adaptées à ce procédé de culture sur milieu solide. A cet effet on a étudié plus particulièrement : la vitesse d'élongation apicale, qui représente l'aptitude à explorer l'environnement ; la production de spores nécessaires pour l'inoculation homogène du milieu solide ; et enfin la production de cellulases indispensables pour transformer la cellulose en sucres assimilables par la moisissure.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) *Microorganismes.*

La liste des champignons filamenteux testés pour leur activité cellulasique est portée dans le tableau I. Il s'agit de souches provenant de collections interna-

TABLEAU I. — Collection de souches de champignons filamenteux.

| N° ORSTOM | Nom de l'espèce | Provenance | N° ORSTOM | Nom de l'espèce | Provenance |
|-----------|----------------------------|------------|-----------|-------------------------------|---------------|
| Tl 1 | <i>T. longibranchiatum</i> | ATCC-26921 | Af 21 | <i>A. flavus</i> | CCMF-449 |
| Tl 2 | <i>T. longibranchiatum</i> | ATCC-28217 | An 22 | <i>A. niger</i> | CCMF-330 |
| Tv 3 | <i>T. viride</i> | CCMF-486 | Ap 23 | <i>A. parasiticus</i> | CCMF-550 |
| Tr 4 | <i>T. reesei</i> | CCMF-521 | Av 24 | <i>A. versicolor</i> | CCMF-620 |
| Tr 5 | <i>T. reesei</i> | CCMF-522 | Aw 25 | <i>A. wentii</i> | CCMF-459 |
| Tr 6 | <i>T. reesei</i> | CCMF-560 | A 10 | Souche sauvage amylolytique | sol (Sénégal) |
| Ff 7 | <i>F. fusaroides</i> | CCMF-166 | C 3 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |
| Ao 8 | <i>A. oryzae</i> | CCMF-172 | C 4 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |
| Tk 9 | <i>T. koningii</i> | CCMF-544 | C 8 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |
| As 10 | <i>A. solani</i> | CCMF-167 | C 14 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |
| Ar 11 | <i>A. radicina</i> | CCMF-197 | C 19 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |
| Ar 12 | <i>A. radicina</i> | CCMF-198 | C 20 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |
| Ta 13 | <i>T. aureoviride</i> | CCMF-541 | C 21 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |
| Th 14 | <i>T. hamatum</i> | CCMF-541 | C 24 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |
| Th 15 | <i>T. harzianum</i> | CCMF-470 | C 29 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |
| Tp 16 | <i>T. piluliferum</i> | CCMF-573 | C 30 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |
| Ts 17 | <i>T. saturnisporum</i> | CCMF-561 | C 36 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |
| Tv 18 | <i>T. viride</i> | CCMF-486 | C 38 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |
| Aa 20 | <i>A. aculeatus</i> | CCMF-596 | C 39 | Souche sauvage cellulolytique | sol (Sénégal) |

ATCC = American Type Culture Collection.
CCM = Czechoslovak Collection of Microorganisms.

tionales et de souches sauvages que nous avons isolées à partir de différents échantillons de sols ou de débris végétaux.

2) Milieux de culture.

Les souches ont été repiquées régulièrement sur milieu « Bacto-malt-agar » (Difco réf. 0024). Elles sont incubées pendant 10 jours à 29° C et peuvent alors être conservées à 4° C pendant environ 6 mois.

La présence de cellulases a été testée sur des cultures obtenues sur milieu gélosé de Mandels et Weber [5], contenant 0,75 % de cellulose microcristalline « Avicel ». Le réactif iodo-ioduré (solution de lugol) est utilisé pour mettre en évidence la zone d'hydrolyse de la cellulose qui apparaît autour de la colonie.

Le dosage des cellulases a été effectué sur des cultures de 66 h en milieu liquide à 1 % de cellulose [6]. Les cultures des différentes souches ont été réalisées dans des fioles coniques (Bellco glass inc. Vineland, New Jersey, USA, réf. 2510) de 300 ml contenant chacune 100 ml de milieu de culture. Les fioles ont été inoculées avec une quantité connue de spores et incubées à 29° C sur agitateur. Les dosages suivants ont été effectués après homogénéisation des cultures à l'ultra-turrax [8] : activité papier filtre (APF), activité carboxyméthylcellulose (ACMC), sucres réducteurs, sucres totaux, protéines.

La mesure de la croissance apicale a été réalisée selon la technique de Ryan et coll. [11] sur les trois milieux suivants : milieu « Malt agar Difco », milieu de Mandels et Weber [5] contenant 0,75 % de cellulose et milieu de Czapek et Dox dans lequel on a remplacé le saccharose par du glucose.

Les spores ont été obtenues à partir de culture sur un milieu gélosé contenant : farine de manioc, 100 g ; KH_2PO_4 , 4 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 g ; urée, 2 g ; gélose, 20 g ; eau distillée, 1 000 ml ; pH 5,6.

Tous ces milieux de culture ont été stérilisés par autoclavage à 110° C pendant 30 min.

3) Conditions d'obtention des spores.

a) *Production de spores en milieu liquide.* — Des fioles coniques de 125 ml, contenant 20 ml du milieu de Czapek et Dox modifié, sont inoculées avec une suspension de 3×10^7 spores/g de substrat et incubées à 29° C. Après 10 jours, les cultures sont diluées et les spores comptées directement sur cellules de Malassez. Les résultats sont exprimés en nombre de spores/g de substrat carboné présent dans le milieu de culture.

b) *Production de spores en milieu solidifié.* — Un procédé de production de spores de champignon filamenteux en milieu solide, mis au point dans notre laboratoire, a fait l'objet d'un brevet d'invention [9]. Le principe repose sur l'utilisation d'un fermenteur particulier à grande surface de sporulation dans lequel le milieu solide est réparti sur des disques rotatifs constitués par des grilles. Le milieu de culture, précédemment décrit, est introduit dans ce fermenteur et stérilisé à 110° C pendant 30 min, puis refroidi à 50° C ; l'inoculum de spores est alors introduit stérilement (3×10^7 spores/g de substrat poids sec). Lorsque le milieu uniformément réparti sur les disques est solidifié, le dispositif est incubé à 29° C, avec une aération de 10 l/h d'air saturé d'eau pendant 10 jours. La récolte des spores est effectuée par simple lavage des surfaces, la biomasse mycélienne restant emprisonnée dans le milieu solidifié.

ACMC = activité carboxyméthylcellulose.
APF = activité papier filtre.
CMC = carboxyméthylcellulose.

PF = papier filtre.
UI = unité internationale.

4) Méthodes de dosage.

Les activités cellulases (APF et APMC) sont mesurées selon la méthode décrite par Mandels et coll. [6]. Les résultats sont exprimés en unités internationales/l (1 UI = la quantité d'enzymes nécessaires pour libérer à partir du substrat soluble ou insoluble carboxyméthylcellulose (CMC) ou papier filtre, 1 μ mol de glucose/min).

Les sucres réducteurs sont dosés à l'acide 3,5-dinitrosalicylique [7]. Les sucres totaux sont estimés à l'anthrone [1].

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide du réactif de Folin [4], le témoin étant de l'albumine de sérum de bœuf.

RÉSULTATS

1) Hydrolyse qualitative de la cellulose en milieu gélosé.

Afin de sélectionner les souches cellulolytiques nous avons testé la croissance de l'ensemble des souches de notre collection sur un milieu sélectif [5] en utilisant la cellulose « Avicel » ou la CMC comme unique source de carbone et d'énergie.

Le tableau II montre que les souches sauvages isolées dans notre laboratoire hydrolysent toute la cellulose assez rapidement, alors que les souches de collection ne sont pas toutes aussi performantes. Parmi les souches de collection que nous avons testées, *T. harzianum* 15 semble être le microorganisme le mieux équipé en exoenzymes.

TABLEAU II. — « Screening » des souches cellulolytiques en milieu gélosé.

| Souche n° | CMC en tube | CMC en boîte +lugol | Cellulose en boîte | Cellulose en boîte +lugol | Souche n° | CMC en tube | CMC en boîte +lugol | Cellulose en boîte | Cellulose en boîte +lugol |
|-----------|-------------|---------------------|--------------------|---------------------------|-----------|-------------|---------------------|--------------------|---------------------------|
| Tl 1 | + | e + | + | e + | C 3 | + | e + | +++ | e ++ |
| Tl 2 | + | e + | + | e + | C 4 | + | e + | + | e + |
| Tv 3 | + | e + | ± | e ± | C 8 | + | e + | ++ | e + |
| Tr 4 | + | e + | ± | e + | C 14 | + | e + | ++ | e + |
| Tr 5 | + | e + | + | e + | C 18 | + | e + | + | e + |
| Tr 6 | + | e + | ++ | e + | C 19 | + | e + | + | e + |
| Ff 7 | - | e ± | ± | e ± | C 20 | + | e + | ++ | e ++ |
| Ao 8 | + | e + | + | e + | C 21 | + | e + | +++ | e +++ |
| Tk 9 | - | e ± | ± | e ± | C 24 | + | e + | +++ | e +++ |
| As 10 | ± | e ± | ± | e - | C 29 | + | e + | ++ | e + |
| Ar 11 | ± | e ± | ± | e + | C 30 | + | e + | + | e + |
| Ar 12 | ± | e ± | ± | e ± | C 36 | + | e + | ++ | e + |
| Th 15 | +++ | e + | +++ | e ++ | C 38 | + | e + | + | e + |
| A 10 | + | e + | + | e + | C 39 | + | e + | ++ | e ++ |

Culture de 3 jours à 29° C, sur milieu de Mandels et Weber. Substrat cellulose « Avicel » ou CMC. Culture positive = + ; culture négative = - ; importance de la zone d'hydrolyse e +.

2) *Mesure des activités cellulases en milieu liquide agité.*

Dans le tableau III nous avons porté les résultats relatifs à 10 souches de collection cultivées en milieu liquide agité. La croissance abondante d'un microorganisme sur ce milieu est suivie par une diminution du pH [14, 15]. Parallèlement il y a excrétion d'exoenzymes dans le milieu de culture. Les souches qui possèdent les APF et APMC les plus élevées sont : *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. aureoviride* et *T. longibranchiatum*. Ces mêmes souches synthétisent également la plus grande quantité de protéines et dégradent plus de 50 % de la cellulose après 66 h de culture.

TABLEAU III. — « Screening » des souches cellulolytiques en milieu liquide.

| Souches | | | pH | APF UI/l | APMC UI/l | Sucres totaux g/l | Protéines mg/l |
|----------------------------|-------|----|------|-------------|--------------|-------------------------|-------------------|
| <i>T. longibranchiatum</i> | n° Tl | 1 | 3,40 | 44 | 918 | 4,10 | 820 |
| <i>T. viride</i> | n° Tv | 3 | 6,00 | 11 | 82 | 7,50 | 580 |
| <i>T. reesei</i> | n° Tr | 4 | 4,35 | 40 | 740 | 4,80 | 1 240 |
| <i>T. reesei</i> | n° Tr | 5 | 3,45 | 75 | 1 229 | 3,80 | 720 |
| <i>T. reesei</i> | n° Tr | 6 | 6,05 | 12 | 66 | 7,70 | 580 |
| <i>T. aureoviride</i> | n° Ta | 13 | 5,95 | 54 | 960 | 5,00 | 1 180 |
| <i>A. oryzae</i> | n° Ao | 8 | 6,10 | 12 | 257 | 8,00 | 780 |
| <i>T. koningi</i> | n° Tk | 9 | 6,80 | 6 | 56 | 7,60 | 560 |
| <i>A. solani</i> | n° As | 10 | 6,10 | 10 | 84 | 7,80 | 560 |
| <i>T. harzianum</i> | n° Th | 15 | 3,55 | 80 | 1 315 | 4,00 | 1 080 |

Culture sur milieu de Mandels et Weber à 1 % de cellulose. Inoculation avec une suspension de spores. Culture agitée à 29° C pendant 66 h.

3) *Croissance apicale.*

L'ensemble des souches de notre collection a été cultivé sur trois milieux différents : Malt agar, milieu de Mandels et Weber [5] et Czapek-Dox agar. Le premier est un milieu riche qui ne nécessite pas l'apport complémentaire d'éléments minéraux ou de facteurs de croissance. Par contre les deux autres milieux sont des milieux semi-synthétiques. Dans le milieu de Mandels et Weber, la cellulose est l'unique source de carbone et d'énergie mais la peptone et l'extrait de levure, présents en faible quantité, apportent des facteurs de croissance qui favorisent la germination des spores. Par ailleurs, dans le milieu de Czapek et Dox nous avons rem-

placé le saccharose par du glucose car nous avons constaté que contrairement au glucose le saccharose n'était pas assimilé par toutes les souches de *Trichoderma*.

Dans le tableau IV nous avons noté les vitesses d'élongation apicale (exprimées en mm/h) pour chacune des souches cultivées sur les 3 milieux indiqués. Les valeurs portées dans ce tableau représentent la moyenne horaire obtenue après une culture de 240 h à 29° C. On peut constater qu'en règle générale les souches de *Trichoderma* sont caractérisées par une croissance apicale élevée, voisine de 1 mm/h, environ 5 fois plus élevée que celles des souches de *Aspergillus* (0,20 mm/h).

TABLEAU IV. — Croissance apicale de champignons filamenteux sur différents milieux de culture en tubes de Ryan.

| Souche n° | Malt agar mm/h | Mandels cellulose mm/h | Czapek glucose mm/h | Souche n° | Malt agar mm/h | Mandels cellulose mm/h | Czapek glucose mm/h |
|-----------|----------------|------------------------|---------------------|-----------|----------------|------------------------|---------------------|
| Th 15 | 1,25 | 0,88 | 0,86 | C 19 | 0,11 | 0,31 | 0,24 |
| Ta 13 | 1,00 | 0,79 | 0,72 | C 4 | 0,15 | 0,26 | 0,17 |
| Tr 6 | 1,33 | 1,02 | 1,18 | Av 24 | 0,08 | 0,25 | 0,04 |
| C 24 | 1,33 | 0,95 | 1,15 | Tr 4 | 0,96 | 0,55 | 0,62 |
| C 3 | 1,15 | 0,90 | 1,10 | Tk 9 | 0,46 | 0,23 | 0,15 |
| C 30 | 1,05 | 0,90 | 1,10 | Ao 8 | 0,16 | 0,22 | 0,27 |
| Tr 5 | 1,00 | 0,65 | 0,63 | Tv 3 | 0,38 | 0,21 | 0,15 |
| Tr 4 | 0,96 | 0,60 | 0,62 | Aa 20 | 0,19 | 0,21 | 0,19 |
| C 31 | 0,94 | 0,64 | 0,70 | An 22 | 0,25 | 0,20 | 0,20 |
| C 18 | 0,82 | 0,58 | 0,55 | Ap 23 | 0,18 | 0,20 | 0,14 |
| Tl 1 | 0,96 | 0,66 | 0,69 | A 10 | 0,23 | 0,20 | 0,20 |
| Tl 2 | 0,96 | 0,61 | 0,66 | Tv 18 | 0,25 | 0,19 | 0,20 |
| Ts 17 | 0,82 | 0,45 | 0,59 | Tp 16 | 0,26 | 0,17 | 0,10 |
| C 8 | 0,60 | 0,45 | 0,69 | Ar 11 | 0,04 | 0,17 | 0,04 |
| C 20 | 0,12 | 0,30 | 0,26 | Ar 12 | 0,08 | 0,14 | 0,18 |
| Th 14 | 0,42 | 0,40 | 0,22 | Aw 25 | 0,04 | 0,14 | 0,07 |

4) Production de spores.

1) *Sporulation en milieu liquide non agité.* — Dans le tableau V les souches ont été classées suivant leurs performances à la sporulation. On constate que sur glucose les souches de *Trichoderma* sont des bonnes productrices de spores. La souche la plus performante est *T. harzianum* 15. Cette souche produit 100 fois plus de spores que *T. reesei* (QM 9414).

2) *Sporulation sur milieu solidifié.* — Le tableau VI indique les résultats obtenus lors de la production de spores de *T. harzianum* 15 dans un fermenteur à disques rotatifs. On constate que le premier lavage permet de récolter 75 % des spores produites dans le fermenteur et d'obtenir un litre de suspension de spores contenant $2,8 \times 10^8$ spores/ml, donc à une concentration 4 fois plus élevée que celle obtenue avec la culture en milieu liquide précédente. Le rendement pondéral en spores rapporté à la quantité totale de substrat introduite dans le fermenteur est de 12 %, ce qui représente un taux de conversion en spores très élevé.

TABLEAU V. — Production de spores en milieu liquide non agité.

| Souche n° | Nombre de spores/ml | Nombre de spores/gSPS | Souche n° | Nombre de spores/ml | Nombre de spores/gSPS |
|-----------|---------------------|-----------------------|-----------|---------------------|-----------------------|
| Th 15 | $6,5 \times 10^7$ | $3,25 \times 10^{10}$ | Tv 18 | $7,2 \times 10^6$ | $3,6 \times 10^9$ |
| C 24 | 5×10^7 | $2,5 \times 10^{10}$ | C 8 | 5×10^6 | $2,5 \times 10^9$ |
| C 3 | 4×10^7 | 2×10^{10} | Ap 23 | 5×10^6 | $2,5 \times 10^9$ |
| C 30 | $3,6 \times 10^7$ | $1,8 \times 10^{10}$ | Tv 3 | 3×10^6 | $1,5 \times 10^9$ |
| C 31 | $2,6 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^{10}$ | Tr 4 | $1,1 \times 10^6$ | $5,5 \times 10^8$ |
| Av 24 | $2,5 \times 10^7$ | $1,25 \times 10^{10}$ | Tl 1 | 5×10^5 | $2,5 \times 10^8$ |
| C 18 | $2,5 \times 10^7$ | $1,25 \times 10^{10}$ | Tr 5 | 5×10^5 | $2,5 \times 10^8$ |
| Aw 25 | $2,0 \times 10^7$ | 1×10^{10} | Tr 6 | 5×10^5 | $2,5 \times 10^8$ |
| Af 21 | $1,8 \times 10^7$ | 9×10^9 | Tk 9 | 4×10^5 | 2×10^8 |
| Aa 20 | $1,7 \times 10^7$ | $8,9 \times 10^9$ | Ta 13 | 4×10^5 | 2×10^8 |
| C 4 | $1,5 \times 10^7$ | $7,5 \times 10^9$ | Tl 2 | 3×10^5 | 2×10^8 |
| A 10 | $1,4 \times 10^7$ | 7×10^9 | As 10 | 2×10^5 | 1×10^8 |
| Ao 8 | $1,4 \times 10^7$ | 7×10^9 | Ar 11 | 2×10^5 | 1×10^8 |
| An 22 | $1,3 \times 10^7$ | $6,2 \times 10^9$ | Ar 12 | 2×10^5 | 1×10^8 |
| C 20 | $1,2 \times 10^7$ | $5,8 \times 10^9$ | Th 14 | 2×10^5 | 1×10^8 |

gSPS = gramme de substrat en poids sec.

TABLEAU VI. — Production de spores de « *T. harzianum* » sur milieu solidifié, dans un fermenteur à disques rotatifs.

| Nom de la souche | | <i>T. harzianum</i> |
|---|-----------------|-------------------------|
| N° de la collection ORSTOM | | Th 15 |
| 1 ^{er} lavage | 500 ml | 76 % |
| 2 ^e lavage | 250 ml | 24 % |
| 3 ^e lavage | 250 ml | 5 % |
| Nombre de spores récoltées dans 1 l | | $2,8 \times 10^{11}$ |
| Teneur en spores/ml | 1 ^{er} | $4,2 \times 10^8$ |
| | 2 ^e | $2,6 \times 10^8$ |
| | 3 ^e | $5,6 \times 10^7$ |
| Nombre de spores formées/cm ² | | $2,2 \times 10^8$ |
| Nombre de spores/g de substrat | | $9,3 \times 10^9$ |
| Poids d'une spore | | $1,3 \times 10^{-11}$ g |
| Rendement pondéral global (poids de spores/100 g de substrat) | | 12,1 % |

DISCUSSION

Le premier passage de notre collection de champignons sur un milieu sélectif nous a permis de classer les souches en fonction de leur aptitude à croître sur un substrat cellulosique. Cependant la réponse obtenue n'est pas qualitative. Dans un deuxième temps, nous avons donc mesuré quantitativement les APF et ACMC formées, les protéines synthétisées et le substrat carboné consommé.

Ces résultats n'ont toutefois qu'une valeur indicative car toutes les souches ont été testées selon des conditions standard, les conditions optimales pour chacune d'elles n'ayant pas été déterminées. Ce « screening » nous autorise toutefois à sélectionner les souches qui nous apparaissent les plus performantes pour la dégradation de la cellulose et la production des cellulases. En particulier la souche de *T. harzianum* dégrade la cellulose à 60 % avec un rendement de croissance de 18 %, ce qui est tout à fait satisfaisant et comparable à celui obtenu par d'autres auteurs [3]. Pour la mesure des APF et ACMC nous avons utilisé la méthode la plus simple et la plus couramment utilisée dans de nombreux laboratoires [6]. Les activités cellulasiques sont exprimées en UI. Nous avons adopté cette stratégie afin de pouvoir comparer facilement nos résultats avec ceux de la littérature. La vitesse de la croissance apicale d'un champignon filamentueux est un caractère stable, qui caractérise chaque espèce de champignon filamentueux [12]. Plusieurs mesures ont été réalisées pour vérifier cette hypothèse. Les résultats que nous avons obtenus étaient toujours du même ordre de grandeur. Cette vitesse d'élongation paraît d'ailleurs peu influencée par la composition du milieu de culture, quoique pour les souches de *Trichoderma* les valeurs obtenues à partir de cultures sur milieu riche soient toujours sensiblement supérieures à celles obtenues à partir de cultures sur milieu synthétique.

Il faut toutefois noter que la croissance apicale n'est pas forcément en corrélation avec le taux de croissance de l'organisme et avec la production de biomasse mycélienne. A cet effet la fréquence de branchement est un facteur capital, mais elle est fortement influencée par la composition du milieu et les conditions d'incubation. Contrairement aux souches de *Trichoderma*, celles de *Aspergillus* sont caractérisées par un mycélium très dense et, malgré leur croissance apicale 5 fois plus lente, elles possèdent des taux de croissance plus élevés lorsqu'elles sont cultivées sur glucose. Pour inoculer un substrat solide en vue de la croissance homogène d'une souche de champignon filamentueux, il est nécessaire d'introduire une quantité de $2 \text{ à } 4 \times 10^7$ spores/g de substrat sec [8]. La possibilité d'obtenir aisément un nombre élevé de spores constitue donc un facteur important dans le choix de l'organisme sélectionné. Nous avons donc mesuré l'aptitude des souches cellulolytiques à produire des spores en milieu liquide et dans un fermenteur à disques rotatifs. L'utilisation de ce fermenteur permet de produire des spores de *T. harzianum* 15 en conditions aseptiques, selon un procédé relativement simple. En outre, les spores obtenues sont pures : elles ne sont contaminées ni par d'autres microorganismes ni par des métabolites ou résidus mycéliens, qui sont retenus dans le dispositif lors de la récolte. Les rendements obtenus sont supérieurs ou comparables à ce que l'on peut obtenir par d'autres techniques.

CONCLUSIONS

Sur la base des résultats obtenus concernant l'aptitude à croître sur cellulose et à synthétiser des quantités importantes d'enzymes cellula-

siques (PF et CMC), nous avons pu sélectionner dans un premier temps 4 souches appartenant toutes au genre *Trichoderma*, à savoir : *T. reesei*, *T. longibranchiatum*, *T. aureoviride* et *T. harzianum*. Toutes ces souches possèdent une vitesse de croissance apicale sensiblement identique. Par contre, la mesure de l'aptitude à la sporulation a montré que *T. harzianum* produit environ 100 fois plus de spores que les 3 autres.

Pour nos études ultérieures sur la production de cellulases par fermentation en milieu solide de substrats lignocellulosiques, nous avons donc sélectionné la souche de *T. harzianum* CCM F-470 qui produit des quantités élevées de cellulase (PF : 80 UI/l ; CMC : 1 315 UI/l, qui a une vitesse de croissance apicale de 1 mm/h et qui permet d'obtenir aisément des quantités de spores importantes grâce à un rendement pondéral en spores de 12,1 % par rapport au substrat carboné.

RÉSUMÉ

Dans l'optique de la production de cellulases par fermentation en milieu solide de substrats lignocellulosiques, cette étude préliminaire nous a conduit à sélectionner, parmi les microorganismes de notre collection de moisissures cellulolytiques, une souche de *Trichoderma harzianum*.

MOTS-CLÉS : *Trichoderma harzianum*, Cellulose, Sporulation ; Croissance apicale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ASHWELL, G., Colorimetric analysis of sugar, in « Enzymology », 3 (84-85). Academic Press, New York, London, 1957.
- [2] GALLO, B. J., ANDREOTTI, R., ROCHE, C., RYU, D. & MANDELS, M., Cellulase production by a new mutant strain of *Trichoderma reesei* MCG 77. *Biotechnol. Bioeng.*, 1978, Symp. n° 8, 89-101.
- [3] GHOSE, T. K. & SAHAI, V., Production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM 9414 in fed-batch and continuous-flow culture with cell recycle. *Biotechnol. Bioeng.*, 1979, 21, 283-286.
- [4] LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.
- [5] MANDELS, M. & WEBER, J., The production of cellulases. *Advanc. Chem. Ser.*, 1969, 95, 391-414.
- [6] MANDELS, M., ANDREOTTI, R. & ROCHE, C., Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng.*, 1976, Symp. n° 6, 21-33.
- [7] MILLER, G. L., Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.*, 1959, 31, 426-428.
- [8] RAIMBAULT, M. & ALAZARD, D., Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1980, 9, 199-209.
- [9] RAIMBAULT, M. & ROUSSOS, S., Procédé de production de spores de champignons filamenteux. Demande de brevet d'invention déposée en 1981.

- [10] REESE, E. T. & MAGUIRE, A., Increase in cellulase yields by addition of surfactants to cellobiose cultures of *Trichoderma viride*. *Develop. Ind. Microbiol.*, 1971, **12**, 212-224.
- [11] RYAN, F. J., BEADLE, G. W. & TATUM, E. L., The tube method of measuring the growth rate of *Neurospora*. *Amer. J. Botany*, 1943, **30**, 784-799.
- [12] SMITH, J. E. & BERRY, D. R., The filamentous fungi. — I. Industrial mycology. Edward Arnold, Publ. Limited, London, 1975.
- [13] STERNBERG, D., Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng.*, 1976, Symp. n° 6, 35-53.
- [14] STERNBERG, D., β -glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1976, **31**, 648-654.
- [15] STERNBERG, D. & DORVAL, S., Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 1978, **21**, 181-191.