



ETUDE DE L'HYDROLYSE DE LA CELLULOSE PAR DES  
MOISSURES CULTIVEES EN MILIEU SOLIDE

*par*

Sévastianos ROUSSOS

*(élève O.R.S.T.O.M.)*

SEPTEMBRE 1981

G30 - RS/sm

Laboratoire de Microbiologie  
de l'O.R.S.T.O.M.  
I.R.C.H.A. - B.P. n° 1  
91710 VERT-LE-PETIT

Responsable : Mr M. RAIMBAULT

TABLE DES MATIERES

	pages
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE I - LES SUBSTRATS CELLULOSIQUES NATURELS .....	3
Composition des celluloses naturelles végétales .....	3
Structure et insolubilité de la cellulose .....	4
Accessibilité et solubilisation de la cellulose .....	5
CHAPITRE II - LA NATURE DES CELLULASES .....	8
Les enzymes de la cellulolyse .....	9
Mécanisme d'action de cellulases de <u>T. viride</u> .....	10
Contrôle et régulation de l'activité cellulasique .....	11
Induction enzymatique .....	12
Répression catabolique .....	12
Rétro-inhibition .....	16
Mécanisme de régulation de cellulases .....	16
CHAPITRE III - LES CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES .....	19
Activité naturelle des moisissures .....	19
Utilisation des moisissures dans les processus de bio- conversions .....	20
Les Trichoderma .....	20
CHAPITRE IV - MATERIEL ET METHODES .....	22
Le matériel biologique .....	22
Conservation et entretien des souches .....	25
Mesure de la croissance apicale .....	25
Screening de souches cellulolytiques .....	25
Production de spores en milieu liquide .....	26
Production de spores en milieu solide .....	26

Conditions de culture pour la production de cellulases .....	27
A - Fermentation liquide .....	27
B - Fermentation solide .....	28
Physiologie et Métabolisme de champignons filamenteux .....	29
 CHAPITRE V - RESULTATS ET DISCUSSION .....	 31
La croissance apicale .....	31
Screening des souches cellulolytiques .....	33
Production de spores .....	35
- en milieu liquide .....	37
- en milieu solide .....	37
Influence de la quantité d'inoculum sur la production de cellulases .....	40
Influence de différents prétraitements de résidus ligno- cellulosiques .....	42
Production de cellulases de <u>T. harzianum</u> à partir des substrats cellulosiques .....	44
- Hydrolyse de la cellulose Avicel en fermentation liquide .....	44
- Hydrolyse d'un mélange paille + son de blé en fermen- tation liquide .....	47
- Hydrolyse de la paille de blé en fermentation solide ..	49
- Hydrolyse d'un mélange paille + son de blé en Pétrin ..	52
- Hydrolyse du son de blé en fermentation solide .....	56
- Hydrolyse des cossettes de betterave .....	58
Physiologie et métabolisme des champignons filamenteux .....	64
 CHAPITRE VI - CONCLUSIONS .....	 72
 BIBLIOGRAPHIE .....	 76

## ANNEXE

### Milieux de culture pour les champignons cellulolytiques

- Malt Extract Agar
- Cristo Malt Agar
- Czapek Dox Agar

- Milieu de MANDELS et WEBER
- Milieu pour la production de spores
- Milieu synthétique

#### Méthodes d'Analyse

- Dosage des sucres réducteurs
- Dosage des sucres totaux
- Dosage des protéines
- Dosage des constituants de la paille
- Contrôle des Activités enzymatiques
  - Activité Carboxyméthyl Cellulose
  - Activité Papier Filtre
  - Activité Coton

#### Les solutions

0

000 000

## INTRODUCTION

La cellulose, constituant majeur de tous les végétaux, représente la ressource renouvelable, la plus importante du monde. Sa décomposition en composants simples par des enzymes, les cellulases, permettrait de résoudre deux problèmes cruciaux : la faim dans le monde et la pollution de l'environnement.

La combustion des matériaux lignocellulosiques augmente la pollution de l'air. Certains procédés de bioconversion pourraient éviter cette pollution, mais demeurent actuellement onéreux.

L'explosion démographique et la menace de la faim dans le monde posent de graves problèmes. Beaucoup d'efforts ont été faits pour accroître le rendement des céréales et développer de meilleurs procédés pour l'agriculture. La production d'aliments amylics fermentés enrichis en protéines par culture de champignons filamenteux (SENEZ, 1979) est une voie de recherche originale et prometteuse.

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

Depuis le début de la crise énergétique, due principalement à l'inflation des prix du pétrole brut, un vif intérêt s'est porté sur les ressources naturelles renouvelables. A ce titre, la cellulose est naturellement au centre des recherches pour la production d'énergie (méthane, alcool) ou de matières nouvelles. On peut donc considérer que dans l'avenir, la cellulose sera utilisée comme une source possible pour l'obtention de divers produits chimiques de très grande consommation.

Depuis 1973, cinq symposiums importants sur le thème de la dégradation de la cellulose par les microorganismes (BERKELEY, NATICK, HELSINKI, NEWDEHLI ou MARSEILLE) ont fait le point sur l'avancement des techniques de préparation et d'utilisation des cellulases. Des progrès encore insuffisants ont été réalisés depuis cette période pour la préparation des cellulases pour les bioconversions.

Cependant, on devra développer ce domaine de recherche si l'on veut que l'utilisation de la biomasse se situe dans un créneau économique compétitif face aux sources traditionnelles des molécules glucidiques dont la transformation en sucres monomères est plus facile (amidon).

Actuellement, les travaux de recherche visent le développement industriel de la production de cellulases en fermentateur liquide. Cette production qui n'a pas encore franchi le stade du pilote, n'est toujours pas rentable.

Dans le cadre des recherches sur l'enrichissement en protéines des substrats amylicés RAIMBAULT et ALAZARD ont développé une technique originale de fermentation en milieu solide. Cette technique, appliquée aux substrats lignocellulosiques, donne des résultats intéressants. Elle peut être utilisée dans le domaine de bioconversion des résidus agricoles cellulosiques pour la production particulière de cellulases.

Ce rapport traite de la structure et de la morphologie de la cellulose, des nouveaux mécanismes pour la dégradation de la cellulose, du complexe cellulasique, des microorganismes capables de produire des cellulases et en particulier des champignons filamenteux et des nouvelles méthodes d'investigation pour la production de cellulases par fermentation en milieu solide.

## CHAPITRE I : LES SUBSTRATS CELLULOSIQUES NATURELS

La cellulose naturelle végétale constitue la majeure partie des réserves carbonées de la biosphère. Elle est régulièrement renouvelée à la surface du sol, mais elle ne peut être utilisée par les microorganismes et les plantes qu'après avoir été solubilisée.

Cette solubilisation se fait grâce à des réactions enzymatiques.

### COMPOSITION DES CELLULOSES NATURELLES VEGETALES

Les celluloses naturelles ne sont pas des substances chimiquement pures. Si à l'origine la paroi de la cellule végétale est constituée de cellulose pure, rapidement cette cellulose est associée à des pentoses en particulier à des polymères de xylose, possédant la même structure que la cellulose. D'autres sucres (galactose et mannose, rhamnose, fucose, xylose, arabinose, acide glucuronique et méthylglucuronique) viennent s'y joindre, formant les hémicelluloses dont la concentration par rapport à la cellulose pure est variable. Tous ces polysaccharides sont unis à des pectines, et plus tardivement des lignines s'y ajoutent.

C'est donc ce polysaccharide hétérogène dénommé "cellulose naturelle végétale", qui sert de substrat à la microflore cellulolytique. Les sucres réducteurs libérés sont rapidement assimilés par les microorganismes, puis les pectines, les hémicelluloses, la cellulose et la lignine. La présence de pentosanes, et à un degré moindre celle des pectines, favorisent la dégradation du polysaccharide naturel. Au contraire, les lignines, avec leur structure de polymère polyphénolique, seraient presque considérés comme des substances inhibitrices.

## STRUCTURE ET INSOLUBILITE DE LA CELLULOSE

La cellulose, homopolymère du  $\beta$ ,D-glucose est une substance insoluble dans l'eau, alors que l'amidon homopolymère du  $\alpha$ ,D-glucose est quant à lui soluble. L'étude de la cellulose pure du coton permet de comprendre ce phénomène.

La structure stérique de la molécule de D-glucose est caractérisée par la disposition équatoriale des groupements OH et  $\text{CH}_2\text{OH}$  dans le même plan que le cycle. Lors de la polymérisation, cette structure plane est respectée et les chaînes polymérisées vont s'empiler les unes au-dessus des autres parallèlement en maintenant cette structure linéaire et plane. C'est en cela que réside la différence fondamentale entre l'amidon et la cellulose. L'amidon est constitué de longues chaînes non ramifiées où les unités glucose sont réunies par des liaisons  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) et forment des micelles hydratées. Dans ces micelles, la chaîne s'enroule en hélice, ce qui entraîne une dispersion et une solubilisation plus aisée. Au contraire la macromolécule de cellulose, du fait de sa structure plane, en présence d'eau ne peut donner que de gros agrégats peu dispersables.

L'arrangement des chaînes linéaires de la cellulose est caractéristique et contribue aussi à rendre son hydratation très difficile. Les molécules de glucose sont liées les unes aux autres d'une façon parfaitement homogène par liaison  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) ; le dimère qui en résulte est le cellobiose que l'on peut considérer comme l'unité constitutive typique.

A l'origine deux longues chaînes de glucose ayant cette liaison  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) sont disposées parallèlement à l'axe de la fibre avec une inclinaison caractéristique de l'espèce végétale (30° pour le coton). Par accumulation, lors de la biosynthèse, les chaînes parallèles vont se rapprocher les unes des autres. La proximité de 2 chaînes voisines entraîne la formation, au contact des hydroxydes secondaires, de liaisons hydrogène, reliant ainsi deux molécules de glucose appartenant à deux chaînes distinctes. Les liaisons hydrogène se reproduisent selon une périodicité variable selon l'origine végétale. Dans le cas de la cellulose du coton, on suppose que toutes les fonctions alcool secondaire seraient ainsi reliées, d'où l'apparence réticulée, dite "cristalline", de ces longues chaînes.

Les paramètres de chaque maille cristalline appartenant au système monoclinique, ont été déterminées par HAWORTH et COLL (1939) et font apparaître l'unité cellobiose,  $10,3 \text{ \AA}$ , comme l'un des paramètres. La zone cristalline peut s'étendre sur 500 à 1000  $\text{\AA}$ , les chaînes ayant une longueur de 5000  $\text{\AA}$ . Lorsqu'il y a rupture de cette structure organisée cristalline, cette désorganisation structurale se produit progressivement jusqu'à la formation d'une zone inorganisée dite "amorphe". C'est au niveau de cette zone amorphe que se ferait la pénétration du microorganisme ou l'attaque de l'enzyme. Les chaînes sont réunies en paquets d'une vingtaine, formant la microfibrille ou paroi secondaire d'une épaisseur de 3 à 4  $\mu$ . Elles sont entourées d'une double paroi protectrice de 0,1  $\mu$  d'épaisseur, de structure spiralée et torsadée très résistante à l'action des agents extérieurs. Les microfibrilles sont pressées les unes contre les autres par l'action des forces de VAN DER WAALS ; elles laissent donc entre elles des espaces lacunaires très réduits (20  $\text{\AA}$ ).

Les deux parois, primaire et secondaire, sont uniformément constituées de molécules de  $\beta$ ,D-glucose liées en 1  $\rightarrow$  4, mais dont le degré de polymérisation est différent. La paroi externe, primaire, est caractérisée par un DP de 2000 à 4000 U. Elle résulte d'une biosynthèse lente et progressive. Au contraire la paroi secondaire de DP plus élevé (14.000) est synthétisée très rapidement et la polymérisation y est homogène ainsi que l'ont montré les travaux de MARX-FIGINI et COLL. (1966).

Cette structure plane de chaque molécule, l'arrangement de toutes les molécules étroitement reliées par les liaisons hydrogène, la polymérisation importante de l'unité constitutive sont les raisons fondamentales qui expliquent l'insolubilité et la non-réactivité de la cellulose native.

### ACCESSIBILITE ET SOLUBILISATION DE LA CELLULOSE

Les matériaux lignocellulosiques sont généralement constitués de trois éléments (hémicelluloses, cellulose et lignine) ; leurs proportions est variable selon les espèces végétales. Les hémicelluloses et la lignine forment une matrice entourant la cellulose. Cet ensemble constitue un système de hauts polymères étroitement imbriqués masquant la cellulose

aux enzymes qui ne peuvent pas pénétrer la barrière constituée par la lignine.

De nombreux traitements des dérivés lignocellulosiques ont été étudiés. Leur objectif est de faciliter l'action enzymatique en améliorant l'accessibilité de la cellulose, accessibilité accrue si les liaisons lignine - cellulose sont rompues, et sa dégradabilité augmentée en modifiant le degré de cristallinité de la fibre de cellulose.

L'accessibilité de la cellulose est fonction de la taille des particules, des propriétés de surface des fibres, des liaisons entre les divers constituants, alors que la dégradation de la cellulose est fonction de son degré de cristallinité. L'efficacité d'un traitement est mesurée par l'étude de la dégradabilité. La technique la plus couramment utilisée pour la mesure de la dégradabilité d'un substrat lignocellulosique consiste à doser la quantité de sucres réducteurs libérés après une attaque par des cellulases du substrat prétraité.

Cette accessibilité peut être augmentée en soumettant le substrat à des traitements variés qui sont de deux sortes :

Les traitements physiques incluant l'utilisation de broyeurs à balles (vibratory ball milling), le broyage (grinding), les radiations aux rayons  $\gamma$  ou les effets thermomécaniques.

Les traitements chimiques mettant en oeuvre essentiellement les agents alcalins "gonflants" tels que l'ammoniaque, la soude ou la potasse ; les acides, les procédés papetiers de délignification, ou des traitements à la vapeur.

Le mécanisme d'action de ces différents agents reste assez controversé. Mais il apparaît que le gonflement dû à la rupture des liaisons hydrogène par l'action de la soude s'accompagne d'une modification des dimensions de la maille, et peut-être de la configuration de la chaîne en augmentant les zones amorphes.

Dans ces zones amorphes les hydroxyles ne sont pas liés les uns aux autres. Les hydroxyles ainsi libérés peuvent alors être étherifiés ou estérifiés par des alcools ou des acides ; c'est le principe de la préparation de substrats solubles dits "substitués" dont le type est la CMC ou carboxyméthyl cellulose

(la substitution étant effectuée avec le monochloracétate de sodium). La CMC possède un degré de polymérisation de 150. C'est également à ces zones amorphes que les microorganismes ou les enzymes attaquent la fibre cellulosique.

o

oo

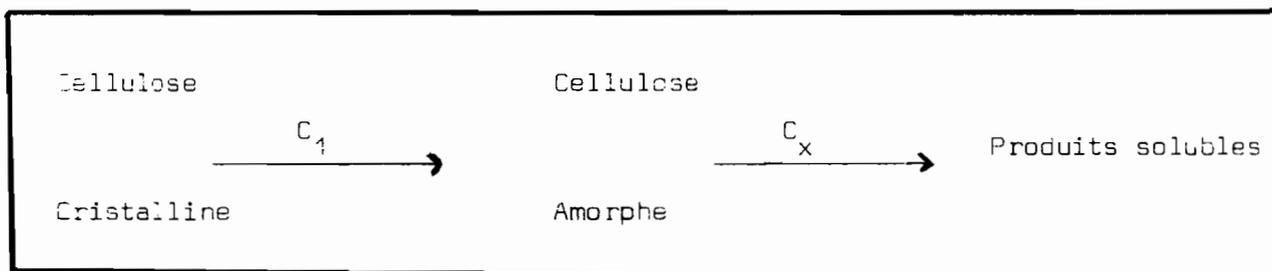
oo

## CHAPITRE II : NATURE DES CELLULOSES

Le processus de la dégradation enzymatique de la cellulose apparaît comme un processus hydrolytique complexe sous la dépendance de cellulases. Le terme de cellulases groupe les enzymes responsables de l'attaque d'un substrat insoluble, qui dans le schéma de REESE correspondent au facteur  $C_1$  et les enzymes responsables de l'attaque de substrats solubles, enzymes qui dans ce même schéma correspondent au facteur  $C_x$ . Les produits obtenus après l'action de ces deux enzymes tels que cellobiose et cellotriose sont transformés en glucose par la  $\beta$ -glucosidase ou cellobiase.

TABLEAU I

LE COMPLEXE CELLULASIQUE SELON REESE ET Coll. (1950)

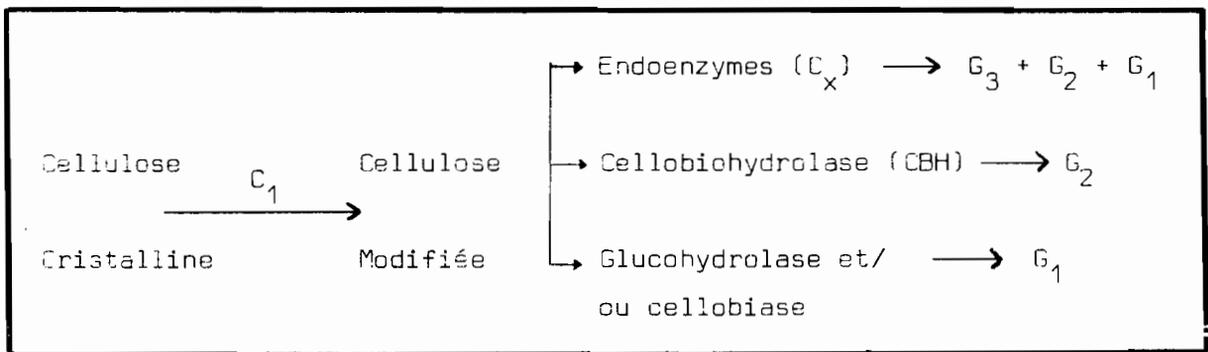


Le concept du  $C_1-C_x$  a pour longtemps dominé les théories des systèmes celluloliques. Cependant le développement et l'amélioration des méthodes de séparation et purification d'enzymes ont conduit à la préparation des composés de plus en plus purs. Ceux-ci ont été récemment déterminés (PETTERSSON, 1975, WOOD, 1968). De ce travail est apparu un nouveau composé que l'on a appelé cellobio-hydrolase (CBH) capable de libérer successivement des unités cellobioses à partir des extrémités non réductrices de la chaîne cellulosique. Cette enzyme a les mêmes caractéristiques chromatographiques que  $C_1$ . De nombreux chercheurs sont convaincus que leurs préparations CBH sont pures et donc que  $C_1$  et CBH sont identiques. REESE (1976) ne pense pas que cela soit probable

étant donné qu'il est pratiquement impossible de donner la même définition au  $C_1$  initialement prévu par REESE et Coll. (1950) et suggère une modification du schéma initial (tableau II).

TABLEAU II

LE COMPLEXE CELLULASIQUE MODIFIÉ SELON REESE (1976)



LES ENZYMES DE LA CELLULOLYSE

PETTERSSON (1975) en utilisant différentes méthodes de chromatographie (tamis moléculaire, échangeuse d'ions, Bispécifique, électrofocusing) a fractionné le complexe cellulase de *T. viride* en quatre composés (Fig. 1). Deux des composés étaient des endoglucanases, l'un, une exoglucanase et l'autre, une  $\beta$ -glucosidase.

L'exoglucanase se révéla être une CBH qui était inhibée par le cellobiose. De ce fait la  $\beta$ -glucosidase accélère beaucoup l'action de l'exoglucanase sur la cellulose microcristalline en enlevant le cellobiose du milieu.

Les caractéristiques biochimiques des enzymes cellulolytiques isolées par PETTERSSON sont rapportées au tableau suivant.

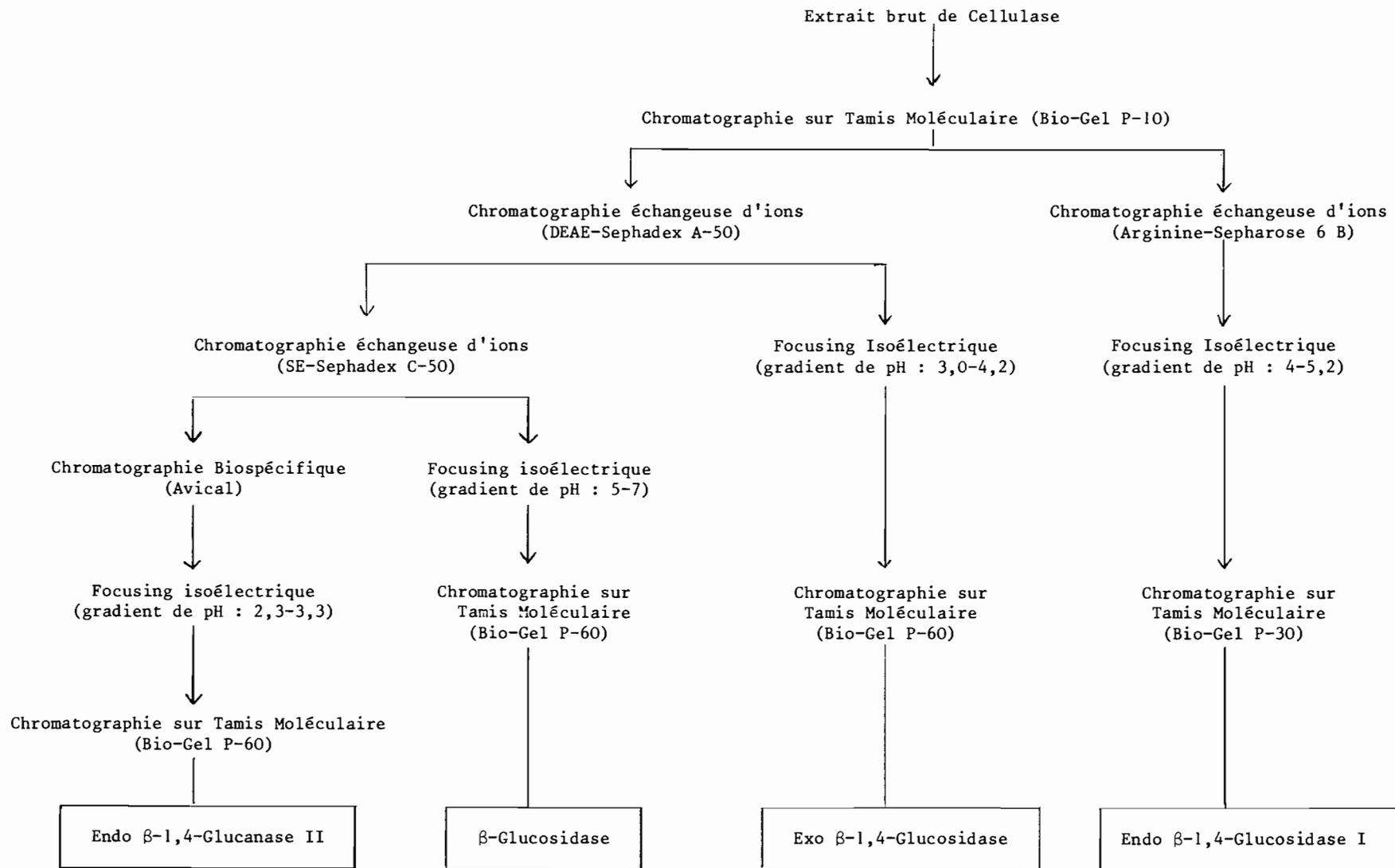


TABLEAU III

QUELQUES PROPRIETES DES ENZYMES CELLULOLYTIQUES ISOLEES  
A PARTIR DE *T. VIRIDE* SELON PETERSSON (1975)

Type d'enzyme	poids moléculaire	Point isoélectrique	Contenu en carbohydrates (%)	Activité à l'égard de différents substrats			
				CMC	Cellulose microcristalline	Cellulose reprécipitée	Cellotetraose
Exo- $\beta$ -1,4-glucanase	42 000	3,79	9	-	+	+	+
Endo- $\beta$ -1,4-glucanase I	12 500	4,60	21	+	-	+	+
Endo- $\beta$ -1,4-glucanase II	50 000	3,39	12	+	-	+	+
$\beta$ -glucosidase	47 000	5,74	0	-	-	-	+

Il semble donc clair que les moisissures produisent au moins quatre différentes enzymes responsables de la cellulolyse. D'autre part il a été démontré que les champignons filamenteux capables d'hydrolyser la cellulose native produisent au moins une exo- $\beta$ -1,4-glucanase qui probablement possède des fonctions identiques avec l'enzyme C<sub>1</sub> (ERIKSSON et PETERSSON ; 1972 ; WOOD et Mc CRAE, 1972). Dans le cas de *T. viride*, de *T. koningii* et de *Sporotrichum pulverulentum* cette enzyme est une  $\beta$ -1,4-glucane-cellobiohydrolase.

MECANISME D'ACTION DES CELLULASES DE *T. VIRIDE*

Prenant en considération ces résultats expérimentaux, PETERSSON (1975) pense qu'il existe une coopération entre les différentes enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose. L'exoglucanase est la seule enzyme qui peut dégrader la cellulose cristalline et la transformer jusqu'à 80 %. C'est donc naturel de donner à cette enzyme un rôle prépondérant dans le schéma de la dégradation totale de la cellulose native.

Le mécanisme de la dégradation enzymatique de la cellulose native pour *trichoderma viride* est représenté sur le tableau suivant :

TABLEAU IV

LE MECANISME DE LA DEGRADATION ENZYMATIQUE DE LA CELLULOSE  
SELON PETERSSON (1975) POUR *TRICHODERMA VIRIDE*

1. Cellulose native	Endoglucanase	→	Cellulose *
2. Cellulose *	Exoglucanase	→	Cellobiose
3. Cellobiose	$\beta$ -Glucosidase	→	2 Glucoses

Cellulose \* : obtenue à partir de la cellulose native par action de l'endoglucanase dans les régions non cristallines des fibres de cellulose.

Tout d'abord les régions de la fibre de cellulose à faible cristallinité sont attaquées par les endoglucanases et des débuts de chaînes libres sont créés. Ensuite l'exoglucanase commence la dégradation à partir des extrémités des chaînes en enlevant par hydrolyse des unités cellobiose. Le cellobiose ainsi libéré est quand à lui hydrolysé en deux molécules de glucose sous l'action de la  $\beta$ -glucosidase. Dans ce mécanisme il existe une coopération entre l'endo- et l'exoglucanase pour la solubilisation de l'homopolymère.

MONTENECOURT et EVELEIGH (1979) basés sur cette hypothèse selon laquelle les enzymes réagissent réciproquement pour dégrader la cellulose microcristalline ont proposé un schéma des différentes étapes de la cellulolyse (Figure 2). Ce modèle a pu être élaboré en tenant compte d'un certain nombre de travaux qui ont pu être fait indépendamment (ERIKSSON et PETERSSON, 1975 ; HALLIWELL et GRIFFIN, 1973 ; WOOD et Mc CRAE, 1975). Dans un premier temps l'endoglucanase est supposée attaquer la cellulose microcristalline créant des failles dans les chaînes linéaires de la cellulose. L'action de

# LES CELLULASES

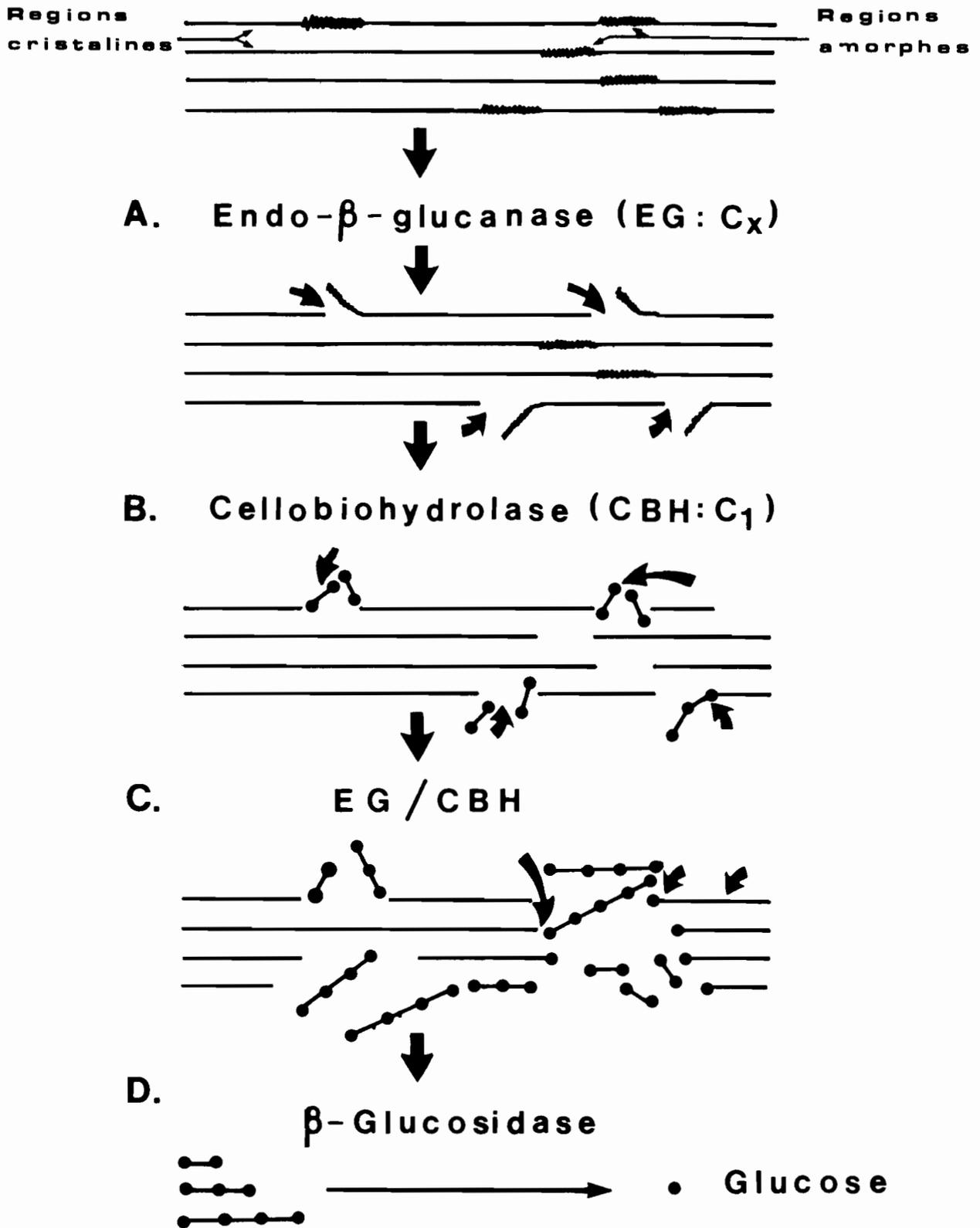


Figure 2 : Représentation schématique des différentes étapes de la cellulolyse selon MONTENECOURT et EVELEIGH (1979).

l'endoglucanase est suivie par l'attaque des cellobiohydrolases à ces points de rupture qui libèrent du cellobiose. L'action continue et combinée de l'endoglucanase et cellobiohydrolase a comme résultat la conversion complète de la cellulose en cellobiose et petits oligosaccharides. La  $\beta$ -glucosidase agit sur le cellobiose et les petits oligosaccharides pour produire le glucose. L'action synergétique de toutes les enzymes impliquées dans ce phénomène est requise pour l'hydrolyse effective de la cellulose cristalline comme produits d'une réaction devenue le substrat pour la suivante.

### CONTROLE ET REGULATION DE L'ACTIVITE CELLULASIQUE

La cellulase est dite constitutive si sa présence est détectée dans le milieu de culture quelle que soit la source carbonée fournie au microorganisme pour sa croissance. Elle est adaptative si sa concentration est proportionnelle à la concentration de la source carbonée fournie pour la croissance.

Pour quelques bactéries les cellulases sont constitutives mais dans le cas de moisissures généralement les cellulases sont adaptatives, les plus fortes concentrations en enzymes sont obtenues lors de cultures faites sur cellulose insoluble.

Comment dans ce cas expliquer l'induction de ces enzymes par la cellulose insoluble ? L'inducteur doit être un ose soluble de faible P.M. et assimilable par le microorganisme. MANDELS et REESE (1960) supposent que le microorganisme possède une infime quantité d'enzymes (indosable par les techniques usuelles) mais suffisante pour libérer à partir de la cellulose insoluble des sucres solubles assimilables par lui ; parmi ces sucres le cellobiose serait considéré le meilleur inducteur. Un autre dimère le sophorose, pourrait également servir d'inducteur. Il est présent en tant qu'impureté dans le glucose et pour longtemps on a supposé que le glucose avait un pouvoir inducteur.

Le complexe cellulolytique de *T. reesei* est sujet à l'induction, à la répression catabolique et la retro-inhibition. Chacun de ces facteurs contribue au faible rendement des enzymes et à leur efficacité limitée pendant le processus de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose.

## INDUCTION ENZYMATIQUE

Les cellulases de *T. reesei* sont inductibles (MANDELS et REESE, 1960 ; STERNBERG, 1976) leur synthèse étant stimulée par la cellulose ainsi que par des faibles concentrations de lactose, cellobiose et sophorose. Le dernier composé (2-O- $\beta$ -D-glucanopyranosyl-D-glucose) est un inducteur extrêmement puissant (MANDELS et Coll. 1962) et a été proposé comme l'inducteur naturel. Pour les fabrications commerciales de cellulases, la cellulose est l'inducteur le plus efficace et le moins coûteux. Cependant, la nécessité d'utiliser un inducteur insoluble complique considérablement l'équipement des fermenteurs et l'opération. Des souches "mutants" qui possèdent le caractère cellulase constitutive et qui sont donc capables de synthétiser de grandes quantités d'enzymes bien qu'étant cultivées sur des milieux peu coûteux tels que cossette de soja ou cossette de betterave seront extrêmement utiles pour diminuer le prix de la production de cellulases.

## REPRESSION CATABOLIQUE

La synthèse de toutes les enzymes du complexe cellulolytique sont sujettes à la répression catabolique (STERNBERG, 1976). Lorsque *T. reesei* est cultivé sur un substrat rapidement assimilable tel que le glucose (1 %), l'activité cellulase n'est pas détectable. Il est généralement admis que la répression catabolique dans la cellule de procaryotes est conduite par des niveaux internes de l'AMP cyclique (MONTENECOURT et EVELEIGH, 1979). Cependant on connaît beaucoup moins bien les processus en ce qui concerne la répression biochimique et génétique des catabolites ou du glucose pour les eucaryotes et particulièrement pour les moisissures.

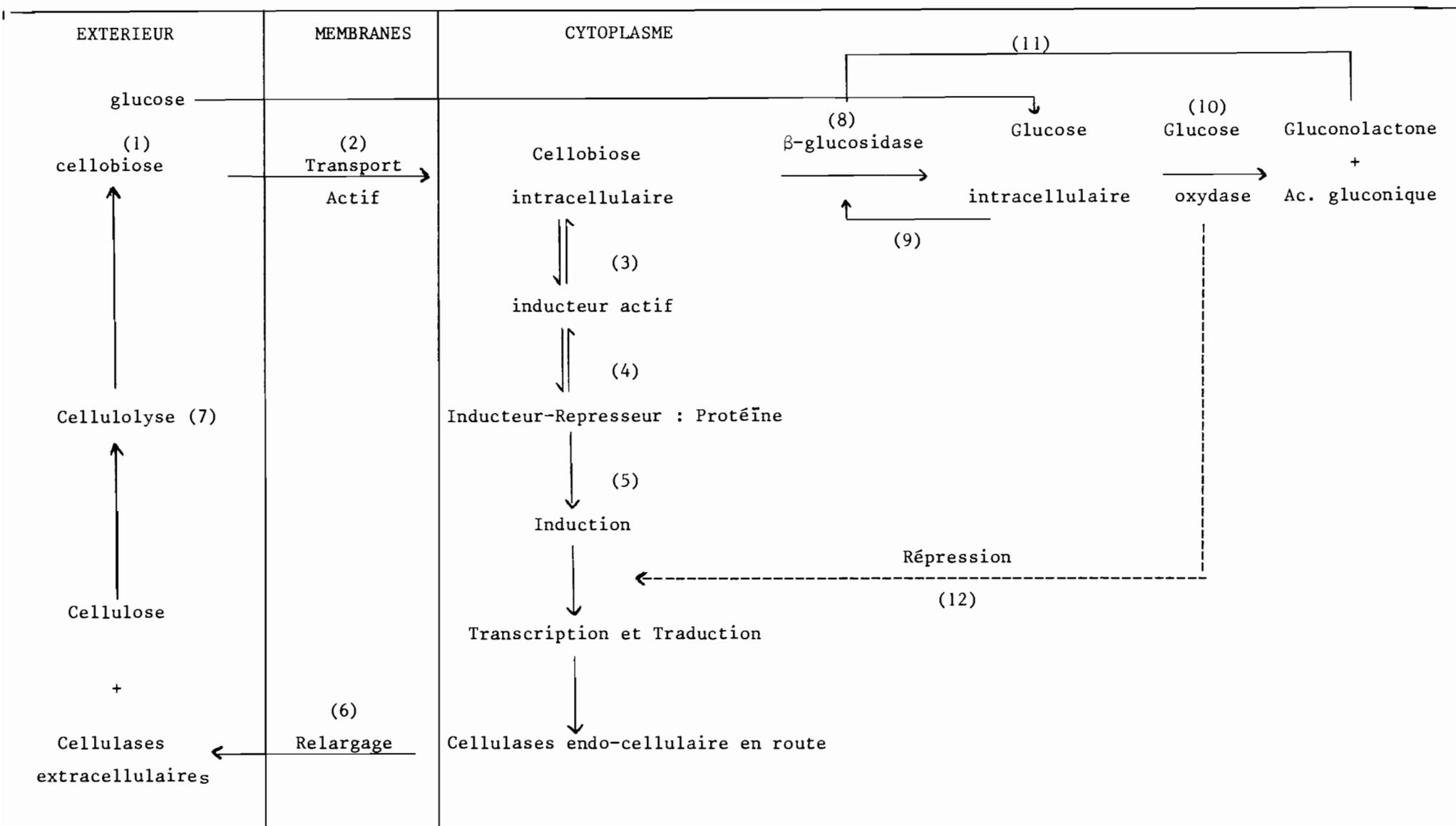
## RETRO-INHIBITION

La conversion enzymatique de la cellulose en glucose sur une échelle pilote nécessitera une grande efficacité au niveau de la saccharification. Cependant l'efficacité à un haut niveau de conversion ne peut être accompli du fait d'une inhibition retro-active des enzymes. Le cellobiose est un puissant inhibiteur retro-actif et inhibe à la fois l'endoglucanase et la cellobiohydrolase (BERGHEM et PETTERSSON, 1973 ; HALLIWELL, 1975 ; WOOD et Mc CRAE, 1975). Tandis que le glucose est un inhibiteur compétitif de la  $\beta$ -glucosidase de *T. reesei* (GONG et Coll. 1977 ; CADISCH et Coll. 1980). L'efficacité de l'hydrolyse de la cellulose est réduite lorsque les quantités de  $\beta$ -glucosidase dans les préparations enzymatiques de *T. reesei* sont généralement basses et agissent de ce fait comme enzymes limitantes. Pour cette raison le cellobiose agit dans le fermenteur en inhibant la biosynthèse de ces deux enzymes (endoglucanase et cellobiohydrolase). Une solution partielle de ce problème consiste à rajouter de la  $\beta$ -glucosidase produite par *A. niger* ou *A. phoenicis* (STERNBERG et Coll. 1976). Ces microorganismes sont des meilleurs producteurs de  $\beta$ -glucosidase mais ils sont incapables d'attaquer la cellulose microcristalline. Une approche plus satisfaisante serait d'isoler des mutants de *T. reesei* dont la cellobiohydrolase, l'endoglucanase et la  $\beta$ -glucosidase ne seront plus sensibles à l'inhibition par leur produit final et qui seront produites en quantité suffisante pour leur permettre une action synergetique optimale.

## MECANISME DE REGULATION DES CELLULASES

La régulation de la biosynthèse de cellulases est contrôlée par des mécanismes d'induction et de répression cataboliques. Les inducteurs impliqués dans ce processus d'hydrolyse de la cellulose comprennent la cellulose, les dérivés de la cellulose, le cellobiose, le sophorose et le lactose. La synthèse enzymatique est réprimée en présence de glucose et des sucres rapidement métabolisables présents dans le milieu de culture (répression catabolique).

Récemment un modèle a été proposé pour la régulation de la biosynthèse des cellulases pour les champignons filamenteux (GONG et TSAO ; 1979). Ce modèle tient



TABEAU V - MODELE DE REGULATION POUR LA BIOSYNTHESE DES CELLULASES

compte des mécanismes connus de l'induction, de la répression et la diversité des réponses des organismes est observée aux différents inducteurs et aux différents milieux de culture (Tableau V).

Cette proposition de mécanisme de régulation des cellulases tient compte des considérations suivantes :

- l'importance de la  $\beta$ -1,4glucosidase dans la régulation ? de glucose et des niveaux de cellobiose à l'intérieur des cellules
- la biosynthèse essentielle des cellulases constitutives à faible concentration pour fournir l'inducteur naturel (cellobiose) pour la production continue de cellulases lorsque les cellules sont cultivées sur un milieu où la cellulose est la seule source de carbone et d'énergie.
- l'expression génétique coordonnée pour les deux cellulases.
- l'inhibition de la synthèse des cellulases au niveau de la traduction des gènes par le glucose (interaction de l'induction et répression).
- régulation des niveaux des inducteurs intercellulaires actifs (cellobiose intercellulaire) par la membrane ou par la  $\beta$ -glucosidase intercellulaire et/ou le glucose ou le gluconolactone.
- régulation de la quantité vraie de cellulases extracellulaires produite par la libération active des mécanismes et
- modifications post-translationnelles protéolytiques des cellulases.

### CHAPITRE III : LES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

#### L'ACTIVITE NATURELLE DES MOISSURES

Le rôle des champignons microscopiques dans le déroulement des cycles biologiques est capital, de même que leur incidence sur l'économie humaine. Les moisissures saprophytes se développent un peu partout : sur des débris végétaux, papiers et bois humides .....

La quantité d'éléments nutritifs indispensables à leur croissance est en réalité très faible et leur équipement enzymatique puissant et varié leur permet une répartition ubiquiste. On les rencontre aussi bien en milieu aquatique marin ou d'eau douce, mais aussi terrestre (l'humus notamment s'en révèle très riche). On les trouve également sous toutes les latitudes, même dans les conditions de sécheresse intense ou de température rigoureuse. L'atmosphère également H contient une multitude de leurs éléments de propagation.

Contrairement à certaines bactéries, aucun champignon n'est anaérobie strict. Mais certains peuvent s'épanouir lorsque les conditions de culture sont microaérophiles (dans le sol, dans les liquides ou à l'intérieur d'un substrat plus ou moins compact).

Les moisissures sont caractérisées par un mode de vie bien diversifié. Elles peuvent se développer à l'état associé, symbiotique ou parasitaire, soit à l'état libre en tant que saprophytes.

Cependant, la biodégradation des déchets organiques est l'aspect le plus positif de leur activité. Cette action s'exerçant principalement dans le sol ou en surface a pour résultat la formation de l'humus et la fertilisation du terrain.

Associés aux autres microorganismes ou organismes décomposeurs (bactéries, actinomycètes, protozoaires, vers, escargots, acariens...), les champignons cellulolytiques assurent la minéralisation de la matière organique complexe, libérant les éléments nutritifs indispensables à la vie des végétaux supérieurs. De tous les participants à la formation de l'humus, les champignons microscopiques sont les mieux adaptés à la décomposition rapide et efficace des molécules complexes, à celles en particulier de la cellulose qui représente près de 75 % de la masse des débris végétaux.

## UTILISATION DES MOISSURES DANS LES PROCESSUS DE BIOCONVERSION

Contaminants banaux, partout présentes, douées d'aptitudes biochimiques étonnamment variées, les moisissures sont des commensaux que l'homme n'a pas manqué de domestiquer. Depuis des temps très reculés, des levures sont utilisées en Europe dans les fermentations pour faire du pain, des fromages, du vin, de la bière et des champignons filamenteux *Aspergillus* et *Mucorales* en Extrême-Orient, pour la fabrication de l'alcool de riz, de la sauce de soja et d'autres produits fermentés.

Les champignons filamenteux sont de plus en plus utilisés en microbiologie industrielle dans des domaines très variés. La technique des cultures contrôlées en fermenteur permet d'orienter presque à volonté le métabolisme des souches. C'est ainsi que l'on obtient diverses enzymes : cellulases,  $\beta$ -glucosidases, amylases, protéases, pectinases, ou des métabolites : acide citrique, alcaloïdes, hormones et antibiotiques.

Ces dernières années, les problèmes posés par la forte demande en protéines alimentaires, la crise énergétique et devant la nécessité de recycler au maximum les composés organiques de façon à diminuer la pollution et à revaloriser les déchets agro-alimentaires et urbains, ont conduit à de nombreux travaux visant à produire des biomasses fongiques pour l'alimentation animale ou des carburants à partir des divers résidus végétaux.

Plusieurs procédés existent, permettant de produire des mycéliums de champignons filamenteux par culture en milieu liquide (PEKILO, SYMBA, STARON...), ou en milieu solide (KOJI, IRCHA-ORSTOM). Les souches de champignons microscopiques utilisées sont différentes en fonction du substrat et du procédé. Pour des substrats amylicés, des souches de champignons filamenteux telles que *Endomycopsis*, *Aspergillus* sont utilisées, par contre pour des substrats celluloseux (paille, papier ou d'effluents d'industries riches en cellulose) des souches de *Trichoderma* sont employées.

### LES TRICHODERMA

Ce sont des microorganismes qui appartiennent au grand ensemble des champignons filamenteux. Leur noyau cellulaire est enveloppé d'une membrane nucléaire et se divise par des mitoses typiques. L'appareil végétatif est un mycélium constitué

par des filaments de 1,5 - 12  $\mu$  de diamètre qui s'enchevêtrent de façon plus ou moins dense et s'anastomosent fréquemment. Les filaments sont cloisonnés, de ce fait, les *Trichoderma* sont classés parmi les champignons supérieurs.

Les filaments mycéliens, ainsi que leurs ramifications, croissent toujours par l'extrémité apicale, c'est-à-dire par la partie la plus jeune, tandis que les substances de réserve, lipides notamment, s'accumulent dans les parties plus âgées. La vitesse de la croissance apicale est un caractère stable qui est propre à chaque espèce. Parmi les champignons cellulolytiques, les *Trichoderma* sont les plus performants pour coloniser une surface plane. Dépourvus de chlorophylle, ils se développent en saprophytes, utilisant les restes d'animaux en végétaux ou d'autres matériaux d'origine organique.

Parmi les moisissures cellulolytiques (*Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Sporotrichum*), les *Trichoderma* sont les plus fréquemment utilisés dans les processus d'hydrolyse de la cellulose et des produits ligno-cellulosiques. Ils produisent en effet des quantités importantes d'Exoenzymes, capables d'hydrolyser complètement la cellulose en glucose.

Pour survivre lorsque les conditions deviennent défavorables ou pour se propager, les *Trichoderma* possèdent un mode de reproduction asexuée. Ils sont, de ce fait, regroupés dans le sous-ensemble de *Fungi Imperfecti*. Dans ce cas, le cytoplasme des vésicules appelées phialides se clive, autour des noyaux apparaissent des parois limitant les phialospores. Ces spores, une fois libérées, vont germer en donnant un nouveau mycélium identique au mycélium initial.

La souche de champignon que nous avons sélectionné pour l'étude de l'hydrolyse de la cellulose par fermentation en milieu solide ou en milieu liquide est un *Trichoderma harzianum*. Cette souche a été décrite par RIFAI (1969) ainsi :

*Trichoderma harzianum* Rifai, spec. nov. - In malti agaro coloniae rapide crescentes, floccosae, zonatae, reverso incolorato. Mycelium ex hyphis septatis, ramosis, hyalinis, 1,5 - 12  $\mu$  diam. compositum. Chlamydo sporae globosae, hyalinae, intercalares, 6-12  $\mu$  diam. Conidiophora regulariter ramosissima, dendroideae. Phialides 5-7 x 3-3,5  $\mu$ , ampulliformes. Phialosporae in mucro aggregatae, subglobosae vel breviter obovoidae, laeves, virides, 2,8 - 3,2 x 2,5 - 2,8  $\mu$ . Habitat in terra.

## CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES

### Le Matériel Biologique

Beaucoup de Microorganismes sont capables d'utiliser la cellulose comme source de carbone et d'énergie pour leur croissance. Sur le tableau (VI) nous avons porté la liste des champignons filamenteux que nous avons testé pour leur activité cellulasique. La plupart de ces souches produisent des enzymes extracellulaires lesquelles hydrolysent la cellulose native plus ou moins vite. Il s'agit des souches provenant de collections Internationales soit des souches cellulolytiques sauvages qui ont été isolées à partir du sol et purifiées dans notre laboratoire.

TABLEAU VI

COLLECTION DE SOUCHES DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

N° ORSTOM	NOM DE L'ESPECE	PROVENANCE
T11	<i>Trichoderma (viride) longibranchiatum</i>	ATCC 26921
T12	<i>Trichoderma (viride) longibranchiatum</i>	ATCC 28217
Tv3	<i>Trichoderma viride</i>	CCM F-486
Tr4	<i>Trichoderma reesei</i>	CCM F-521
Tr5	<i>Trichoderma reesei</i>	CCM F-522
Tr6	<i>Trichoderma reesei</i>	CCM F-560
Fj7	<i>Fusarium fusaroides</i>	CCM F-166
Ao8	<i>Aspergillus oryzae</i>	CCM F-172
Tk9	<i>Trichoderma koningii</i>	CCM F-544
As10	<i>Alternaria solani</i>	CCM F-167
Ar11	<i>Alternaria radicina</i>	CCM F-197
Ar12	<i>Alternaria radicina</i>	CCM F-198
Ta13	<i>Trichoderma aureoviride</i>	CCM F-559
Th14	<i>Trichoderma hamatum</i>	CCM F-541
Th15	<i>Trichoderma hargianum</i>	CCM F-470
Tp16	<i>Trichoderma piluliferum</i>	CCM F-573
Ts17	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	CCM F-561
Tv18	<i>Trichoderma viride</i>	CCM F-486
Tp19	<i>Trichoderma polysporum</i>	CCM F-572
Aa20	<i>Aspergillus aculeatus</i>	CCM F-596
Af21	<i>Aspergillus flavus</i>	CCM F-449
An22	<i>Aspergillus niger</i>	CCM F-330
Ap23	<i>Aspergillus parasiticus</i>	CCM F-550
Av24	<i>Aspergillus versicolor</i>	CCM F-620
Aw25	<i>Aspergillus wentii</i>	CCM F-459

ATCC : American Type Culture Collection

CCM : Czechoslovak Collection of Microorganisms

N° ORSTOM	NOM DE L'ESPECE	PROVENANCE
Mv26	<i>Myrothecium verrucaria</i>	CCM F-291
Pc27	<i>Penicillium cammanberti</i>	CCM F-378
Pc28	<i>Penicillium commune</i>	CCM F-426
P129	<i>Penicillium luteum</i>	CCM F-517
Pr30	<i>Penicilium roqueforti</i>	CCM F-431
Rs31	<i>Rhizopus stolonifer</i>	CCM F-445
Cp32	<i>Chondrophea populea</i>	CCM F-538
Fs33	<i>Fusarium solani</i>	CCM F-552
C3	<i>Souche sauvage cellulolytique</i>	sol, Sénégal
C4	" "	" "
C8	" "	" "
C14	" "	" "
C19	" "	" "
C20	" "	" "
C21	" "	" "
C24	" "	" "
C29	" "	" "
C30	" "	" "
C36	" "	" "
C38	" "	" "
C39	" "	" "
C40	" "	bois, France
C41	" "	bois, France

### Conservation et entretien des souches

A des temps réguliers (environ tous les six mois) les souches sont repiquées sur le milieu cristo-Malt Agar, puis incubées pendant 10 jours à 29°C. Elles sont ensuite conservées à + 4°C. Nous avons également lyophilisé la plus grande part des souches de notre collection.

### Mesure de la croissance apicale

Elle est effectuée selon la technique de RYAN et coll. (1943) sur le milieu de CZAPEK et DOX et sur le milieu malt extract agar. L'inoculation se fait avec des spores déposées à une extrémité du tube. On mesure toutes les 24 h l'avancement du mycelium à la surface du milieu pendant 10 jours. Les résultats sont exprimés en mm/h.

### Screening des souches cellulolytiques

La présence de cellulases est testée sur le milieu gélosé de MANDELS et WEBER à 0,75 % de cellulose microcristalline Avicel. Le réactif iodo-ioduré (solution de lugol) est utilisé pour mettre en évidence l'hydrolyse de la cellulose.

Le dosage quantitatif de production de cellulase est effectué sur des cultures de 64 H et 160 H sur le milieu liquide de MANDELS et WEBER à 0,75 % de cellulose. Les cultures de différentes souches se font dans des erlens Belco de 300 ml contenant chacun 100 ml de milieu de culture. Les erlens sont inoculés avec une quantité connue de spores et incubés à + 29°C et agités pendant 64 ou 160 H. Sur les échantillons homogénéisés à l'ultra-turrax les dosages suivants sont effectués :

- Activité papier filtre
- Acitivité carboxy méthyl cellulose
- Dosage de sucres réducteurs
- Dosage de sucres totaux
- Dosage de protéines

### Production de spores en milieu liquide

Des erlens Belco de 125 ml contenant 20 ml d'un milieu synthétique à 0,2 % de glucose sont inoculés avec une suspension de spores de concentration connue et placés à l'étuve à 29°C. Après 10 jours de culture les spores produites sont comptées directement après dilution sur cellule de Malassez. Les résultats sont exprimés en nombre de spores présentes par gramme de substrat carboné au départ.

### Production de spores en milieu solide

Dans un fermenteur spécial, précédemment décrit (RAIMBAULT et ROUSSOS), on introduit 300 ml de milieu pour la production de spores (ANNEXE). Le fermenteur est stérilisé à 120°C pendant 30 min. Le dispositif est alors refroidi et lorsque la température du milieu est de 50°C l'inoculum de spores est introduit stérilement ( $3 \times 10^7$  spores/g de substrat P.S.). Le milieu est alors homogénéisé par une rotation des disques à raison de 60 t/min. pendant 10 minutes puis refroidi par un courant d'air stérile et froid. Lorsque le milieu uniformément réparti sur les disques est solidifié le dispositif est placé dans une étuve à + 29°C et le fermenteur aéré par un débit de 10 litres/h d'air saturé d'eau à la température d'incubation.

Après 7 jours d'incubation, la récolte des spores est réalisée en introduisant dans le fermenteur 500 ml d'eau stérile contenant quelques gouttes de Tween 80. L'aération est stoppée et la rotation des disques à 100-200 t/mn est maintenue pendant 10 minutes. La suspension des spores est alors recueillie et le nombre de spores compté directement sur cellule de Malassez au microscope. Une partie de la suspension de spores est utilisée directement pour l'inoculation de différents substrats, l'autre est décantée et après élimination du surnageant une poudre sèche de spores est obtenue par évaporation sous vide de la suspension concentrée. Sous forme sèche les spores serviront pour une utilisation ultérieure.

## Conditions de culture pour la production de cellulases

### A - En Fermentation liquide

Les cultures ont été faites dans des fermenteurs Biolafitte de 2 litres contenant 1.250 ml de milieu de culture en utilisant chaque fois un des substrat suivants : cellulose Avicel, paille de blé, son de blé, cossette de betterave.

Prétraitement du substrat : Broyage et chauffage à 120°C pendant 1 h dans le fermenteur contenant soit le milieu minéral de MANDELS et WEBER dépourvu de bacto agar, soit le milieu minéral suivant :

Sulfate d'ammonium	0,975 g
Urée	0,238 g
Phosphate monopotassique	0,50 g
Eau	1000 ml
pH : 5,6	
Substrat : 10g/l	

Inoculation : avec une suspension de spores pour ramener à  $3 \times 10^7$  spores/g de substrat P.S.

Conditions de culture :

- température : 29°C  $\pm$  1°C
- aération : 10 l/h
- agitation : 500 t/min
- pH : non régulé
- Antimousse : huile de colza

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

Sur les échantillons décongelés et homogénéisés par passage à l'ultraturax

puis au Potter les dosages suivants sont réalisés.

- Mesure du pH
- Sucres réducteurs (DNS)
- Sucres totaux (Anthrone)
- Activité papier filtre
- Activité carboxy méthyl cellulose
- Protéines.

Les résultats sont exprimés en g ou mg de produit formé ou disparu par g de substrat poids sec de départ. Les activités Enzymatiques sont exprimées en UI/100 g de substrat P.S. initial.

#### B - En Fermentation solide

Les cultures ont été réalisées en utilisant les dispositifs de colone décrits par RAIMBAULT et ALAZARD (1980).

Substrats : paille de blé, son de blé, mélange de paille et de son de blé, cossette de betterave.

Solution minérale pour 100 g de substrat :

Sulfate d'ammonium	9,75 g
Urée	2,38 g
Phosphate monopotassique	5,00 g
Eau distillée	100 ml
pH : 4,2	

Prétraitement : A 100 g de substrat finement broyé (< 0,5 mm) on ajoute 100 ml de la solution minérale. On mélange bien. Le tout est porté à l'autoclave à 120°C pendant 1h.

Inoculation : avec une suspension concentrée de spores pour ramener la concentration finale à  $3 \times 10^7$  spores/g de substrat P.S. ainsi que l'humidité initiale à 60 ou 70 %.

Humidité initiale : 60 ou 70 %

Conditions de culture : On mélange le substrat traité et refroidi à 50 %

d'humidité avec la suspension de spores. 20 g de ce mélange à 60 ou 70 % d'humidité sont répartis dans chaque incubateur, ces derniers sont placés dans un bain-marie à 29°C.

L'aération des cultures se fait avec de l'air saturé en eau. Le débit d'air est réglé à 7 l/h.

Mesure des paramètres : A des temps variables on sort des incubateurs du bain-marie et le contenu du fermenteur est pesé (poids humide). Le produit est ensuite homogénéisé à la spatule et un prélèvement de 5 g est mis dans un erlen de 150 ml et congelé. On effectue également sur le produit restant une mesure de poids sec ainsi que les observations au microscope pour apprécier l'évolution de l'inoculum en fonction du temps.

Aux échantillons décongelés on ajoute 50 ml d'eau distillée. Cette suspension est homogénéisée à l'ultraturax. Le pH est alors mesuré. A partir de ces échantillons une dilution au 1/3 est nécessaire pour ramener la concentration du substrat à 10 g pH/litre. Les dosages suivants sont alors réalisés sur les échantillons ainsi dilués et passés au Potter :

- sucres réducteurs
- sucres totaux
- Activités enzymatiques (papier filtre, carboxyméthylcellulose)
- Protéines

Les résultats sont exprimés en g ou mg de produit formé ou disparu par g de substrat poids sec de départ. Les activités enzymatiques sont exprimées en UI/100 g de substrat P.S. initial.

### Physiologie et Métabolisme des champignons filamenteux

Nous avons utilisé deux milieux différents : le premier est un milieu pléthorique très riche utilisé pour l'entretien et la production de spores de souches. Le second est un milieu entièrement synthétique (Annexe).

Le milieu synthétique est réparti à raison de 25 ml dans des erlens Belco de 125 ml. Les sucres utilisés comme substrat (2 g/l) sont : glucose, xylose, lactose, saccharose, cellobiose, amidon et cellulose avicel. L'inoculation des milieux se fait avec une suspension de spores. La température d'incubation est de 20°C pour *P. camemberti* et de 29°C pour les autres souches. Les cultures ne sont pas agitées. Après 7 jours d'incubation les cultures sont homogénéisées à l'ultraturrax pendant 30 sec. et centrifugées à 6.000 t/min pendant 15 min.

Les sucres réducteurs résiduels ainsi que les activités amylasiques et cellulasiqes (Activité Papier Filtre, Activité Carboxymethylcellulose) contenues dans le surnageant sont dosés. Les culots sont repris et lavés deux fois avec 24 ml d'eau distillée. On dose les protéines contenues dans chaque culot ainsi lavé.

Les résultats sont exprimés en UI/g de substrat initial pour les activités enzymatiques et en mg/l de protéines formées.

°° °°

## CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

### LA CROISSANCE APICALE

L'ensemble des souches de notre collection a été cultivé sur trois milieux différents : Malt Agar ; Milieu de MANDELS et WEBER (1969) et CZAPEK-DOX agar. Le premier, est un milieu pléthorique et par conséquent il n'y a pas eu besoin d'apporter d'éléments minéraux ou de facteurs de croissance. Les deux autres milieux sont beaucoup plus pauvres, il s'agit de milieux synthétiques. Dans le milieu de MANDELS et WEBER la cellulose est l'unique source de carbone et d'énergie mais la présence de peptone et d'extrait de levure, en faible quantité, apporte principalement des facteurs de croissance pour favoriser la germination des spores. Dans le cas du milieu de CZAPEK et DOX qui est entièrement synthétique, nous avons apporté une modification en utilisant le glucose comme source de carbone à la place du saccharose. En effet, nous avons constaté, au cours des expériences, que le saccharose n'est pas assimilé par certaines souches de Trichoderma alors que le glucose est utilisé par l'ensemble des souches dans les mêmes conditions.

Sur le tableau VII nous avons porté les réponses obtenues pour l'ensemble des souches cultivées sur les milieux selon la technique de tubes utilisée par RYAN et coll. (1943). La vitesse de la croissance apicale est exprimée en mm/h.

Les valeurs portées sur ce tableau sont des valeurs moyennes horaires obtenues après une culture de 240 heures à 29°C.

La plupart des souches de Trichoderma sont caractérisées par une croissance apicale qui est voisine de 1 mm/h alors que l'ensemble des souches d'Aspergillus ont une croissance apicale beaucoup plus faible qui est de l'ordre de 0,20 mm/h.

Parmi les différentes souches de Trichoderma la souche qui possède la vitesse de croissance apicale la plus élevée est T. reesei n° 6. Le mycelium de cette souche, lorsqu'il est déposé au centre d'une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre, est capable d'envahir cette surface en 34 heures. Une autre souche, Trichoderma harzianum n° 15 est caractérisée par une vitesse de la croissance apicale assez élevée et proche de celle de T. reesei n° 6.

N° de souche	Malt Agar mm/h	MANDELS Cellu-lose mm/h	CZAPEK Glucose mm/h
T. harzianum 15	1,25	0,88	0,86
T. aureoviride 13	1,00	0,79	0,72
T. reesei 6	1,33	1,02	1,18
C <sub>24</sub>	1,33	0,95	1,15
C <sub>3</sub>	1,15	0,90	1,10
C <sub>30</sub>	1,05	0,90	1,10
T. reesei 5	1,00	0,65	0,63
T. reesei 4	0,96	0,60	0,62
C <sub>31</sub>	0,94	0,64	0,70
C <sub>18</sub>	0,82	0,58	0,55
T. longibranchiatum 1	0,96	0,66	0,69
T. longibranchiatum 2	0,96	0,61	0,66
T. saturnisporum 17	0,82	0,45	0,59
C <sub>8</sub>	0,60	0,45	0,69
C <sub>20</sub>	0,12	0,30	0,26
T. hamatum 14	0,42	0,40	0,22

N° de souche	Malt Agar mm/h	MANDELS Cellu-lose mm/h	CZAPEK Glucose mm/h
C <sub>19</sub>	0,11	0,31	0,24
C <sub>4</sub>	0,15	0,26	0,17
A. versicolor 24	0,08	0,25	0,04
T. reesei 4	0,96	0,55	0,62
T. koningii 9	0,46	0,23	0,15
A. oryzae 8	0,16	0,22	0,27
T. viride 3	0,38	0,21	0,15
A. aculeatus 20	0,19	0,21	0,19
A. niger 22	0,25	0,20	0,20
A. parasiticus 23	0,18	0,20	0,14
A. niger 10	0,23	0,20	0,20
T. viride 18	0,25	0,19	0,20
T. piluliferum 16	0,26	0,17	0,10
A. radicina 11	0,04	0,17	0,04
A. radicina 12	0,08	0,14	0,18
A. wentii 25	0,04	0,14	0,07

Tableau VII : Croissance apicale de champignons filamenteux cultivés sur différents milieux de culture en tubes de RYAN.

Cependant, les souches présentant une vitesse de la croissance apicale élevée ne sont pas forcément les plus performantes au niveau de la production de la quantité de biomasse mycélienne. En effet nous avons observé que les souches les plus rapides à coloniser une surface solide présentent moins de branchements aériens, ce qui a comme conséquence une faible densité du mycélium. Contrairement aux Trichoderma, les Aspergillus sont caractérisés par un mycélium très dense et malgré leur vitesse de croissance apicale qui est 5 fois inférieure ils produisent la même quantité de biomasse mycélienne dans les mêmes conditions expérimentales lorsqu'on utilise une source de carbone telle que le glucose.

La vitesse de la croissance apicale d'un champignon filamenteux est un caractère stable. Plusieurs mesures ont été réalisées dans le temps avec un nombre restreint de souches pour vérifier cette hypothèse. Les résultats obtenus avec ces mêmes souches sont chaque fois du même ordre de grandeur. Chaque espèce de champignon microscopique possède donc une vitesse de croissance apicale qui lui est propre et qui le caractérise. Cette vitesse n'est pas influencée par la nature de la source de carbone du milieu de culture lorsque celui-ci est un milieu synthétique. Cependant, pour les Trichoderma, les valeurs de la croissance apicale obtenues à partir des cultures sur milieu pléthorique sont toujours sensiblement supérieures à celles obtenues à partir des cultures sur milieu synthétique.

#### Screening des souches cellulolytiques

Pour la sélection des souches capables d'utiliser la cellulose en prototrophie, nous avons testé la croissance de l'ensemble des souches de notre collection sur le milieu sélectif de MANDELS et WEBER (1969) en utilisant la cellulose Avicel ou la Carboxyméthyl cellulose (CMC) comme unique source de carbone et d'énergie.

Les moisissures qui ont donné une culture positive en tube ont été repiquées par la suite sur une boîte de Pétri contenant le même milieu de culture. Après 3 jours d'incubation à 29°C l'hydrolyse de la cellulose par des exoenzymes (cellulases) est révélée par un réactif iodo-ioduré (lugol). Les réactions positives sont notées par l'apparition d'auréoles autour des colonies.

Le tableau VIII rassemble les résultats obtenus pour les souches qui ont donné une culture positive. Les souches sauvages isolées dans notre laboratoire sont toutes capables d'hydrolyser la cellulose assez rapidement. Au contraire, les souches de

N° de la souche	Carboxyméthyl Cellulose en tube	CMC en boîte + Lugol	Cellulose Avicel en boîte	Cellulose Avicel en boîte + Lugol
T. longibranchiatum n° 1	+	⊕	+	⊕
T. longibranchiatum n° 2	+	⊕	+	⊕
T. viride n° 3	+	⊕	±	⊕
T. reesei n° 4	+	⊕	±	⊕
T. reesei n° 5	+	⊕	+	⊕
T. reesei n° 6	+	⊕	++	⊕
F. fusaroides n° 7	-	⊕	±	⊕
A. oryzae n° 8	+	⊕	+	⊕
T. koningi n° 9	-	⊕	±	⊕
A. solani n° 10	±	-	-	-
A. radicine n° 11	±	⊕	±	⊕
A. radicine n° 12	±	⊕	±	⊕
T. harzianum n° 15	++	⊕	+++	⊕
C <sub>3</sub>	+	⊕	+++	⊕

N° de la souche	CMC en tube	CMC en boîte + Lugol	Cellulose Avicel en tube	Cellulose Avicel en boîte + Lugol
C <sub>4</sub>	+	⊕	+	⊕
C <sub>8</sub>	+	⊕	++	⊕
C <sub>14</sub>	+	⊕	++	⊕
C <sub>18</sub>	+	⊕	+	⊕
C <sub>19</sub>	+	⊕	+	⊕
C <sub>20</sub>	+	⊕	++	⊕
C <sub>21</sub>	+	⊕	++	⊕
C <sub>24</sub>	+	⊕	+++	⊕
C <sub>29</sub>	+	⊕	++	⊕
C <sub>30</sub>	+	⊕	+	⊕
C <sub>31</sub>	+	⊕	+	⊕
C <sub>36</sub>	+	⊕	++	⊕
C <sub>38</sub>	+	⊕	+	⊕
C <sub>39</sub>	+	⊕	+++	⊕

Tableau VIII : Screening des souches cellulolytiques. Culture de 3 jours à 29°C sur Milieu de MANDELS et WEBER. Substrat cellulose Avicel ou CMC. Culture positive + Culture négative - ; Présence d'exoenzymes : ⊕

collection ne sont pas toutes aussi performantes. Parmi celles-ci, Trichoderma harzianum 15 semble être le microorganisme le mieux équipé en exoenzymes pour l'hydrolyse de la cellulose Avicel.

Ce premier passage de microorganismes sur un milieu sélectif nous a permis de sélectionner les souches cellulolytiques parmi l'ensemble de notre collection. Cependant la réponse obtenue reste qualitative. Dans un deuxième temps nous avons étudié la production quantitative de cellulases, de protéines, la dégradation de la cellulose ainsi que l'évolution du pH.

Sur le tableau IX nous avons porté les résultats relatifs à 11 souches de collection cultivées en milieu liquide agité. La croissance abondante d'un microorganisme sur ce milieu est suivie par une diminution du pH ; (STERNBERG ; 1978). Parallèlement il y a une libération d'exoenzymes dans le surnageant. Les souches qui possèdent des activités Papier Filtre (PF) et Carboxyméthyl Cellulose (CMC) les plus élevées sont : T. harzianum, T. reesei et T. longibranchiatum. Ces mêmes souches synthétisent le plus de protéines et dégradent la cellulose à 60 % après 66 heures de culture.

Cependant, ces résultats n'ont qu'une valeur comparative, les conditions optimales pour chaque souche n'ayant pas été déterminées. Ce screening nous autorise toutefois de choisir les souches qui apparaissent les plus performantes pour dégrader la cellulose et produire des cellulases.

#### Production de spores

Les spores de champignons imparfaits sont la forme de résistance et de reproduction asexuée. Ces spores constituent le point de départ de toutes les applications industrielles de l'utilisation de champignons filamenteux dans les processus de fermentation. Elles servent pour le lancement d'une opération dans le cas de fermentations en milieu solide. Dans ce dernier cas une quantité de  $3 \times 10^7$  spores/gramme de substrat poids sec est utilisée (RAIMBAULT et ALAZARD ; DESCHAMPS et Coll.).

Cependant deux problèmes restent à résoudre lors d'une fermentation en milieu solide :

- Tout d'abord sélectionner le microorganisme qui correspond le mieux au type de l'opération (par ex. production de cellulases à partir d'un substrat lignocellulosique) et qui en même temps est capable de produire une quantité importante de spores sur un milieu simple.

Souche n°	pH	Sucres réducteurs mg/l	Activité PF UI/l	Activité CMC UI/l	Sucres totaux mg/l	Protéines mg/l
T. longibranchiatum 1	3,35	90	64	1.388	4,20	820
T. longibranchiatum 2	3,40	110	44	918	4,10	820
T. viride 3	6,00	100	11	82	7,50	580
T. reesei 4	4,35	90	40	740	4,80	1.240
T. reesei 5	3,45	50	75	1.229	3,80	720
T. reesei 6	6,05	100	12	66	7,70	580
T. aureoviride 13	5,95	70	54	960	5,00	1.180
A. oryzae 8	6,10	130	12	257	8,00	780
T. koningi 9	6,10	120	6	56	7,60	560
A. solani 10	6,10	80	10	84	7,80	560
T. harzianum 15	3,55	20	80	1.315	4,00	1.080

Tableau IX : Screening des souches cellulolytiques. Conditions de culture : Milieu de MANDELS et WEBER à 1 % de cellulose Avicel. Inoculation avec une suspension de spores. Culture agitée à 29°C pendant 66 heures.

- Ensuite produire une quantité importante de spores propres de manière à pouvoir inoculer 10 kg de substrat P.S.

#### Production de spores en milieu liquide

Sur le tableau X nous avons porté les résultats obtenus pour 30 souches de champignons filamenteux cellulolytiques. Les souches ont été classées suivant leurs performances du point de vue de production de spores. On constate que sur glucose où toutes les souches donnent une croissance abondante les Trichoderma sont les meilleurs producteurs de spores. La souche la plus performante est Trichoderma harzianum n° 15. Elle est suivie par quatre souches sauvages C<sub>24</sub> ; C<sub>3</sub> ; C<sub>30</sub> et C<sub>31</sub>. Ces quatre souches sont également des Trichoderma. La quantité de spores produite évolue de 1 à 300 x 10<sup>8</sup> spores/g SPS pour l'ensemble des souches. On constate que les souches sauvages cellulolytiques sont de bonnes productrices de spores alors que les souches provenant de collections internationales sont classées parmi les moins performantes. En particulier la souche de référence la plus utilisée lors de fermentations liquides, Trichoderma reesei n° 6 (QM 9414), produit 100 fois moins de spores que la souche sauvage C<sub>24</sub>.

#### Production de spores en milieu solide

Dans notre laboratoire nous avons mis au point un procédé de production de spores de champignons filamenteux en milieu solide et déposé un brevet d'invention. Le principe repose sur l'utilisation d'un fermenteur particulier à disques rotatifs de façon à obtenir une grande surface de sporulation et qui permet la récolte aisée des spores par simple lavage des surfaces, la biomasse mycélienne restant emprisonnée dans le milieu solidifié.

Le tableau XI indique les résultats obtenus pour quatre souches de champignons filamenteux. On constate que le premier lavage permet de récolter 75 à 90 % des spores produites dans le dispositif du fermenteur à grilles et d'obtenir des suspensions de spores concentrées contenant au moins 1,1 x 10<sup>8</sup> à 4,2 x 10<sup>8</sup> spores par ml.

La quantité de spores formée par cm<sup>2</sup> varie de 3 x 10<sup>7</sup> à 2,2 x 10<sup>8</sup> spores/cm<sup>2</sup>. Le rendement pondéral en spores rapporté à la quantité de substrat introduite dans le fermenteur varie de 5 à 14 %, ce qui représente un taux de conversion en spores important.

N° de souche	Nombre de spores par ml	Nombre de spores par GSPS
T. harzia-num 15	$6,5 \times 10^7$	$3,25 \times 10^{10}$
C <sub>24</sub>	$5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^{10}$
C <sub>3</sub>	$4 \times 10^7$	$2 \times 10^{10}$
C <sub>30</sub>	$3,6 \times 10^7$	$1,8 \times 10^{10}$
C <sub>31</sub>	$2,6 \times 10^7$	$1,3 \times 10^{10}$
A. versicolor 24	$2,5 \times 10^7$	$1,25 \times 10^{10}$
C <sub>18</sub>	$2,5 \times 10^7$	$1,25 \times 10^{10}$
A. wentii 25	$2,0 \times 10^7$	$1 \times 10^{10}$
C <sub>21</sub>	$1,9 \times 10^7$	$9,9 \times 10^9$
A. flavus 21	$1,8 \times 10^7$	$9 \times 10^9$
A. aculeatus 20	$1,7 \times 10^7$	$8,9 \times 10^9$
C <sub>4</sub>	$1,5 \times 10^7$	$7,5 \times 10^9$
A. oryzae 8	$1,4 \times 10^7$	$7 \times 10^9$
A. niger 22	$1,3 \times 10^7$	$6,2 \times 10^9$
C <sub>20</sub>	$1,2 \times 10^7$	$5,8 \times 10^9$

N° de souche	Nombre de spores par ml	Nombre de spores par GSPS
T. viride 18	$7,2 \times 10^6$	$3,6 \times 10^9$
C <sub>8</sub>	$5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^9$
A. parasiticus 23	$5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^9$
T. viride 3	$3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^9$
T. viride 4	$1,1 \times 10^6$	$5,5 \times 10^8$
T. longibranchiatum 1	$5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^8$
T. reesei 5	$5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^8$
T. reesei 6	$5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^8$
T. koningii 9	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^8$
T. aureoviride 13	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^8$
T. longibranchiatum 2	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^8$
A. solavi 10	$2 \times 10^5$	$1 \times 10^8$
A. radicina 11	$2 \times 10^5$	$1 \times 10^8$
A. radicina 12	$2 \times 10^5$	$1 \times 10^8$
T. hamatum 14	$2 \times 10^5$	$1 \times 10^8$

Tableau X : Production de spores en milieu liquide non agité.

TABLEAU XI

## PRODUCTION DE SPORES EN MILIEU SOLIDE CONTROLE DANS UN FERMENTEUR ORSTOM

Nom de la souche	<u>Aspergillus niger</u>	<u>Trichoderma harzianum</u>	<u>Penicillium sp</u>	<u>Penicillium camemberti</u>
N° de la collection ORSTOM	10	Th 15	42	PC
1er lavage 500 ml	75 %	76 %	87 %	92 %
2ème lavage 250 ml	15 %	24 %	11 %	6 %
3ème lavage 250 ml	10 %	5 %	2 %	2 %
Nb de spores récoltées dans 1 l	$7,3 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^{10}$
Concentration 1ère	$1,1 \times 10^8$ sp/ml	$4,2 \times 10^8$ sp/ml	$2,6 \times 10^8$ sp/ml	$6,9 \times 10^7$ sp/ml
en 2ème	$4,3 \times 10^7$ sp/ml	$2,6 \times 10^8$ sp/ml	$6,6 \times 10^7$ sp/ml	$9,1 \times 10^6$ sp/ml
spores/ml 3ème	$3 \times 10^7$ sp/ml	$5,6 \times 10^7$ sp/ml	$1,2 \times 10^4$ sp/ml	$3,0 \times 10^6$ sp/ml
Nb de spores formées/cm <sup>2</sup>	$5,75 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$3 \times 10^7$
Nb de spores/g de substrat	$2,5 \times 10^9$	$9,3 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$	$1,25 \times 10^9$
Poids d'1 spore	$6 \times 10^{-11}$ g	$1,3 \times 10^{-11}$ g	$1,1 \times 10^{-11}$ g	$4 \times 10^{-11}$ g
Rendement pondéral global rapporté au substrat carboné Poids spores/g	14,6 %	12,1 %	5,75 %	5 %

Cette nouvelle technique permet de produire des spores de champignon en conditions aseptiques et selon un procédé relativement simple, d'une mise en oeuvre facile ne nécessitant pas de manipulations longues et coûteuses. En outre, les spores ainsi obtenues sont pures, sans contamination par d'autres microorganismes ni par des métabolites ou résidus mycéliens qui sont retenus essentiellement dans le dispositif lors de la récolte. Enfin les rendements obtenus sont supérieurs ou comparables à ce que l'on peut obtenir par les autres techniques habituelles d'une mise en oeuvre délicate.

#### Influence de la quantité d'inoculum sur la production de cellulases

Pour déterminer la quantité de spores qu'il faut apporter nous avons suivi la croissance de T. harzianum dans les échantillons ayant reçu des doses de 0 ;  $3,5 \times 10^3$  ;  $3,5 \times 10^4$  ;  $3,5 \times 10^5$  .....  $3,5 \times 10^{10}$  spores/gramme de cellulose. Les cultures sont effectuées en milieu liquide agité à 29°C. Des prélèvements sont effectués toutes les 24 heures pour suivre le taux de germination des spores ainsi que la cinétique de production de cellulases et de protéines et de dégradation de la cellulose.

Sur les tableaux XII et XIII sont portés les résultats de différents paramètres suivis après 90 et 160 heures de culture à 29°C.

Pour les plus fortes concentrations en spores ( $10^{10}$  ;  $10^9$  ;  $10^8$  ;  $10^7$ ) le processus de l'hydrolyse de la cellulose est pratiquement terminé après 90 heures : le pH atteint les valeurs minimales ( $\approx 3,10$ ) ; les activités PF et CMC ont atteint les valeurs maximales. Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs d'activités enzymatiques obtenues pour les concentrations très élevées en spores ( $10^{10}$  et les valeurs plus faibles ( $10^7$  spores). Cependant, on note un écart de valeur au niveau des protéines. Cet écart peut être dû à l'apport de protéines par l'inoculum et à la pigmentation des spores qui peut fausser le dosage des protéines.

Par contre, l'examen microscopique révèle qu'entre ces quatre échantillons le taux de germination des spores est très différent. Pour la concentration de  $2,3 \times 10^{10}$  spores, uniquement 1 % des spores ont germé pour donner un tube germinatif et par la suite un mycélium abondant ; environ 20 % des spores ont doublé de volume mais n'ont pas donné de mycélium. Le reste des spores, environ 80 %, ne présentent aucune évolution. Pour les concentrations de  $2,3 \times 10^9$  et  $2,3 \times 10^8$  spores nous avons observé

Tableau XII : Influence de la concentration de l'inoculum sur l'hydrolyse de la cellulose. Culture de T. harzianum en milieu synthétique à 1 % de cellulose, en eriens agités à 29°C pendant 90 heures.

Nb de spores 2,3 x	10 <sup>10</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	SPORES LAVEES		
									10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>
pH	3,10	3,20	3,20	3,75	5,05	5,25	5,60	5,60	5,80	6,05	5,80
Sucres Réduc- teurs mg/l	74	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Activi- té PF UI/l	80	85	67	57	37	28	0	0	0	0	0
Activi- té CMC UI/l	1029	1104	1067	937	770	622	0	0	0	0	0
Sucres Totaux g/l	8,5	7,8	6,7	9,5	10	9,8	10	10	10	10	10
Proté- ines mg/l	1550	750	580	500	350	200	100	100	375	100	100

un taux de germination de 20 et 40 % respectivement. Ce taux de germination reste stable au cours du temps et varie uniquement en fonction de la concentration en spores de l'inoculum. A partir des concentrations de  $2,3 \times 10^7$  spores, le taux de germination est de 100 % après 20 h de culture à 29°C.

Nous avons donc adopté pour la suite de nos expériences une concentration de  $3 \times 10^7$  spores/g de substrat. RAIMBAULT et ALAZARD (1980) ont utilisé une dose d'inoculum de  $2 \times 10^7$  spores/g de farine pour la production de protéines d'A. hennebergii à partir de la farine de manioc.

Les résultats du tableau XIII ont été obtenus après 160 h de culture de T. harzianum sur cellulose. On observe que toutes les concentrations d'inoculum ont donné une croissance et les activités enzymatiques sont du même ordre de grandeur. La cellulose a été hydrolysée à 60 % pour les concentrations en spores supérieures à  $10^7$  spores.

Par contre, le pourcentage d'hydrolyse de la cellulose, après 160 h de culture de T. harzianum, est fonction de la concentration de l'inoculum pour les concentrations inférieures à  $10^7$  spores.

Nous avons également fait le même type d'expérience en utilisant des spores lavées deux fois dans de l'eau distillée et remises en suspension dans de l'eau. Les résultats (tableaux XII et XIII) démontrent que les spores ainsi lavées ont perdu un facteur de germination. L'examen microscopique révèle qu'il n'y a pas eu de germination des spores pour les trois essais réalisés avec des concentrations de  $2,3 \times 10^8$ ,  $2,3 \times 10^7$  et  $2,3 \times 10^7$  spores lavées/gramme de cellulose. Il existe donc un facteur de germination contenu par les spores qui est soluble dans l'eau et disparaît avec les eaux de lavage.

#### Influence de différents prétraitements de résidus lignocellulosiques

L'étude de l'influence de divers prétraitements de résidus lignocellulosiques en vue de leur utilisation pour l'enrichissement en protéines par fermentation en milieu solide a été réalisée en collaboration avec Mme Claude VIDAUD, stagiaire IRCHA. Cette étude a fait l'objet d'un mémoire de 5ème année présenté par Mme VIDAUD à l'Université de Clermont-Ferrand II.

Tableau XIII : Influence de la concentration de l'inoculum sur l'hydrolyse de la cellulose. Culture de T. harzianum en milieu synthétique à 1 % de cellulose, en erlens agités à 29°C pendant 160 heures.

Nb de Spores 2,3 x	10 <sup>10</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	SPORES LAVEES		
									10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>
pH	3,05	3,35	3,50	3,85	3,80	4,00	4,55	4,50	6,15	6,70	6,40
Sucres Réduc- teurs mg/l	52	20	20	20	20	20	20	20	10	10	10
Activi- té PF UI/l	93	83	70	57	41	37	65	93	0	0	0
Activi- té CMC UI/l	755	851	814	759	630	630	852	722	100	80	80
Sucres Totaux g/l	5,7	4,0	4,20	4,0	5,0	6,0	7,4	7,7	10	10	10
Proté- ines mg/l	2000	1000	625	580	700	850	850	880	580	400	100

Les résultats obtenus ont permis de définir les conditions essentielles de mise en oeuvre de la fermentation en milieu solide en utilisant la paille comme substrat pour la croissance de champignons filamenteux cellulolytiques. Les conditions sont les suivantes :

- utilisation de la paille broyée d'une taille inférieure à 5 mm.
- traitement de la paille en milieu imprégné, de façon à augmenter l'accessibilité de la cellulose aux cellulases et à éviter les pertes importantes de matière, par ailleurs source de pollution.
- traitement de la paille soit uniquement par la chaleur à 110°C pendant 30 min, soit dans les mêmes conditions mais en présence de soude à 1 %.

#### Production de cellulases de *T. harzianum* à partir des substrats cellulosiques.

Parmi les souches de champignons filamenteux nous avons retenu la souche de *T. harzianum* n° 15 pour l'étude de l'hydrolyse de la cellulose et des produits lignocellulosiques par fermentation en milieu liquide et en milieu solide. En effet, la vitesse de la croissance apicale, la production de cellulases ainsi que le rendement de sporulation font que cette souche est la mieux adaptée pour ce type d'étude.

Avant d'appliquer le procédé de fermentation solide décrit par RAIMBAULT et ALAZARD (1980) aux substrats lignocellulosiques naturels, nous avons étudié dans un premier temps, l'hydrolyse de la cellulose microcristalline Avicel en fermentation liquide dans le but : de mettre au point les différentes méthodes de dosage, de mesurer la quantité de cellulases produites à partir de la cellulose pure et de suivre l'évolution de *T. harzianum* au cours de la fermentation. Ceci permettra dans un deuxième temps d'utiliser différents substrats lignocellulosiques et de comparer les rendements de production de cellulases en fermentation solide et liquide.

#### Hydrolyse de la cellulose Avicel en fermentation liquide

La figure 3 représente l'évolution du pH, des activités cellulases et des protéines lors de la culture de *T. harzianum* en fermenteur de 2 litres.

Il est possible de distinguer trois phases d'évolution du pH. Au cours de la première phase qui correspond à la germination des spores et au début de la

croissance du mycélium, on note une légère augmentation du pH qui passe de 5,8 à 6,1. Cette augmentation pourrait être due à une hydrolyse de l'urée pendant la germination des spores, les ions ammonium étant alors libérés dans le milieu à une vitesse supérieure à celle de leur assimilation.

Lors de la deuxième phase qui dure environ 20 h, on remarque une diminution du pH liée à la croissance active du mycélium. Les conditions acides qui apparaissent dans le milieu ne sont pas dues à la sécrétion d'acides organiques par le microorganisme mais selon STERNBERG (1976) elles sont liées à la consommation des ions  $\text{NH}_4^+$  sous forme  $\text{NH}_3$  et avec accumulation des ions  $\text{H}^+$ . Le tampon phosphate n'est pas suffisant pour pallier à cette production. D'ailleurs STERNBERG et DORVAL (1979) proposent une modification du milieu standard de MANDELS et WEBER (1969) où l'urée et le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sont respectivement remplacés par  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  et  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

Après l'arrêt de la croissance dû principalement à l'épuisement du substrat disponible (MANDELS et STERNBERG ; 1976), la troisième phase est caractérisée par une remontée du pH qui tend vers la neutralité en fin de culture.

L'observation microscopique révèle tout d'abord un gonflement de la spore qui aboutit après 7 h d'incubation à l'apparition d'un tube germinatif. Celui-ci donne naissance à un mycélium cloisonné fin et long. Les premiers branchements se développent après 17 h de culture. Après 25 h, leur multiplication rapide conduit à un foisonnement du mycélium qui envahit le milieu. Un épaissement des extrémités apicales du mycélium apparaît après 90 h de croissance. Une heure après, on note l'apparition dans le milieu des spores ainsi que le début de lyse du mycélium.

Nous avons suivi l'évolution de deux activités enzymatiques : l'activité Carboxyméthyl Cellulase ( $\text{C}_x$ ) et l'activité papier filtre ( $\text{C}_1 + \text{C}_x$ ). La cinétique de production de ces deux types de cellulases est rapportée sur la figure 3. Globalement, les activités cellulases apparaissent dans le milieu après 16 heures de culture pendant la phase de multiplication active du mycélium. Les valeurs maxima d'activité cellulase libérées dans le milieu correspondent aux valeurs minima du pH. Après 50 h de culture, la production de cellulases a atteint sa valeur maximum. Ces valeurs sont de 21.000 UI/100 grammes de substrat poids sec (SPS) au départ d'activité CMC et de 2.000 UI/100 grammes SPS d'activité PF. Le rapport ACMC/APF est voisin de 10.

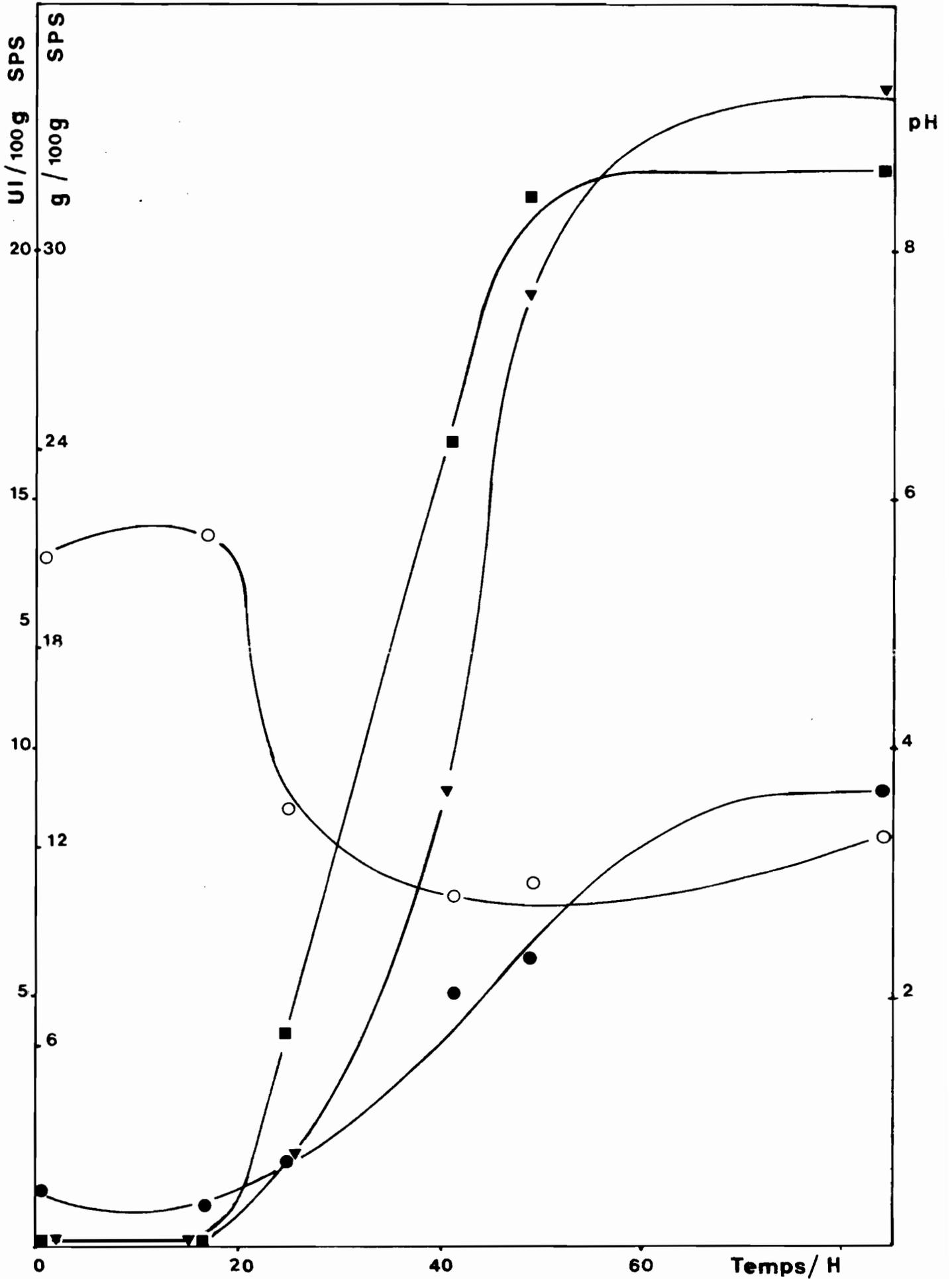


Figure 3 : Hydrolyse de la cellulose avicel par *T. harzianum* en fermentation

liquide : ■—■ Activité CMC x 1000 UI ; ▼—▼ Activité PF x 100 UI ;  
●—● Protéines ; ○—○ pH.

Ainsi que nous l'avons observé précédemment dans le cas de l'évolution de l'inoculum et des activités cellulaisiques, la biosynthèse des protéines est fonction de la germination des spores : elle apparait après 20 h de culture pour atteindre la valeur maximale après 60 h qui est de 10,2 g/100 g SPS.

Plusieurs auteurs (GALLO et Coll. ; 1978 ; STERNBERG ; 1976) ont obtenu des résultats similaires en utilisant des mutants de souches de Trichoderma reesei.

Culture de T. harzianum sur un mélange paille + son de blé en fermentation liquide.

Les cultures ont été faites dans un fermenteur de 2 litres en utilisant un mélange de paille et de son de blé (10 g/2 g) comme source de carbone et un milieu minéral composé de sulfate d'ammonium, d'urée et de phosphate monopotassique.

L'évolution des différents paramètres dosés au cours de la fermentation est portée sur la figure 4. La diminution du pH est nettement moins accentuée pour la culture de T. harzianum sur paille que sur cellulose Avicel. Cette faible diminution du pH peut être due à un effet tampon de la paille conjugué à une croissance plus lente du mycélium sur un substrat où la cellulose est moins accessible.

L'observation microscopique nous révèle les mêmes évolutions de l'inoculum, avec une colonisation de brins de paille par le mycélium après 25 h de culture, que celles observées précédemment sur cellulose Avicel. Cependant l'épaississement des extrémités apicales du mycélium apparait beaucoup plus tôt. L'apparition prématurée des spores lors de la croissance sur paille de blé peut être liée à l'épuisement des sucres disponibles libérés dans le milieu. En effet, contrairement à la cellulose Avicel pure, la paille de blé contient seulement 24 % d'hémicellulose et 36 % de cellulose. La lignine qui représente 20 % en poids sec de la paille n'est pas dégradée par T. harzianum et gêne l'accessibilité de la cellulose aux enzymes cellulolytiques. De nombreux auteurs ont noté ce phénomène (MANDELS et Coll., 1974, TANACA et Coll., 1979, BERTRAND et BULEON, 1980) et proposent différents prétraitements physiques ou chimiques de la paille ou autres résidus lignocellulosiques pour démasquer la cellulose et la rendre ainsi plus accessible aux cellulases.

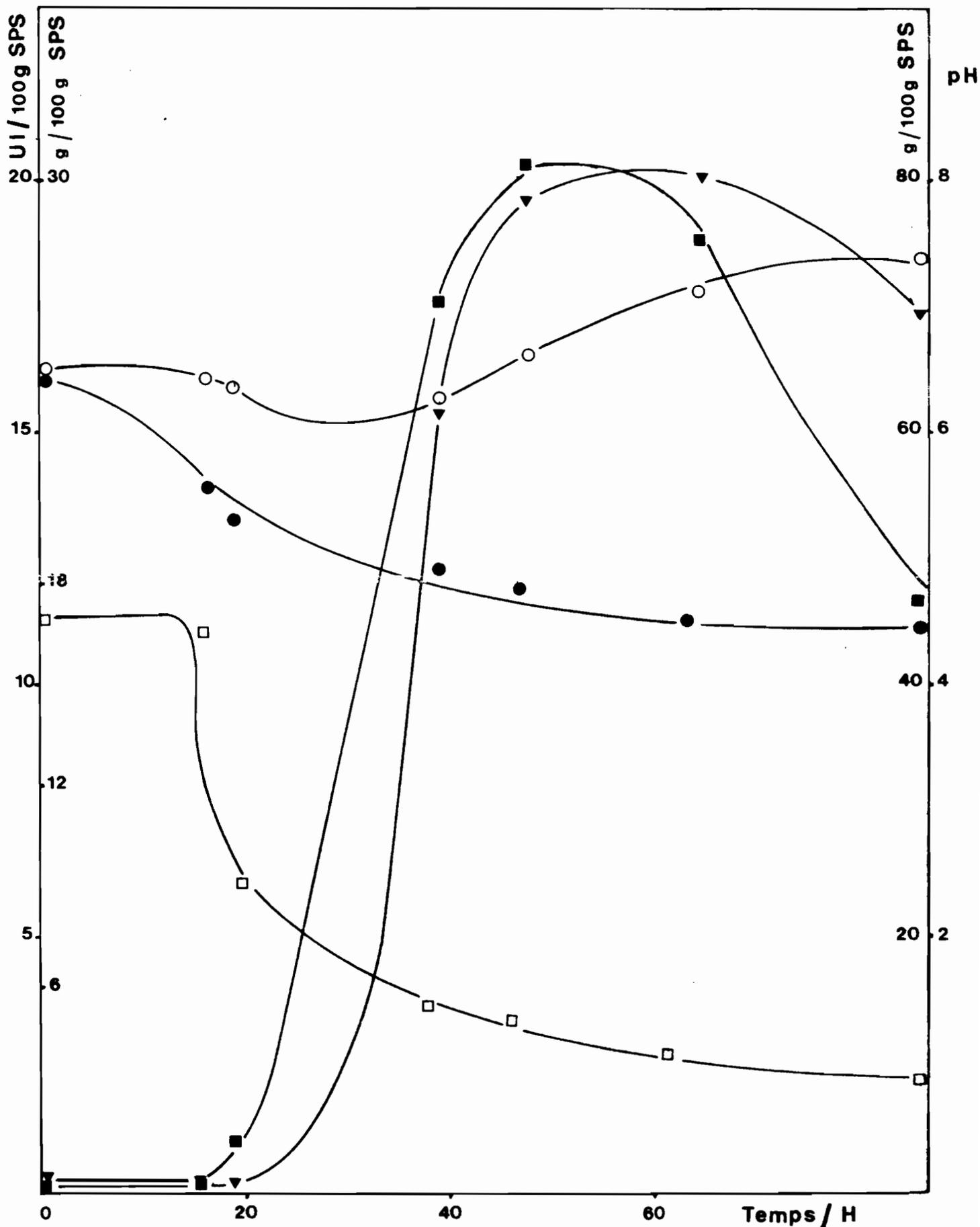


Figure 4 : Culture de *T. harzianum* sur paille + son de blé en fermentation liquide :

■-■ Activité CMC x 1000 UI ; ▼-▼ Activité PF x 100 UI ; ●-● Protéines ; □-□ sucres totaux ; ○-○ pH.

Les activités cellulasiqes apparaissent dans le milieu après 25 heures de culture. Elles atteignent leur valeur maximale au bout de 50 h de culture. Ces valeurs sont 20.369 UI (A CMC)/100 g SPS et 2.010 UI (APF)/100 g SPS. Le rapport A CMC/APF est voisin de 10. Si on compare ces résultats à ceux obtenus à partir d'une culture sur cellulose Avicel on constate qu'ils sont très proches.

Les sucres totaux initialement présents dans le milieu représentent 40 g/100 g SPS ; à la fin de la fermentation ils ne représentent que 4 g/100 g SPS au départ. Le champignon a donc utilisé 90 % des sucres totaux au cours de sa croissance.

#### Hydrolyse de la paille de blé en fermentation solide

Pour la croissance de champignons filamenteux sur les substrats lignocellulosiques en fermentation en milieu solide, nous avons utilisé la technique de culture en colonne décrite par RAIMBAULT et ALAZARD (1980). Notre objectif est le passage de cette technique des substrats amylicés aux substrats lignocellulosiques.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné le microorganisme le mieux adapté pour l'hydrolyse de ce type de substrat et nous avons étudié l'influence de différents prétraitements (physiques ou chimiques) de ces substrats en vue de leur utilisation en fermentation solide.

En utilisant donc une souche de Trichoderma au lieu d'une souche d'Aspergillus et de la paille de blé à la place du manioc et sans apporter de modification à la technique, nous n'avons pas pu obtenir une croissance abondante du mycélium et une prise en masse de la colonne. Tout d'abord, le produit est trop sec à 50 % d'humidité et par conséquent la phase de germination de spores est très longue. La température d'incubation de 35°C est trop élevée pour cette souche. La paille seule est utilisée très lentement par T. harzianum.

Toutes ces observations nous ont amenés à modifier les conditions de cultures et les adapter pour les substrats lignocellulosiques sans pour autant les optimiser. Les conditions sont les suivantes :

- souche : Trichoderma harzianum n° 15
- Substrat : paille de blé, son de blé, cossette de betterave. Le substrat a subi un prétraitement précédemment décrit.

- Concentration de l'inoculum :  $3 \times 10^7$  spores/g SPS
- Humidité initiale : 60 ou 70 %
- Aération : 7 l/h
- Température d'incubation : 29°C.

Sur la figure 5 nous avons porté les premiers résultats obtenus en fermentation solide en utilisant un mélange de paille et de son de blé (80 g/20 g) à 60 % d'humidité.

On constate tout d'abord que le processus de la dégradation du substrat démarre avec beaucoup de retard. Le pH commence à diminuer après 40 h de culture. L'apparition des activités enzymatiques dans le milieu suit cette évolution lente du pH.

Une observation microscopique nous révèle que les spores commencent à germer après 26 h. de culture. Lorsque l'humidité initiale est de 70 %, la germination des spores est terminée après 17 h de culture. On peut en déduire que l'humidité initiale du milieu influence la germination des spores et par conséquent le développement rapide du mycélium. Le mycélium envahit les brins de paille après 42 h de culture. Nous n'avons pas observé de formations de conidiophores même après 86 h de culture ; alors que pour une culture où l'humidité initiale du substrat est ramenée à 70 %, ces formes de reproduction asexuée apparaissent après 45 h de culture.

Le type de prétraitement qu'a subi le substrat ramené à 50 % d'humidité initiale (autoclavage à 110°C pendant 45 min) permet d'éliminer un grand nombre de microorganismes présents initialement sur la paille. L'inoculation en masse du substrat avec  $3 \times 10^7$  spores/g SPS favorise le développement préférentiel de la souche même si les différentes opérations ne se font pas stérilement. C'est ainsi que lors des observations microscopiques on ne décèle pas la présence de contaminants d'origine bactérienne .

La production de cellulases commence après 40 h de culture. Les valeurs des activités CMC sont faibles. Après 70 h de culture, il y a dans le milieu 10.983 UI d'activité CMC et 2.457 UI d'activité PF. Le rapport ACMC/APF est de 4,4. On constate également que la quantité de protéines présentes dans le milieu augmente en cours de la fermentation.

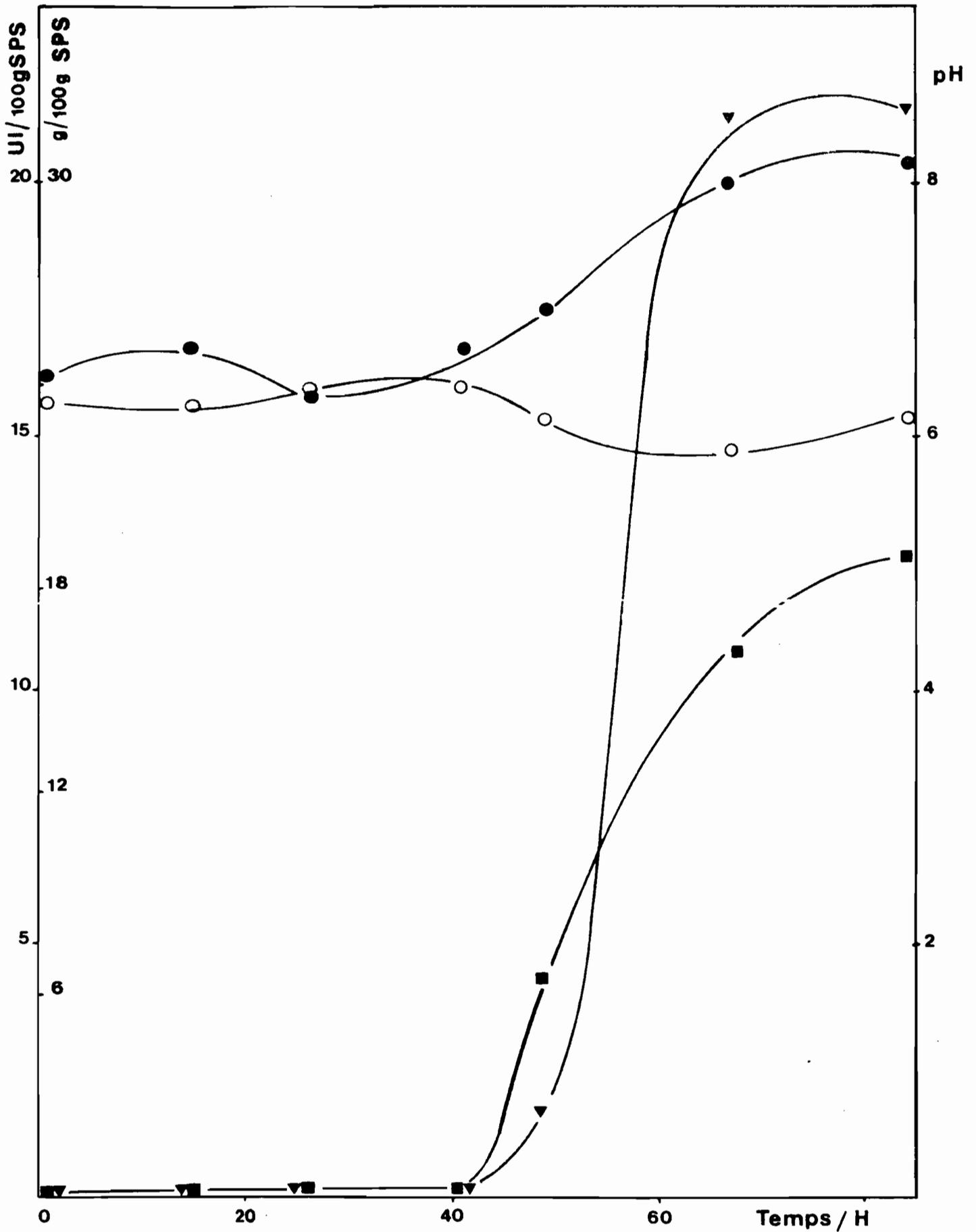


Figure 5 : Culture de *T. harzianum* sur paille + son de blé en fermentation solide à 60 % d'humidité : ■—■ Activité CMC x 1000 UI ; ▼—▼ Activité PF x 100 UI ; ●—● Protéines ; ○—○ pH.

Pour vérifier que l'humidité initiale du substrat est un facteur d'inhibition de germination nous avons fait la même expérience en portant l'humidité initiale à 70 %. Les résultats sont représentés sur la figure 6.

L'allure de la courbe de pH est semblable à celle obtenue au cours de la fermentation de la paille en milieu liquide : elle augmente légèrement puis elle diminue lors de la croissance rapide du mycélium et elle remonte vers la fin de croissance. Cependant on constate que la croissance rapide du mycélium débute après 40 h de culture. Ce retard de croissance est dû au fait que les fermenteurs n'ont pas été aérés pendant les 12 premières heures.

D'ailleurs une observation microscopique des échantillons prélevés après 12 h révèle des spores gonflées. Parmi celles-ci, très peu ont germé. Après 40 h de culture c'est à dire après 28 h de culture aérée, 100 % des spores ont germé. Le mycélium envahit le substrat. Les premiers conidiophores apparaissent après 65 h de culture.

Le maximum d'activité cellulase est atteint après 50 h de culture. Les valeurs respectives d'activité CMC et de l'activité PF sont 17.277 UI ACMC et 1.772 UI APF. Le rapport ACMC/APF est égal à 10.

#### Production de cellulases de *T. harzianum* cultivé sur paille de blé en Pétrin

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

L'appareil utilisé est un mélangeur de type pétrin de boulangerie. Ce matériel a été modifié par la mise en place d'un double fond permettant l'introduction d'air par l'intermédiaire des trous percés dans le fond de la cuve.

Les conditions de culture de *T. harzianum* sont les suivantes :

Substrat : paille de blé 500 g ; son de blé 100 g

Prétraitement : 600 g de substrat + 600 ml de la solution minérale sont portés à 110°C pendant 45 min.

Humidité de départ : 70 %

Aération : 25 l/h avec de l'air saturé en eau

Agitation : Toutes les heures on fait tourner le bras d'agitation pendant 2 min.

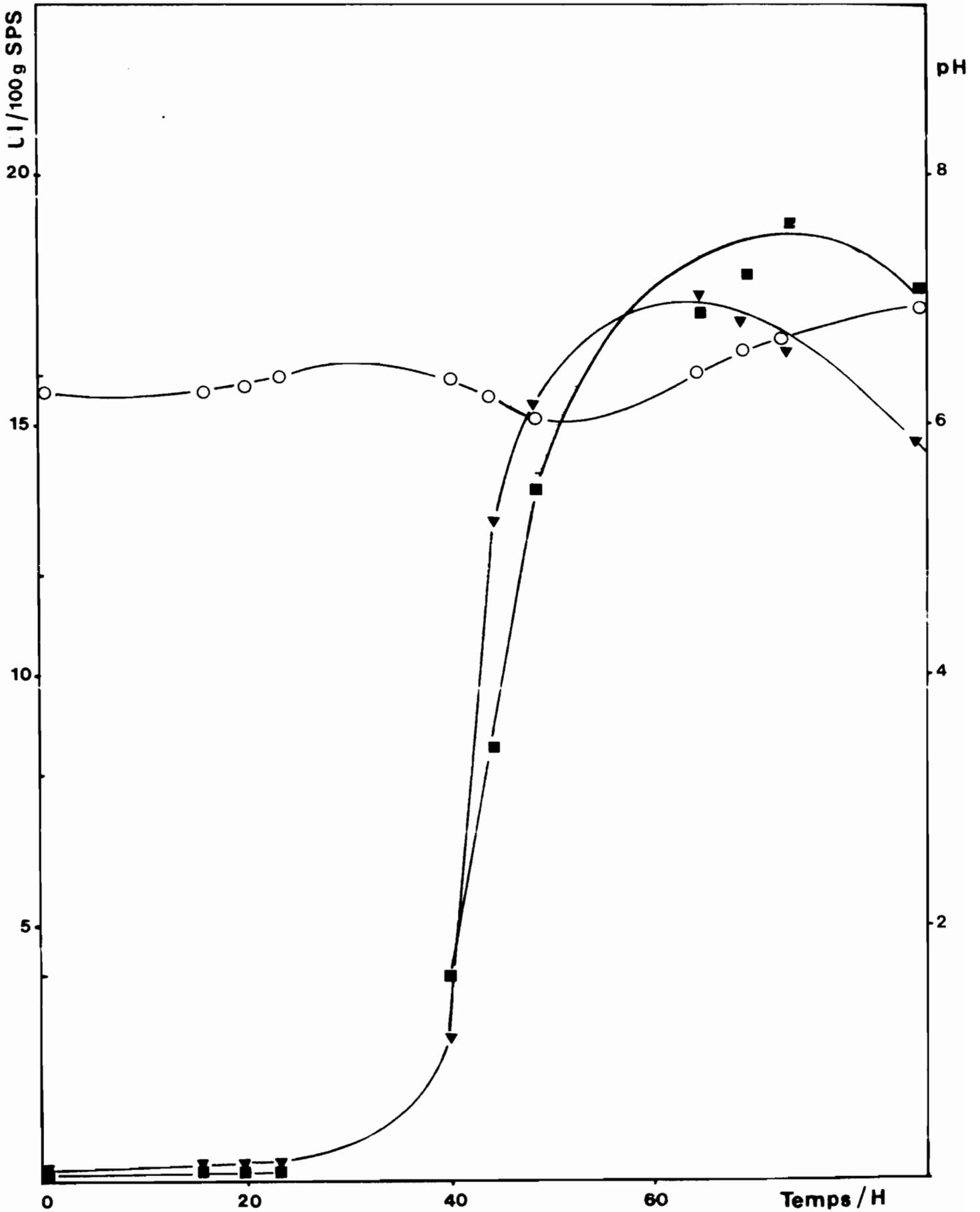


Figure 6 : Culture de *T. harzianum* sur paille + son de blé en fermentation solide à 70 % d'humidité : ■—■ Activité CMC x 1000 UI ; ▼—▼ Activité PF x 100 UI ; ○—○ pH.

Température :  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$  : température du laboratoire

Inoculation : avec  $2 \times 10^{10}$  spores de T. harzianum provenant d'une culture de cette souche dans un fermenteur ORSTOM.

Les résultats sont portés sur la figure 7. Le pH commence à baisser après 50 h de culture. La valeur la plus faible du pH est atteinte après 60 h de culture. L'effet tampon exercé par la paille rend inutile le système de régulation. L'observation microscopique nous révèle que 90 % des spores ont germé après 20 heures de culture, mais ce n'est qu'à partir du 2<sup>ème</sup> jour que le mycélium commence à envahir le substrat. Cependant nous n'avons pas observé une élévation importante de la température au cours de la fermentation. Les calories produites sont rapidement dégagées à l'extérieur lorsqu'on fait agir le bras d'agitation. Par contre l'humidité du produit diminue en fonction du temps. Au départ elle est de 71,7 % et passe à 67,3 % après 90 h.

Le dosage des protéines manuel ou au technicon nous donne le même résultat. Au départ, après inoculation, le produit contient 10,48 g de protéines pour 100 g SPS. En fin de fermentation, il en contient 20,68 g pour 100 g SPS au départ. Il y a eu donc un enrichissement en protéines de 10 %.

Les sucres totaux initialement présents dans le milieu représentent 89,61 g/100 g SPS ; ils passent à 63,41 g/100 g SPS au départ après 70 h de culture. On observe donc une diminution de 26 %.

La libération de cellulases dans le milieu débute après 20 h. Elles sont synthétisées plus lentement en pétrin qu'en colonne. Leur taux de production maximum est atteint après 70 h de culture. Les valeurs obtenues sont les suivantes : 25.630 UI ACMC et 2.490 UI APF/100 g SPS au départ. Le rapport ACMC/APF est voisin de 10.

Ces résultats obtenus à partir d'une culture de T. harzianum sur un substrat ligno-cellulosique en fermenteur type pétrin sont meilleurs qu'en fermentation liquide et presque identiques à ceux obtenus à partir d'une culture en colonne avec 30 fois moins de substrat. Ces résultats nous autorisent donc à envisager prochainement une expérimentation en pétrin pour optimiser les conditions de culture et augmenter encore plus les rendements de production de cellulases.

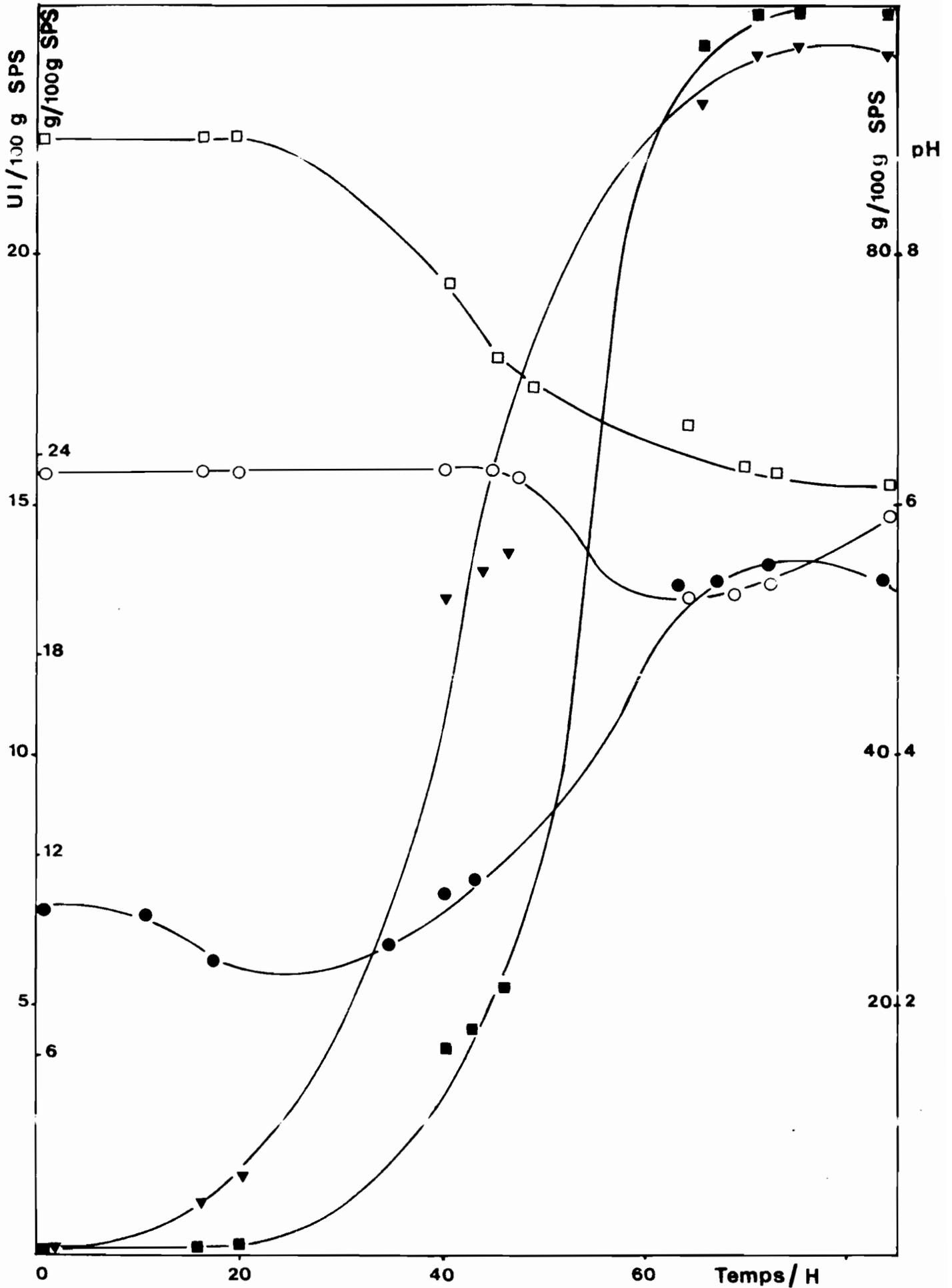


Figure 7 : Culture de *T. harzianum* sur paille + son de blé en pétrin : ■-■ Acti-uité CMC x 1000 UI ; ▼-▼ Acti-uité PF x 100 UI ; ●-● Protéines ; □-□ sucres totaux ; ○-○ pH.

Culture de *T. harzianum* sur son de blé en fermentation solide

Au lieu d'utiliser un mélange de paille et de son de blé, nous avons voulu suivre la croissance de *T. harzianum* sur du son de blé uniquement. Des problèmes de texture et de densité de ce substrat nous ont amené à utiliser une humidité de départ inférieure à 60 %.

L'utilisation du son de blé, n'ayant pas subi de prétraitement, comme substrat pour la croissance de *T. harzianum* en fermentation solide est représentée sur la figure 8. On constate que le pH reste stable pendant les 50 premières heures. D'autre part, il n'y a pas de synthèse de cellulases. L'observation microscopique nous révèle que les spores germent avec beaucoup de retard pour donner un mycélium fin et long qui se lyse quelques heures après. Une microflore bactérienne assez riche et variée s'y développe. Les protéines présentes dans le milieu après 40 h de culture sont plutôt d'origine bactérienne que fongique.

A la suite de ces observations, nous avons envisagé un prétraitement du son de blé à la chaleur (110°C pendant 45 min) pour les raisons suivantes :

- Stérilisation partielle ou totale du substrat
- Hydratation du son de blé sous pression à haute température ; ce qui permet de chasser l'air des différents canaux capillaires et le remplacer par de l'eau.
- Diminution des régions microcristallines de la cellulose et augmentation des zones amorphes.

Sur la figure 9 nous avons porté les résultats obtenus en fermentation solide en utilisant comme substrat le son de blé ayant subi un prétraitement à la chaleur.

Le pH diminue rapidement et passe de 6,1 à 4,1 après 40 h de culture. L'observation microscopique nous révèle une germination synchrone et rapide des spores. Après 24 heures de culture, le mycélium commence à envahir le substrat. Le développement rapide du mycélium qui présente de très nombreux branchements aboutit après 40 h de culture à une prise en masse du substrat fermenté.

Les activités cellulasiques sont libérées dans le milieu après 24 h. Les valeurs de ces activités après 40 h de culture sont les suivantes : 6.100 UI ACMC et 2.067 UI APF et le rapport ACMC/APF est de 3. On constate donc que la quantité et la nature de ces activités sont différentes de celles obtenues à partir d'un mélange de paille et de

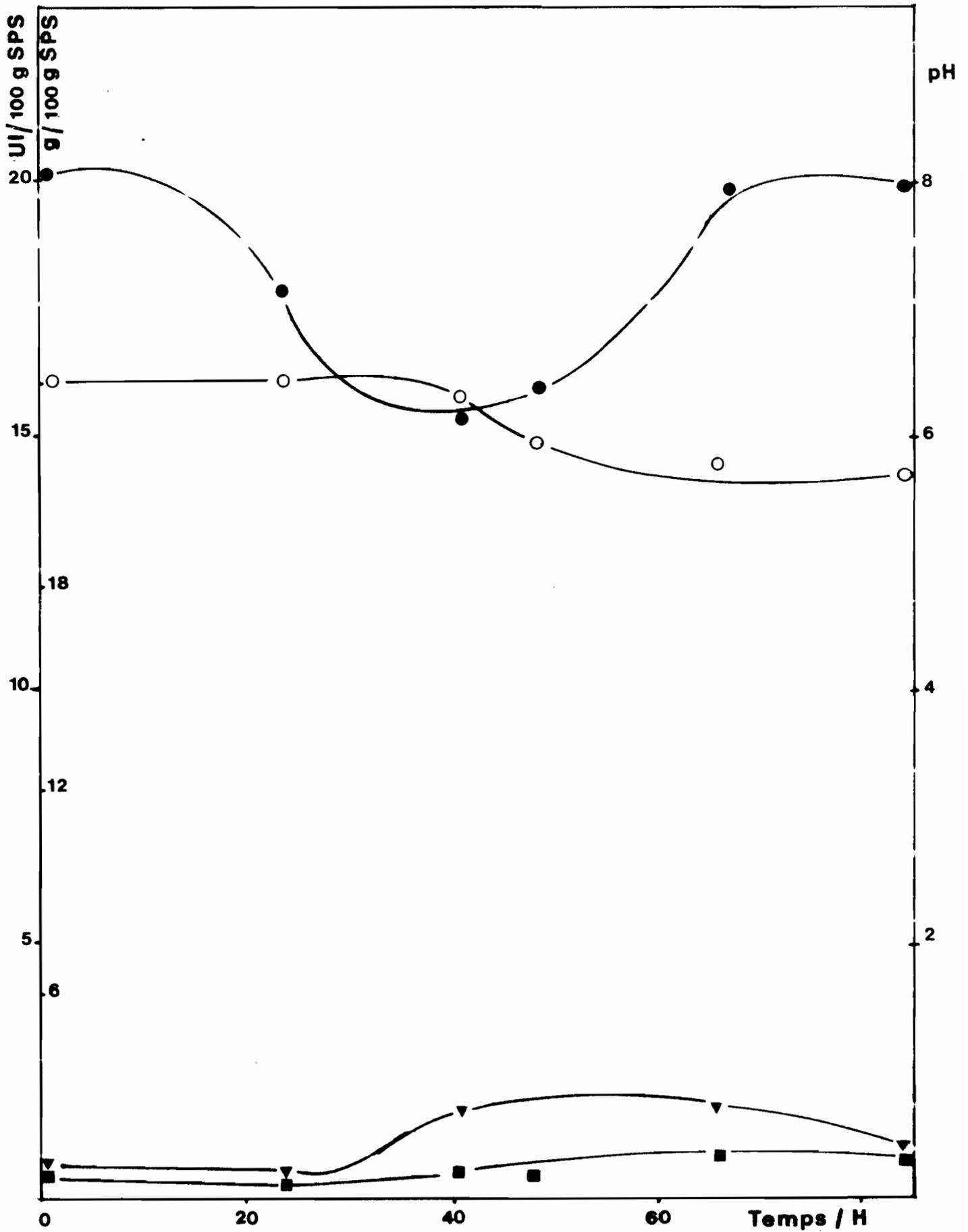


Figure 8 : Culture en milieu solide de *T. harzianum* sur son de blé non traité à 60 % d'humidité : ■—■ Activité CMC x 1000 UI ; ▼—▼ Activité PF x 100 UI ; ●—● Protéines ; ○—○ pH.

son de blé.

Le taux initial en protéines du substrat est de 21,91 g/100 g SPS et passe à 32,49 g/100 g SPS au départ. Ce résultat nous paraît très intéressant.

D'autre part, il est préférable d'utiliser le procédé pour un enrichissement éventuel du son de blé en protéines que pour la production de cellulases.

Production de cellulases de T. harzianum cultivé sur cossette de betterave

---

La France, avec ses sucreries de betterave en métropole et ses sucreries de canne des départements d'Outre-mer, figure parmi les grandes puissances sucrières. La culture de la betterave est concentrée surtout dans les départements du Nord et tient la première place des cultures des plantes industrielles. Elle couvre en métropole près de 600.000 ha.

Le principal produit, le sucre, est utilisé essentiellement en alimentation et les sous produits sont utilisés en agriculture pour l'alimentation du bétail, en Industrie les mélasses sont utilisées pour la fabrication de levures et de métabolites.

Les cossettes de betterave, les feuilles et les collets qui représentent 0,9 millions de tonnes M.S. annuellement renouvelables sont actuellement enfouis à 96 %. Nous pensons cependant qu'il existe de nouveaux débouchés pour les déchets cellulosiques en les utilisant comme substrat pour la croissance des champignons filamenteux cellulolytiques.

Dans cette optique et dans un premier temps nous avons essayé de produire des enzymes cellulolytiques à partir d'une culture d'un champignon filamenteux T. harzianum.

Ce microorganisme en effet utilise comme source de carbone et d'énergie la cellulose et les produits cellulosiques pour sa croissance. Pour cela, il synthétise des enzymes cellulolytiques extracellulaires et grâce à ces enzymes transforme la cellulose des cossettes de betterave en glucose. Le glucose peut être utilisé par le microorganisme pour sa propre croissance et également transformé en d'autres métabolites.

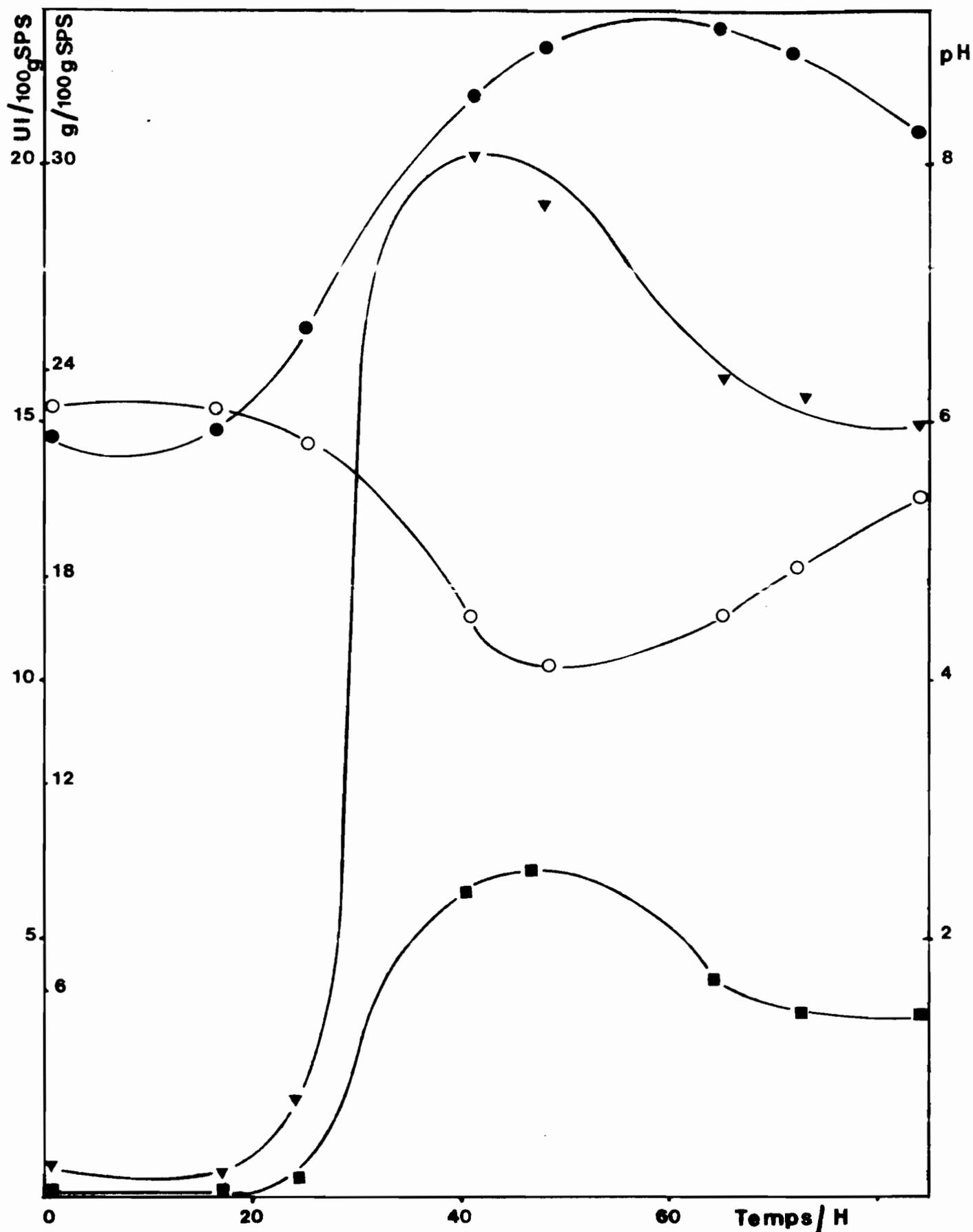


Figure 9 : Culture de *T. harzianum* sur son de blé traité en milieu solide à 60 % d'humidité : ■—■ Activité CMC x 1000 UI ; ▼—▼ Activité PF x 100 UI ; ●—● Protéines ; ○—○ pH.

Pour la croissance de T. harzianum la cossette de betterave a subi un prétraitement préalable (Broyage mécanique, thermique à 120°C) pour rendre la cellulose plus accessible et diminuer également sa cristallinité. Par ces prétraitements on favorise donc le développement des microorganismes et par conséquent on augmente la production de cellulases.

Une étude comparée en fermentation en milieu liquide et solide a été faite pour suivre la cinétique :

- d'hydrolyse de la cossette
- de la biosynthèse des protéines
- de la biosynthèse d'enzymes cellulolytiques.

Sur les fig. 10 et 11 nous avons porté les résultats concernant l'évolution du pH, des protéines, des sucres totaux et des activités cellulases au cours de la croissance de T. harzianum cultivé en fermentation en milieu liquide et solide respectivement.

L'inoculation des cossettes de betterave se fait avec des spores de T. harzianum. Pendant le temps de latence qui dure environ 20 h il y a le processus de croissance du champignon filamenteux qui se met en route. Tout d'abord les spores doublent de volume pour donner un tube germinatif lequel donne naissance au mycélium. Les cellules mycéliennes en présence des inducteurs synthétisent des cellulases lesquelles sont relarguées dans le milieu. Le pH suit l'évolution de toutes ces étapes. Nous constatons cependant que les variations du pH ne sont pas très importantes et que la cossette de betterave provoque un effet tampon.

L'évolution de la production de protéines en milieu liquide et en milieu solide est différente. En effet on constate que contrairement aux cultures en milieu solide, la synthèse des protéines en milieu liquide a lieu uniquement pendant la première phase de croissance du mycélium et après 40 h de culture le taux de protéines diminue. En milieu solide le taux de protéines augmente régulièrement et après 60 h de culture un pallier est atteint. Dans les deux cas on remarque cependant une augmentation du taux de protéines qui est de l'ordre de 6 et 10 % (g/100 g SPS initial) de protéines synthétisées au cours de la croissance active du mycélium en milieu liquide et en milieu solide respectivement.

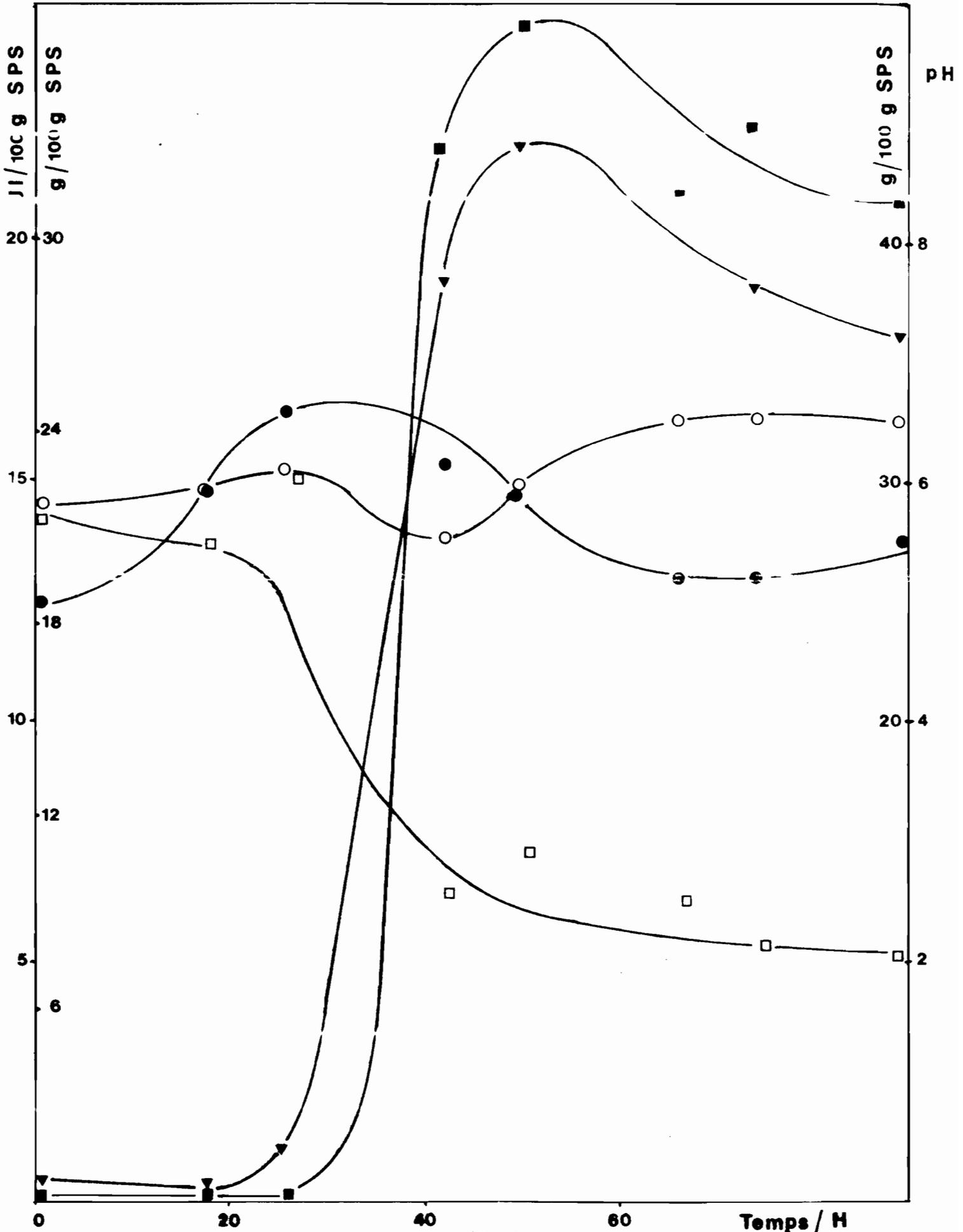


Figure 10 : Production de cellulases de *T. harzianum* cultivé sur cossette de betterave en milieu liquide : ■-■ Activité CMC ; ▼-▼ Activité

L'étude comparative de la cinétique d'apparition et de production de cellulases en milieu liquide et en milieu solide ne fait pas apparaître de différences importantes concernant la quantité d'enzymes synthétisées. Nous avons considéré principalement deux types d'activités : l'Activité Papier Filtre et l'Activité carboxyméthyl cellulose. Les résultats sont exprimés en UI/100 g SPS (1 UI = la quantité d'enzymes nécessaire pour libérer à partir d'un substrat soluble ou insoluble, Papier Filtre ou carboxyméthyl cellulose, une micromole de glucose par minute).

Globalement, il n'y a pas de différences significatives entre les deux types de culture. Les cellulases apparaissent dans le milieu après 24 h de culture. Les valeurs maxima sont atteintes après 50 h de croissance. La nature des cellulases est la même si l'on considère que le rapport Activité Carboxyméthyl cellulose/Activité Papier Filtre est voisin de 10 pour les deux cas. Cependant les cellulases obtenues à partir d'une culture en milieu solide paraissent être moins sensibles à l'action des protéases étant donné que le palier reste stable contrairement aux cellulases obtenues en milieu liquide.

Le bilan global est le suivant : Pour 100 g de Substrat Poids Sec (SPS) initial nous avons obtenu 2.000 UI Activité Papier Filtre et 22.000 UI Activité Carboxyméthyl cellulose pour une culture en fermentation solide et 2.200 UI APF et 24.000 UI ACMC pour une culture en milieu liquide.

Cette étude préliminaire nous a permis de mettre en évidence un nouveau processus de revalorisation de sous-produits agricoles en utilisant des champignons filamenteux cellulolytiques pour produire des cellulases en fermentation solide.

La cinétique comparée de biosynthèse de cellulases en milieu solide et en milieu liquide ne montre pas des différences importantes. Par contre, les protéines produites par T. harzianum en fermentation solide sont plus stables du fait que les champignons cellulolytiques se développent mieux en milieu solide qu'en milieu liquide. Dans les deux cas la cossette de betterave paraît être un excellent substrat pour la croissance de T. harzianum et grâce au pouvoir tampon de la cossette il n'est pas nécessaire de réguler le pH pendant toute la durée de ce processus de bioconversion.

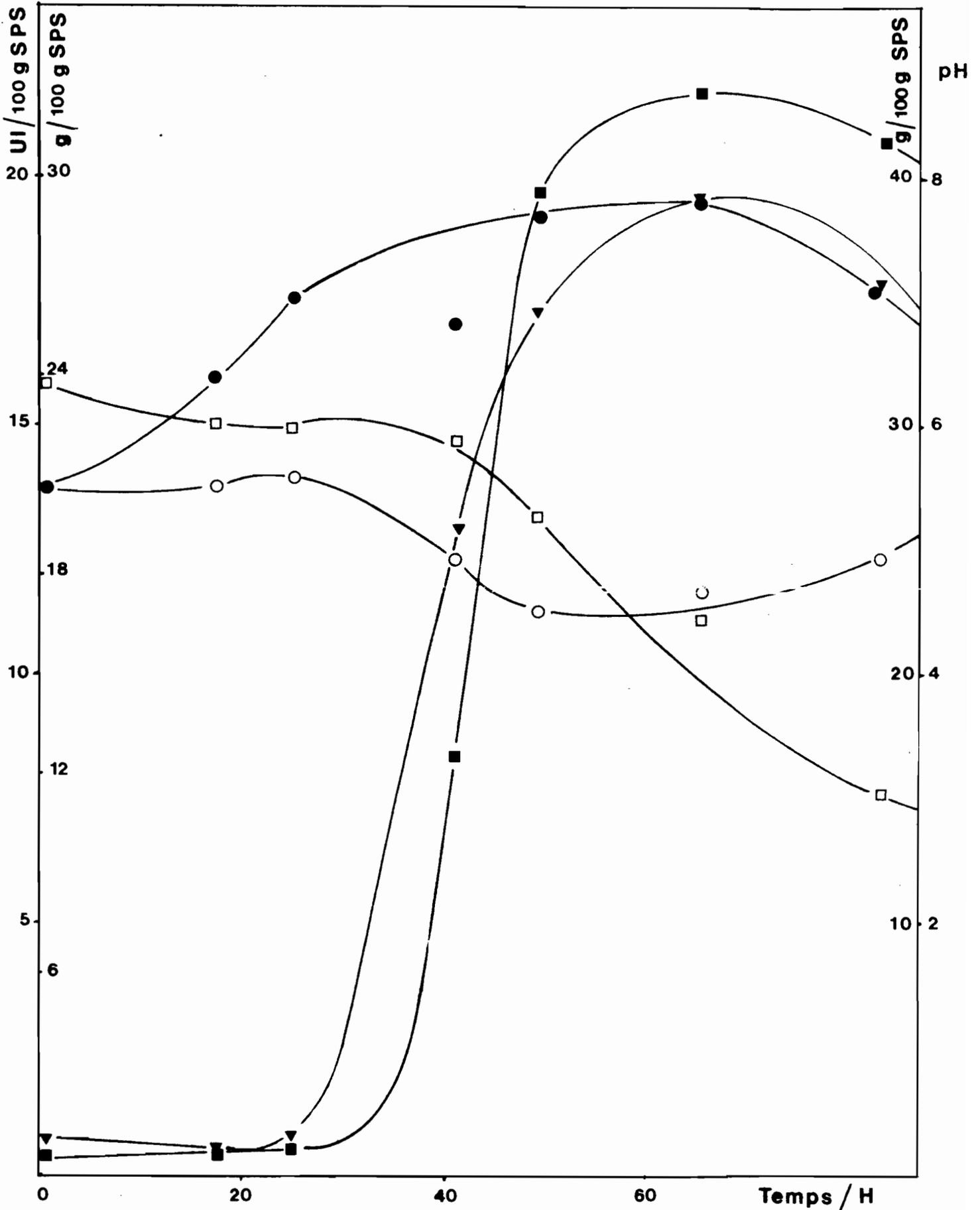


Figure 11 : Production de cellulases de *T. harzianum* cultivé sur cossette de betterave en milieu solide : ■—■ Activité CMC ; ▼—▼ Activité PF ; ●—● Protéines ; □—□ Sucres totaux ; ○—○ pH.

### Physiologie et Métabolisme des champignons filamenteux

L'identification des moisissures est basée essentiellement sur des critères morphologiques (RIFAI ; 1969, ZAMBETTAKIS et JOLY, 1973). Le développement des utilisations des champignons filamenteux dans le domaine de bioconversions de substrats agro-alimentaires nécessite de plus en plus une meilleure connaissance de ces microorganismes : aussi bien connaître leurs potentialités métaboliques mais également pouvoir décrire leurs caractères physiologiques et nutritionnels.

Une connaissance plus approfondie dans ce domaine permettrait d'abord une utilisation mieux adaptée des souches en fonction des objectifs fixés et ensuite un contrôle pour vérifier la stabilité des organismes au cours de leur utilisation.

Dans un premier temps nous avons souhaité mettre au point une stratégie à suivre pour standardiser la méthode d'analyse globale qui porte essentiellement sur quatre types de caractères :

Les caractères morphologiques : Il s'agit de décrire la colonie, le mycélium, la spore, la production de pigments et de mesurer la croissance apicale d'une moisissure cultivée sur un milieu pléthorique standard.

Les caractères physiologiques : Déterminer des conditions optimum de croissance (pH, température, prototrophie, auxotrophie, hétérotrophie, aérobie, anaérobie, taux de croissance).

Les caractères nutritionnels : Déterminer la source d'azote, de carbone, les exigences en facteurs de croissance, les exigences et les tolérances des différents éléments minéraux essentiels (Phosphore, Soufre, Calcium etc...).

Les caractères biochimiques : Mesurer la production d'exoenzymes (amylases,  $\beta$ -glucosidases, cellulases, protéases, pectinases...) et étudier la nature constitutive ou adaptative de ces enzymes. Etudier la production de métabolites (acides organiques, vitamines, antibiotiques, mycotoxines...) par les champignons filamenteux au cours de leur croissance.

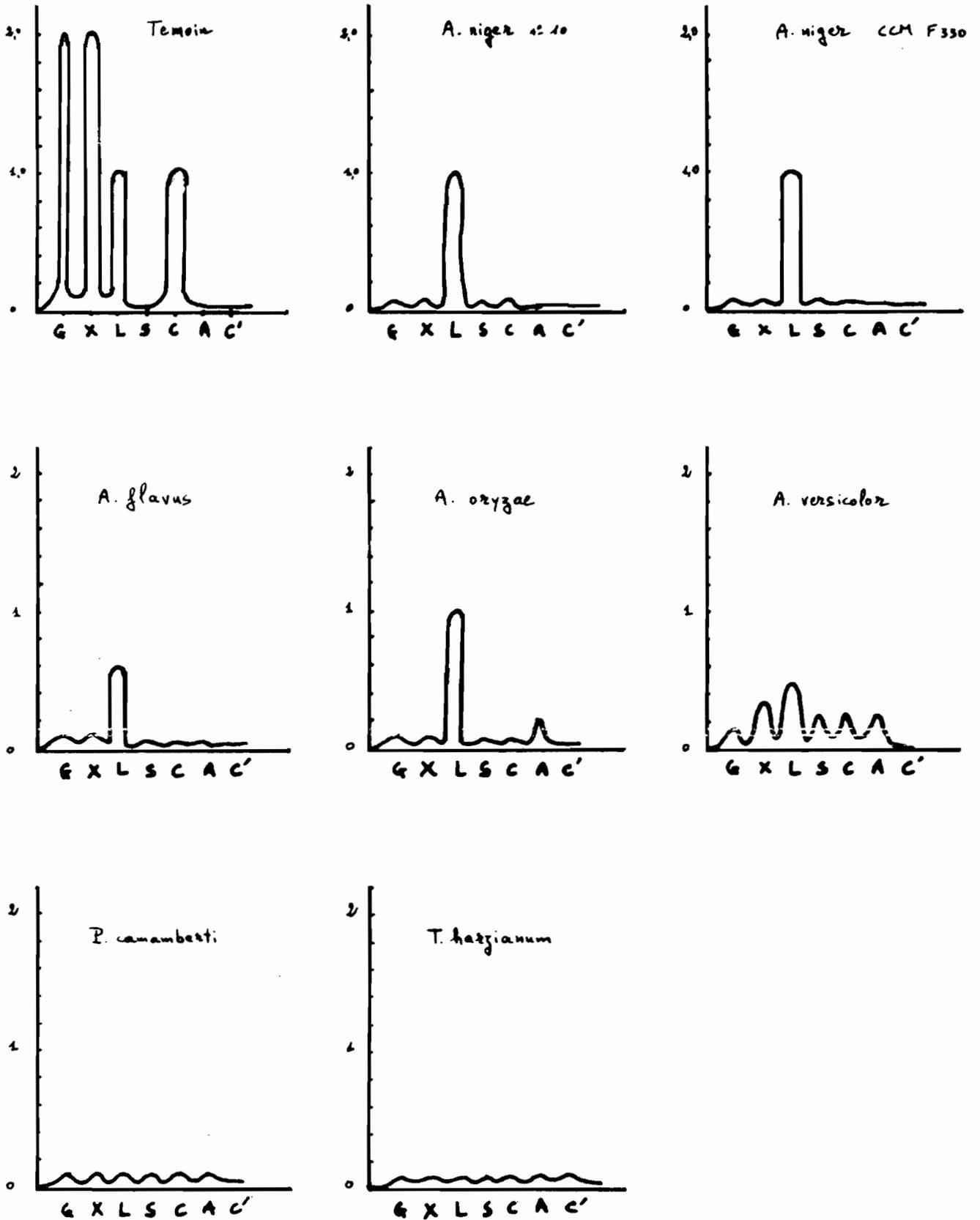


Figure 12 : Sucres réducteurs résiduels (mg/ml).

Cette note porte essentiellement sur la mise au point de la méthode. Dans un premier temps nous avons étudié l'utilisation de 7 sucres, simples ou composés, par les champignons filamenteux. Nous avons déterminé la quantité de deux sortes d'enzymes, amylases et cellulases, produites au cours de la croissance de ces moisissures.

Une méthode d'analyse automatique a été utilisée pour le dosage des sucres réducteurs présents dans le milieu avant (témoin blanc) et après la culture de différentes souches. Cette méthode ne permet pas de doser le Saccharose, l'Amidon et la Cellulose. Pour avoir la concentration exacte de lactose et du cellobiose il faut multiplier le résultat obtenu par le dosage par un coefficient de 2. Le contrôle de la croissance des microorganismes à partir d'un substrat donné a été vérifié également par un dosage quantitatif de protéines contenues dans le culot.

1 - Assimilation des sucres. L'utilisation des sucres comme unique source de carbone et d'énergie par les Aspergillus, le Penicillium et le Trichoderma sur milieu entièrement synthétique est démontrée à la fig. 12. Trois sucres sont entièrement utilisés par l'ensemble de souches testées : le glucose, le xylose et le cellobiose. Le lactose est assimilé entièrement par le T. harzianum et le P. camemberti alors que les A. niger ainsi que A. oryzae n'utilisent pas ce sucre. Parmi les souches d'Aspergillus que nous avons testé la souche d'A. versicolor assimile la moitié du lactose présent dans le milieu et A. flavus utilise encore moins ce sucre.

2 - Production de protéines. Sur la fig. 13 nous avons représenté la quantité de protéines présentes dans le culot après 7 jours de culture pour les souches d'Aspergillus, de Penicillium et de Trichoderma cultivées sur différents milieux. La croissance du mycélium et la biosynthèse de protéines dépendent de la nature de la source de carbone. En général pour une souche donnée la production de protéines varie selon la source de carbone exception faite pour P. camemberti où la concentration en protéines est presque la même pour les six sucres utilisés. A l'inverse pour un sucre donné, par exemple le glucose qui est utilisé par l'ensemble des souches, la quantité de protéines synthétisées varie suivant l'espèce lorsque les cultures sont faites dans les mêmes conditions.

3 - Influence de la source de carbone sur l'activité amylasique. Les activités amylasiques présentes dans le surnageant après 7 jours de culture sont représentées sur la fig. 14. Parmi les microorganismes testés, seules les souches d'Aspergillus produisent une activité amylasique importante, alors que toutes les souches dégradent l'amidon.

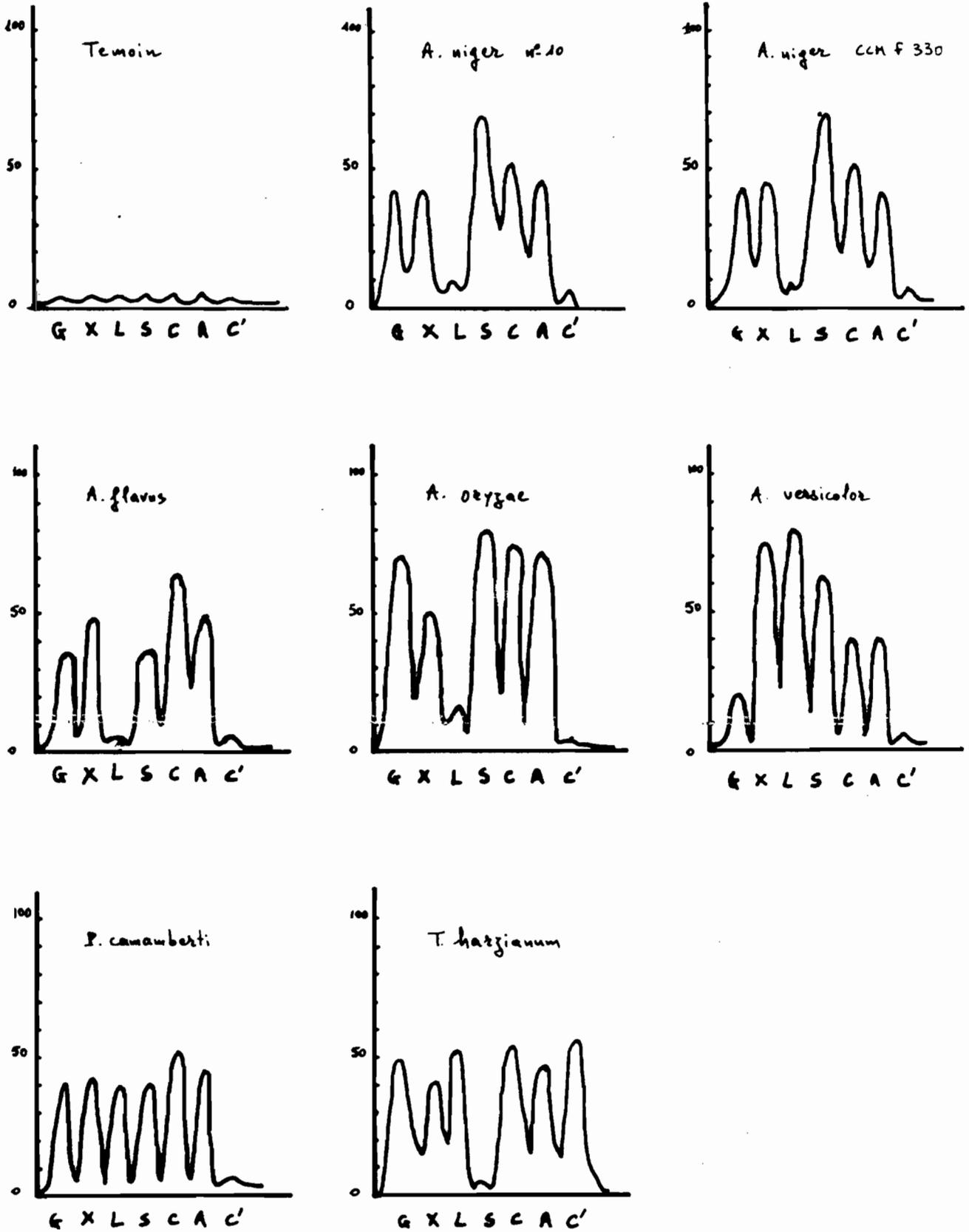


Figure 13 : Protéines dans le culot (mg/l).

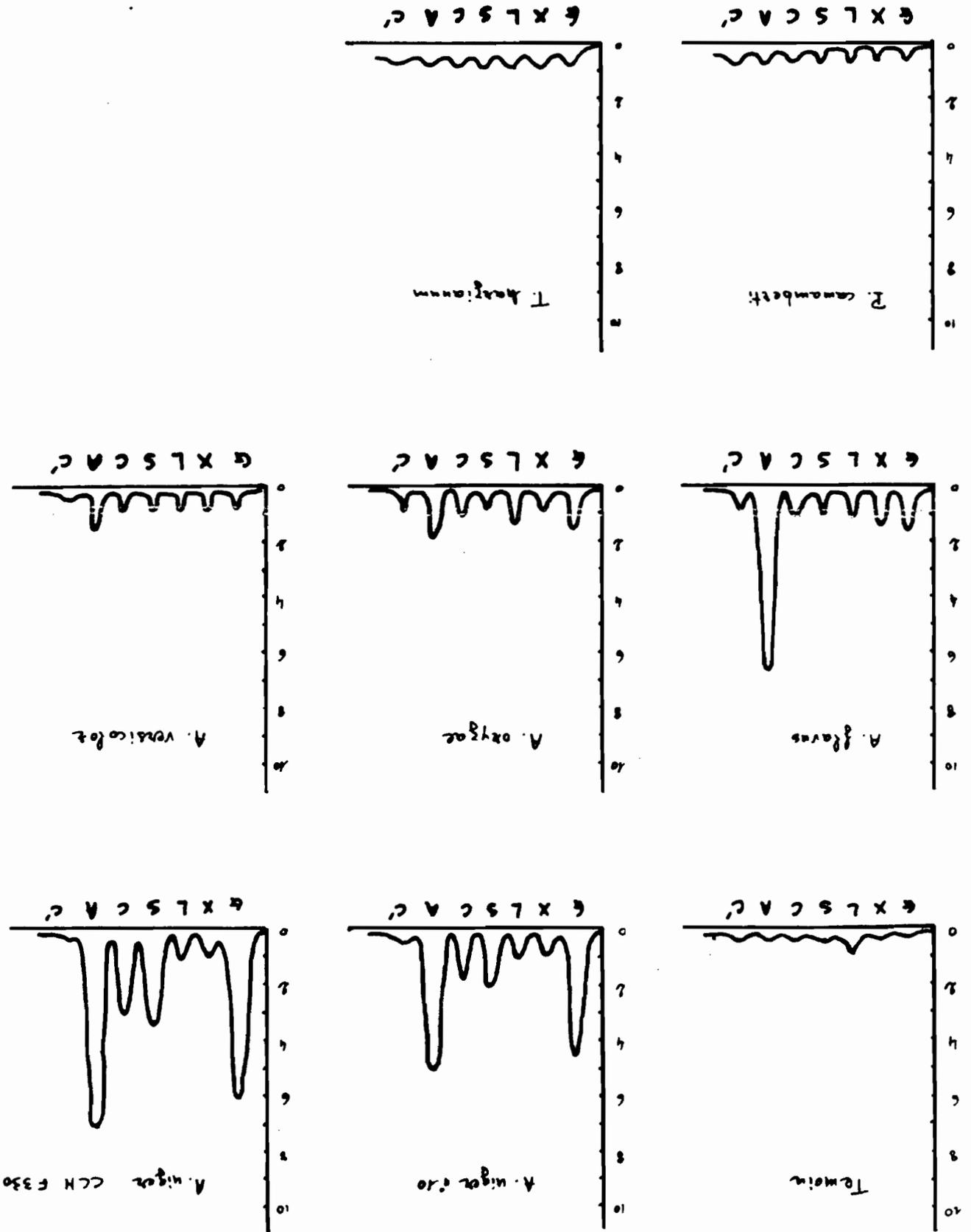
L'activité amylasique produite au cours de la croissance, pour une souche donnée, dépend de la nature du substrat carboné. L'amidon dans ce cas paraît le meilleur inducteur de production d'amylases pour les souches d'*Aspergillus*. Les souches les plus performantes sont *A. niger* n° 10 et n° 22 ainsi qu'*A. flavus* n° 21. Les souches d'*A. oryzae* et d'*A. versicolor* produisent des activités amylasiques beaucoup plus faibles.

Le spectre d'activité de deux souches d'*A. niger* n° 10 et n° 22 cultivées sur différents sucres est de même nature, il diffère uniquement par son intensité. La souche de collection CCM-F-330 produit plus d'amylases que la souche sauvage n° 10. Pour ces deux souches, le Glucose, le Saccharose et le Cellobiose ne sont pas à cette concentration (2g/l) des répresseurs mais agissent au contraire comme des inducteurs. Ce phénomène est différent pour la souche d'*A. flavus* qui présente un spectre d'activité très différent de celui des *A. niger*. Pour la souche d'*A. flavus* qui produit autant d'amylases lorsqu'elle est cultivée sur amidon, elle ne produit pas d'amylases lorsqu'elle est cultivée sur les autres sucres. On peut penser que les amylases sont des enzymes adaptatives pour la souche d'*A. flavus* et que le glucose, le xylose, le saccharose et le cellobiose agissent comme des répresseurs à cette concentration (2g/l).

5 - Influence de la source de carbone sur les activités cellulasiqes. Les cellulases produites par les champignons filamenteux sont des enzymes adaptatives (MANDELS et WEBER ; 1969). Parmi les souches que nous avons étudié seulement *T. harzianum* donne une culture abondante sur un milieu simple à la cellulose et n'a pas besoin de facteurs de croissance. Cette souche se développe bien sur les 6 sucres simples ou composés testés sauf sur saccharose. Cependant les activités cellulasiqes sont produites seulement lorsque le microorganisme est cultivé sur cellulose ou sur les sucres possédant une liaison  $\beta$ -(1-4). Les meilleurs inducteurs pour la production de cellulases sont la cellulose, le sophorose, le lactose et le cellobiose pour une souche de *T. viride* étudié par MANDELS et WEBER (1969). Pour la souche de *T. harzianum* n° 15 nous avons constaté que les meilleurs inducteurs sont la cellulose et le lactose. Le cellobiose à cette concentration (2g/l) n'est pas un inducteur mais agit plutôt comme un répresseur (fig. 15).

La germination des spores et le développement du mycélium des champignons filamenteux sont fortement influencés par la nature de la source de carbone lorsque ces microorganismes sont cultivés sur un milieu entièrement synthétique.

Figure 14 : Activités amyliques dans le surnageant (mg de glucose libéré après 15 min/ml).



Pour suivre la dégradation d'un substrat dans des conditions bien définies, on peut soit doser l'épuisement du substrat, soit doser sa transformation en protéines ou autres métabolites. Dans le cas présent nous avons dosé les sucres réducteurs résiduels après une culture de 7 jours. Nous avons pu suivre ainsi l'évolution du glucose, du xylose, du lactose, du cellobiose et mettre en évidence l'épuisement du glucose, xylose et cellobiose pour l'ensemble des souches ainsi que la non utilisation du lactose par les Aspergillus. L'inconvénient de cette méthode réside sur la spécificité du dosage des sucres. Le Saccharose, l'Amidon ainsi que la cellulose qui ne sont pas des sucres réducteurs ne sont pas dosés. Pour pallier à ce manque, nous avons parallèlement dosé les protéines contenues dans le culot de culture et biosynthétisées au cours de la croissance des microorganismes.

La quantité de protéines présentes dans le culot d'une culture est le reflet d'une croissance quantitative d'un microorganisme. Cette analyse devrait donc vérifier et compléter les résultats obtenus par le dosage des sucres réducteurs résiduels. Cependant il faut l'utiliser avec prudence, car il présente quelques inconvénients, ainsi il ne prend pas en considération la lyse que peut subir le mycélium et par conséquent la libération de protéines solubles dans le surnageant. Il est d'autre part déconseillé d'estimer la croissance d'un microorganisme par le dosage des protéines présentes dans le surnageant, parce que la présence de quelques sucres, libérés au cours de la croissance ou non dégradés, peuvent influencer le résultat. Ainsi la présence du lactose dans le surnageant influence le dosage des protéines au folin et fausse complètement les résultats de protéines réellement présentes dans le surnageant. (O' SULLIVAN et MATHISON ; 1970).

Mis à part des problèmes posés au niveau de l'analyse qui peuvent être résolus, cette nouvelle technique d'étude des caractères physiologiques et biochimiques des champignons filamenteux peut être un outil de travail appréciable pour connaître :

- le taux de production de protéines à partir d'un substrat simple ou composé.
- la nature et la quantité des différentes activités enzymatiques (amylases, cellulases...), ceci dans un deuxième temps peut être particulièrement intéressant pour une éventuelle utilisation des champignons filamenteux ainsi décrits dans le domaine des bioconversions et la revalorisation des déchets agricoles.

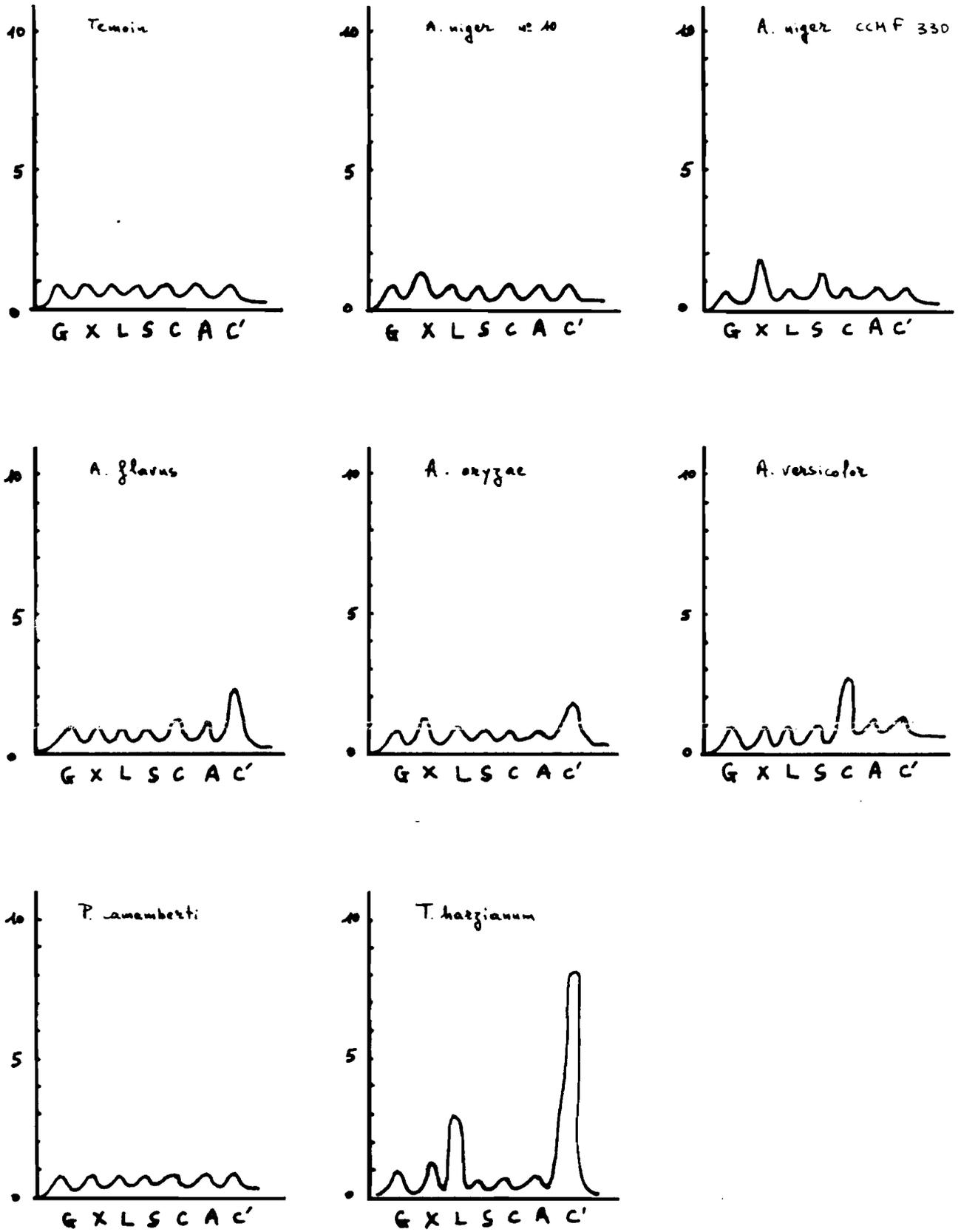


Figure 15 : Activités CMCase (mg de glucose libéré après 30 min/ml).

## CHAPITRE VI : CONCLUSION

La cellulose représente à elle seule plus de 50 % du carbone organique total de la biosphère. C'est le polyoside à la fois le plus simple (polymère linéaire, sans ramifications, formé d'unités d'anhydroglucose liées entre elles par des liaisons  $\beta$ -1,4-glucosidiques) et le plus abondant du règne végétal.

Le poids moléculaire minimum de la cellulose varie entre 50.000 et 500.000, c'est à dire de 300 à 3.000 unités glucose. La cellulose s'organise en faisceaux de chaînes parallèles ou fibrilles, assemblées par des liaisons hydrogène. Ces fibrilles sont totalement insolubles dans l'eau. Certaines zones sont ordonnées et présentent une structure cristalline. Les zones constituent en moyenne 85 % de la cellulose totale, le reste étant constitué de régions peu organisées dites amorphes.

Certaines bactéries sont capables de dégrader la cellulose (cellulomonas, Pseudomonas, Bacillus, Clostridium). De nombreux champignons filamenteux participent à l'hydrolyse de la cellulose et des substrats lignocellulosiques. Les plus étudiés sont : Trichoderma reesei, Trichoderma koningii et Sporotrichum pulverilentum.

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

- endo- $\beta$ -1,4-glucanase ( $C_x$ )
- exo- $\beta$ -1,4-glucanase ( $C_1$ )
- $\beta$ -1,4-glucosidase.

Le mécanisme d'action des cellulases est le suivant : tout d'abord l'endo- $\beta$ -1,4-glucanase attaque les régions amorphes des fibres de la cellulose et ouvre ainsi la chaîne glucidique. L'exo- $\beta$ -1,4-glucanase attaque les extrémités des chaînes auparavant ouvertes pour libérer du cellobiose. Ces deux enzymes agissent synergiquement pour produire du cellobiose, lequel est ensuite dégradé en glucose par la  $\beta$ -1,4-glucosidase.

Les cellulases sont des enzymes adaptatives. Leur synthèse est contrôlée par un mécanisme inducteur-répresseur. Le cellobiose et le sophorose induisent la synthèse

des cellulases. Le meilleur inducteur pour la production de cellulases est la cellulose. Le glucose reprime la synthèse des cellulases.

La susceptibilité de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose est largement déterminée par son accessibilité aux enzymes cellulolytiques extracellulaires sécrétées par les champignons filamenteux. Le contact direct entre ces enzymes et les molécules des substrats cellulosiques est une condition essentielle pour l'hydrolyse. Puisque la cellulose est un substrat insoluble et de structure complexe, ce contact peut se réaliser seulement par diffusion des enzymes, produites par les microorganismes, à l'intérieur de la matrice du complexe structural de la cellulose. Des caractéristiques structurales limitent l'accessibilité de la cellulose aux enzymes par diffusion à l'intérieur de la fibre et diminuent par conséquent la susceptibilité de la cellulose de ces fibres à la dégradation enzymatique.

Les études de l'efficacité de divers prétraitements physiques et chimiques sur l'accessibilité des constituants cellulosiques de la paille à l'hydrolyse enzymatique avaient pour objectif de déterminer les conditions de prétraitements pour obtenir un substrat utilisable en fermentation solide.

Les résultats obtenus ont permis de définir les conditions essentielles de mise en oeuvre de cette technique :

- utilisation de paille broyée.
- traitement de la paille en milieu imprégné destiné à éviter les pertes importantes de matière par ailleurs source de pollution.
- traitement de la paille, soit uniquement par la chaleur à 110°C pendant 45 min, soit dans les mêmes conditions mais en présence de soude à 1 %.

L'utilisation de champignons filamenteux pour la valorisation des substrats agricoles par fermentation en milieu solide, nécessite en premier lieu de disposer de quantités importantes de spores. Dans notre laboratoire une étude préliminaire nous a conduit à concevoir un dispositif stérilisable permettant de produire de façon aseptique des spores de champignons mais également d'étudier la physiologie et le métabolisme au cours de la sporulation. Ce dispositif qui a fait l'objet d'un dépôt de brevet est basé sur l'utilisation d'un fermenteur à disques rotatifs permettant la culture en masse du mycélium dans un milieu solide et la sporulation à la surface. Les résultats préliminaires sont très prometteurs.

La méthode de fermentation en milieu solide (RAIMBAULT ; 1980) est basée sur le conditionnement du substrat solide uniformément inoculé par les spores de champignon filamenteux. Grâce à un dispositif d'incubation simple, et à des conditions de culture adaptées, nous avons pu suivre le développement du mycélium et étudier l'hydrolyse des substrats lignocellulosiques en milieu solide.

Une étude préliminaire nous a permis de sélectionner, parmi les souches de notre collection de champignons filamenteux cellulolytiques, une souche de T. harzianum qui présente des caractéristiques satisfaisantes dans l'optique de production de cellulases à partir de substrats celluloses par fermentation en milieu solide.

Un nouveau processus de revalorisation de sous-produits agricoles (paille de blé, son de blé, cossette de betterave) a été mis en évidence en utilisant des champignons filamenteux pour produire des cellulases par fermentation en milieu solide.

La cinétique comparée de biosynthèse des cellulases en milieu solide et en milieu liquide ne montre pas des différences significatives. Par contre les protéines produites par T. harzianum en fermentation solide sont plus stables.

L'utilisation, de la cossette de betterave ou d'un mélange de paille et de son de blé, comme substrat pour le développement de T. harzianum en fermentation solide donne des résultats particulièrement intéressants : globalement pour 100 g de substrat poids sec au départ nous avons obtenu 2.000 UI d'activité PF et 20.000 UI d'activité CMC.

En outre, grâce au pouvoir tampon de la paille et de la cossette de betterave, il n'est pas nécessaire de réguler le pH pendant toute la durée du processus de bioconversion. De même le développement lent de T. harzianum sur ces substrats ne nécessite pas une évacuation des calories produites au cours de la croissance.

Cependant ces études doivent être poursuivies pour définir les conditions optimales pour la croissance de T. harzianum au cours de la fermentation en milieu solide.

Le développement des utilisations de champignons filamenteux dans le domaine des bioconversions nécessite de plus en plus d'une part, une connaissance plus approfondie des potentialités métaboliques de ces microorganismes, et d'autre part une description plus complète de leur caractères physiologiques, biochimiques et nutritionnels.

Une meilleure connaissance dans ce domaine permettrait d'abord une utilisation mieux adaptée des souches en fonction des objectifs fixés et ensuite un contrôle pour vérifier la stabilité des organismes au cours de leur utilisation.

0

000 000

BIBLIOGRAPHIE

BERGHEM, L.E.R., and L.G. PETERSSON 1973. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Purification of cellulolytic enzyme from Trichoderma viride active on highly ordered cellulose. Eur. J. Biochem. 37 : 21-30.

BERTRAND, D., et A. BULEON 1980. Influence du traitement par la soude sur la dégradabilité enzymatique de la cellulose de coton. Colloque cellulolyse Microbienne. Marseille, France, 23-24 Mai 1980. 127-138. CNRS ed.

DESCHAMPS F., MEYER F., et J.P. PREBOIS 1980. Mise au point d'une unité pilote de fermentation aérobie en milieux solides. Colloque Annuel, Soc. Microbiol. Ind. Fr. I.N.S.A. Toulouse, 13-14 Mars.

ERIKSSON, K-E., and B. PETERSSON. 1972. Extracellular enzyme system utilized by the fungus Chrysosporium lignorum for the break-down of cellulose, in Biodeterioration of materials. Vol. 2. Applied Sciences Publishers Ltd., London p. 115.

ERIKSSON, K-E., and B. PETERSSON 1975. Extracellular enzyme system utilized by the Fungus Sporotrichum pulverulentum (Chrysosporium lignorum) for the break-down of cellulose 1. Separation, purification and physico-chemical characterization of five endo- $\beta$ -1,4-glucanases. Eur. J. Biochem 51 : 193-213.

GALLO, B.J., ANDREOTTI, R., ROCHE, C., RYU, D., and M. MANDELS 1978. Cellulase production by a new mutant strain of Trichoderma reesei MCG 77. Biotechnol. Bioeng 8 : 89-101.

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

HALLIWELL, G., and M. GRIFFIN 1973. The nature and mode of action of the cellulolytic component C<sub>1</sub> of Trichoderma koningii on native cellulose. Biochem J. 135 : 587-594.

HALLIWELL, G. 1975. Mode of action of components of the cellulase complex in relation to cellulolysis p. 319-336. In Bailey, M., Enari, T-M, and M. Linko (ed). Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. F.N.F.R.D. Helsinki 1975.

HAWORTH, W.N., PEAT, S., and W.J. WILSON 1939. Cité par M. CHARPENTIER 1968. Metabolisme des substances glucidiques dans le sol. Rapport général Ann-Pasteur 115 : 497-537. J. Chem. Soc.,

LADISCH, M.R., GONG, C-H., and G.T. TSAO 1980. Cellobiose hydrolysis by endoglucanase (glucan glucanohydrolase) from Trichoderma reesei : Kinetics and mechanism. Biotechnol Bioeng. XXII : 1107-1126.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., and R.J. RANDALL 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

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

MANDELS, M., PARRISH, F.W., and E.T. REESE 1962. Sophorose as an inducer of cellulase in Trichoderma viride. J. Bacterid. 83 : 400-408.

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

MANDELS, M., HONTZ, L., and J. NYSTROM. 1974. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. Biotechnol. Bioeng. XVI : 1471-1493.

MANDELS, M., and D. STERNBERG. 1976. Recent advances in cellulase Technology. J. Ferment. Technol. 54 (4) : 267-286.

MANDELS, M., ANDREOTTI, R., and C. ROCHE. 1976. Measurement of saccharifying cellulases. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 : 21-33.

MARX-FIGINI., M., and G.V. SCHULZ. 1966. Biochem. Biophys-Acta 112 : 81-89.

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

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

O' SULLIVAN, J., and G.E. MATHISON. 1970. Interference by monosaccharides with the estimation of tyrosine and proteins using the Folin. Ciocalteu phenol reagent. *Analyt. Biochem.* 35 (2) : 540-542.

PETTERSSON, L.G. 1975. The mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulose by Trichoderma viride p. 255-261. In. Bailey, M., Enari, T.M., and M. LINKO (Ed.). Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. F.N.F.R.D., Helsinki, 1975.

RAIMBAULT, M. 1980. Fermentation en milieu solide : croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. Thèse Doct. d'Etat. Université Paul SABATIER, TOULOUSE 291 p. Ed. ORSTOM.

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

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

REESE, E.T., SIU, R.G.H., and H.S. LEVINSON 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolyses. *J. Bact.* 59 : 485-497.

REESE, E.T. 1976. History of the cellulose program at the us Army Natick development Center. *Biotechnol. Biang. Symp.* 6 : 9-20.

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

RYAN, F.J., BEADLE, G.W., and E.L. TATUM 1943. The tube method of measuring the growth rate of Neurospora. *Am. J. Bot.* 30 : 784-799.

SENEZ J.C. 1979. Pour une politique nationale en matière de protéines alimentaires. *Le progrès scientifique* 203 : 5-32.

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

- STERNBERG, D. 1976.  $\beta$ -glucosidase of Trichoderma : Its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. Appl. Environ. Microbiol. 31 (5) : 648-654.
- STERNBERG, D. 1976. Production of cellulase by Trichoderma. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 : 35-53.
- STERNBERG, D., VIJAYAKUMAR, P., and E.T. REESE 1977.  $\beta$ -glucosidase : microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Can. J. Microbiol. 23 (2) : 139-147.
- STERNBERG, D., and G.R. MANDELS 1979. Induction of cellulolytic enzymes in Trichoderma reesei by sophorose. J. Bacteriol 139 : 761-769.
- STERNBERG, D., and S. DORVAL 1979. Cellulase production and ammonia metabolism in Trichoderma reesei on high levels of cellulose. Biotechnol. Bioeng. XXI : 181-191.
- TANAKA, M., TANIGUCHI, M., MORITA, T., MATSUNO, R., and T. KAMIKUBO 1979. Effect of chemical treatment on solubilization of crystalline cellulose and cellulosic wastes with Pellicularia filamentosa cellulase. J. ferment. Technol. 57 : 186-190.
- VAN SOEST, P.J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. P. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. Assoc. Offic. Anal. Chem. J. 46 : 825-829.
- VIDAUD, C. 1980. Etude de divers prétraitements de résidus lignocellulosiques en vue de leur utilisation pour l'enrichissement en protéines par fermentation en milieu solide. Mémoire de 5ème année. 43 p. Université de Clermont-Ferrand II.
- WOOD, T.M. 1968. Cellulolytic enzyme system of Trichoderma koningii. Separation of components attacking native cotton. Biochem. J. 109 : 217-227.
- WOOD, T.M., and S.I. Mc CRAE. 1972. The purification and properties of the C<sub>1</sub> component of Trichoderma koningii cellulase. Biochem. J. 128 : 1183-1192.
- WOOD, T.M., and S.I. Mc CRAE. 1975. The cellulase complex of Trichoderma koningii. p. 231-254. In. Proc. Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose, Aulanko, FINLAND.

ZAMBETTAKIS, Ch. et P. JOLY. 1973. Application de traitements numériques à la systématique des Ustilaginales. I. le genre Melanotaenium. Bull. Soc. Myc. Fr. LXXXVIII : 193-208.

o

oo oo

ANNEXE

MILIEUX DE CULTURE POUR LES CHAMPIGNONS CELLULOLYTIQUES

Malt Extract Agar (Difco B 112)

Bacto-malt extract broth . . . . .	15 g
Bacto agar . . . . .	15 g
Eau distillée . . . . .	1000 ml

pH : 5,6

Stérilisation : Autoclavage 20 min à 120°C

Cristo-Malt Agar

Cristo malt . . . . .	30 g
Bacto agar . . . . .	15 g
Eau distillée . . . . .	1000 ml

pH : 5,6

Stérilisation : Autoclavage 20 min à 120°C

Czapek Dox Agar (Difco B 339)

Saccharose . . . . .	30 g
Nitrate de Sodium . . . . .	2 g
Phosphate dipotassique . . . . .	1 g
Sulfate de Magnésium . . . . .	0,5 g
Chlorure de Potassium . . . . .	0,5 g
Sulfate de fer (eux) . . . . .	0,01 g

Bacto agar .....	15 g
Eau distillée .....	1000 ml
pH : 7,3	
Stérilisation : Autoclavage 20 min à 120°C	

Milieu de MANDELS et WEBER (1969)

Sulfate d'Ammonium .....	1,4 g
Phosphate monopotassique .....	2,0 g
Urée .....	0,3 g
Chlorure de Calcium .....	0,3 g
Sulfate de Magnésium .....	0,3 g
FeSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O .....	5,0 mg
MnSO <sub>4</sub> - H <sub>2</sub> O .....	1,6 mg
ZnSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O .....	1,4 mg
Co Cl <sub>2</sub> .....	2,0 mg
Cellulose avicel .....	7,5 g
Tween 80 .....	1,0 g
Extrait de levure .....	0,25 g
Peptone végétale .....	0,25 g
Bacto agar .....	15 g
Eau distillée .....	1000 ml
pH : 5,6	
Stérilisation : Autoclavage 20 min à 120°C	

Milieu pour la production de spores (RAIMBAULT et ROUSSOS)

farine de manioc .....	100 g
------------------------	-------

Phosphate monopotassique .....	4 g
Sulfate d'ammonium .....	8 g
Urée .....	2 g
Bacto agar .....	20 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH : 5,6

Stérilisation : Autoclavage 30 min à 120°C

### Milieu Synthétique

Sulfate d'Ammonium .....	1 g
Urée .....	0,3 g
Phosphate monopotassique .....	1,3 g
Phosphate dissodique .....	0,12 g
Sulfate de Magnésium .....	0,30 g
Chlorure de Calcium .....	0,30 g
Solution d'oligoéléments* .....	1 ml
Solution de vitamines* .....	1 ml
Source de carbone .....	2 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH : 5,6

Stérilisation : - la solution de vitamines et la source de carbone par filtration (filtre mullinore Ø 0,45 µ)

- le milieu minéral par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

\* Solution de vitamines

Biotine .....	20 mg
Ac. folique .....	20 mg
Pyridoxine HCl ....	100 mg
Thiamine HCl .....	50 mg
Riboflavine .....	50 mg
Ac. Nicotinique ....	50 mg
D.L. Pantothénate de Ca <sup>++</sup>	50 mg
Vitamine B12 .....	1 mg
Ac. P-aminobenzoïque	50 mg
Ac. lipoïque	50 mg
Eau distillée ....	1000 ml

\* Solution d'oligoéléments

Fe SO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O .....	5,0 g
Mn SO <sub>4</sub> - H <sub>2</sub> O .....	1,6 g
Zn SO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O .....	1,4 g
Ca Cl <sub>2</sub> .....	2,0 g
Eau distillée .....	1000 ml

ooo ° ooo

A N N E X E

METHODES D'ANALYSE

Dosage des sucres réducteurs (MILLER)

Sous l'action de la chaleur l'acide 3,5-dinitrosalicylique est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique tandis que les groupements carboxyles des sucres sont oxydés en aldéhydes. Une couleur jaune-brun se développe. La lecture se fait à 575 nm.

Dans les tubes de  $\emptyset$  16 mm mettre :

- 2 ml de la solution à doser (convenablement diluée)
- 3 ml du réactif au DNS

Bien agiter au vortex pour mélanger. On porte les tubes au bain-marie à 100°C pendant 5 min. On stoppe la réaction en refroidissant rapidement les tubes. La gamme étalon va de 0 à 1 g/l de glucose.

Dosage des sucres totaux à l'Anthrone

Par chauffage en milieu acide, les sucres donnent des dérivés du furfural qui réagit avec l'antranol en équilibre avec l'anthrone pour donner un composé bleu vert. La lecture se fait à 625 nm.

Dans des tubes de  $\emptyset$  16 placés dans un bain-marie à 0°C on apporte successivement :

- 2,5 ml de la solution à doser, correctement diluée
- 5 ml de la solution d'anthrone réfrigérée.

Quand la série des tubes est prête, on mélange rapidement au vortex et on place les tubes au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes. La réaction est arrêtée en plaçant les tubes dans l'eau glacée pendant 5 min. La gamme étalon va de 0 à 50 mg/l de glucose ou cellulose avicel.

#### Dosage des protéines (LOWRY et Coll.)

Après mise en solution des protéines par chauffage en milieu alcalin, on les dose avec le réactif de Folin-Ciocalteu. La coloration bleu obtenue est le résultat d'une réaction de Diuret (formation d'un complexe pourpre entre les liaisons peptidiques et les ions cuivriques en milieu alcalin) et de la réduction du réactif phosphomolybdique et phosphotungstique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine.

Dans des tubes de  $\varnothing$  16 apporter successivement :

- 1 ml de la solution à doser, convenablement diluée
- 1 ml de soude N. (Ne pas agiter les tubes)
- Porter à 100°C pendant 5 min. Refroidir brutalement
- Ajouter 5 ml d'une solution A+B+C (50 : 1 : 1 v-v)
- Laisser 30 min à l'obscurité à la température du laboratoire.
- Ajouter 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué de moitié dans l'eau. Bien agiter.
- Laisser 30 min à l'obscurité, à la température du laboratoire. Faire la lecture à 750 nm.

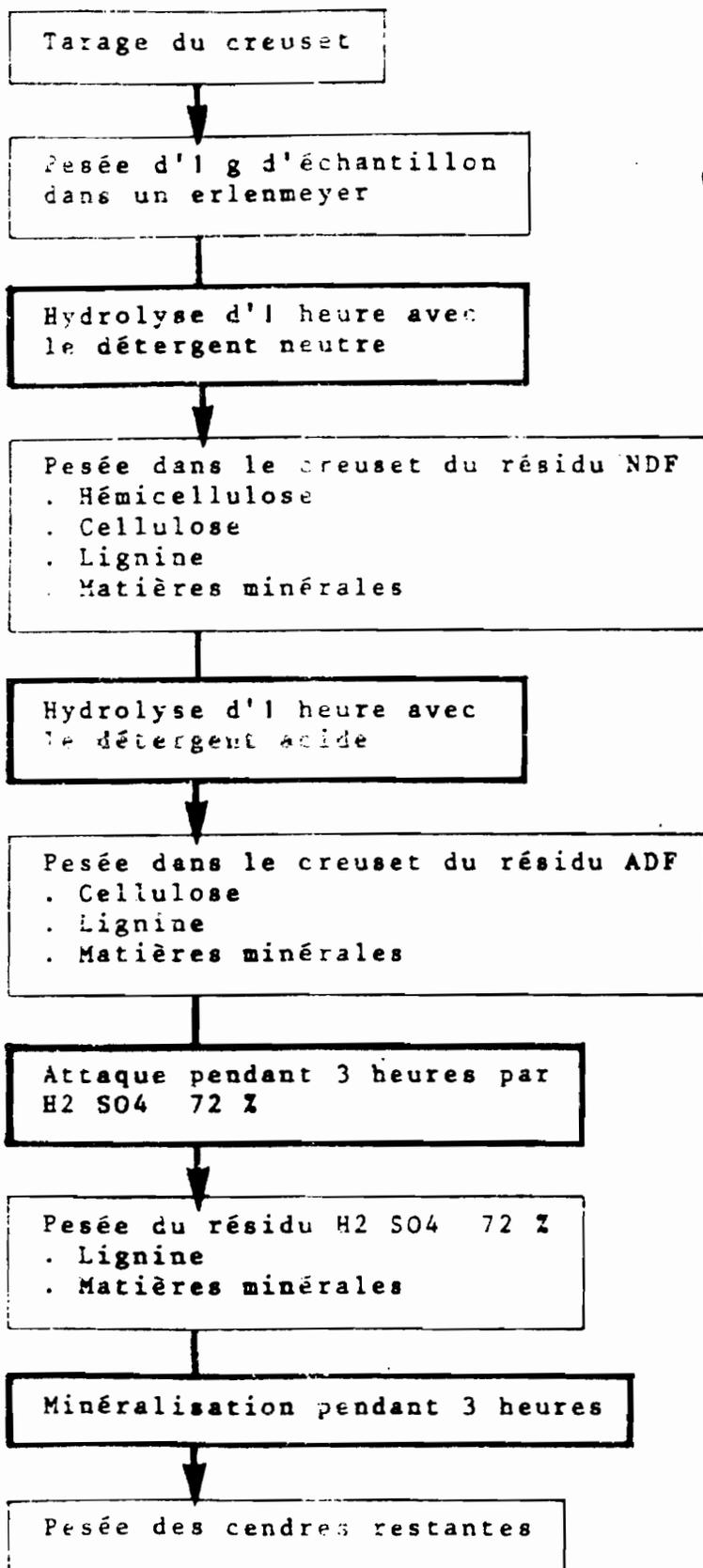
La gamme étalon va de 0 à 300 mg/l de serum albumine.

#### Dosage des constituants de la paille par la méthode de VAN SOEST

Le principe de cette méthode repose sur l'extraction successive des principaux constituants (cellulose, hemicellulose, lignine) des matériaux lignocellulosiques. Après chaque extraction, le produit retenu sur le filtre est séché et pesé. Les différentes étapes de ce dosage sont rapportés au schéma suivant :

SCHEMA DU MODE OPERATOIRE

Calculs



ⓐ

ⓑ

ⓒ

ⓓ

ⓔ

ⓕ

$$\text{Hémicellulose} = \frac{P1 - P2}{E} \times 100$$

$$\text{Cellulose} = \frac{P2 - P3}{E} \times 100$$

$$\text{Lignine} = \frac{P3 - P4}{E} \times 100$$

$$\text{Cendres} = \frac{P4 - P0}{E} \times 100$$

$$\text{NDF} = \frac{P1 - P4}{E} \times 100$$

$$\text{ADF} = \frac{P2 - P4}{E} \times 100$$

Le détergent acide permet de solubiliser les hémicelluloses et le bromure de cetyltriméthyl ammonium élimine une partie supplémentaire des protéines. L'attaque acide permet de solubiliser la cellulose et la minéralisation permet de mesurer la fraction minérale.

Peser 1 g d'échantillon (E) séché à l'air et broyé, le placer dans un récipient adapté au système de reflux verser 50 ml de NDS. Porter à ébullition pendant 30 min. Ajouter 50 ml de solution détergent + amylase. Porter à ébullition pendant 1 h. Filtrer sur un creuset en verre fritté n° 1 préalablement paré ( $P_0$ ). Rincer 2 à 3 fois l'échantillon avec de l'eau bouillante pour éliminer tout le détergent. Rincer 2 fois à l'acétone. Placer le creuset à l'étuve à 100°C pendant 8 h et peser après refroidissement en dessiccateur ( $P_1$ ).

Le résidu que l'on vient d'obtenir (NDF) est récupéré pour subir une seconde hydrolyse. Le mode opératoire est le même que pour obtenir le NDF mais la solution NDS est remplacée par une solution d'ADS. Le nouveau résidu obtenu donc après hydrolyse, filtration, séchage à l'acétone et passage à l'étuve à 100°C pendant 8 h est pesé ( $P_2$ ).

Le creuset contenant le résidu d'ADF est placé dans un cristalliseur. Ajouter de l'acide sulfurique à 72 % afin de remplir le creuset jusqu'à mi-hauteur. Agiter la solution avec un agitateur en verre. Mélanger toutes les heures. Après 3 h de traitement, filtrer sous vide le maximum d'acide et laver par de l'eau distillée chaude jusqu'à neutralisation du résidu. Placer le creuset à l'étuve à 100°C pendant 8 h et peser après refroidissement à dessiccateur ( $P_3$ ).

Minéralisation à 550°C pendant 3 h. Laisser refroidir dans le four. Mettre le creuset pendant 1 h à l'étuve à 100°C. Le peser ( $P_4$ ).

### Contrôle des activités enzymatiques

#### Activité carboxyméthyl cellulose (CMC)

Le mélange réactionnel est le suivant :

- 1 ml d'une solution à 1 % de carboxyméthyl cellulose dans du tampon citrate-phosphate 0,05 M pH = 4,8

- 1 ml de la solution à doser
- Incubation 30 min à 50°C au bain-marie

#### Activité Papier Filtre (PF)

Le mélange réactionnel est le suivant :

- 50 mg de papier WATHMANN n° 1 (rectangle de 1 cm x 5 cm)
- 1 ml de tampon citrate-phosphate 0,05 M pH = 4,8
- 1 ml de la solution à doser
- Incubation 60 min à 50°C

#### Activité Coton (AC)

Le mélange réactionnel est le suivant :

- 50 mg de coton hydrophile
- 1 ml de tampon citrate-phosphate
- 1 ml de la solution à doser
- Incubation 24 heures à 50°C

Pour chaque essai on réalise des témoins sans enzymes dans lesquels 1 ml de la solution à doser est remplacé par 1 ml de tampon citrate phosphate 0,05 M pH : 4,8. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans un bain-marie bouillant pendant 3 minutes. Les sucres réducteurs libérés pendant la réaction enzymatique sont alors dosés par la méthode colorimétrique de MILLER (1959) dont le réactif est l'acide 2,5 - dinitrosalicylique (DNS).

SOLUTIONS

Dosage des sucres réducteurs

\* Réactif au DNS :

Ac. 3,5 - Dimitrosalicylique .....	1 g
Hydroxyde de sodium .....	1 g
Sulfite de sodium anhydre .....	0,05 g
Phenol .....	0,20 g
Eau distillée .....	1000 ml

\* Glucose 500 mg dans 1000 ml d'eau distillée

Dosage des sucres totaux

\* Réactif à l'anthrone :

anthrone .....	200 mg
Ac. sulfurique 95 % .....	100 ml

\* Cellulose Avicel 50 mg dans 1000 ml d'eau distillée

Dosage des Protéines

\* Réactif de Biuret (A + B + C : 50 : 1 : 1 v/v) à mélanger au dernier moment

A. $\text{Na}_2\text{CO}_3$	à 2 % dans une solution de soude à 0,4 %
B. $\text{Cu SO}_4$	à 1 % dans de l'eau
C. Tartrate double de Sodium et Potassium	à 2 % dans de l'eau.

\* Serum albumine 300 mg dans 1000 ml d'eau distillée

\* Soude 1 N et 0,1 N à 4 et 0,4 % dans de l'eau distillée

\* Réactif de Folin-Ciocalteu à diluer dans de l'eau distillée

Constituants de la paille : VAN SOEST

\* NDS : Neutral détergent solution

- Lauryl sulfate de sodium .....	30 g
- E.D.T.A. déshydraté .....	18,61 g
- Sodium borate décahydrate .....	6,81 g
- Disodium hydrogénéphosphate anhydre .....	4,56 g
- 2 éthoxyéthanol .....	10 ml
- Eau distillée .....	1000 ml

\* Solution d'amylase

- α amylase type III A de <i>B. subtilis</i> .....	2 g
- Ethoxyéthanol .....	10 ml
- Eau distillée .....	1000 ml

Solution détergent + Amylase

- 2 ml de la solution d'amylase pour 100 ml de N.D.S.

\* A.D.F. : Acid detergent Fiber

- Bromure de cétyle triméthyle ammonium (CTAB) ..	20 g
- Acide sulfurique 1 N .....	1000 ml

\* Acide sulfurique à 72 %

Dosage des activités enzymatiques

\* Tampon citrate 0,05 M pH = 4,8

- Acide citrique, H <sub>2</sub> O PM 210,11 .....	4,8323 g
- Citrate trisodique, 5H <sub>2</sub> O PM 357,00 .....	9,639 g
- Eau distillée pour .....	1000 ml
- pH = 4,8 (rajusté avec NaOH N)	
- merthiolate de sodium 0,1 M .....	1 ml

× Carboxyméthyl cellulose à 1 %

- carboxyméthyl cellulose ..... 1 g
- tampon citrate 0,05 M pH = 4,8 ..... 100 ml

× Papier filtre WATMANN n° 1

- 50 mg : rectangle de 1 cm x 5 cm)

× Coton hydrophile

- 50 mg de coton hydrophile

o  
ooo    ooo