T H E S E

Présentée à l'

UNIVERSITE DE PROVENCE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

SEVASTIANOS ROUSSOS

CROISSANCE DE TRICHODERMA HARZIANUM PAR FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE : PHYSIOLOGIE, SPORULATION ET PRODUCTION DE CELLULASES.

Membres du Jury :

Mrs. J-P. BELAICH.
J-M. BELIN.
DAVE
J-L. GARCIA
G. STARKA.

Rapporteurs : Mrs. BELAICH , BELIN et RAIMBAULT.

Date de soutenance : 18 Décembre 1985

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

M.A. RIFAI ,1969

" La taxonomie des microorganismes est une discipline qui ne doit pas être négligée, car la connaissance approfondie des caractères des souches microbiennes conditionne toute application biotechnologique...."

A. SASSON,1983

à ANNIE

à MARKOS et à KANDIO

à YANNIS et à GIORGOS

à ABDEL , à LEO et à MAURICE

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé successivement ,au Laboratoire de Microbiologie ORSTOM , au Centre de Recherche de l'IRCHA , 91710 Vert le Petit, au Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Appliquée ORSTOM en Martinique ,97210 Fort de France ainsi qu'au Departement de Biotechnologie de l'Universitad Autonoma Metropolitana (UAM-Iztapalapa) à Mexico D.F., sous la direction de Dr. M.RAIMBAULT, maitre de recherche à l'ORSTOM.

Je tiens à remercier Maurice RAIMBAULT , créateur et responsable à l'ORSTOM des fermentations en milieu solide, qui m'a accueilli dans son laboratoire et a accepté de diriger mes recherches. Il m'a toujours soutenu de ses conseils et de ses encouragements.Récemment il a consacré une grande part de son temps à la correction du manuscrit. Actuellement comme représentant de l'ORSTOM au Mexique et Professeur de Biotechnologie à l'UAM il a contribué d'une manière importante à l'essor des fermentations en milieu solide au Mexique et en Amérique Latine. C'est un plaisir pour moi de lui faire part de ma reconnaissance et de mon attachement.

J'adresse tous mes remerciements au Dr.Jean-Louis GARCIA ,Directeur de recherche et chef de l'UR 601 de l'ORSTOM, pour les conseils avisés qu'il n'a cessé de me prodiguer ainsi que de notre fructueuse collaboration datant de plusieurs années et établie à Dakar. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Le Professeur Jean-Pierre BELAICH, Directeur du Département de Microbiologie et Physiologie Biochimique de l'Université de Provence ainsi que membre de la Commission Scientifique du Département F de l'ORSTOM , a toujours manifesté un interêt particulier pour mes recherches et a accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Je le remercie bien sincèrement.

Depuis mes débuts dans la recherche j'ai pu bénéficier des discussions fructueuses et des conseils avisés de mon parrain de recherche le Professeur Jean-Marc BELIN de l'ENSBANA de DIJON. Je le remercie d'avoir accepté d'assurer cette tàche ainsi que de juger mon travail en tant que rapporteur de cette thèse.

J'exprime ma sincère gratitude au Professeur Georges STARKA, de l'Université de Provence ainsi qu'au Dr. P. DAVET du département de Phytopathologie de l'INRA-ENSAM (Montpellier) d'avoir bien voulu faire partie du jury.

Je tiens à remercier également :

Mr. F.DESCHAMPS, responsable du Département de biotechnologie à l'IRCHA, ses collaborateurs ainsi que les techniciens des ateliers de cet Institut.

Mr. J-P.PREBOIS ,Ingénieur à l'IRCHA, qui a mis au point le Zymotis et qui m'a fait profiter de son expérience en biotechnologie.

Mrs les Directeurs des centres ORSTOM de la Martinique J-P TONNIER et de Guadeloupe M.HOEPFFNER.

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

Mr. ROSEMAIN, Directeur du CTCS , ainsi que ses collaborateurs , en particulier Mlle DUFRENOT.

Mr. F.GEOFFROY , de la station de recherches zootechniques de l'INRA Antilles-Guyane, pour notre fructueuse collaboration sur l'ensilage de la Fraction Insoluble.

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

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

Je tiens également à remercier tous mes collègues de Laboratoire , Didier ALAZARD qui m'a initié aux techniques des fermentations en milieu solide, Claude PEYCHENG qui a fait des centaines d'analyses des produits fermentés ainsi que tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de publications communes . Je pense notamment à Claude VIDAUD, Christine GIULIANO, Marcel ASTHER, Romesch SEDHA,Alejandro OLMOS ,Gorge AVILES, Leobardo SERRANO et Maria de los Angeles AQUIHUATL.

Mlles Aline BURGUNDER et Béatrice REYES CLOT ,secrétaires à la mission ORSTOM de Mexico , qui ont assuré la dactylographie avec compétance.

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

Que tous ceux qui m'ont aidé et soutenu tout au long de ce travail soient assurés de mon amitié et de mon entière reconnaissance.

A mis amigos y compañeros Profesores del Departamento de Biotecnologia de la Universitad Autonoma Metropolitana de Iztapalapa con mis agradecimientos y un saludo caluroso : Dr. Gustavo VINIEGRA GONZALEZ ,Jefe de la area de Biotecnologia ; Profesor Oscar MONROY HERMOSILLO ,Jefe del Departamento de Biotecnologia ; asi mismo a los Profesores: M.A. AQUIHUATL ; G.BACQUET ; J. BARRIOS ; G. GOMEZ ; M. GUTIERREZ ; S. HUERTA ; A. MASSUCO ; E.ORIOL y G. SAUCERO .

A los estudiantes de Biotecnologia de la UAM-Iztapalapa , los cuales seguramente reconoceran parte de su trabajo en esta tesis, con mi agradecimiento y mi amistad.

A Wilfrido, que desde hace varios meses se ha dedicado a la presentacion general y fue un colaborador muy eficaz para la impresion de esta tesis, le presento un muy cordial saludo.

TABLE DES MATIERES

RESUME

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I - PRESENTATION GENERALE..... 4

1.1. La bagasse de la canne à sucre..... 4
1.1.1. La culture de la canne à sucre dans le monde..... 4
1.1.2. Les sous produits de la canne..... 6
1.1.3. La bagasse et ses transformations..... 9

1.2. Les champignons filamenteux cellulolytiques..... 9
1.2.1. Le genre *Aspergillus*..... 10
1.2.2. Le genre *Chaetomium*..... 10
1.2.3. Le genre *Sporotrichum*..... 11
1.2.4. Le genre *Trichoderma*..... 11

1.3. Les Cellulases..... 13
1.3.1. Nature des cellulases..... 13
1.3.2. Mécanisme d'action des cellulases..... 14
1.3.3. Contrôle et régulation génétique des cellulases.. 16

1.4. Les Fermentations en milieu solide des substrats cellulosiques..... 17
1.4.1. Les procédés agités..... 20
1.4.1.1. Le procédé Koji..... 20
1.4.1.2. Le procédé ORSTOM - IRCHA..... 22
1.4.1.3. Le procédé INRA - DIJON..... 22

1.4.2. Les procédés statiques..... 25

1.5. Conclusion.

CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES..... 25

2.1. Screening des souches cellulolytiques..... 25
2.1.1. Microorganismes..... 25
2.1.2. Milieux de culture et dosages..... 25

2.2. Description des *Trichoderma*..... 26
2.2.1. Caractères morphologiques..... 26
2.2.2. Caractères physiologiques..... 26
2.2.3. Caractères biochimiques et nutritionnels..... 27

2.3. Conidiogénèse de *T. harzianum*..... 27
2.3.1. Milieux de production des conidiospores..... 27
- en erlenmeyer..... 27
- en fermenteur à disques 27
2.3.2. Description du fermenteur à disques..... 30

2.3.3. Inoculation des milieux de culture..... 31
2.3.4. Température d'incubation..... 31
2.3.5. Aération des cultures..... 32
2.3.6. Récolte des conidiospores..... 32
2.3.7. Conservation des conidiospores..... 32
2.3.8. Viabilité et pouvoir de germination..... 32

2.4. Fermentations en milieux liquides..... 34

2.5. Fermentations en milieu solide..... 35
2.5.1. En colonne..... 35
2.5.2. En zymotis..... 35

2.6. Extraction et conservation de la fraction soluble..... 38
2.6.1. Pressage..... 38
2.6.2. Conservation..... 38

2.7. Ensilage de la fraction insoluble..... 40

2.8. Analyses et expression des résultats..... 41
2.8.1. Microflore hétérotrophe aérobie de la bagasse..... 41
2.8.2. Production de conidiospores de I. harzianum..... 41
2.8.3. Production de cellulases de I. harzianum..... 42

RESULTATS

CHAPITRE III - CHOIX DE L'ORGANISME..... 44

3.1. Introduction..... 44

3.2. Screening des souches..... 44
3.2.1. Hydrolyse qualitative de la celulose en milieu gélosé..... 44
3.2.2. Croissance apicale..... 46
3.2.3. Production de conidiospores..... 47

3.3. Choix de I. harzianum 48
3.3.1. Séléction à partir des résultats obtenus..... 48
3.3.2. Séléction selon la littérature..... 48

3.4. Description morphologique de I. harzianum 54

3.5. Conclusion..... 55

CHAPITRE IV - PHYSIOLOGIE DE LA CROISSANCE..... 56

4.1. Introduction 56

4.2. Les étapes physiologiques de la croissance..... 56
4.2.1. La germination des conidiospores..... 56
4.2.2. La multiplication végétative..... 60

4.2.3. La conidiogénèse..... 62

4.3. Prototrophie..... 62

4.4. Tolérance à la température..... 63

4.5. Tolérance à la salinité..... 64

4.6. Tolérance au pH..... 65

4.7. Biochimie et Nutrition..... 66
4.7.1. Source d'Azote..... 66
4.7.2. Source de Carbone..... 67
4.7.3. Influence du pH sur la production de cellulases.. 68

4.7.4. Présence de facteurs de germination dans les conidiospores..... 69

4.8. Codification des caractères..... 70

4.9. Fichier d'identification rapide de I. harzianum..... 70

4.10. Conclusion..... 70

CHAPITRE V - PHYSIOLOGIE DE LA SPORULATION..... 73

5.1. Introduction..... 73

5.2. Influence du mode d'inoculation..... 74

5.3. Influence de la quantité de la source de Carbone..... 75

5.4. Influence de la quantité de la source d'Azote..... 77

5.5. Cinétiques de production des Conidiospores..... 78
5.5.1. Influence de la concentration du substrat..... 80
5.5.2. Influence de la concentration de la source d'Azote..... 82
5.5.3. En fonction de la salinité..... 84
Effets de NaCl..... 84
Effets de KCl..... 86
Effets de CaCl2..... 87

5.6. Conclusion..... 89

CHAPITRE VI - PRODUCTION D'INOCULUM EN FERMENTEUR A DISQUES..... 91

6.1. Introduction..... 91

6.2. Influence de la concentration du substrat..... 92

6.3. Influence de la concentration de la source d'Azote..... 94

6.4. Influence de l'aération..... 95

6.5. Cinétique de production de conidiospores..... 96

6.6. Conservation, viabilité, conditionnement..... 99
6.6.1. Conservation..... 99
6.6.2. Viabilité..... 101
6.6.3. Conditionnement..... 102

6.7. Conclusion..... 102

CHAPITRE VII - CROISSANCE DE T. HARZIANUM EN MILIEU SOLIDE..... 103

7.1. Introduction..... 103

7.2. Optimisation des conditions de culture en colonne.. 104
7.2.1. Humidité initiale du substrat..... 105
7.2.2. Température de fermentation..... 106
7.2.3. pH de la solution minérale..... 107
7.2.4. Concentration en sels de la solution minérale... 107

7.3. Culture sur divers substrats lignocellulosiques.... 109
7.3.1. Croissance sur paille et son de blé..... 109
7.3.2. Croissance sur son de blé..... 111
7.3.3. Croissance sur pulpe de betterave..... 113
7.3.4. Croissance sur bagasse de canne à sucre..... 115

7.4. Conclusion..... 116

CHAPITRE VIII - PRODUCTION DE CELLULASES EN MILIEU SOLIDE.118

8.1. Introduction..... 118

8.2. Production de cellulases au Laboratoire..... 118
8.2.1. Microflore hétérotrophe aérobie..... 118
8.2.2. Production de cellulases en milieu liquide..... 119
8.2.3. En milieu solide statique..... 121
8.2.4. En milieu solide agité..... 122
8.2.5. Production comparée de cellulases (liquide/solide)..... 124

8.3. Production de cellulases au niveau Pilote..... 125
8.3.1. En fermenteur agité..... 125
8.3.2. En fermenteur statique..... 127

8.4. Extraction des cellulases et des métabolites solubles..... 131

8.5. Conditionnement des cellulases. 133

8.6. Ensilage de la fraction insoluble..... 134
8.7. Conclusion..... 140

CONCLUSIONS GENERALES..... 141

BIBLIOGRAPHIE 146

ANNEXE 162

RESUMEN

CRECIMIENTO DE IRICHODERMA HARZIANUM POR FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO :FISIOLOGIA, ESPORULACION Y PRODUCCION DE CELLULASAS.

El desarrollo de los hongos filamentosos sobre sustratos sólidos juega un papel importante en numerosas areas como son el medio ambiente, la alimentacion y la microbiologia industrial. Su importancia se acrecenta con la intensificación de las investigaciones con respecto a las bioconverciones y a la valorisación de los sub-productos agricolas lignocellulosicos.

Este estudio fue llevado a cabo con el fin de conocer la fisiología del microorganismo y las posibilidades de control de las fermentaciones en medio sólido en vias de valorizar los sub-productos agricolas lignocelulosicos para la production de metabolitos de alto valor agregado como por ejemplo las celulasas.

Una tecnica original fue adaptada para el cultivo de un hongo filamentoso celulolitico sobre sustrato sólido y el control de su desarrollo aerobio en la fase de multiplicación vegetativa. Esta tecnica muy simple permite mantener conditions favorables a la largo de la incubaciòn y conduce a una invasion de toda la masa del sustrato lignocelulosico por el micelio del hongo.

Un estudio preliminar nos permitió seleccciona r, entre cepas de hongos filamentosos celulolíticos de nuestra colección, una cepa de Irichoderma harzianum presentando caracteristicas satisfactorias en la optica de una producción de celulasas por fermentation en medio solido. Esta cepa produce cantidades importantes de celulasas ,y posee un crecimiento apical elevado (1,2 mm/h), permitiendole invadir los sustratos rapidamente, y produce cantidades muy elevadas de conidiosporas en la superficie. Además, I. harzianum es un antagonista poderoso con respecto a un cierto numero de hongos fitopatógenos. Recientemente, se describió una serie de peptidos nuevos, presentes en la conidiosporas de I. harzianum y, por lo tanto, el poder antibiotico pudo ser verificado. Era pues interesante disponer de datos precisos sobre la biologia y la fisiologia de este prometedor organismo.

El estudio de la fisiología del crecimiento demonstro que I.harzianum es un microorganismo protótrofo de un gran flexibilidad de adaptacion ,capaz de desarollarse sobre condiciones extremas (pH: 2 a 8 ; temperatura de 10 a 35°C ; salinidad de 0 a 80 g de NaCl/l).Además la utilisacion de un

medio de cultivo sintètico permitió demostrar que es una cepa protótrofa que asimila bien el nitrato, la urea, las sales de amonio y poco menos el nitrito. De la misma manera ,los siguientes azucares: D-glucosa, D-fucosa, Lactosa, D-ribosa, xilosa, cellobiosa, galactosa, sacarosa, almidon, celulosa y manitol se utilizan como unica fuente de carbono y de energia para este microorganismo.

El estudio de la fisiología de la esporulación ,en relación a la producción cuantitativa de conidiosporas, permitió definir las condiciones del medio ambiente y de optimizar la composicion del medio de cultivo para la producción masiva de conidiosporas.

Un nuevo procedimiento de producción de conidiosporas de hongos filamentosos ha sido mejorado no solamente por I. harzianum sino que tambien para un gran numero de cepas de hongos filamentosos. Este procedimiento presenta la ventaja del cultivo en superficie sobre medio solidificado con la utilización de un fermentador de discos rotativos particular, cuyo principio de utilización fue fundamentalmente modificado con el fin de obtener una gran superficie de esporulación.

En el fermentador de discos, lo optimo de producción de conidiosporas de I. harzianum fue obtenido despues de 7 dias de incubacion con 7,3 X 10^{11} conidiosporas producidas. Esto corresponde a un rendimiento de esporulacion particularmente elevado de 3,5 X 10^{10} conidiosporas producidas por gramo de sustrato .

El metodo de fermentacion en medio solido esta basado en el acondicionamiento del sustrato insoluble ,uniformemente inoculado por una suspension de conidiosporas de hongos filamentosos,afin de llevar el medio de cultivo solido a una humedad inicial de cultivo de 72%. La influencia de la temperatura, de la humedad, de la aireación, del pH y de la inoculación sobre la evolución del crecimiento, fue determinado de manera a definir las condiciones optimas de incubación.

Los estudios microscopicos permitieron mostrar el desarrollo selectivo del micelio del mismo hongo, en condiciones no estrictamente asepticas como las que fueron adoptadas. Asi mismo, la utilización de diversos sustratos lignocelulosicos (paja y salvado de trigo, desechos de remolacha, bagazo) nos permitió generalizar este modo de cultivo en el conjunto de los sub-productos lignocelulosicos.

La cinetica comparada de biosintesis de las celulasas en medio solido y en medio liquido no muestra diferencias significativas a nivel de los rendimientos de producción para estas enzimas. Esto es totalemente alentador y nos autoriza a considerar la producción de celulasas de I. harzianum por fermentacion en medio sólido.

La aplicación de los resultados y de los conocimientos adquiridos a lo largo de este estudio permitió definir un nuevo procedimiento de fermentación en medio sólido para la valorización de sustratos lignocelulosicos. Este procedimiento comprende cinco etapas :

1- Pretratamiento del sustrato (molido y tratamiento termico)
2- Inoculacion con una suspension de conidiosporas , dejando una humedad de 72 %
3- Fermentacion aerobia con un flujo continuo de aire humedo a traves de la masa del producto durante 48 h
4- Extracción de celulasas y de metobolitos solubles por presion del producto fermentado, obteniendo de esta manera una fraccion soluble (FS) y una fraccion insoluble (FI)
5- Condicionamiento de 2 fracciones : por evaporacion de la FS se obtiene las celulasas y los metabolitos bajo la forma de polvo seco. Por ensilaje de la FI se estabiliza este sub-producto.

Los resultados obtenidos en el laboratorio fueron confirmados por las conclusiones de los estudios realizados a nivel piloto experimental , utilizando un nuevo fermentador estatico de tipo zymotis con una escala de extrapolación de 1/2500 segun el procedimiento anteriormente descrito.

Sub-productos agricolas como la paja de los cereales, bagazo ,cascara de remolacha , pueden ser utilizados como sustrato para la producción de celulasas. Despues de 48 h de fermentacion sobre estos sustratos, hay una producción promedio de 20.000 UI de actividad Carboxymetilcelulosa y de 2.000 UI de actividad Papel Filtro por 100 g de sustrato seco. El producto fermentado es prensado ,recuperandose el 80 % de la fracción soluble conteniendo esta las enzimas y los metabolitos en una solución concentrada.

Otras posibilidades de aplicación de los conocimientos adquiridos en el transcurso de este trabajo se estan actualmente estudiando, concretamente en lo que respeta a la producción de metabolitos de alto valor agregado (enzimas, antibioticos) , asi como el crecimiento de microorganismos sobre soporte celulosico.

ABSTRACT

THE GROWTH OF TRICHODERMA HARZIANUM IN SOLID STATE FERMENTATION : PHYSIOLOGY, SPORULATION AND CELLULASES PRODUCTION

The culture of filamentous fungi on solid substrates plays an important role in various applications such as, ecology, nutrition and industrial microbiology. Moreover, the intensive research on bioconversion of lignocellulosic agricultural wastes in order to increase their value has increased its importance.

This work emphasises on the microorganism growth physiology and solid-state-fermentation (SSF) in order to produce metabolites like cellulases.

A new technic is presented to study the growth of filamentous fungi on solid sustrates. The simplicity of the method gives excellent non sterile incubation conditions and allows a total development of the mycelium all over the substrate.

To begin, a screening process lead us to the selection of the strain Trichoderma harzianum for the following characteristics: cellulases production , apical growth and high yield of conidiospores.Furthermore, because T. harzianum is a strong antagonist in front of few phytopathogeneous fungi, it is also used as biological agent.This study showed that T. harzianum is a prototrophus fungi capable of growth in extreme conditions (2<pH<8 , 10° C<Temperature<35 ° C and 0 g of NaCl/l<80). Can use different nitrogen and carbon sources for growth.

Environmental conditions and optimal culture medium for high yield spore production was set and a new spore production process had been elaborated not only for T. harzianum but also for others filamentous fungi. This process is based on the surperficial growth on solid substrate with a new rotative disc reactor.

The best results were obtained after 7 days incubation in this reactor: 7.3 x 10 ^11 spores were produced and a very hight sporulation yield factor (3.25 x 10 ^10 sp./g. carbonated substrate) was obtained.

This SSF method depends on substrate pretreatment, homogeneously inoculated with a spore suspension containing salts. Influence of temperature, humidity, aeration, pH and inoculation were determined to describe the optimal growth

conditions for SSF.

Microscopic observations have shown selective growing of mycelium, even when non-aseptic conditions were used. Several substrates were tested (straw and a bran of corn, bagasse, white beet wastes), in the aim to extend this process on lignocellulosic agricultural wastes.

Kinetics of cellulases biosynthesis do not show differences between solid and liquid cultures regarding the enzymes production yield factor. This encouraging result will support T. harzianum cellulases production in SSF.

Knowledge and results obtained during this work have lead to a new SSF process in 5 steps:

1- Substrate pretreatment (cutting, thermal treatment)

2- Inoculation with spore solution, substrate has a 72% humidity

3- Aerobic fermentation , circulation of humidified air during 48 h

4- Cellulase and metabolite extraction by pressing the final product

5- Final treatment of the 2 fractions: by evaporating the soluble one a dry powder is obtained; by silage stabilisation of the insoluble fraction.

Laboratory results were confirmed by pilot scale studies using a new static reactor (Zymotis) with a 2500 times scaling-up. After 48 h processing, cellulase production raise 20,000 IU of Cellulase Carboxymethyl Activity and 2,000 IU of Filter Paper Activity per 100 g of dry sustrate. By a simple mecanic pressing of the product recovery of 80% of the enzymatic activity and metabolites is obtained in a high concentrated solution.

Other applications are under investigation concerning metabolite production of interest (enzymes, antibiotics) and microorganism growth on cellulosic supports.

" CROISSANCE DE IRICHODERMA HARZIANUM PAR FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE : PHYSIOLOGIE, SPORULATION ET PRODUCTION DE CELLULASES".

RESUME

L'étape limitante pour les applications possibles de valorisation biotechnologiques des substrats agricoles cellulosiques (pailles de céréales, pulpes de betteraves, bagasse...) est l'hydrolyse chimique ou enzymatique de la cellulose en sucres simples. Nos recherches ont été orientées vers la production de cellulases d'un champignon filamenteux cellulolytique Irichoderma harzianum cultivé sur différents substrats lignocellulosiques par fermentation en milieu solide. L'étude de la physiologie de la croissance et de la sporulation de I. harzianum nous a permis de définir des conditions et des milieux de culture optima pour ce microorganisme. De même l'utilisation d'un dispositif d'incubation simple nous a permis de suivre le développement de I. harzianum et d'étudier au laboratoire la production de cellulases sur divers substrats lignocellulosiques (paille et son de blé, pulpe de betterave, bagasse) en milieu solide. Pour l'extrapolation des résultats au niveau Pilote expérimental nous avons mis au point deux nouveaux fermenteurs pour la culture en milieu solide :

- Un fermenteur à disques de 4,4 litres pour la production d'inoculum.

- Un fermenteur statique de 100 litres pour la production de cellulases.

Ce travail a permis d'élaborer un nouveau procédé de production et d'extraction de cellulases de I. harzianum par culture en milieu solide statique. De plus trois brevets d'invention ont été déposés à l'ANVAR.

INTRODUCTION

La cellulose, constituant majeur de tous les végétaux, représente une ressource potentielle naturelle en sucres bien connue. Sa décomposition biologique en éléments simples par les cellulases devrait permettre l'amélioration à moyen terme des problèmes graves tels que : l'alimentation, l'énérgie et la pollution de l'environnement.

Les problèmes démographiques, la désertification et les crises économiques liées aux échanges internationaux conduisent de plus en plus fréquemment à des famines graves difficilement surmontables. L'exemple actuel de l'Ethiopie en est une illustration. Certes, beaucoup d'efforts ont été faits pour accroitre les rendements de céréales et développer de meilleurs procédés pour l'agriculture. Cependant, de l'avis des experts, ces progrès nécéssaires ne seront pas suffisants pour les prochaines années. Les biotechnologies, si elles sont bien, comprises et si les efforts sont bien orientés vers les problèmes d'alimentation et de santé, peuvent contribuer à resoudre les problèmes de pénurie alimentaire et d'approvisionnement en énérgie dans les pays les moins favorisés . Associées aux progrès de l'agriculture, elles peuvent favoriser significativement les conditions du développement de ces pays (SASSON, 1984). La production d'aliments fermentés enrichis en protéines (AFEP) par culture de champignons filamenteux est un exemple de recherche qui se situe dans cette perspective (SENEZ, 1979).

Après la crise énérgétique de 1973 un vif intérêt des pouvoirs publics s'est porté sur les ressources renouvelables. A ce titre, la cellulose fut naturellement au centre des recherches pour la production de carburants de substitution (méthane, alcools) et même pour étudier de nouvelles filières de production de molécules chimiques à partir de la cellulose, la "cellulochimie" ou "carbochimie" étant présentée comme une alternative à la pétrochimie dans la fabrication de nouveaux biopolymères, biosolvants et biodétérgents(SASSON, 1983).

De nombreux symposium internationaux sur le thème de la dégradation de la cellulose par les microorganismes (USA, FINLANDE, INDE, FRANCE) ont permis de faire le point régulièrement sur l'avancement des travaux réalisés dans ce domaine. Des progrès significatifs ont été réalisés en ce qui concerne la séléction des microorganismes cellulolytiques, les mutations génétiques pour l'obtention de souches hyperproductrices et les conditions de culture des microorganismes impliqués. Cependant tous ces travaux n'ont pas encore abouti à la production de cellulases en quantité industrielle (REESE, 1976, MONTENECOURT et EVELEIGHT, 1977, WARZYWODA et Coll. 1983).

D'une manière générale, il est surprenant de constater que la valorisation biologique de la cellulose et des substrats lignocellulosiques aie reçu encore peu d'applications. Cela est du en partie à la nécéssité d'hydrolyser les liaisons glucidiques (β-1,4), processus lent et difficile à réaliser. Il faut noter toutefois que la grande majorité de ces études a été réalisée en cultures liquides dans lesquelles le substrat cellulosique n'est pas soluble. Ces cultures en milieu liquide présentent l'inconvenient de diluer considérablement les enzymes cellulolytiques synthétisées par le microorganisme ; de ce fait l'attaque de la cellulose non solubilisée par les enzymes spécifiques diluées n'est pas efficace. Par contre, les cultures sur substrat solide pourraient présenter des avantages intéressants. Etant donné que les champignons filamenteux se développent au contact du substrat, les enzymes excrétées se trouvent concentrées sur le substrat lui-même, qu'elles peuvent hydrolyser beaucoup plus efficacement. En retour les sucres libérés pourront être mobilisés rapidement par le microorganisme pour son développement (RAIMBAULT, 1980). Le système de culture en milieu solide parait donc mieux adapté à la culture de microorganismes cellulolytiques sur de tels substrats insolubles.

Après une étude nous ayant conduit à la séléction d'une souche d'un champignon cellulolytique (Trichoderma harzianum) et l'étude de sa physiologie de croissance et de sa sporulation, nous avons donc entrepris des recherches visant à adapter la culture en milieu solide de ce champignon filamenteux cellulolytique sur de la bagasse de canne à sucre comme substrat lignocellulosique en vue de la production de cellulases dans des conditions économiquement rentables.

Dans le cadre de recherches portant sur l'enrichissement en protéines de substrats amylacés, une nouvelle technique de culture d' Aspergillus niger en milieu solide avait été mise au point par RAIMBAULT et ALAZARD en 1980. Cette technique, appliquée aux substrats lignocellulosiques, pourrait être utilisée dans le domaine de la bioconversion des résidus agroindustriels cellulosiques tels que les pulpes de betterave, la bagasse de canne à sucre, le son ou la paille de blé pour la production d'aliments fourragers, d'enzymes ou même de métabolites fongiques à haute valeur ajoutée.

Trichoderma harzianum qui est le microorganisme retenu pour notre étude, est un champignon filamenteux cellulolytique d'un grand interêt potentiel ; il produit des quantités importantes de cellulases, sa croissance apicale est élevée et sa sporulation est abondante et aisée. Il a été démontré que cette souche n'est pas toxique en alimentation animale (MUINDI et HANSSEN, 1981 a). Ce microorganisme, à cause de ses effets antagonistes puissants, commence à être

utilisé en lutte biologique contre différentes espèces de champignons phytopathogènes (DUBOS et Coll. 1983). Il produit en outre des antibiotiques nouveaux contenus dans la spore (BACHET et Coll. 1983). Il était donc intéressant de disposer de renseignements précis sur la biologie et la physiologie de cet organisme prometteur.

Ayant obtenu des renseignements sur la physiologie de sa croissance et de sa sporulation nous avons orienté nos recherches vers son utilisation pour la valorisation biotechnologique de divers substrats lignocellulosiques tel que la bagasse de canne à sucre, en vue d'améliorer les ressources fourragères dans la région d'Amérique Centrale et Caraibes. En effet, dans ces régions tropicales, la production de fourrages est largement déficitaire au cours de la saison sèche (CELANIE, 1982). La carence des élevages laitiers en fourrages conduit à l'importation d'une grande partie de la production de lait pendant cette période. La fermentation en milieu solide et l'ensilage pourraient permettre d'améliorer la digestibilité des sous-produits lignocellulosiques abondants dans ces régions (bagasse, rafles de mais) grâce à l'action des cellulases d'un champignon et à l'acidification lactique.

Après une présentation générale concernant la nature et la disponibilité de la bagasse de canne à sucre, nous rappelerons les principales connaissances bibliographiques sur les microorganismes cellulolytiques, les cellulases ainsi que les fermentations des substrats cellulosiques. Nous décrirons ensuite notre étude de séléction de souches cellulolytiques qui nous a conduit à choisir cette souche de I. harzianum pour réaliser la suite de nos recherches. Les études physiologiques sur la croissance et la sporulation de ce microorganisme sont alors exposées. Elles nous permettront d'optimiser les conditions de culture et de la sporulation. Pour la production des spores nécéssaires à notre étude, nous avons mis au point et expérimenté un nouveau type de sporulateur. Pour adapter la technique de culture en milieu solide à divers substrats lignocellulosiques nous avons suivi l'évolution des principaux paramètres de croissance et en particulier la production de cellulases. L'utilisation de différents appareils de culture pour milieu solide, agité ou statique, nous a permis de produire des cellulases non seulement en colonnes à l'échelle du laboratoire mais également en réacteurs à l'échelle pilote expérimentale. Cette étude débouche finalement sur la description d'une nouvelle technique de production et d'extraction d'enzymes ou de métabolites sécrétés par des champignons filamenteux cultivés en milieu solide.

CHAPITRE I - GENERALITES.

Parmi les sous-produits lignocellulosiques disponibles en grande quantité, la bagasse représente un potentiel particulièrement important pour les régions tropicales. Notre effort a donc porté essentiellement vers des solutions permettant de valoriser ce résidu agricole lignocellulosique par des techniques biologiques.

Il nous a paru important dans un premier temps de présenter les potentialités que représente la bagasse de canne à sucre, les perspectives et les difficultés rencontrées pour sa valorisation biotechnologique. Par la suite, nous ferons le point sur les différentes catégories de microorganismes cellulolytiques susceptibles d'être utilisés. Une présentation générale des connaissances concernant les mécanismes d'action et la nature des cellulases nous permettra alors de mieux appréhender les problèmes d'hydrolyse de ce substrat carboné naturel. Enfin nous ferons le point sur les diverses techniques de fermentations en milieu solide susceptibles d'être mises en oeuvre pour la valorisation des résidus lignocellulosiques.

1.1. LA BAGASSE DE CANNE A SUCRE.

1.1.1. La culture de la canne dans le monde.

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

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

Christophe COLOMB, à son second voyage, a fait planter des boutures de canne provenant des îles Canaries en République Dominicaine. Cette culture s'est alors développée entre 1500 et 1600 dans la plupart des zones tropicales de l'Amérique (Antilles, Mexique, Brésil, Pérou...), et fut pendant longtemps la principale richesse agricole de ces pays.

La canne à sucre n'étant limitée que par le froid ou l'altitude, sa culture est très largement pratiquée dans les zones tropicales et subtropicales comme le montre la fig. 1. C'est ainsi que la limite Nord englobe Madère, le Sud-Est de l'Espagne, la Haute Egypte, le Sud de l'Iran, le Pakistan, l'Inde du Gange, la Chine du Sud, Formose, l'Ile japonaise de

Riou Kiou, les Iles Hawai, le Mexique, le Sud de la Louisiane et de la Floride. La limite Sud contient la province de Natal en Afrique du Sud, Madagascar, la Réunion et l'Ile Maurice, le Queensland en Australie, les Iles Fidji, la côte Péruvienne, la province de Tucuman en Argentine et le Nord de l'état du Parana au Brésil (FAUCONNIER et BASSEREAU ; 1970). Les principaux pays producteurs sont actuellement le Brésil, l'Inde, Cuba, puis le Mexique, la Chine, les Philippines, l'Australie, l'Afrique du Sud, Hawai, la République Dominicaine et Formose.

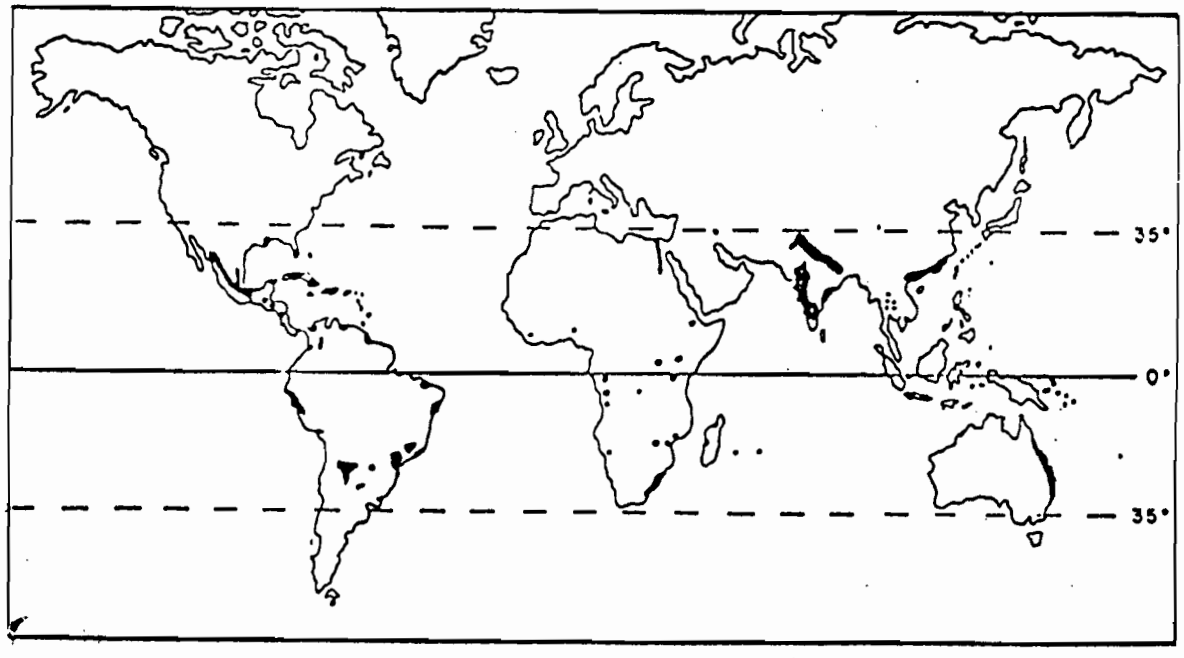


Fig. 1 : Localisation des cultures de canne à sucre dans le monde .

1.1.2. Les sous produits de la canne au Brésil et en Martinique

Ainsi que nous venons de le voir le Brésil se place en tête des pays producteurs de canne à sucre. La fabrication artisanale du sucre était très prospère il y a encore quelques dizaines d'années, mais a peu à peu disparu à partir de 1970. Actuellement la production de sucre représente une activité industrielle très bien organisée. Depuis la crise pétrolière et ses conséquences économiques qui ont sécoué ce pays pendant cette période, le gouvernement Brésilien a développé un programme de production de carburant de substitution à partir du sucre de canne.Les autorités Brésiliennes ont ainsi crée en 1975 le programme alcool (Proalcool), qui vise à remplacer progressivement la quasi totalité de l'essence par de l'alcool carburant (éthanol) (SASSON ; 1984).

Le choix s'est porté sur la production d'alcool à partir de la canne à sucre car le Brésil avait déjà à cette époque une technologie et des infrastructures importantes dans le domaine des sucreries et disposait de quantités excédentaires de sucre importantes. Les équipements ont alors été complétés par des installations de fermentations et de distillation integrées aux complexes sucriers déjà existants.

Le gouvernement a programmé une production de 10,7 milliards de litres d'alcool pour l'année 1985. Il faudrait, pour atteindre cet objectif traiter 5.500.000 ha de canne à sucre, ce qui représente 1 % de la surface du Brésil et une production annuelle de 126.000.000 T de canne à sucre (CERRI, 1983).

La production industrielle d'alcool au Brésil est assurée soit dans des distilleries intégrées aux sucreries (Fig. 2.) soit dans des distilleries autonomes (Fig. 2). Cette production offre des quantités considérables de sous-produits en particulier des vinasses qui vont rapidement poser des problèmes graves de pollution. Pour une production de 10,7 millions de m3 d'alcool prévue pour 1985, découleront 140 millions de m3 de vinasses, et 9.450.000 T de bagasse excédentaire.

La production de la canne à sucre en Martinique a été de 200.000 T pour 1984. Cette canne est destinée principalement aux 13 distilleries de Rhum et à la fabrique de sucre du GALLION). Cette dernière a effectivement traité 56.000 T en 1982 et 93.000 T de canne à sucre en 1983.

Sur la fig. 3 nous avons reproduit le schéma de sous-produits de canne en Martinique ROSEMAIN, 1983). Après passage de la canne dans les moulins, on obtient 30% de bagasse par rapport au tonnage de canne broyée. Une partie de cette bagasse est brulée en chaudière pour produire de la vapeur qui sert à fabriquer l'éctricité dans les grosses

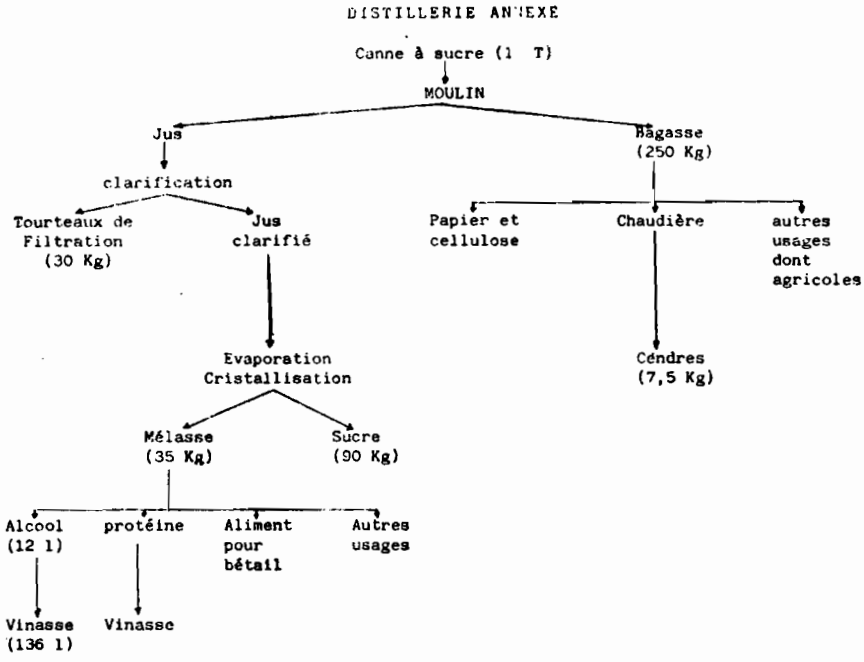


Fig. 2 : Produits obtenus par Tonne de canne à sucre en distillerie annexe au Brésil; valeurs moyennes (BACCHI).

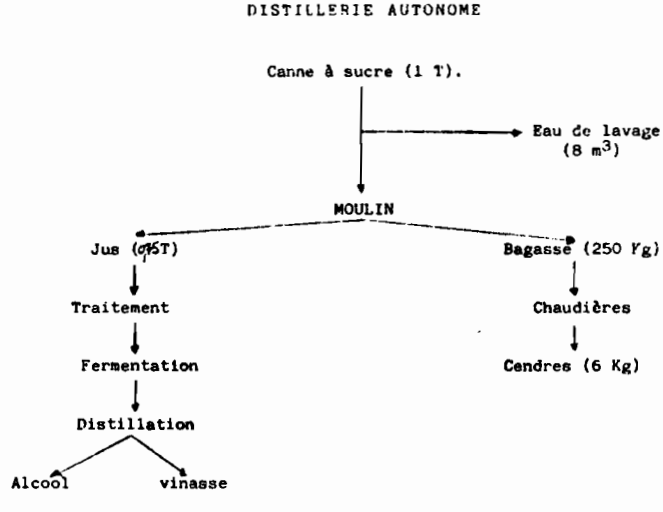


Fig 2' : Produits obtenus par tonne de canne à sucre en distillerie autonome au Brésil. Valeurs moyennes (BACCHI, 1983).

unités ou à entrainer les moulins. La bagasse ainsi brulée permet aux usines d'économiser le fuel.

On peut considérer que pour l'ensemble des unités de production en Martinique, l'excédent global de bagasse varie entre 15 % et 30 %, ce qui représente 15.000 T de bagasse par an (ROSEMAIN, 1983).

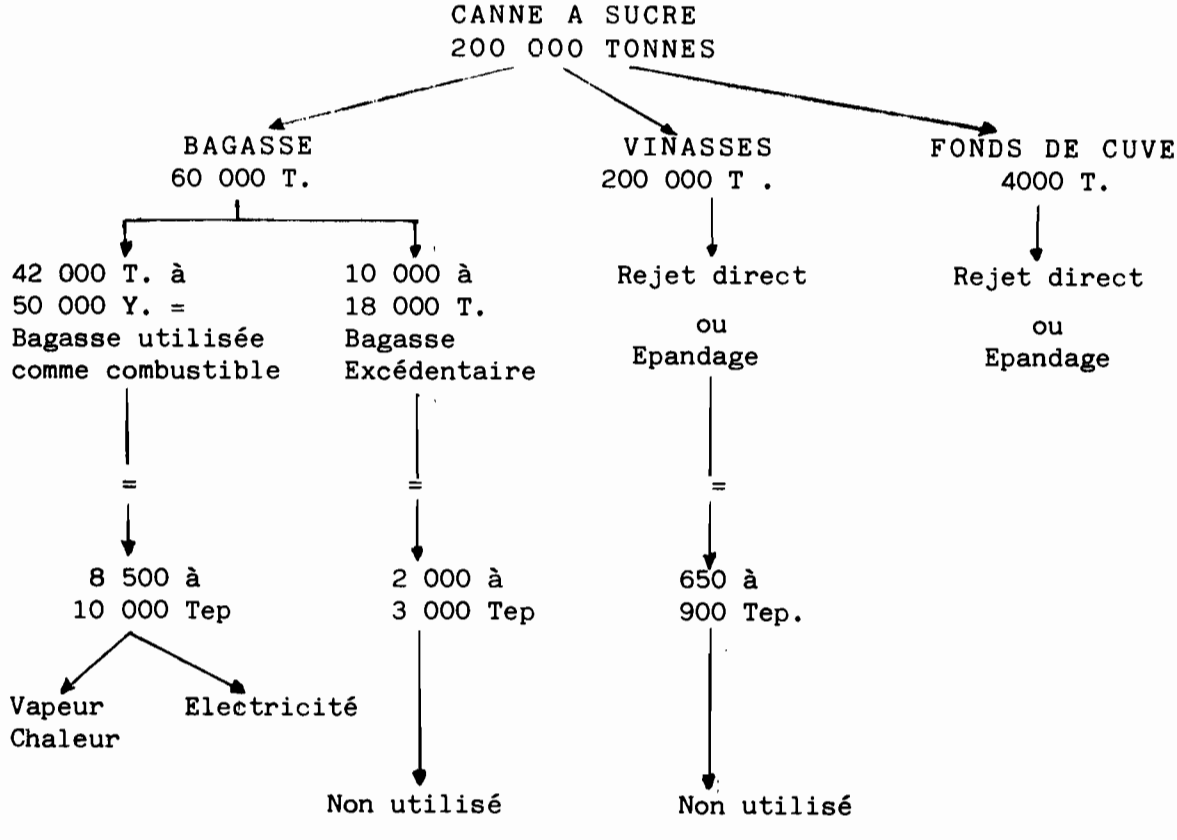


Fig. 3 : Schéma de sous produits de canne à sucre en MARTINIQUE (ROSEMAIN 1983).

1.1.3. La bagasse et ses transformations.

La bagasse est le résidu de l'extraction à la presse du jus de la canne broyée dans des moulins. Sur le Tableau I nous avons indiqué la composition moyenne de la bagasse. La cellulose en est le principal constituant, suivie par les hemicelluloses et la lignine. Elle constitue de ce fait un résidu lignocellulosique qui peut être utilisé pour la fabrication de panneaux de fibres agglomérées ou en pâte à papier pour la fabrication de cartons d'emballages. Elle peut également être utilisée comme substrat pour des biotransformations.

TABLEAU I. Composition moyenne de la bagasse %

CELLULOSE	HEMICELLULOSES	LIGNIME
38	34	11

La transformation chimique des produits lignocellulosiques a été explorée par GOLDSTEIN (1976). Tout d'abord, la transformation des produits lignocellulosiques par voie physique nécéssite des procédés drastiques à très haute température (1000 ° C) et de fortes pressions pour obtenir des produits tels que Méthanol, Ammonium, Hydrocarbures aliphatiques, Huiles et Gaz. Ces produits sont obtenus par pyrolyse, par liquéfaction ou encore par gazéification.

Par hydrolyse acide chimique, la cellulose libère du glucose qui par transformation chimique à haute température fournit de l'hydroxyméthyl furfural qui sert de précurseur à de nombreuses synthèses chimiques dont l'acide lévulinique est un exemple.

De même, les hemicelluloses par hydrolyse acide, libèrent du mannose et du xylose. Le Mannose par fermentation produit de l'éthanol alors que le xylose par traitement acide se transforme en furfural. Enfin la lignine peut être transformée en phénol puis en Benzène par voie chimique.

1.2. LES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX CELLULOLYTIQUES.

Aussi bien dans les sols que dans les sédiments marins, de très nombreux microorganismes (Bactéries, Champignons, Actinomycètes) participent à la dégradation des débris cellulosiques contribuant à la formation de l'humus ou à la minéralisation de la matière organique (POCHON et de BARJAC, 1958 ; BIANCHI, 1971). Dans le rumen les bactéries

anaérobies cellulolytiques procurent à l'animal une grande partie de son énérgie alimentaire et des protéines dont il a besoin (THIVEND et Coll., 1980).

Parmi les microorganismes les plus utilisés dans les études sur la cellulolyse, on trouve de nombreux champignons filamenteux. Leur rôle dans l'hydrolyse de la cellulose a été étudié et développé dans diverses revues de synthèse (WOOD, 1970 ; GHOSE, 1977 ; SENARI et MARKKANEN, 1977 et MANDELS 1982). Des travaux moins nombreux ont été consacrés aux bactéries cellulolytiques mesophiles et thermophiles (RAMASAMY, 1980 ; HITCHER, 1978 ; AIT et Coll, 1981). Peu de travaux concernent la décomposition de la cellulose par les Actinomycètes (CRAWFORD, 1978 ; SU et PAULAVICIUS, 1975 ; DAIGNEAULT-SYLVESTRE et KLUEPFEL, 1979 ; HAGERDAL et Coll. 1978). Nous développerons essentiellement les principaux genres de champignons cellulolytiques.

1.2.1. Le genre Aspergillus.

Au cours d'une étude précédente nous avons démontré que dans le genre Aspergillus quelques espèces sont capables de produire des cellulases parmi lesquelles A. oryzae , A. versicolor , A. aculeatus , A. niger et A. wentii . Cette production de cellulases reste cependant faible et limitée à des conditions particulières de culture (ROUSSOS, 1981).

D'autres espèces d' Aspergillus comme A. terreus et A. fumigatus ,sont capables de se développer sur la cellulose microcristalline en produisant des quantités importantes de β-glucosidase (D'SOUZA et VOLFOVA, 1982 ; WASE et VAID, 1983 ; STEWART et Coll. 1983).

Les cellulases produites par des espèces d' Aspergillus sont généralement riches en endo- β-glucanases et β-glucosidases, mais pauvres en exo- β-glucosidases. De ce fait, elles ont une action limitée sur la cellulose microcristalline. On trouve cependant dans le commerce des cellulases d' A. niger commercialisées par Miles (Elkhart, Indiana, U.S.A.).

1.2.2. Le genre Chaetomium.

Les deux espèces cellulolytiques les plus souvent utilisées sont C. thermophile et C. cellulolyticum .L'influence de la température sur la croissance et la production de cellulases par C. thermophilus a été étudiée par ERIKSEN et GOKSOYR (1976). L'hydrolyse de la cellulose en sucres simples par le complexe enzymatique extracellulaire de C. cellulolyticum a été décrit par FAHNRICH et IRRGANG (1982 a et b).

C'est C. cellulolyticum qui est le plus souvent

utilisé pour la bioconversion des substrats lignocellulosiques bruts tels que la sciure de bois, la bagasse etc... Les fermentations de ces substrats inoculés avec C. cellulolyticum se déroulent généralement en milieu solide (PAMMENT et Coll. 1978, ULMER et Coll., 1981 ; ROUSSOS et SEDHA, 1983).

1.2.3. Le genre Sporotrichum.

Le genre Sporotrichum est l'anamorphe (forme asexuée) du genre Phanerochaete qui représente la forme téléomorphe. Deux espèces ont été particulièrement étudiées :

- Sporotrichum thermophile anamorphe de P. thermophile.
- Sporotrichum pulverulentum anamorphe de P. chrysosporium.

Toutes ces espèces attaquent le bois et sont appelées à ce titre "pourriture blanche du bois". Depuis plusieurs années une équipe de chercheurs Suédois dirigée par K. E. ERIKSSON a etudié une souche de S. pulverulentum et l'on dispose maintenant de nombreux renseignements sur le processus de dégradation de substrats lignocellulosiques par cette souche (ERIKSSON et HAMP, 1978 ; ERIKSSON, 1978 ; AYERS et Coll. 1980 ; DESHPANDE et Coll. 1978 ; EK et ERIKSSON, 1978 ; ERIKSSON et PETTERSSON, 1975 ; ANDER et Coll. 1983). Le "complexe" enzymatique de cette souche comprend des endo-glucanases, exo-glucanases, glucosidases, xylanases, lactonases, glucose oxidase, cellobiose oxidase, cellobiose quinone oxido réductase, catalase, laccase, péroxidase ainsi que des enzymes de dégradation de la lignine en monomères. Ce microorganisme a été proposé également pour la production de Protéines d'Organismes Unicellulaires à partir de substrats lignocellulosiques (THOMKE et Coll. 1980). Cependant S. pulverulentum n'a pas été utilisé dans des études sur la production de cellulases en vue de la saccharification de la cellulose.

La souche S. thermophile a été utilisée pour l'étude de la régulation de la biosynthèse des cellulases (induction - répression) dans le cas des espèces thermophiles (CANEVASCINI et Coll. 1979, COUDRAY et Coll. 1982).

1.2.4. Le genre Trichoderma .

Contrairement au genre Sporotrichum, le genre Trichoderma appartient au grand ensemble des champignons imparfaits (Fungi Imperfecti) (RIFAI, 1969). Ces espèces sont fréquemment utilisées dans les processus d'hydrolyse de la cellulose. Elles produisent en effet des quantités importantes d'exoenzymes, capables d'hydrolyser complètement la cellulose en glucose. Les espèces suivantes : T. reesei (OGAWA et Coll., 1982 ; TALLEN et ANDREOTTI, 1982 ; MANDELS,

1982), *T. viride* (GONG et Coll., 1977 ; WEBER et GRIFFIN, 1973) ; HALLIWELL et VINCENT, 1981), *T. pseudokoningii* (HARRER et Coll., 1983), *T. longibranchiatum* (SIDHU et SANDHU, 1980) ainsi que *T. harzianum* (ROUSSOS et RAIMBAULT, 1982) sont les espèces les plus utilisées pour l'étude du mécanisme du complexe enzymatique ainsi que pour la production de cellulases.

Il existe une certaine confusion dans la littérature à propos de la nomenclature de *T. viride*. Cette espèce se rencontre actuellement sous l'appellation *T. reesei*. Il faut cependant préciser que cette dénomination n'est valable que pour la souche *T. viride* QM6a, qui a subi de nombreuses mutations (MANDELS, 1982).

Les différents mutants obtenus à partir de *T. viride* QM6a produisent des quantités importantes de cellulases, mais la composition ainsi que les propriétés du complexe enzymatique à l'égard des substrats cellulosiques sont similaires. De même les proportions relatives d'endo et exo-glucanases ne changent pas. Toutes les souches de *T. reesei* produisent de faibles quantités de cellulases constitutives. Les manipulations génétiques visent à la production de cellulases constitutives. Cependant, pour l'ensemble des espèces de *Trichoderma*, la biosynthèse des cellulases est régulée par le contrôle d'induction-répression décrit dans un chapitre suivant. L'intensité de cette régulation est fonction de la souche ainsi que des conditions de culture (MONTENECOURT et Coll. 1981 ; PURQUIE et VANDECASTELLE, 1984).

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

Lors des études précédentes sur l'hydrolyse de la cellulose par les moisissures, nous avons pu séléctionner, dans un premier temps, 4 souches appartenant toutes au genre *Trichoderma*, à savoir *T. reesei*, *T. longibranchiatum*, *T. aureoviride* et *T. harzianum*. Par la suite en fonction d'un certain nombre de critères (croissance apicale, sporulation, production de cellulases), nous avons retenu parmi ces souches *T. harzianum* (ROUSSOS, 1981 ; ROUSSOS et RAIMBAULT, 1982 a et b).

Les cellulases de *T. harzianum*, sont synthétisées pendant les premières heures de croissance et restent à l'intérieur des cellules mycéliennes. Ces enzymes sont ensuite excrétées dans le milieu de culture ou leur concentration augmente en fonction du temps. Cette souche est donc parfaitement bien adaptée pour la production de cellulases par fermentation en milieu solide. (ROUSSOS et SEDHA, 1983 ; ROUSSOS et Coll. 1984).

1.3. LES CELLULASES

1.3.1) Nature des cellulases .

Il n'existe pas une enzyme unique capable de dégrader complètement la cellulose brute jusqu'à ses composants ultimes, cellobiose et glucose. En fait, la plus simple définition des cellulases consiste en un complexe polyenzymatique qui attaque les sucres simples capables de traverser la paroi cellulaire. Selon cette définition, le système enzymatique complet n'existe que chez relativement peu d'organismes ; les mieux connus parmi les champignons filamenteux sont les genres Aspergillus , Chaetomium , Penicillium , Sporotrichum et Trichoderma (ERIKSSON et HAMP, 1978 ; IKEDA et Coll. 1973 a et b ; SIMBSON et MARSH, 1964 ; BHATAWADEKAR, 1981 ; OGAWA et Coll. 1982 ; COUDRAY et Coll. 1982) et les Clostridium parmi les bactéries anaérobies (GIULIANO et Coll. 1983 ; KUNDU et Coll. 1983 ; AIT et Coll. 1979).

Pour T. viride le complexe cellulasique a été fractionné en quatre composants par PETTERSSON en 1975 qui a utilisé différentes méthodes de chromatographie. Deux de ces composants sont des endoglucanases ; les autres sont une exoglucanase et une β-glucosidase.

Plus récemment, d'autres auteurs (HALLIWELL et GRIFFIN 1978 ; CONG et Coll. 1979 ; GHOSE et BISARIA, 1979 ; WEBER et Coll. 1980, FLIESS et SCHUGERL, 1983) en utilisant des tamis moléculaires, des résines échangeuses d'ions, ou par éléctrofocusing, ont obtenu seulement trois composants enzymatiques pour T. reesei . :

1) Endo-β-1,4 Glucanase = Carboxyméthyl cellulase (ACMC).
   No. 3.2.1.4. ou (EG : Cx)

2) Exo-β-1,4-Glucanase = Cellobiohydrolase
   No. 3.2.1.91 ou (CBH : C1)

3) β-Glucosidase ou cellobiase
   No. 3.2.1.21

La caractérisation de ces enzymes a été décrite par plusieurs auteurs et une synthèse de ces travaux a été faite par MANDELS (1982).

1.3.2) Mécanisme d'action des cellulases .

Prenant en considération les résultats expérimentaux, PETTERSSON (1975) pense qu'il existe une synérgie 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 % en glucose. Il semble donc logique, comme l'a proposé PETTERSSON, de donner à cette enzyme un rôle prépondérant dans le schéma de la dégradation totale de la cellulose native par *T. viride* (Tableau II).

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

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

MONTENECOURT et EVELEIGH (1979) en se basant sur l'hypothèse de PETTERSSON (1975) selon laquelle les enzymes réagissent successivement pour dégrader complètement la cellulose, ont proposé un schéma des différentes étapes de la cellulosyse (Fig. 4) ; ce modèle a été élaboré en tenant compte d'un certain nombre de travaux antérieurs qui ont été faits indépendamment sur des cellulases fongiques (ERIKSSON et PETTERSSON ; 1975. HALLIWELL et GRIFFIN, 1973 ; WOOD et Mc CRAE, 1975).

Dans un premier temps, les endoglucanases sont supposées attaquer la cellulose microcristalline, créant des failles dans les chaînes linéaires de la cellulose. L'action des endoglucanases est suivie par l'attaque des cellobiohydrolases en ces points de rupture qui libèrent du cellobiose. L'action continue et combinée des endoglucanases et cellobiohydrolases entraine la conversion complète de la cellulose en cellobiose et petits oligosaccharides. La β-glucosidase agit sur le cellobiose et les petits oligosaccharides pour libérer le glucose. L'action synérgique

de toutes les enzymes impliquées dans ce phénomène est nécéssaire pour réaliser l'hydrolyse effective de la cellulose cristalline. (MONTENECOURT et EVELEIGH, 1979).

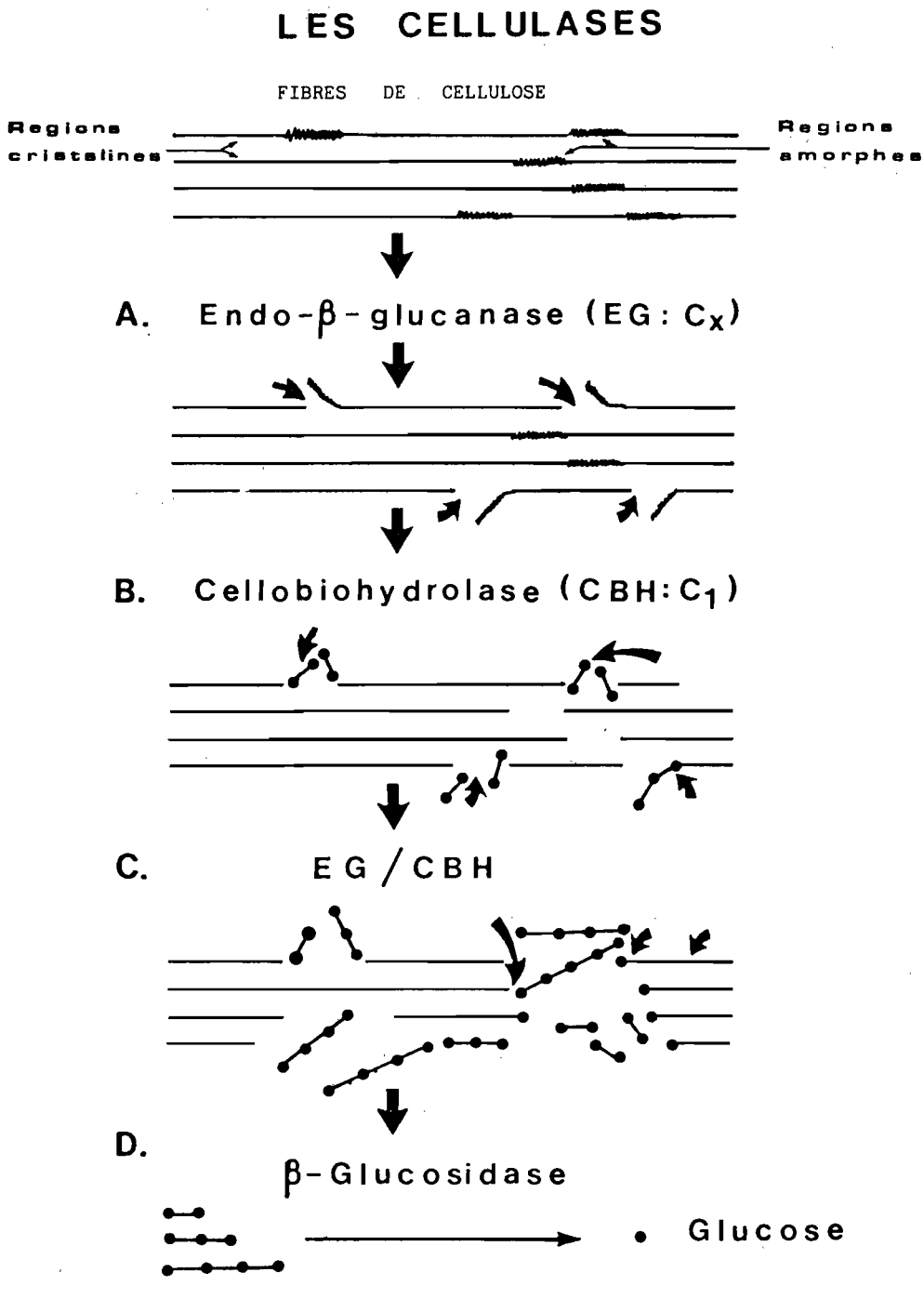


Fig. 4 : Représentation schématique des différentes étapes de la cellulolyse selon MONTENECOURT et EVELEIGH (1979) .

1.3.3) Contrôle et régulation de la biosynthèse des cellulases .

Le fonctionnement des enzymes cellulolytiques témoigne d'une intérdépendance complexe qui n'est d'ailleurs pas encore totalement élucidée. Le schéma de la Fig. 5 résume les connaissances actuelles (CONG et TSAO, 1979 ; ROSS et Coll. 1983).

Il est maintenant admis que la synthèse des enzymes de dégradation de la cellulose est contrôlée par un système inducteur-répresseur (LOEWENBERG, 1984). Cela signifie que le complexe cellulasique est naturellement réprimé par un répresseur qui bloque la transcription des gènes de structure de ces enzymes. Les inducteurs ont pour rôle de lever cette répression. Cependant, plusieurs auteurs s'accordent à penser qu'il existe aussi une faible quantité de cellulases constitutives (MANDELS et REESE, 1960 ; ROUSSOS et RAIMBAULT, 1982 b) dont la β-glucosidase (GHOSE, 1977). la régulation des enzymes cellulasiques s'effectue à trois niveaux :

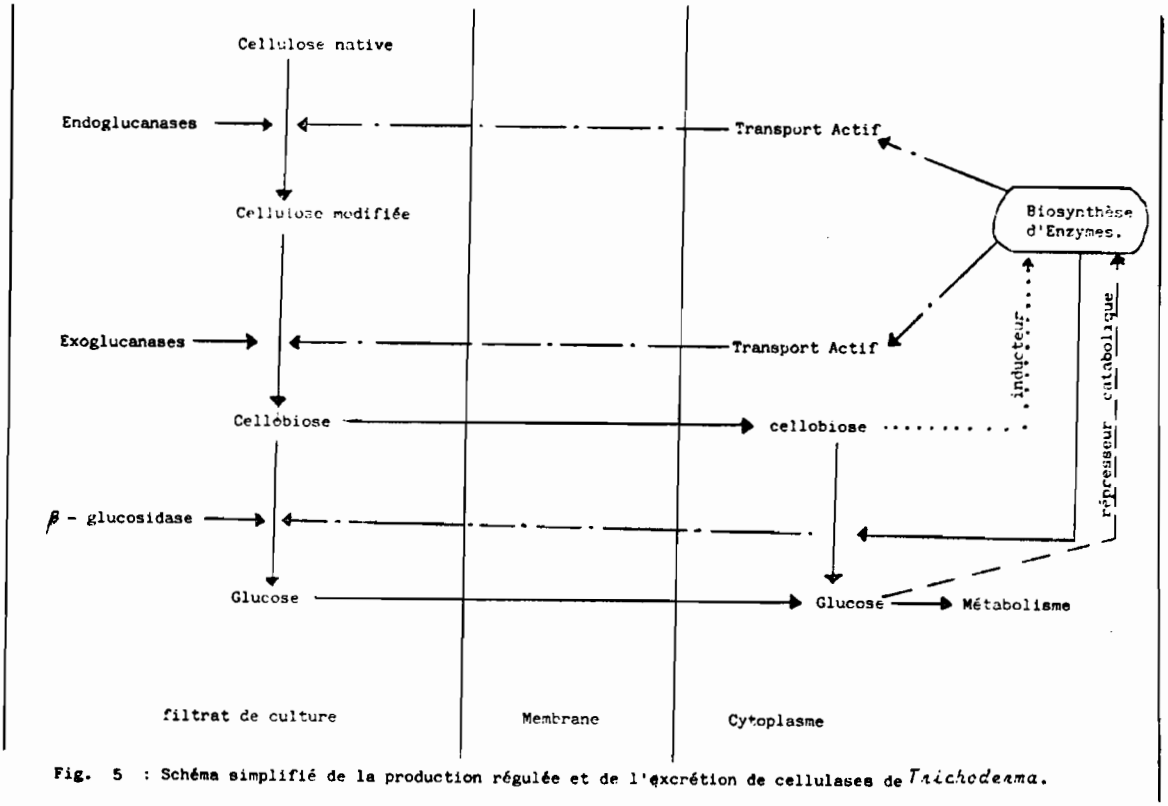


Fig. 5 : Schéma simplifié de la production régulée et de l'excrétion de cellulases de *Trichoderma*.

- Induction-répression du système enzymatique qui est naturellement réprimé par le glucose. La répression de la synthèse des cellulases est levée par les inducteurs, substrat ou non, tels que la cellulose ou le thiocellobiose. (NISIZAWA et Coll. 1971 ; STERNBERG et MANDELS, 1979) ; les oligosaccharides cités induisent en général la biosynthèse de β-glucosidase (LOEWENBERG, 1984).

- Répression catabolique exercée par le glucose, produit final de la réaction, qui bloque principalement la synthèse de l'enzyme constitutive β-glucosidase (GHOSE, 1977 ; CONG et Coll. 1977 ; MANDELS et Coll. 1975 ; NISIZAWA et Coll. 1972 ; CANEVASCINI et Coll. 1979 ; WOODWARD et ARNOLD, 1981 ; FERCHAK et PYE, 1983).

- Rétroinhibition qui s'exerce à plusieurs niveaux ; le glucose inhibe l'activité de la β-glucosidase et des endoglucanases. Le cellobiose, associé aux cellodextrines, inhibe les endo et exoglucanases (GHOSE, 1977 ; MONTENECOURT et Coll. 1981).

1.4.LES FERMENTATIONS EN MILIEU SOLIDE DES SUBSTRATS CELLULOSIQUES.

Le terme "fermentation en milieu solide" en Anglais "solid state fermentation" désigne toute fermentation dans laquelle le substrat n'est pas liquide. RAIMBAULT (1980) avait défini ainsi les milieux solides en opposition aux milieux liquides et pâteux "comme étant ceux pour lesquels le substrat n'est pas liquide et possède une granulométrie et une structure organisée. Les substrats solides peuvent donc être des produits végétaux fragmentés dans lesquels l'eau se trouve sous forme d'eau de constitution, d'eau libre et d'eau liée par des forces de différentes natures. En aucun cas l'eau ne doit occuper la totalité des espaces libres et ne doit s'écouler librement.

L'utilisation des fermentations en milieu solide n'est pas récente et de nombreuses fermentations alimentaires sont basées sur ce principe et ont été pratiquées traditionnellement depuis très longtemps en Europe (fromages, champignons comestibles) ou en Extrême Orient (Koji, Miso, Sake, Tempech, Ontjom, Raji). Actuellement divers procédés de fermentation en milieu solide sont utilisés au niveau commercial en Extrême Orient (Hesseltine, 1965) ou de métabolites de champignons filamenteux. Sur le Tableau III, nous avons reporté les enzymes produites industriellement par fermentation en milieu solide.

Les fermentations en milieu solide présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux fermentations en milieu liquide que LAMBERT et MEERS (1983) ont résumé de la façon suivante :

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

2. L'absence de phase liquide et l'humidité faible du substrat permettent :

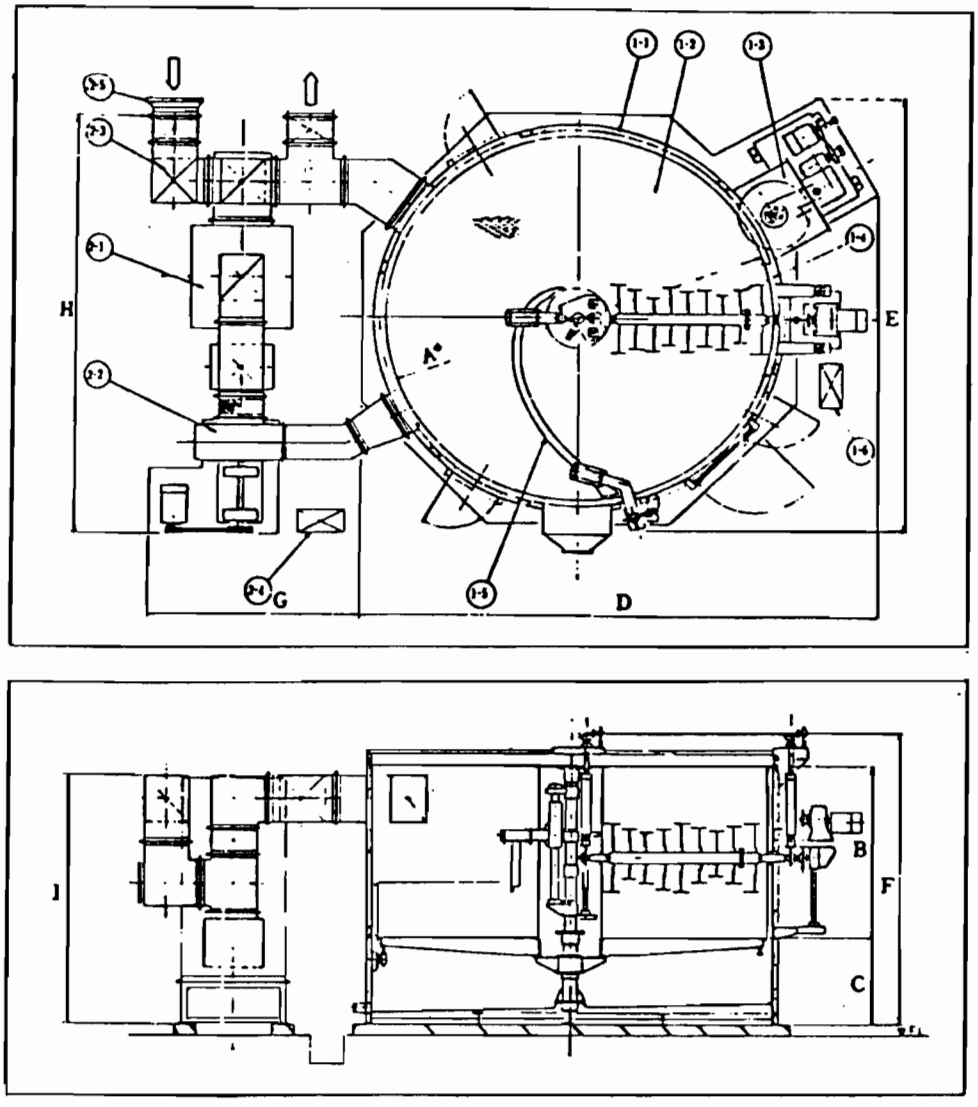
- de réduire le volume des fermenteurs
- d'éviter les effluents à traiter
- d'économiser des réactifs lors de la récupération des métabolites.
- d'éviter les contaminations bactériennes grâce à une faible humidité
- d'éviter parfois de stériliser le substrat (RAIMBAULT et GERMON, 1976).

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

TABLEAU III : Enzymes fongiques produites par fermentation en milieu solide.

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

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



1-1 Equipement pour le fermenteur agité type KOJI
1-2 Cuve mobile du fermenteur
1-3 Moteur d'avancement de la cuve
1-4 Système d'agitation du produit
1-5 Système de chargement et de déchargement
1-6 Table de contrôle

2 Equipement du conditionnement de l'air
2-1 Air conditionné
2-2 Eventail
2-3 Canalisation et Humidification
2-4 Table de contrôle
2-5 Plaque de chauffage

Figure 6 . Schema d'un fermenteur industriel pour la préparation de KOJI
(FUJIWARA BREWING MACH. IND. - Japon)

La production de cellulases de T. viride cultivé en milieu solide a été décrite par TOYAMA (1976). Pour cela, le procédé Koji a été adapté pour permettre la culture de T. viride sur un milieu solide composé essentiellement de paille de riz et de germes de blé. Un appareil automatique à chambre rotative a été mis au point, la culture statique se fait en couche de 10 cm de hauteur.

1.4.1) Les procédés agités .

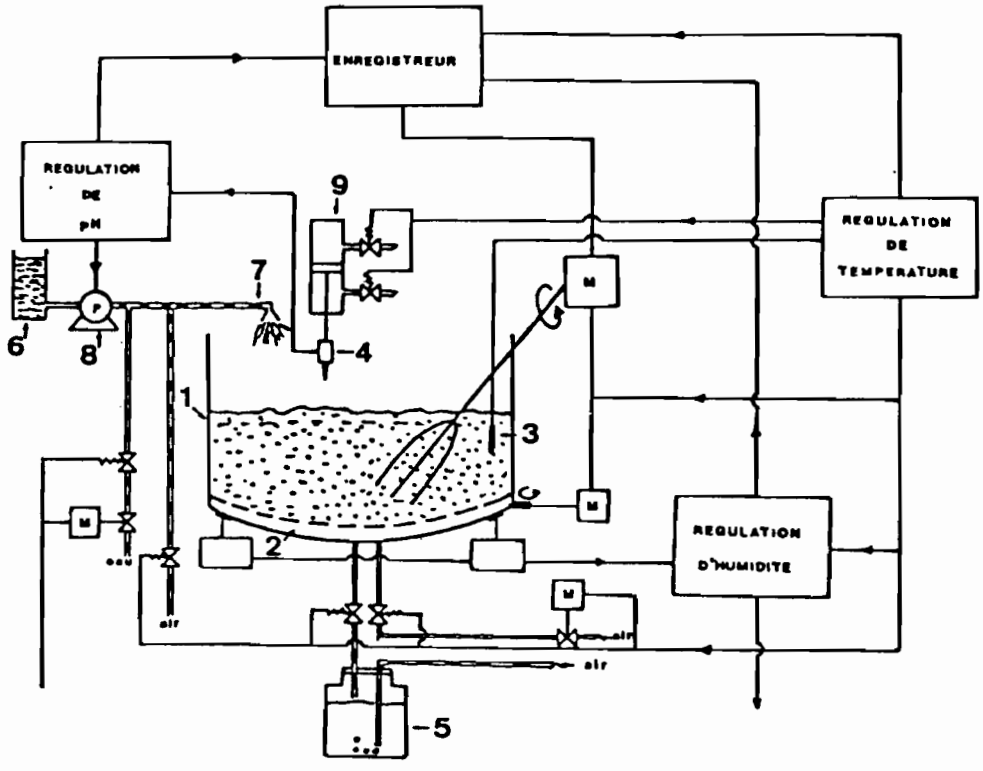
1.4.1.1 Le procédé Koji

A l'origine, le procédé Koji consistait en une culture de moisissures A. oryzae ou A. soyae sur grains de riz, de soja ou de blé préalablement chauffés à la vapeur pour produire des aliments fermentés (Saké, Miso, sauce de soja...). Traditionnellement ce procédé étant statique, le substrat inoculé était réparti sur une épaisseur de 4 à 10 cm dans des paniers de bambous tressés, placés dans une chambre d'incubation à 25-30 ° C ; les plateaux étaient disposés sur plusieurs étages espacés de 10 cm pour permettre l'aération du produit. L'agitation et le malaxage des produits se faisait manuellement.

Les principales applications industrielle du procédé Koji, outre la production d'aliments fermentés déjà cités, visent essentiellement à produire des enzymes (amylases, cellulases, protéases) et des métabolites tels que des mycotoxines (AIDOO et Coll. 1982) ou des acides organiques (RAIMBAULT, 1980).

Il y a dix ans TOYAMA (1976) a décrit un procédé automatique pour la préparation de Koji en vue de produire des cellulases. La technique consistait à cultiver T. reesei sur un milieu solide composés essentiellement d'un mélange de paille de riz et de son de riz (ou de blé), dans un rapport de 8/2 ; l'incubation à 25-30 ° C durait 4 jours. La masse du produit fermenté était extraite dans 3 volumes d'eau ce qui fournissait une solution contenant une forte activité cellulasique.

Récemment la société Japonaise FUJIWARA a développé et commercialisé une série de fermenteurs Koji entièrement automatisés. Le chargement, l'agitation et le déchargement des fermenteurs se faisant automatiquement. Les cuves des fermenteurs en inox permettent de réaliser toutes les opérations de conditionnement du substrat (cuisson, homogénéisation, stérilisation), de fermentation (agitation, régulation des paramètres de croissance) ainsi que la récupération du produit fermenté dans le même appareil. Sur la Fig. 6 on a reproduit le schéma sommaire de cet appareil. La cuve fixe est de forme cylindrique de 2 à 5 m de diamètre à double fond perforé pour l'aération du produit, la hauteur totale de la cuve étant de 2,5 m et la hauteur utile de 1,5



1 Cuve du fermenteur
2 Double-fond perforé
3 Sonde de température
4 Sonde de pH
5 Barboteur
6 Réserve d'urée
7 Spray de refroidissement
8 Pompe à débit variable
9 Vérin de la sonde pH

Figure 7 . Schema du fermenteur agité équipé de ses accessoires , mis au point à l'IRCHA et construit par LOISELET-France (selon DESCHAMPS et coll. 1980).

m. Un système d'agitation rotatif se déplacant tout autour de la cuve permet d'agiter le produit. L'air conditionné par ailleurs est introduit par le fond de la cuve et assure l'apport d'oxygène et les échanges gazeux au cours de la croissance.

1.4.2.2. Le procédé ORSTOM - IRCHA.

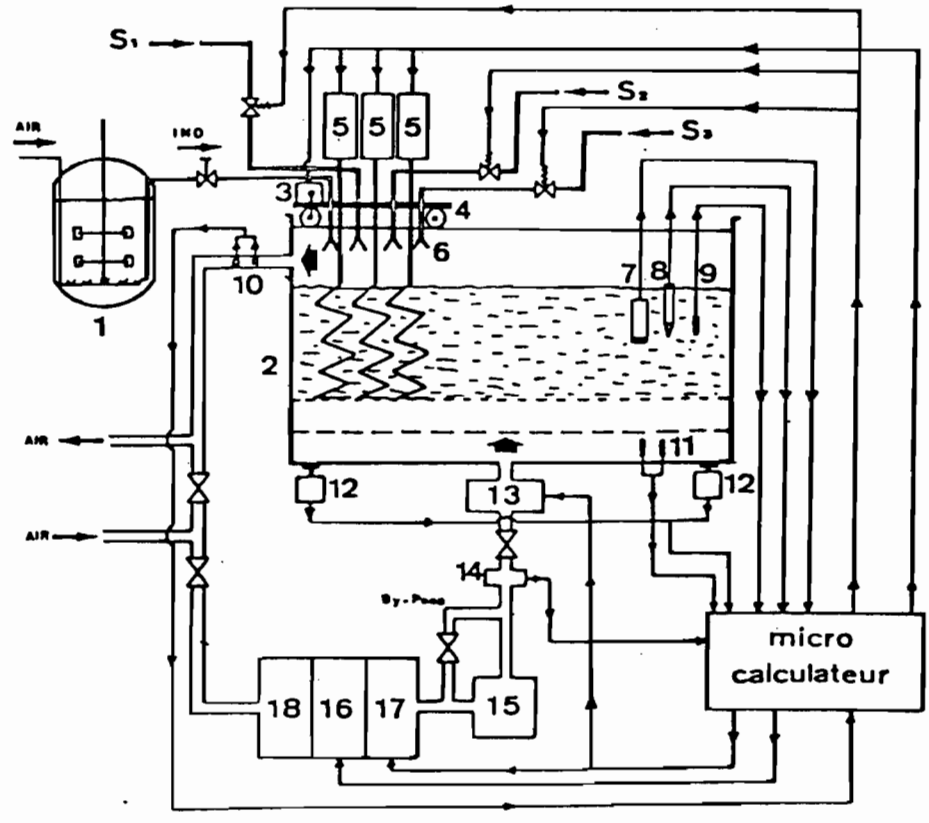
Le dispositif de culture en colonne réactionnelle s'étant révévé difficilement extrapolable, à cause de la grande quantité de calories à évacuer (RAIMBAULT 1980), un nouveau fermenteur pour milieux solides a été mis au point à l'IRCHA (MEYER et DESCHAMPS, 1979). Ce fermenteur est un mélangeur de type pétrin de boulangerie de 1.200 l constitué d'une cuve circulaire tournant librement autour d'un axe vertical et équipé d'un bras d'agitation à trois doigts. La cuve est équipée d'un double fond permettant l'introductrion d'air par l'intermédiaire de trous percés dans le fond de la cuve. Les différentes étapes de cuisson, d'inoculation, d'homogénéisation et de fermentation sont réalisées dans le même appareil. Le schéma de principe de ce fermenteur est représenté sur la Fig. 7.

Au cours de la fermentation qui dure environ 30 h, le controle de la croissance du microorganisme est assuré par les régulations suivantes : température, aération, pH et humidité. L'agitation commandée du produit permet une homogénéisation régulière et évite le dessèchement en surface. Ce procédé a été utilisé pour l'enrichissement en protéines de différents substrats amylacés tels que manioc, pomme de terre, pulpe de féculerie de pomme de terre, bananes, en vue d'obtenir des aliments pour bétail. Il a été utilisé également par la fermentation de la paille de blé (ASTHER, 1982). Après 30 h de culture le produit fermenté est à 63 % d'humidité et contient en moyenne 20 % de protéines et 25 - 30 % de sucres résiduels (DESCHAMPS et Coll. 1980), la bioconversion des carbohydrates en protéines étant de 20 - 25 % (SENEZ, 1978). L'inconvenient du système pétrin réside essentiellement dans les difficultés d'extrapolation à grande échelle compte tenu notamment de la nature des substrats utilisés.

1.4.2.3. Le procédé INRA - DIJON.

A la Station de Génie Microbiologie de l'INRA - DIJON une variante de ce type de fermenteur a été conçue en vue de l'enrichissement en protéines des pulpes de betteraves par fermentation en milieu solide. L'inoculation du substrat se fait avec du mycélium de I. album (DURAND, 1983).

Le fermenteur est de forme parallélépipédique (2m de long sur 0,8 m de large). La partie inférieure de la cuve comporte deux plaques perforées maintenant le substrat et permettant une aération homogène. Un chariot muni d'un



1. Préparation de l'inoculum
2. Cuve
3. Moteur d'avancement du chariot
4. Chariot
5. Moteurs des retourneurs
6. Rampe de spray
7. Sonde d'oxygène
8. Sonde de pH
9. Sonde de température
10. Sonde de température et d'humidité (sortie d'air
11. " " (entrée d'air)
12. Capteurs de contrainte en compression
13. Humidificateur
14. Mesure du débit d'air
15. Ventilateur
16. Batterie froide de l'enceinte de climatisation
17. Batterie chaude " "
18. Filtre à air " "

S_1, S_2, S_3 Apport de différentes solutions

Figure 8 . Schéma du fermenteur agité muni de ses accessoires, mis au point à l'INRA-DIJON et construit par NORDON-France (selon DURAND ; 1983).

retourneur à trois hélices parcourt la longueur du fermenteur en 30 mim environ. Sur le chariot sont fixés des asperseurs permettant l'addition de solutions en cours de culture par l'intermédiaire d'éléctrovannes. L'ensemble du réacteur repose sur quatre capteurs de contrainte en compresssion assurant la messure en continu de la masse. La capacité totale du réacteur permet de travailler sur une tonne de substrat (20 % de MS) sur une hauteur de 1 mètre (Fig. 8).

Différents capteurs sont implantés dans la masse de la culture et sur le circuit d'aération pour permettre les mesures en continu de l'air à l'entrée et en sortie ; débit d'air entrant ; perte de charge ; température de la masse totale dans le temps et analyse des gaz en sortie (oxygène consomé, CO2 produit). Toutes ces mesures sont collectées sur ordinateur. Le logiciel de commande des différents actionneurs permet de contrôler la fermentation en agissant sur : l'avance du chariot, le retourneur, la régulation du pH, la température et l'humidité de l'air et le débit de l'aspersion. Ce fermenteur est un prototype conçu pour être extrapolable industriellement.

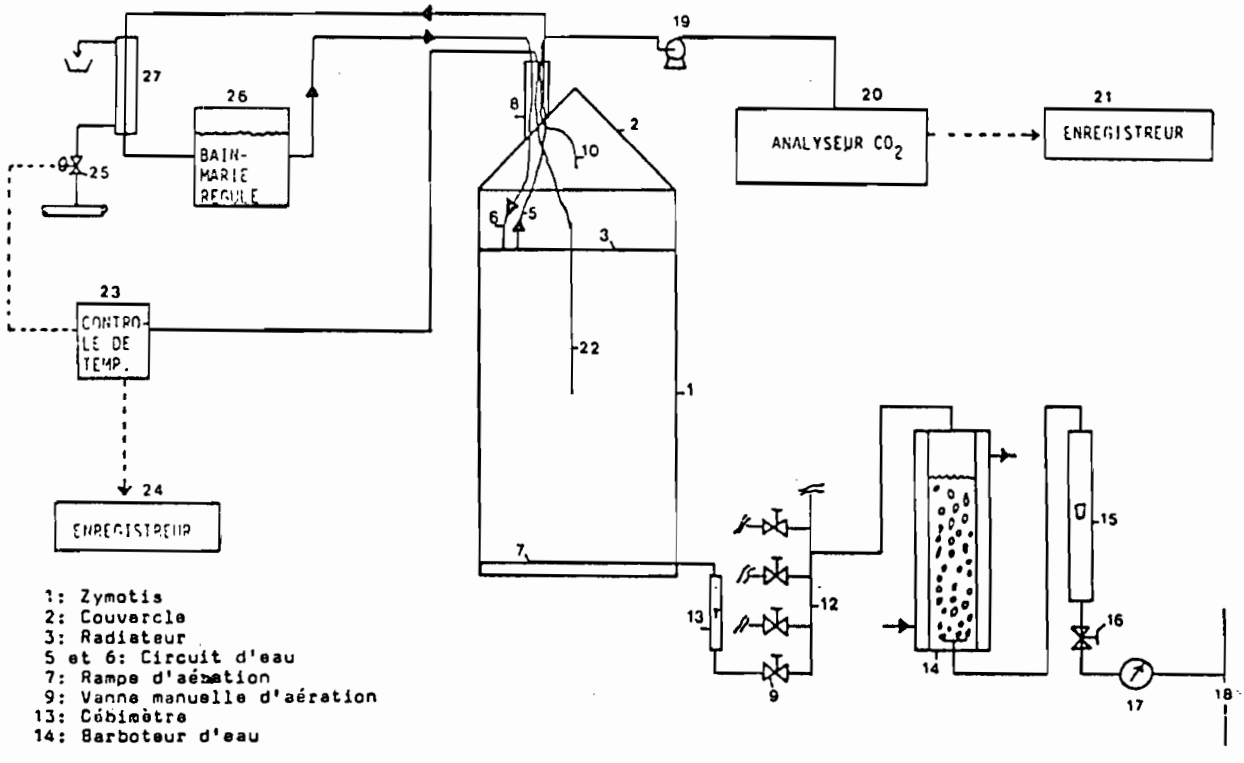


Fig. 9 : Schéma du Zymotis équipé de ses annexes .

1.4.2. Les procédés statiques.

En Indonesie les fermentations en milieu solide des graines de soja ou de riz ainsi que les tourteaux d'arachide sont couramment pratiquées pour la fabrication des produits déstinés à la consommation humaine. Suivant le substrat et les souches utilisés le procédé est différent. Il n' existe pas moins de 24 aliments différents ainsi obtenus par fermentation traditionnelle (SAONO, 1984).

Lors des études réalisées par Raimbault et Germon (1976) pour la mise au point d'une technique de culture en milieu solide statique en vue de l'enrichissement en protéines des substrats amylacés comestibles, il a été démontré que l'un des principaux facteurs limitants pour l'extrapolation de ce procédé était l'élimination des calories dégagées au cours de la croissance du microorganisme. Un nouveau fermenteur équipé avec des échangeurs thermiques a été mis au point pour la fermentation en milieu solide des substrats agricoles. La présence des radiateurs permet le contrôle et la régulation d'une température optimale pour la croissance du microorganisme (PREBOIS et Coll. 1985). Le volume compris entre deux radiateurs détérmine un compartiment bénéficiant d'une aération autonome, assurant ainsi une bonne oxygénation du milieu de culture. Le réacteur étant constitué d'une succession de compartiments ; ce fermenteur est de type modulaire compact et extrapolable dans les trois dimmensions (Fig. 9). Son principe d'utilisation sera développé dans le chapitre Matériel et Méthodes.

1.5. CONCLUSION.

La biomasse cellulosique constituée par les résidus agricoles (paille de céréales, tiges de mais) et par les sous-produits de l'industrie agroalimentaire (pulpes de betterave, bagasse) représente une réserve considérable de sucres fermentescibles. Contrairement aux résidus agricoles qui sont dispersés dans les champs de production, les sous-produits de l'industrie agroalimentaire sont concentrés sur les sites de production. Pour la bagasse en particulier il y a des tonnages importants d'excédents pouvant être valorisés par voie biotechnologique dans le site même de leur accumulation.

Les principaux programmes actuels de valorisation biotechnologique de ces résidus par fermentation en milieu liquide (Natick ou IFP) n'ont pas encore franchi le stade pilote expérimental et rencontrent entre autres inconvenients une limitation de contacts/substrat microorganisme ainsi qu'une forte viscosité des milieux de culture.

Ces dernières années, un essor important des fermentations en milieu solide a abouti à la mise au point de nouveaux procédés pour la production de biomasse ou de métabolites fongiques à partir de substrats amylacés ou cellulosiques. Les applications industrielles des fermentations en milieu solide, limitées auparavant à la production d'enzymes, vont sans doute s'etendre à d'autres métabolites ainsi qu'à la production d'AFEP avant la fin de cette décénnie.

Les microorganismes impliqués dans ces nouveaux procédés de fermentation en milieu solide, agités ou statiques, sont essentiellement des champignons filamenteux. Ceci est dû principalement à deux raisons : Tout d'abord leur mode de multiplication végétative par développement apical leur permet de coloniser rapidement des surfaces importantes. D'autre part les moisissures se développent mieux que les bactéries sur des substrats dont l'humidité est faible.

Le retard important pris par rapport aux fermentations en milieu liquide était dû essentiellement au manque de méthodologie de culture (fermenteurs) ainsi qu'à l'absence d'informations sur la physiologie de la croissance de moisissures.

Notre travail a consisté dans un premier temps à étudier la physiologie de la croissance ainsi que la physiologie de la sporulation d'un champignon filamenteux cellulolytique(Trichoderma harzianum). Sur la base de ces résultats nous avons ensuite étudié le développement du microorganisme sur divers substrats cellulosiques par fermentation en milieu solide en utilisant la méthode de culture en colonne mise au point par RAIMBAULT (1980) au niveau laboratoire et différents types de fermenteurs par la production de cellulases au niveau pilote expérimental.

CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES.

2.1.SCREENING DES SOUCHES CELLULOLYTIQUES.

2.1.1. Microorganismes.

La liste des champignons filamenteux testés pour leur activité cellulasique est portée sur le Tableau IV. Il s'agit de souches provenant de collections internationales et de souches sauvages que nous avons isolées à partir de différents échantillons de sols ou de débris végétaux.

2.1.2. Milieux de culture et dosages.

Les souches ont été repiquées régulièrement tous les six mois sur le milieu "Bacto-malt-agar" (Difco. ref. 024). Elles sont incubées pendant 7 jours à 29°C et peuvent alors être conservées à 4°C pendant environ 6 mois.

La présence de cellulases a été testée sur des cultures obtenues sur milieu gélosé de MANDELS et WEBER (1969), contenant 0,75 % de cellulose microcristalline "Avicel". Le réactif iodo-ioduré (solution de lugol) est utilisé pour mettre en évidence la zone d'hydrolyse de la cellulose qui apparait autour de la colonie.

TABLEAU IV : Collection et provenance des souches de champignons filamenteux utilisés pour cette étude (ATCC : American Type Culture Collection ; CCM : Czechoslovak Collection of Microorganisms).

N° ORSTOM	NOM DE L'ESPECE	PROVENANCE	N° ORSTOM	NOM DE L'ESPECE	PROVENANCE
Tl 1	Trichoderma longibranchiatum	ATCC 26921	Af 21	Aspergillus flavus	CCMF - 449
Tl 2	Trichoderma longibranchiatum	ATCC 28217	An 22	Aspergillus niger	CCMF - 330
Tv 3	Trichoderma viride	CCMF - 486	Ap 23	Aspergillus parasiticus	CCMF - 550
Tr 4	Trichoderma reesei	CCMF - 521	Av 24	Aspergillus versicolor	CCMF - 620
Tr 5	Trichoderma reesei	CCMF - 522	Aw 25	Aspergillus wentii	CCMF - 459
Tr 6	Trichoderma reesei	CCMF - 560	A 10	Souche sauvage amylolytique	sol, Sénégal
Ff 7	Fusarium fusaroides	CCMF - 166	C 3	" " cellulolytique	" "
Ao 8	Aspergillus oryzae	CCMF - 172	C 4	" " "	" "
Tk 9	Trichoderma koningii	CCMF - 544	C 8	" " "	" "
As 10	Alternaria solani	CCMF - 167	C 14	" " "	" "
Ar 11	Alternaria radicina	CCMF - 197	C 19	" " "	" "
Ar 12	Alternaria radicina	CCMF - 198	C 20	" " "	" "
Ta 13	Trichoderma aureoviride	CCMF - 541	C 21	" " "	" "
Th 14	Trichoderma hamatum	CCMF - 541	C 24	" " "	" "
Th 15	Trichoderma harzianum	CCMF - 470	C 29	" " "	" "
Tp 16	Trichoderma pilluliferum	CCMF - 573	C 30	" " "	" "
Ta 17	Trichoderma asturnisporum	CCMF - 561	C 36	" " "	" "
Tv 18	Trichoderma viride	CCMF - 486	C 38	" " "	" "
As 20	Aspergillus aculeatus	CCMF - 595	C 39	" " "	" "

Le dosage des cellulases a été effectué sur des cultures de 66 h en milieu liquide à 1 % de cellulose selon la méthode standardisée par MANDELS et Coll (1976). Les cultures des différentes souches ont été réalisées dans des fioles coniques (Belco glass Inc. réf. 2.510) de 300 ml contenant chacune 100 ml de milieu de culture. Les fioles ont été inoculées avec une quantité connue de conidiospores et incubées à 29 ° C sur agitateur. Les dosages suivants ont été effectués après homogénéisation des cultures à l'ultra-turrax : Activité Carboxyméthyl Cellulose (ACMC) et Activité Papier Filtre (APF) selon MANDELS et Coll (1976), sucres Réducteurs (SR) selon MILLER (1959), sucres Totaux (ST) selon DUBOIS et Coll. (1956) et Protéines (P) selon LOWRY et Coll. (1961).

La mesure de la croissance apicale a été réalisée selon la technique de RYAN et Coll. (1943) sur les trois milieux suivants : milieu "Malt-agar-Difco", milieu de MANDELS et WEBER (1969) contenant 0,75 % de cellulose et milieu de Czapek et Dox dans lequel on a remplacé le saccharose par du glucose.

Les conidiospores ont été obtenues à partir de cultures sur un milieu liquide de Czapek et Dox modifié. Ce milieu a été réparti en fioles coniques de 125 ml, contenant 20 ml de milieu. L'inoculation a été réalisée avec 3 . 10^7 conidiospores/g de substrat et les cultures ont été maintenues à 29 ° C sans agitation pendant 10 jours. Les cultures ont été ensuite homogénéisées et convenablement diluées et les conidiospores comptées sur cellule de Malassez. Les résultats sont exprimés en nombre de conidiospores produites par gramme de substrat carboné présent initialement dans le milieu de culture (Is) et en nombre de conidiospores par ml de milieu de culture (Ps).

2.2.DESCRIPTION DES IRICHODERMA .

2.2.1. Caractères morphologiques.

La description des caractères morphologiques des souches de Trichoderma a été faite à partir de cultures de 7 jours à 29°C sur Malt-agar. La croissance apicale du mycélium a été mesurée comme décrit précédement (Cf. 2.1).

2.2.2. Caractères physiologiques.

Pour l'étude de la physiologie et du métabolisme des Trichoderma on a utilisé un milieu de culture entièrement synthétique dont la composition est donnée sur le Tableau V. La solution de vitamines et la source de carbone sont stérilisées par filtration sur filtre Millipore (0,45 μ) ; le milieu minéral est autoclavé à 110°C pendant 30 min.

TABLEAU V : Composition du Milieu Minéral de base (MMB) utilisé pour la description des caractères physiologiques et nutritionnels de Trichoderma. (milieu No. 1).

(NH4)2 SO4	1,00 g
Urée	0,30 g
KH2 PO4	1,30 g
Na2 HPO4	0,12 g
Mg SO4	0,30 g
Ca C12	0,30 g
Source de Carbone	2,00 g
Solution d'oligoéléments (*)	1,00 ml
Solution de vitamines (**)	1,00 ml
Eau distillée qsp.	1000 ml
pH	5,6

(*) Solution d'oligoéléments : FeSO4,7H2O : 5,0 g ; Mn SO4,H2O : 1,6 g ; Zn SO4,7H2O, 1,4 g ; CaC12 : 2,0 g ; Eau distillée : 1000 ml.

(**) Solution de vitamines : Biotine : 20 mg ; Ac. folique : 20 mg ; Pyridoxine-HCl : 100 mg ; Thiamine-HCl : 50 mg ; Riboflavine : 50 mg 3 Vitamine B,12 : 1 mg ; Ac. p. aminobénzoique : 50 mg ; Ac. lipoique : 50 mg ; Eau distillée : 1000 ml.

Le milieu synthétique est réparti dans des fioles coniques de 125 ml (Belco ref. 2510) à raison de 50 ml / fiole. Nous avons utilisé 2 g de glucose comme source de carbone pour l'étude de la croissance de T. harzianum en fonction du pH (1 à 10), de la température (20 à 40°C), et de la concentration en NaCl (1 à 100 g/l).

Pour la détérmination des coefficients de croissance de T. harzianum (taux et rendement de croissance) le milieu No. 1 a également été utilisé avec une concentration de 5 g/l de glucose. Les cultures sont réalisées dans un fermenteur Biolafitte (paragraphe 2.5).

2.2.3. Caractères Biochimiques et Nutritionnels.

Le caractère de prototrophie a été défini sur le milieu synthétique contenant du glucose, dépourvu de vitamines. Les substrats carbonés suivants ont été testés en présence de vitamines : D-arabinose, L-arabinose, D-fucose, L-fucose, D-ribose, -D-fructose ; cellobiose, galactose, maltose, mannitol, Carboxyméthyl-cellulose (CMC), glucose, xylose, lactose, saccharose, cellulose, amidon eu cellulose microcristalline. L'inoculation des milieux de culture se fait avec une suspension de conidies (3. 10^7 conidiospores/g de sucre).

La température d'incubation est de 29 ° C pour l'ensemble des souches. Les cultures ont été agitées à 200 tours/min. Après 66 heures d'incubation, les cultures sont homogénéisées à l'ultra-turrax puis centrifugées à 6.000 t/min, pendant 15 min. Les culots sont repris et lavés deux fois à l'eau distillée (fig. 10). Dans les culots ainsi lavés, on dose les protéines au Technicon selon la technique de LOWRY et Coll. (1951). Les sucres réducteurs résiduels ainsi que les activités amylasiques et Carboxyméthyl Cellulasiques (ACMC) sont dosés dans le surnageant au moyen du Technicon selon la méthode de PARK et JOHNSON (1949).

Pour doser les activités amylasiques, à 1 ml du surnageant on ajoute 4 ml d'une solution tampon Citrate Phosphate 0,05 M pH = 4,5 renfermant 1 % d'amidon. On incube à 50 ° C pendant 15 min. ; on arrête la réaction par un traitement de 5 min à 100°C et on dose les sucres réducteurs par la méthode de PARK et JOHNSON (1949). (ALAZARD, 1979).

TABLEAU VI : Composition des différents milieux de culture utilisés pour la production de conidiospores de *T. harzianum*.

Composition des Milieux de sporulation (g/l)						
Nº Milieux	Farine Manioc	KH_2PO_4	$(NH_4)_2SO_4$	Urée	Agar	pH
1	1	0,04	0,08	0,02	15	5,6
2	5	0,20	0,40	0,10	15	5,6
3	10	0,40	0,80	0,20	15	5,6
4	15	0,57	1,14	0,29	15	5,6
5	20	0,80	1,60	0,40	15	5,6
6	25	1,00	2,00	0,50	15	5,6
7	33	1,33	2,66	0,66	15	5,6
8	40	1,60	3,20	0,80	15	5,6
9	50	2,00	4,00	1,00	15	5,6
10	100	4,00	8,00	2,00	15	5,6

2.3. CONIDIOGENESE DE I. HARZIANUM .

2.3.1. Milieux de production des conidiospores.

- En Erlenmeyer.

La composition des différents milieux de culture utilisés pour étudier l'influence de la concentration de la source de carbone est reportée sur le Tableau VI. Ces milieux ont été répartis dans des erlens de 250 ml à raison de 25 ml/erlen et stérilisés à l'autoclave à 110°C pendant 30 min. Pour l'ensemble des milieux nous avons utilisé la farine de manioc comme source de carbone.

- En fermenteur à disques.

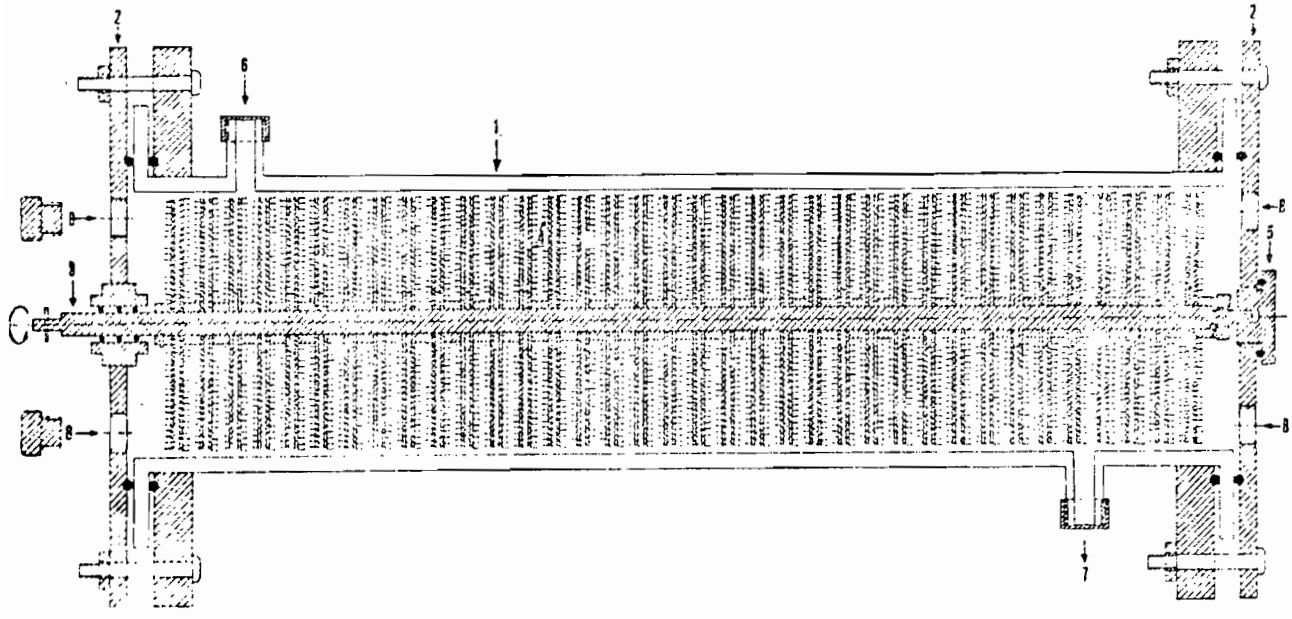
Sur le Tableau VII on a reporté la composition des milieux de culture qui ont été utilisés pour l'étude cinétique de la production de conidiospores en fonction du temps. Le fermenteur contenant 1 litre du milieu de culture a été autoclavé à 110°C pendant 45 min.

TABLEAU VII: Composition des différents milieux de culture utilisés pour l'étude de la production de conidiospores de en erlen et en fermenteur à disques.

Compostion des Milieux de sporulation (g/l)								
Milieux	A	B	C	D	E	F	G	H
Manioc	100	40	20	40	40	40	40	40
KH_2PO_4	4	2	1	1	1	0,5	4	2
$(NH_4)_2SO_4$	8	4	4	2	1	0,5	8	4
Urée	2	1	1	1	1	1	2	1
$CaCl_2$	0	0	0	0	0	0	0	1
Agar	20	15	15	15	15	15	15	15
Eau (ml)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
pH	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6

2.3.2. Description du Fermenteur à disques.

Le fermenteur à disques que nous avons utilisé est décrit sur la Figure 11. Il a été équipé de 35 disques de 5 cm de diamètre développant une surface utile de 4.960 cm2. Les disques sont constitués de deux grilles d'acier de 2 mm d'épaisseur et de maille de 4 mm. L'espacement entre les disques a été de 10 mm. Le fonctionnement de ce fermenteur a été décrit par ailleurs (RAIMBAULT et ROUSSOS ; 1985) et a fait l'objet d'un dépot de brevet en France No. 85.08555.



1 : Cuve
2 : Platine
3 : Axe
4 : Disques
5 : Support de l'axe
6 : Entrée haute de la cuve
7 : Sortie basse de la cuve
8 : Entrées et sorties fixes

Fig. 11 Schéma détaillé du fermenteur à disques

2.3.3. Inoculation des milieux de culture.

Sauf indication contraire, les milieux gélosés ont été inoculés dans la masse. Pour cela, les milieux préalablement stérilisés ont été réfroidis à 40°C et inoculés avec une suspension de conidiospores de *T. harzianum* de concentration connue. Nous avons toujours utilisé une concentration de 3 . 10^7 conidies par gramme de substrat carboné (ROUSSOS et RAIMBAULT 1982). Le milieu a été agité pour obtenir une inoculation homogène. Pendant que le milieu inoculé était encore en surfusion, nous avons prélevé des échantillons d'environ 25 g des milieux de culture du fermenteur et les avons introduit stérilement dans des erlens de 250 ml, préalablement stérilisés. Il restait environ 600 ml de milieu dans le fermenteur.

2.3.4. Température d'incubation.

Les erlens contenant le milieu de culture inoculé ont été incubés à la température ambiante dans une pièce non climatisée et à la lumière du jour. Les variations nycthémérales de température pendant la période de l'expérimentation, étaient comprises entre 22 et 29°C.

TABLEAU IX : Composition des milieux utilisés pour la culture et la production de cellulases de *T. harzianum*.

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

2.3.5. Aération des cultures.

Pour les cultures en erlen, il n'y a pas eu d'aération forcée. Par contre, les cultures en fermenteur ont été aérées pendant la période d'incubation par un flux d'air stérile, humidifié par barbotage. Le débit d'aération sauf indication contraire a été maintenu constant à 100 l/h.

2.3.6. Récolte des conidiospores.

Après 8, 13 ou 18 jours d'incubation, on a récolté les spores en introduisant dans le fermenteur 2 litres d'eau additionnée de tween 80 (1 ml) et en maintenant une rotation rapide des disques pendant 10 min. La suspension de spores a été ensuite récupérée pour compter le nombre de conidiospores par la méthode de comptage microscopique direct après dilution.

Dans le cas des erlens, les cultures ont été arrêtées après 3, 5, 7, 12, 14, 20 et 25 jours et on a introduit 100 ml d'eau additionnée de tween 80 (0,1 ml). A l'aide d'un bareau aimanté et par agitation magnétique pendant 10 min., les conidiospores produites en surface ont été mises en suspension dans laquelle on a réalisé le comptage microscopique direct après dilution.

2.3.7. Conservation des conidiospores.

Après la récolte des conidiospores de *T. harzianum* celles-ci ont été conservées de deux manières : humides ou sèches. La première consiste à conserver les suspensions au réfrigérateur à + 4°C pendant plusieurs semaines. La seconde fait appel à l'utilisation d'un rotavapor pour l'évaporation de l'eau sous vide à différentes températures (de +30 à +60° C). Pour faciliter la récupération et maintenir un taux élevé de viabilité des conidiospores ainsi séchées, un support insoluble et préalablement stérilisé (bagasse 15g/l) a été incorporé dans la suspension de conidiospores avant le séchage (ROUSSOS et Coll. 1985).

Les différents essais de séchage ont été réalisés le même jour avec 100 ml d'une suspension de conidiospores pour chaque essai.

2.3.8. Viabilité et pouvoir de germination.

Les conidiospores séchées au rotavapor ont été remises en suspension dans une solution aqueuse contenant du tween 80 (0,1 %) et agitées pour obtenir une suspension homogène. Plusieurs dilutions ont été réalisées à partir de ces suspensions. Pour vérifier la viabilité des conidiospores après séchage, nous avons inoculé avec 0,2 ml des suspensions dilutions ainsi obtenues, des boîtes de Pétri contenant le milieu de DOUGLAS et Coll. 1979 (Tableau VIII). L'incubation

des cultures à 29 ° C a duré une semaine avec des lectures quotidiennes.

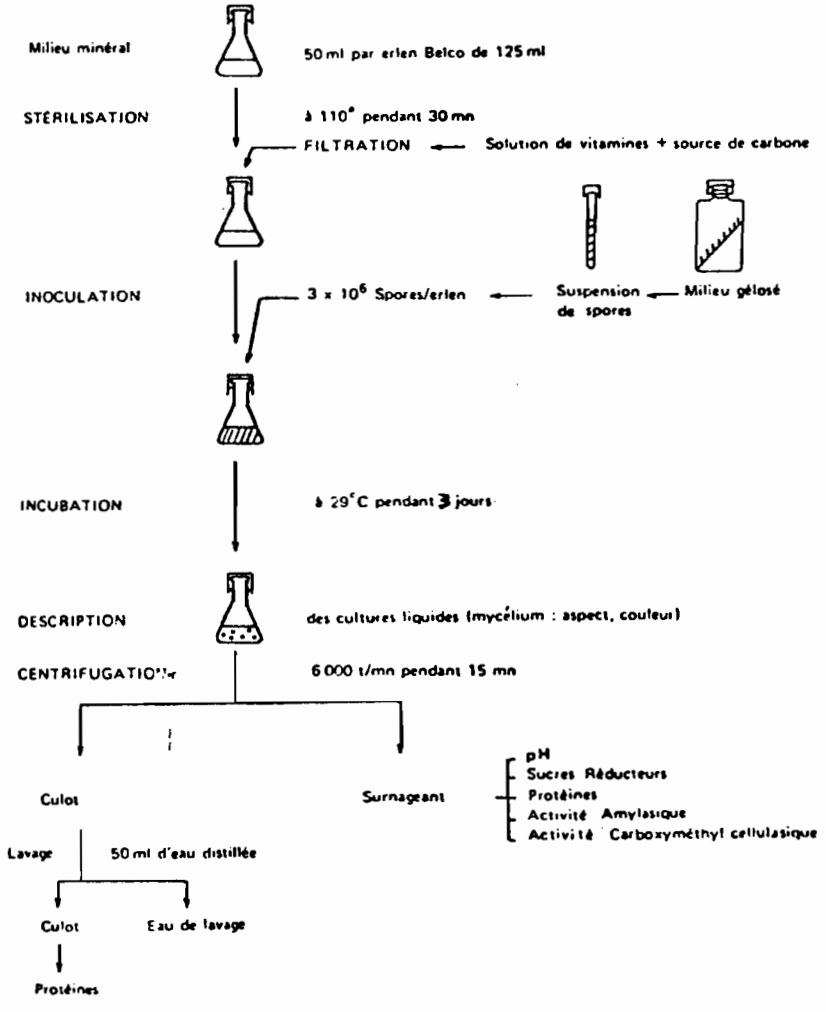


Fig. 10 : Schéma représentant les différentes étapes expérimentales pour l'étude des caractères biochimiques et nutrionnels.

La cinétique de germination des conidiospores a été réalisée en milieu liquide agité à 29 ° C sur un milieu synthétique (tableau V).Des observations au microscope ont été réalisées sur des prélèvements réguliers afin d'établir le pourcentage de germination. Nous avons considéré qu'une conidiospore avait germé lorsque la taille du tube germinatif était supérieure ou égale au diamètre le plus grand de la conidiospore (FROSARD et OERTLI, 1982).

TABLEAU VIII : Composition du milieu de culture utilisé pour la mesure de viabilité des conidiospores de I. harzianum

glucose	5 g
Peplone	5 g
Mg SO4	0,5 g
KH2PO4	1 g
Rose de Bengal	25 mg
Agar	15 g
Eau	1000 ml
pH	5,6

Le milieu est stérilisé à 110°C pendant 30 min puis distribué en boîtes de Pétri.

2.4.FERMENTATIONS EN MILIEUX LIQUIDES.

Un fermenteur Biolafitte (Poissy, France) de 2 litres contenant 1.250 ml du milieu liquide de MANDELS et WEBER (1969) additionné de 3 ml d'huile de colza (agent antimousse) et stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 45 min., a été inoculé avec une suspension de conidiospores à raison de 3 X 10^7 conidiospores/g de substrat carboné. Pendant la fermentation, la température a été maintenue à 29 ° C, l'aération à 10 l/h et l'agitation à 500 tours/min ; le pH n'a pas été régulé, mais sa valeur a été notée à chaque échantillonage.

Pour la production de cellulases de I. harzianum cultivé sur pulpes de betterave par fermentation en milieu liquide nous avons utilisé un milieu de culture différent de celui de MANDELS et WEBER (1969). La composition de ce milieu est donnée sur le Tableau IX.

Mesure des paramètres : aux temps choisis, on a fait des prélèvements de 10 ml dans le fermenteur. L'évolution de l'inoculum a été suivie par observation au microscope, après coloration au bleu cotton. Les prélèvements ont été conservés au congélateur puis analysés après décongélation et broyage à l'Ultra-Turrax.

2.5. FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE.

2.5.1. En colonne.

Les cultures ont été réalisées dans les dispositifs de colonnes décrits par RAIMBAULT et ALAZARD (1980) (photos 1 et 2) en utilisant la bagasse séchée, le son de blé, les pulpes de betterave ou un mélange de bagasse (80 g) et son de blé (20 g) comme substrats solides. La composition de la solution minérale est donnée dans le Tableau IX.

Le prétraitement a été réalisé de la façon suivante : à 100 g de substrat sec finement broyé, on a ajouté la solution minérale pour amener l'humidité du produit à 50 % ; après homogénéisation on a autoclavé à 110°C pendant 1 h. Le substrat prétraité est alors inoculé avec une suspension concentrée de conidiospores de façon à obtenir une concentration finale de 3 . 10^7 conidiospores/g de substrat poids sec et une humidité totale d'environ 70 %.

Le milieu de culture solide ainsi obtenu est réparti dans les incubateurs à raison de 18 g par colonne, et incubé dans un bain-marie thermostaté à 29°C. Chaque incubateur a été aéré par de l'air saturé d'eau à raison de 5 l/h.

Le produit contenu dans chaque incubateur a été pesé (poids total humide). Le contenu des colonnes a été dilacéré à l'aide d'une spatule et homogénéisé ; un échantillon de 2,5 g a été prélevé et placé dans un erlen de 150 ml et immédiatement congélé pour analyses ultérieures. Le reste de l'échantillon a servi à la mesure du poids sec et pour les observations microscopiques afin d'apprécier l'évolution morphologique de l'inoculum en fonction du temps.

2.5.2. En zymotis (du Grec = fermenteur).

Un Biofermenteur Statique (Zymotis) pour la culture de champignons filamenteux en milieu solide sur substrats amylacés a été mis au point précédemment pour des produits amylacés (PREBOIS et Coll. 1985). Ce zymotis, d'un volume utile d'environ 100 litres, a été utilisé pour la production de cellulases de I. harzianum au niveau pilote. Les paramètres ont été calculés par extrapolation des résultats de la fermentation de la bagasse en colonne.

Le zymotis est décrit sur la figure 9, il est constitué d'une cuve parallélépipédique contenant dix plaques de réfrigération.

Le remplissage du Zymotis se fait en garnissant chaque compartiment avec le substrat prétraité et conditionné. Le substrat est progressivement et régulièrement tassé lors de son introduction dans le Zymotis. Le fermenteur a été testé à des capacités de 4 8 10 et 12 Kg de substrat (mélange de

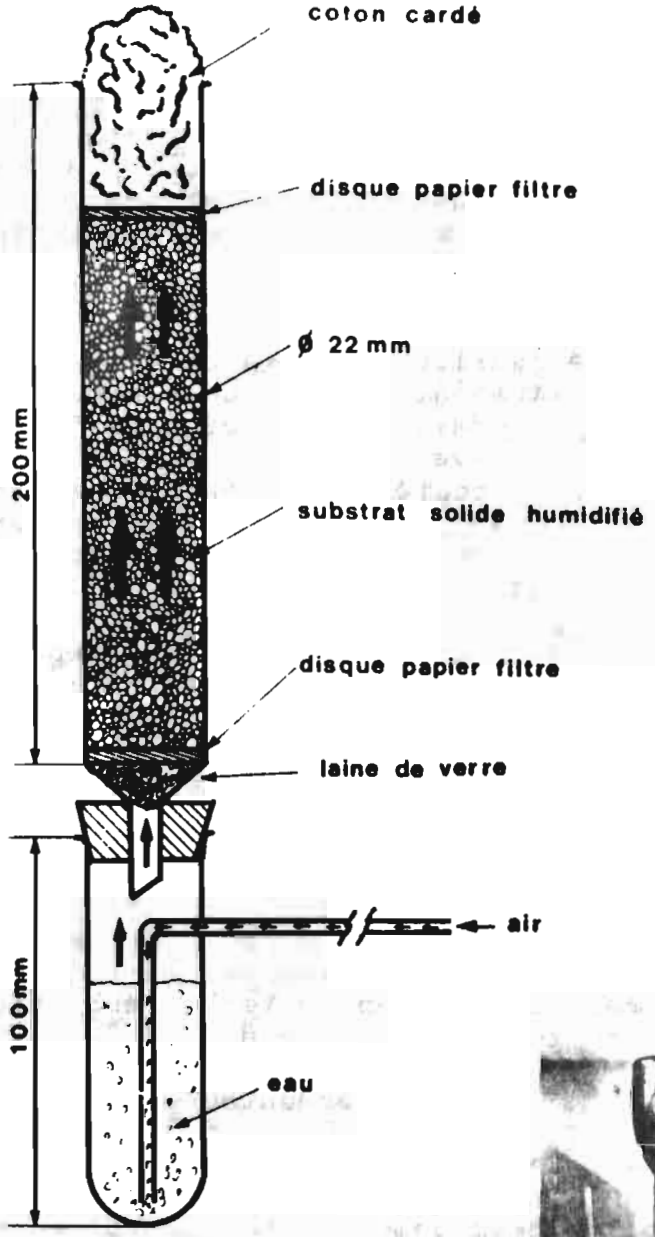


Photo 1 - Dispositif d'incubation

a - vanne à aiguille pour ajuster le flux d'air
b - débit-mètre
c - contrôle du débit d'air
d - incubateur
e - thermostat

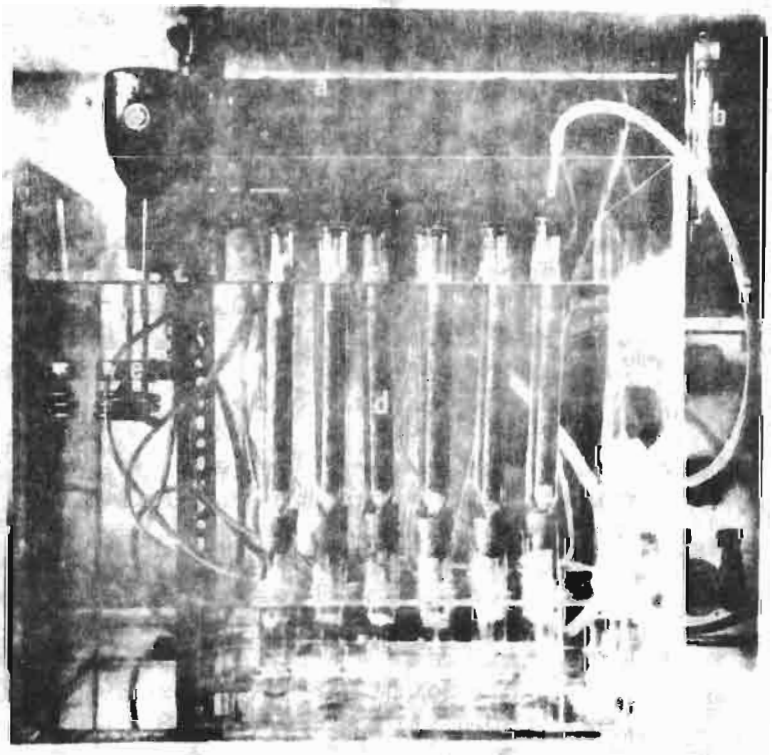


Photo 2 - Equipement de 24 dispositifs d'incubation

bagasse et de son de blé).

La température du circuit d'eau a été réglée à 29°C pendant les 15 premières heures ; après cette période elle a été réglée à 27°C. Le débit d'air dans chaque compartiment a été fixé à 300 l/h/Kg de substrat sec pendant les 16 premières heures de fermentation. Il a été ensuite fixé à 600 l/h/Kg de substrat. Une télésonde de température, placée au sein du produit, a permis de mesurer et de contrôler en continu l'évolution de l'échauffement du produit. Un tuyau souple introduit à l'interieur du couvercle du Zymotis raccordé à un analyseur de CO2 a permis de mesurer en permanence le pourcentage de CO2 dans l'air de sortie du fermenteur.

Au cours de la fermentation des échantillons du produit ont été prélevés et traités selon le protocole décrit sur la fig. 12.

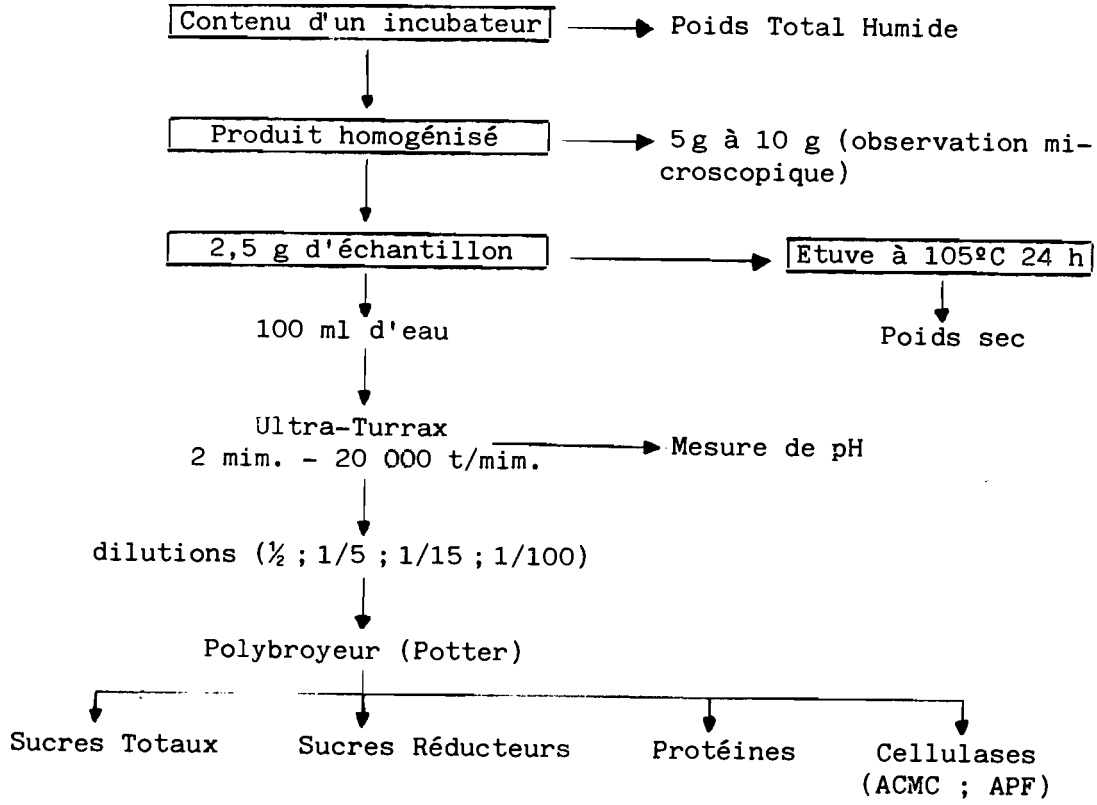


FIg. 12 : Schéma protocole de traitement et analyses des échantillons de bagasse fermentée.

2.6. EXTRACTION ET CONSERVATION DE LA FRACTION SOLUBLE.

2.6.1. Pressage

La totalité du produit fermenté est récupérée en fin de fermentation ; après une homogénéisation par malaxage, il est réparti en lots de 500 g dans des sacs de polyéthylène étanches. La totalité des fractions ainsi confectionnées est alors traitée à la presse hydraulique dans les quelques heures qui suivent l'arrêt de la fermentation.

La presse que nous avons utilisée a été gracieusement mise à notre disposition par le Directeur du Centre Technique de la Canne et du Sucre (CTCS) de la Martinique. Il s'agit d'une presse hydraulique de fabrication francaise (PINETTE EMIDECAU S. A. 71 CHALON / SAONE) de type 45 T (Photo No. 2). Cette presse est couramment utilisée dans les sucreries pour déterminer la concentration en saccharose de la canne à sucre broyée. Elle peut exercer une pression maximale de 250 Bar pendant quelques minutes. La durée de pressage peut être réglée automatiquement par un chronomètre incorporé. Le produit à presser est placé dans une cellule de pressage ouverte de 20 cm de diamètre et munie de nombreux orifices de 1 mm de diamètre.

Le produit fermenté (500 g) placé à l'intérieur de la cellule a été pressé pendant 2 mn.30 à 220 Bar ou plus généralement pendant 1 mm à 230 Bar. Nous avons obtenu ainsi deux fractions. La fraction soluble (jus) contenant les cellulases ainsi que les protéines solubles et les sels minéraux résiduels (FS) ; la fraction insoluble composée essentiellement par le substrat non utilisé ainsi que par le mycélium (FI).

2.6.2. Conservation

La fraction soluble a été directement récupérée dans un récipient de 20 litres . Après élimination des particules solides par filtration, le volume total a été mesuré. Cette fraction liquide a alors été conservée soit par réfrigération à + 4°C, soit par congélation, soit par lyophylisation.

La lyophylisation a été réalisée dans un appareil DURA DRING à deux plateaux d'une capacité d'élimination de 3,8 l d'eau par cycle de fonctionnement. Afin de diminuer la durée de la lyophilisation nous avons toujours introduit la solution déjà congélée. Chaque cycle de lyophilisation a été réalisé avec 3.5 l de la F.S. pendant 6 jours. La poudre sèche a été placée dans des récipients à fermeture étanche et conservée au réfrigérateur.

Photo 3 : Vue générale de la presse hydraulique en fonctionnement .

a = Piston
b = Cuve
c = Manomètre
d = Chronomètre

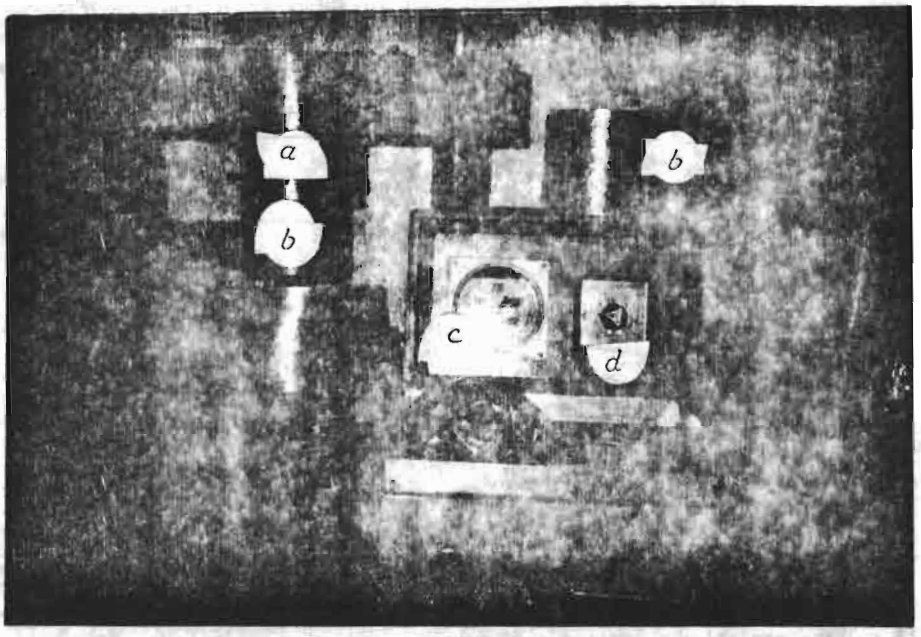


Photo 4 : Vue partielle de la presse hydraulique.

2.7. ENSILAGE DE LA FRACTION INSOLUBLE.

La fraction insoluble du produit obtenu après extraction des cellulases par pressage du produit fermenté, contenait 55 % de matière sèche. Pour les études d'ensilage nous avons ramené la matière sèche (M.S.) aux environs de 45 et 35 % par addition d'eau avant la fermeture des silos. Les différents conservateurs étudiés ont été :

- La Mélasse de canne à sucre (à 5 g 0/00).
- L'"Ensipron" qui est un Mélange d'acide et de formol (à 3 et 4 g 0/00).
- Le "protéinor" qui est un Bioconservateur à base de ferments lactiques (à 2 ; 3 et 4 g 0/00).
- Le "A.I.V." qui est un mélange d'acide chlorhydrique concentré (7 volumes) et d'acide sulfurique concentré (1 volume) (à 10 g 0/00).

Le conservateur a été dilué avec la quantité d'eau nécéssaire puis ajouté au résidu de pressage dans un mélangeur pétrin pendant 5 mn. Le produit est alors ensaché et conservé pendant plusieurs mois puis analysé.

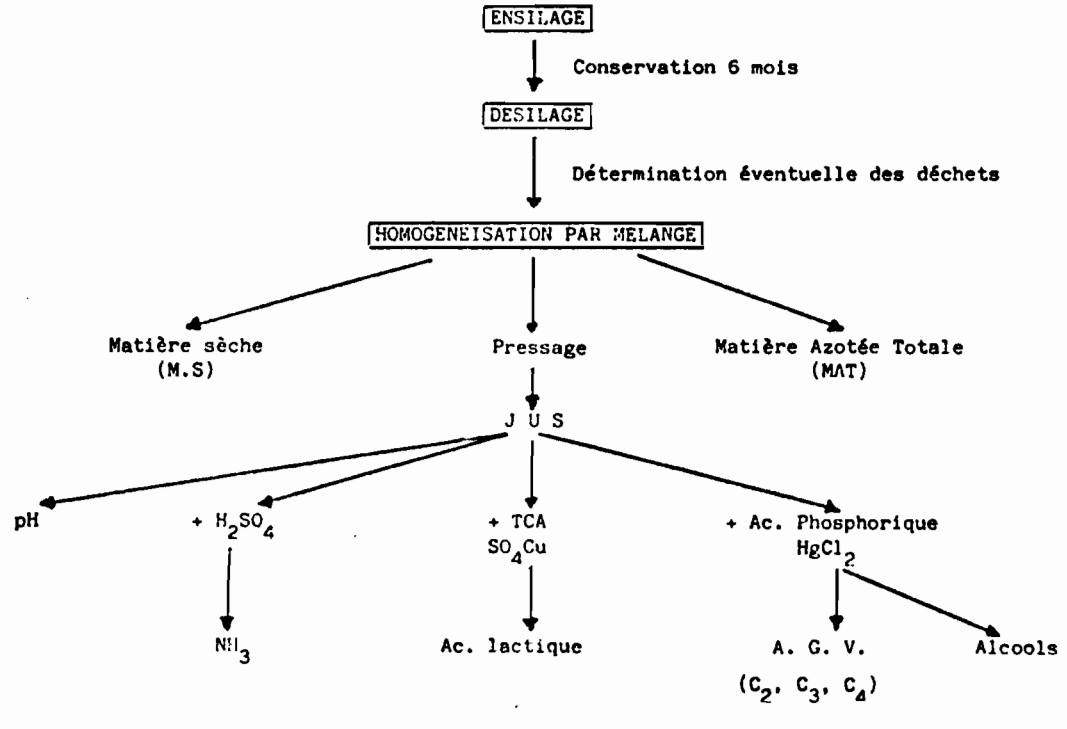


Figure 13 : Représentation schématique des différentes étapes de traitement des échantillons d'ensilage pour les analyses chimiques.

Un bilan matière a été réalisé par pesée des quantités ensilées et des quantités désilées après 5 mois. Les analyses chimiques réalisées au Laboratoire de Zootechnie de l'INRA Guadeloupe sur les produits frais et les produits conservés pendant 5 mois sont données sur le schéma de la fig. 13.

2.8. ANALYSES ET EXPRESSION DES RESULTATS.

2.8.1. Microflore hétérotrophe aérobie de la bagasse .

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

Milieux de comptages des différentes microflores.

a) Bactéries Totales :

Bacto peptone 10 g ; Glucose 5 g ; Extrait de levure 3 g ; Agar 15 g ; Eau 1000 ml ; pH 7,2.

b) Microflore Fongique Totale.

Extrait de malt 15 g ; Agar 15 g ; Eau 1000 ml ; pH 5.

c) Champignons Cellulolytiques. Nous avons utilisé le milieu de MANDELS et WEBER. (1969)

Les différents milieux ont été stérilisés 30 min. à 110 ° C. Pour les 2 derniers milieux on a ajouté 10 ml/l de Streptomycine à 80 U après stérilisation. Les milieux ont été ensuite répartis en Boîtes de Pétri.

2.8.2. Production de conidiospores de T. harzianum.

Deux ml d'une suspension homogène de conidiospores sont convenablement dilués afin d'obtenir entre 30-60 conidiospores par unité de comptage d'un hématimètre type Malassez. Le comptage a été réalisé en calculant le nombre moyen (n) à partir de 20 unités de comptage. Le nombre de conidiospores contenus par ml d'une suspension (N) est ensuite calculé en utilisant la formule suivante :

$$N = n \cdot F \cdot 10^5$$

- N nombre de conidiospores /ml de la suspension initiale
- n nombre moyen de conidiospores dans 1 cellule de comptage
- F facteur de la dilution (inverse de la dilution)

Nous avons exprimé les résultats de deux façons : Tout d'abord, nous avons donné le nombre total de conidiospores produites par incubateur (erlen ou fermenteur). Ce résultat est suivi de l'indice de sporulation ($\mathfrak{Q}$) qui représente le nombre de conidiospores produites par gramme de substrat Carboné initialement présent dans le milieu de culture.

2.8.3. Production de cellulases de T. harzianum.

Les échantillons (2.5 g Poids humide) traités selon le protocole décrit sur la fig. 12 sont décongélés. On ajoute 100 ml d'eau distillée ; la suspension est homogénéisée à l'Ultra-Turrax pendant 1 min ; le pH est alors mesuré. A partir de cette suspension, différentes dilutions (1/2, 1/5, 1/15 ou 1/100) ont été réalisées en vue d'effectuer les dosages suivants :

- Sucres réducteurs au DNS selon Miller (1959) : 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 transformés en aldéhydes. Une couleur jaune-brun se développe. La lecture se fait à 575 nm. Le glucose est utilisé comme standard.

- Sucres Totaux à l'anthrone selon DUBOIS et Coll. (1956). 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. Le glucose est utilisé comme standard.

- Protéines au Folin selon LOWRY et Coll (1951). Après mise en solution des protéines par chauffage en milieu alcalin, on les dose avec le réactifs de Folin-Ciocalteu. La coloration bleue obtenue est le résultat d'une réaction de Biuret (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. L'albumine du serum de bovin est utilisée comme standard.

- activités cellulasiques selon MANDELS et Coll. (1976). Sous l'action des cellulases, la cellulose soluble (Carboxyméthyl-cellulose) ou cellulose insoluble (Papier

Filtre) en présence d'une solution tampon de citrate 0,05 M à pH 4,8 et à 50°C est hydrolysée en sucres simples. Les sucres réducteurs ainsi libérés après 30 min. (ACMC) ou après 60 min (APF) sont dosés au DNS selon la méthode de MILLER (1959).

Les résultats ont été exprimés en heures pour le temps, en unités pH pour le pH, en % pour l'humidité et le poids sec ; les bilans de matières ont été exprimés en g pour 100 g de substrat poids sec initial. Les Activités Enzymatiques ont été données en Unités Internationales (UI).

Une Unité Internationale de ACMC ou de APF correspond à la quantité d'enzymes nécéssaires pour libérer une micromole de glucose par minute dans une solution tampon Citrate-phosphate 0,05 M, pH = 4,8 à 1 % de carboxyméthyl cellulose ou contenant une bande de papier Watman No. 1 (1 cm X 5 CM = 50 mg), à 50°C .

III - CHOIX DE L'ORGANISME.

3.1. INTRODUCTION.

Parmi les moisissures cellulolytiques (Alternaria , Aspergillus , Chaetomium , Fusarium , Myrothecium , Penicillium , Trichoderma , Sporotrichum) les espèces du genre Trichoderma sont les plus fréquemment utilisées pour l'hydrolyse de la cellulose et des produits lignocellulosiques (GALLO et Coll. 1978 ; GHOSE et SAHAI, 1979 ; REESE et MAGUIRE, 1971). Au cours de leur croissance ces espèces produisent des quantités importantes d'exoenzymes capables d'hydrolyser complètement la cellulose en glucose (STERNBERG, 1976 ; STERNBERG et DORVAL, 1979).

Avant d'appliquer la technique de culture en milieu solide mise au point par RAIMBAULT et ALAZARD en 1980, nous allons faire le choix d'une souche parmi l'ensemble des souches de champignons filamenteux cellulolitiques les plus efficientes de notre collection afin de séléctionner la meilleure.

3.2. Screening des souches.

L'objectif de cette étude a été de séléctionner les souches de moisissures cellulolytiques les mieux adaptées au procédé de fermentation en milieu solide des substrats lignocellulosiques. A cet effet on a plus particulièrement étudié :

- la production des cellulases indispensables pour transformer la cellulose en sucres assimilables par la moisissure
- la vitesse d'élongation apicale qui représente l'aptitude à explorer l'environnement et enfin
- la production de conidiospores nécessaires pour l'inoculation en masse des substrats utilisés pour le démarrage de la fermentation en milieu solide.

3.2.1. Hydrolyse qualitative de la cellulose en milieu gélosé.

Nous avons testé la croissance de l'ensemble des souches de champignons filamenteux de notre collection sur un milieu séléctif (MANDELS et WEBER 1969) gélosé en utilisant la cellulose Avicel ou la Carboxyméthyl Cellulose comme unique source de carbone et d'énérgie.

Le Tableau X montre que les souches sauvages isolées dans notre laboratoire hydrolysent toutes la cellulose assez

TABLEAU X : "Screening" des souches cellulolytiques en milieu gélosé. (ROUSSOS et RAIMBAULT ; 1982 a).

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

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

TABLEAU XI : "Screening des souches cellulolytiques en milieu liquide agité (ROUSSOS et RAIMBAULT ; 1982 a).

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

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

rapidement, alors que les souches de collection ne sont pas toutes aussi performantes. Parmi les souches de collection que nous avons testées, I. harzianum (Th 15) semble être le microorganisme le mieux équipé en exoenzymes.

Le Tableau XI nous rapporte les résultats relatifs à 10 souches de collection cultivées en milieu liquide agité. La croissance abondante d'un microorganisme sur ce milieu provoque une diminution importante du pH. Parallèlement il y a excrétion de cellulases dans le milieu de culture.Les souches qui possèdent les APF et les "Activités Carboxyméthyl Cellulase" (ACMC) les plus élevées sont : I. harzianum , I. reesei , I. aureoviride et I. longibranchiatum . Ces mêmes souches synthétisent également la plus grande quantité de protéines et dégradent plus de 50 % de la cellulose après 66 h de culture.

3.2.2. Croissance apicale.

Pour mesurer la croissance apicale selon la méthode de RYAN qui représente l'aptitude d'un microorganisme à coloniser une surface solide, l'ensemble des souches a été cultivé sur trois milieux différents : Malt agar, milieu de MANDELS et WEBER (1969) et Czapek Dox agar. Le premier est un milieu riche qui ne nécéssite pas l'apport complémentaire d'éléments minéraux ou dé facteurs de croissance. Par contre les deux autres milieux sont des milieux sémi-synthétiques.

TABLEAU XII : Croissance apicale de champignons filamenteux sur différents milieux de culture gélosés en tube de RYAN (ROUSSOS et RAIMBAULT ; 1982).

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

Dans le milieu de MANDELS et WEBER, la cellulose est l'unique source de carbone et d'énergie mais la peptone et l'extrait de levure, présents en faible quantité, apportent des facteurs de croissance qui favorisent la germination des spores. Par ailleurs, dans le milieu de Czapek et Dox nous avons remplacé le saccharose par du glucose, car nous avions constaté que contrairement au glucose le saccharose n'est pas assimilé par toutes les souches que nous avons testées.

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

3.2.3. Production de conidiospores.

La sporulation a été étudiée en milieu liquide non agité. Dans le Tableau XIII les souches ont été classées suivant leur performance à la sporulation. On constate que sur glucose les souches de Trichoderma sont de bonnes productrices de conidiospores. La souche la plus performante est T. harzianum (Th 15). Cette souche produit 100 fois plus de conidiospores que T. reesei (QM 9414) (Tableau XIV).

TABLEAU XIII : Production de conidiospores en milieu liquide non agité (ROUSSOS et RAIMBAULT ; 1982)

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

gSPS = gramme de substrat en poids sec.

3.3. CHOIX DE I. HARZIANUM .

3.3.1. Séléction à partir des résultats obtenus.

Le premier passage de notre collection de champignons filamenteux cellulolytiques sur un milieu séléctif nous a permis de classer les souches en fonction de leur aptitude à croitre sur un substrat cellulosique. Cependant la réponse obtenue n'est pas qualitative. Dans un deuxième temps, nous avons donc mesuré quantitativement les APF et ACMC produites, les protéines synthétisées et le substrat carboné consommé afin de préciser les capacités des différentes souches.

Toutefois ces résultats n'ont qu'une valeur indicative car toutes les souches ont été testées selon des conditions standard, les conditions optimales pour chacune d'elles n'ayant pas été déterminées. Ce "screening" nous autorise toutefois à séléctionner les souches qui nous apparaissent les plus performantes pour la dégradation de la cellulose et la production des cellulases. En particulier la souche de I. harzianum dégrade la cellulose jusqu'à 60% avec un rendement pondéral de croissance de 18 %, ce qui est tout à fait satisfaisant et comparable à celui obtenu par d'autres auteurs (GHOSE et SAHAI, 1979). Pour la mesure des APF et ACMC nous avons utilisé la méthode la plus simple et la plus couramment employée dans de nombreux laboratoires (MANDELS et Coll. 1976). Les activités cellulasiques sont exprimées en UI. Nous avons adopté cette stratégie afin de pouvoir comparer facilement nos résultats avec ceux de la littérature.

La vitesse de la croissance apicale d'un champignon filamenteux est un caractère stable, qui caractérise chaque espèce de champignon filamenteux (SMITH et BERRY, 1975). Plusieurs mesures ont été réalisées pour vérifier cette hypothèse. Les résultats que nous avons obtenus étaient toujours du même ordre de grandeur. Cette vitesse d'élongation parait d'ailleurs peu influencée par la composition du milieu de culture, quoique pour les souches de Trichoderma les valeurs obtenues à partir de cultures sur milieu riche soient toujours sensiblement supérieures à celles obtenues à partir de cultures sur milieu synthétique plus pauvre .Il faut cependant noter que la croissance apicale n'est pas forcément en corrélation avec le taux de croissance de l'organisme et avec la production de biomasse mycélienne. A cet effet la fréquence de branchement est un facteur capital, mais elle est fortement influencée par la composition du milieu et les conditions d'incubation. Contrairement aux souches de Trichoderma , celles d' Aspergillus sont caractérisées par un mycélium très dense et, malgré leur croissance apicale 5 fois plus lente, elles possèdent des taux de croissance plus élevés lorsqu'elles sont cultivées sur glucose.

Pour inoculer un substrat solide en vue de la croissance homogène d'une souche de champignon filamenteux, il est nécessaire d'introduire une quantité de 2 à 4 X 10^7 spores/g de substrat sec (RAIMBAULT et ALAZARD, 1980). La possibilité d'obtenir aisément un nombre élevé de spores constitue donc un facteur important dans le choix de l'organisme séléctionné. Pour cette raison nous n'avons pas retenu la souche de I. reesei qui produit 200 fois moins de conidiospores que I. harzianum. (Tableau XIV).

TABLEAU XIV : Sporulation des différentes espèces de *Trichoderma* cultivées dans les mêmes conditions de milieu et d'environnement.

Nom de l'espèce	Nb. de spores/ml	Rendement de Sporulation *
Trichoderma harzianum	$6,5 \times 10^7$	$3,25 \times 10^{10}$
Trichoderma viride	$7,2 \times 10^6$	$3,60 \times 10^9$
Trichoderma longibranchiatum	$5,0 \times 10^5$	$2,50 \times 10^8$
Trichoderma reesei	$5,0 \times 10^5$	$2,50 \times 10^8$
Trichoderma koningii	$4,0 \times 10^5$	$2,00 \times 10^8$
Trichoderma aureoviride	$4,0 \times 10^5$	$2,00 \times 10^8$
Trichoderma hamatum	$2,0 \times 10^5$	$1,00 \times 10^8$

* Rendement de sporulation : Nb. de spores produites par gramme de substrat Carboné initialement présent dans le milieu de culture.

3.3.2. Séléction sur la base de la littérature.

- En plus des résultats décrits concernant les performances de la souche, un certain nombre de critères d'ordre général nous a conduit à choisir une souche de I. harzianum .

Une souche de I. harzianum a déjà été utilisée pour l'enrichissement en protéines de la farine de manioc par fermentation en milieu liquide (MUINDI et HANSSEN ; 1981 a). Après 60 h de culture en milieu liquide, la biomasse récoltée contenait 38 % de protéines brutes. Sur le Tableau XV, nous avons donné la composition en aminoacides des protéines brutes contenues dans les tubércules de manioc et la farine de manioc fermentée.

La valeur nutritive de la Biomasse de I. harzianum a également été évaluée. Le coefficient de digéstibilité pour les protéines brutes a été de 66 % et de 81 % pour les aminoacides. D'autre part le produit fermenté a été utilisé

dans des rations alimentaires de poulets avec succès (MUINDI et HANSSEN ; 1981 b).

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

Aminoacides	g Aminoacides/100 g SPS	
	TM	TMF
AMINOACIDES ESSENTIELS.		
Tryptophane	0,01	0,40
Lysine	0,08	1,50
Méthionine	0,02	0,30
½ Cystine	0,04	0,50
Thréonine	0,07	1,40
Isoleucine	0,08	1,40
Leucine	0,12	2,00
Valine	0,09	1,60
Phenylalanine	0,07	1,20
Tyrosine	0,04	0,90
Histidine	0,05	0,90
Arginine	0,08	1,60
T O T A L	0,75	13,70
AMINOACIDES NON ESSENTIELS.		
Alanine	0,12	1,70
Acide aspartique	0,15	2,50
Acide glutamique	0,26	3,10
Proline	0,08	1,30
Glycine	0,07	1,30
Serine	0,08	1,30
Hydroxyproline	0,03	0,04
T O T A L	0,79	11,24
TOTAL AMINOACIDES	1,54	24,94

- T. harzianum est un antagoniste microbien puissant :

"Parmi les antagonistes vedettes qui règnent dans les sols saturés en microflore équilibrée pour le milieu et le biotope, outre bactéries et fusariums, on rencontre presque toujours une espèce du genre Trichoderma , l'un des rares parmi les élus du démi siècle, à n'avoir pas déçu les espoirs qu'il portait. Mais il aura fallu vingt ans et des preuves répétées pour que Trichoderma fasse taire ses derniers détracteurs scientifiques. Car c'est un antagoniste actif, polyvalent, d'une grande souplesse d'adaptation, à croissance rapide, supérieurement armé. Si bien que même hors de son biotope d'élection, il conserve des propriétés étonnantes en traitement des maladies des organes aériens des plantes, rivalisant d'efficacité avec les fongicides..."J. PONCHET

(1983).

En 1983 le 24ème Colloque de la Société Française de Phytopathologie a été organisé par l'INRA à Montpellier : groupe de travail sur les Trichoderma et a traité des antagonistes microbiens (Bordeaux, 26-28 Mai 1983). De nombreuses communications ont été présentées traitant des antibiotiques volatils de T. harzianum , du mode d'action de ces antibiotiques vis-à-vis des champignons phytopathogènes, de l'influence des facteurs physiologiques sur les aptitudes antagonistes des Trichoderma , sur la production des biopesticides à base de T.harzianum contre diverses maladies des plantes telles que Excoriose de la vigne, maladie du Plomb, Fusariose de l'oeillet, pourriture grise de la vigne , graphiose de l'orme ...Parmi les espèces de Trichoderma utilisées en lutte biologique T.harzianum est de loin la plus utilisée. Ceci est principalement dû à son spectre polyvalent d'antagoniste vis-à-vis des différents champignons phytopathogènes, ainsi qu'à sa grande souplesse d'adaptation physiologique.

Il a été clairement démontré par OLIVIER et GERMAIN (1983) que T. viride et T. harzianum produisent des gaz qui peuvent inhiber à distance certaines phases du développement des champignons phytopathogènes. Pour cela un dispositif d'étude en circuit fermé a été utilisé (fig. 14). Ce dispositif fait appel à une double filtration des gaz dans un circuit fermé. Une pompe assure la circulation des gaz dans le circuit. Dans le dispositif il y a d'un côté l'antagoniste (Trichoderma) et de l'autre côté la cible (Dactylium) sur des milieux de culture appropriés. L'effet antagoniste est nettement augmenté lorsque Trichoderma est cultivé sur substrat cellulosique (paille ou feuilles mortes), et varie suivant la durée d'incubation ainsi qu'en fonction de la température.

En utilisant différents dispositifs expérimentaux (fig. 14), il a été possible de mettre en évidence une action fongistatique exercée à distance par plusieurs isolats de Trichoderma sur des champignons cibles comme Rhizoctonia , solani , Botrytis cinerea et Dactylium dendroides. (OLIVIER et GERMAIN, 1983).

Le constituant essentiel des sclérotes de B. cinerea est le β - (1-3 : 1-6) glucane (ou cinéréane) (DUBOURDIEU, 1982). Ce polysaccharide peut être hydrolysé par les glucanases de type exo- β - (1-3). Certaines espèces de Trichoderma peuvent hydrolyser par voie enzymatique le glucane de B. cinerea . Une β - (1-3) glucanase active sur le cinéréane a été isolée d'une préparation enzymatique industrielle (Novozym 116) issue de Trichoderma . (DUBOURDIEU 1983). Cette exo- β - (1-3) glucanase hydrolyse le cinéréane en glucose et géntiobiose, une β -glucosidase dégrade ensuite le géntiobiose en glucose. Alors que les activités exo- β -

(1-6) - glucanase et endo β (1-3)-glucanase également présentes dans la préparation Enzymatique, sont sans action sur le cinéréane.

Un mécanisme pour le mycoparasitisme a été récemment proposé (CHET et ELAD ; 1983). Tout d'abord l'antagoniste Trichoderma sp approche par chimiotropisme le mycélium de l'hôte Rhizoctonia solani . Ensuite l'attachement au champignon hôte se fait soit par des crochets soit par des enroulements du mycélium. La réconnaissance est apparemment dûe à la présence de lectines sur le mycélium des champignons pathogènes qui se lient à des sucres spécifiques présents sur les parois cellulaires de Trichoderma . L'addition de galactose et du glucose dans le milieu empèche ce phénomène. Dans un troisième temps et lorsque cette intéraction survient, T. harzianum excrète une β -1,3 glucanase et une chitinase provoquant une lyse partielle des parois cellulaires de R. solani et Sclerotium rolfsii et permettant à l'antagoniste de pénétrer les cellules hôtes et de consommer leur cytoplasme. De la même façon l'antagoniste est capable de pénétrer les sclérotes de S. rolfsii et de lyser ainsi leur contenu (CHET et ELAD, 1983).

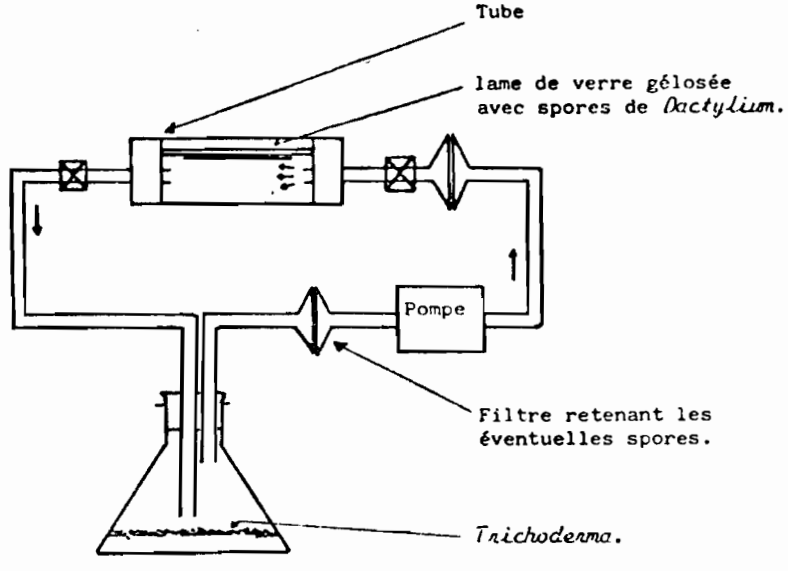


Figure 14 : Dispositif d'étude en circuit fermé selon OLIVIER et GERMAIN (1983)

Les recherches des produits responsables de l'action à distance de T.harzianum ont permi de mettre en évidence la présence dans les spores d'une série de péptides nouveaux dont l'action antibiotique a pu être vérifiée (BACHET et Coll. 1983). Ces péptides nouveaux ont été nommés TRICHORZIANINES. Les caractéristiques principales de ces péptides sont les suivantes :

- Forme brute : C9 H149 N23 O24
- Poids Moléculaire : 1948.
- Un groupe acétyl terminal.
- Dix acides aminés + 8 méthylalanines.
- Un Aminoalcool terminal : le tryptophanol ou le phénylalaninol.

D'autre part il est connu que les Trichoderma produisent des antibiotiques nouveaux tels que Trichopolyns I et II, Isonitriles. (FUJITA et Coll. 1981 ; OKUDA et Coll. 1982). Cependant ces antibiotiques n'ont pas été encore commercialisés.

La société BINAB (Sigtuna-Suède) commercialise un produit en granulés à base de Trichoderma et depuis 10 ans le produit est utilisé avec succès contre les maladies du plomb des arbres fruitiers (RICARD, 1983a) ainsi que depuis 1979 contre la graphiose de l'orme causée par Ceratocystis (RICARD, 1983 b),. Ce produit a été homologué en Grande Bretagne en 1982. Il est utilisé pour la protéction des plaies de taille des arbres fruitiers. Son utilisation est conseillée également pour des applications préventives, par insertion des préparations solides dans le tronc de l'arbre. La Société ORSAN (Nesle - France) a breveté (N. 124388,EP) et a obtenu l'autorisation de distribution pour expérimentation d'une préparation PHIOR P à activité biopesticide à base de spores de T. harzianum pour le traitement de la graphiose de l'orme. Ce produit est efficace vis-à-vis de nombreuses souches de champignons phytopathogènes tels que Sclerotinia ou Ceratocystis (BOIRIE et Coll. 1983).

3.4. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DE T. HARZIANUM .

La croissance apicale du mycélium sur malt agar est de 1,25 mm/h. Sur ce même milieu de culture les colonies de T. harzianum sont initialement blanches et deviennent vertes aux endroits ou il y a des conidies. Sur boîte de Pétri inoculée au Centre on observe au cours de la culture de T. harzianum , la formation de zones concentriques vertes typiques. De même en tubes de Ryan sur différents milieux de culture il y a formation de zones frontales vertes induites par l'exposition de la culture à la lumière du jour. Ce phénomène de formation de zones concentriques de sporulation a déjà été décrit pour T. viride (ELLISON et Coll. ; 1981). Ces zones concentriques de sporulation sont formées par T. viride lorsque le milieu de culture(PDA) contient de la glycine ou du (NH4)2SO4.

En milieu liquide agité il n'y a pas de formation de "pellets". Le mycélium est mucilagineux. Aussi bien pour les cultures liquides qu'en culture de surface, il y a production d'un arôme typique (odeur de noix de coco). Plusieurs auteurs ont noté cette caractéristique en l'appelant arôme "coconut" (RIFAI, 1969 ; OKUDA et Coll. 1982).

Les conidiophores ne sont pas très élaborés, ils sont disposés en touffes sous forme pyramidale, Fig. 15. Les phialides sont incurvées, leur taille est variable suivant leur disposition (5-8 µ X 3-4 µ). Les conidies sont globuleuses, légèrement ovoides (3 µX 2,6 µ) pigmentées en vert. Leur surface est lisse ; c'est d'ailleurs une des caractéristiques essentielles pour différencier cette espèce de T. viride pour laquelle la surface des conidiospores est légèrement rugueuse. Les chlamydospores sont présentes uniquement sur des cultures âgées. Le nombre de conidies produites en milieu liquide non agité contenant du glucose est de 3,25 X 10^10 conidies/g de glucose initialement présent dans le milieu.

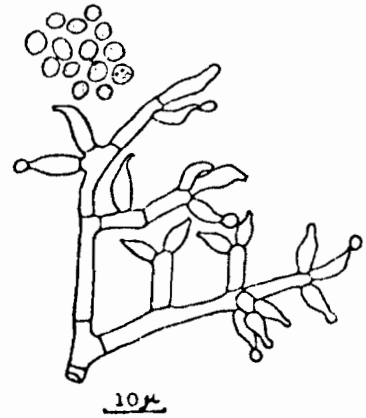


Figure 15 : Morphologie des conidiophores et des Conidiopores de *T. harzianum*.

3.5. CONCLUSION.

Sur la base des résultats obtenus concernant l'aptitude à croitre sur cellulose microcristalline et à synthétiser des quantités importantes d'enzymes cellulasiques (APF et ACMC), nous avons pu séléctionner, parmi les 38 souches de champignons filamenteux cellulolytiques de notre collection, 4 souches appartenant toutes au genre Trichoderma : T. reesei , T. longibranchiatum , T. aureo-viride et T. harzianum. Toutes ces souches possèdent une vitesse de croissance apicale sensiblement identique. Par contre, la mesure de l'aptitude à la sporulation montre que T. harzianum produit environ 200 fois plus de conidiospores que les 3 autres.

Pour les fermentations en milieu solide des substrats lignocellulosiques, il est important de séléctionner un microorganisme caractérisé par une sporulation abondante. T. harzianum a été séléctionné pour l'étude de valorisation des substrats lignocellulosiques par fermentation en milieu solide en raison de cette caractéristique et en fonction de ses utilisations potentielles en lutte biologique.

La souche de T. harzianum CCM F-470 produit des quantités élevées de cellulases (APF : 80 UI/l ; ACMC : 1. 315 UI/l), possède une croissance apicale élevée (1 mm/h) et sporule abondamment avec un rendement de sporulation bien supérieur aux autres souches cellulolytiques (3,25 X 10^10 conidiospores/g de substrat).

La biomasse de T. harzianum n'est pas toxique et a déjà été utilisée pour la production d'Aliments Fermentés Enrichis en Protéines (AFEP) à partir de farine de manioc. Le produit fermenté a été utilisé dans des rations alimentaires de poulets avec succès (MUINDI et HANSSEN ; 1981 b).

T. harzianum est un antagoniste microbien puissant. Il est utilisé en lutte biologique contre de nombreuses maladies des plantes telles que l'excoriose de la vigne, la maladie du plomb, la fusariose de l'oeillet, la pourriture grise, la graphiose de l'orme. Récemment on a mis en évidence la présence d'une série de peptides nouveaux (TRICHORZIANINES) dans les conidiospores de T. harzianum , dont l'activité antibiotique a pu être vérifiée (BACHET et Coll. 1983).

L'optimisation des conditions de culture de T. harzianum par fermentation en milieu solide peut ainsi être orientée non seulement vers la production de cellulases mais aussi vers l'enrichissement en protéines mycéliennes de substrats lignocellulosiques. De même l'optimisation des conditions de sporulation peut aboutir à la production massive d'inoculum ou à la production massive de substances antibiotiques utilisées en lutte biologique.

CHAPITRE IV - PHYSIOLOGIE DE LA CROISSANCE

4.1. INTRODUCTION.

Dans la vie d'un champignon imparfait il y a principalement quatre étapes physiologiques importantes qui sont la dormance, la germination, la multiplication végétative et la conidiogénèse (Fig. 16).

La conidiospore est en dormance lorsqu'elle ne germe pas et reste dans son état initial. Cette dormance peut être de deux types : constitutionnelle ou environementale (ALLEN, 1965).

Chez les Trichoderma (champignons imparfaits) la condiospore ou conidie représente la forme de reproduction asexuée. La définition que SUSSMAN (1965) a donné de la conidiospore est la suivante : "Toute période de vie ralentie ou d'interruption réversible du développement de l'organisme ; la caractéristique fondamentale de la conidiospore est d'être un individu en potentialité, cette potentialité étant reportée dans le temps par la dormance".

Nous allons examiner dans ce chapitre la physiologie de la croissance de T. harzianum et plus particulièrement la germination des conidiospores ainsi que la multiplication végétative du mycélium cultivé sur différents milieux de culture. La physiologie de la conidiogénèse sera traitée dans les chapitres suivants (chap. V et VI). La dormance qui est l'étape de conservation et de dispersion dans le temps des champignons sera brièvement traitée à la fin du chapitre VI.

4.2. LES ETAPES PHYSIOLOGIQUES DE LA CROISSANCE.

4.2.1. La germination des conidiospores .

La germination est la somme des processus et des changements qui interviennent lors de la reprise du développement de la forme en dormance et sa transformation en une structure différente (ALLEN, 1965). C'est aussi le premier stade irréversible qui est observable comme étant différent de l'organisme en dormance le jugement pouvant se faire sur des critères morphologiques, cytologiques, physiologiques ou biochimiques (SUSSMAN ; 1965).

Pour l'étude de la germination des conidiospores de T. harzianum ,nous avons utilisé un Milieu Minéral de Base (MMB) dont la composition figure sur le Tableau V et différentes sources de Carbone (2 g/l). Les cultures ont été agitées et incubées à 29 ° C. La cinétique de germination des

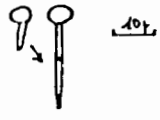
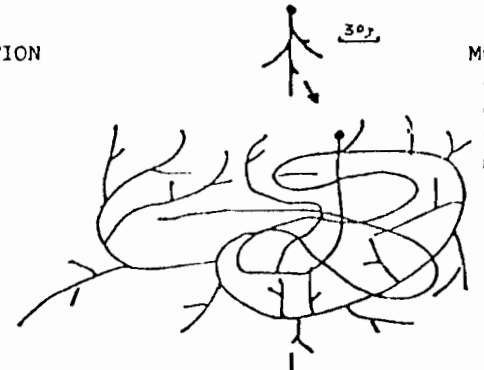
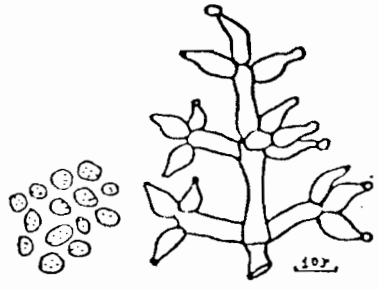
Etapes Physiologiques	Morphologie	Description
CONSERVATION		Conidiospores : Forme de conservation à longue durée , servent d'inoculum pour les fermentation en milieu solide.
GERMINATION		Apparition d'un tube germinatif après 11 heures d'incubation dans des conditions optimales de croissance.
MULTIPLICATION VEGETATIVE		Multiplication active du mycélium développant de nombreuses ramifications. Le mycélium est cloisonné. La durée de cette étape est fonction des conditions ainsi que dela composition des milieux de culture. En général elle dure 40 h.
CONIDIOGENESE		Formation de conidiophores , phialides , et libération de conidiospores , conidies. Cette étape est sous le contrôle étroit de phénomènes d'induction-inhibition exercésprincipalement par la composition du milieu de culture. Cette étape dure plusieurs semaines.

Figure 16 . Principales étapes physiologiques de T.harzianum en fonction de l'aspect morphologique de son développement sur substrat solide dans des conditions de culture optimisées.

conidiospores a été suivie par observation directe au microscope sur des parties aliquotes prélevées toutes les deux heures. Les résultats ont été donnés en % de conidiospores germées. La germination des conidiospores a été mesurée en se basant sur un critère morphologique : Une conidiospore a germé lorsque le tube germinatif a atteint une longueur égale au diamètre le plus large de la conidiospore (FROSSARD et OERTLI, 1982).

Dans les conditions ainsi définies la germination de I. harzianum sur des sucres simples (Glucose, Fructose, Galactose) commence après 9 heures de culture pour se terminer après 14 heures (Fig. 17). Après cette période, toutes les conidiospores présentent un tube germinatif de longueur variable mais supérieur au diamètre de la spore. Pour certaines, le mycélium présente déjà des cellules cloisonnées.

Pour des cultures sur disaccharides (Saccharose, Lactose, Cellobiose, Maltose) la germination commence après 9 heures également. Cependant on observe un ralentissement de la germination après 14 heures. Ce ralentissement parait dépendre du type de liaison (α-1,4 ou β-1,4) reliant le dimère. Après 14 heures de culture sur saccharose, liaison α-1,4, le taux de germination est de 90 % alors que sur lactose et cellobiose (liaison β-1,4) il est seulement de 70 % (Fig. 17).

Ce phénomène de ralentissement du taux de germination des conidiospores par les liaisons glucidiques du type β-1,4 est accentué dans le cas de cultures sur polysaccharides. Alors que sur amidon (polymère du glucose par des liaisons α-1,6) la cinétique de germination des conidiospores est très rapide et simmilaire à celle obtenue sur glucose. La germination sur Carboxyméthyl-cellulose et sur cellulose microcristalline (polymères du glucose par des liaisons β-1,4) est considérablement retardée. Le taux de germination est deux fois plus rapide sur Carboxyméthyl-cellulose que sur cellulose. Après 14 heures de culture sur Amidon, le taux de germination est de 100 %, alors qu'il est de 45 % pour la CMC et seulement de 20 % pour les cultures sur cellulose microcristalline, insoluble dans le milieu de culture (Fig. 18).

Cette étude démontre clairement que la germination des conidiospores de I. harzianum démarre en règle générale après 9 h de culture qui est le temps nécéssaire pour lever la dormance. La vitesse de germination dépend alors de la nature du substrat Carboné. Les conidiospores contiennent des enzymes (amylases, β-glucosidases, endo- et exo-cellulases) permettant l'hydrolyse du substrat en sucres simples et assurant la germination. Ceci est vérifié par l'expérience rapportée au paragraphe 4.7.4.

Sur des substrats cellulosiques naturels (bagasse, son

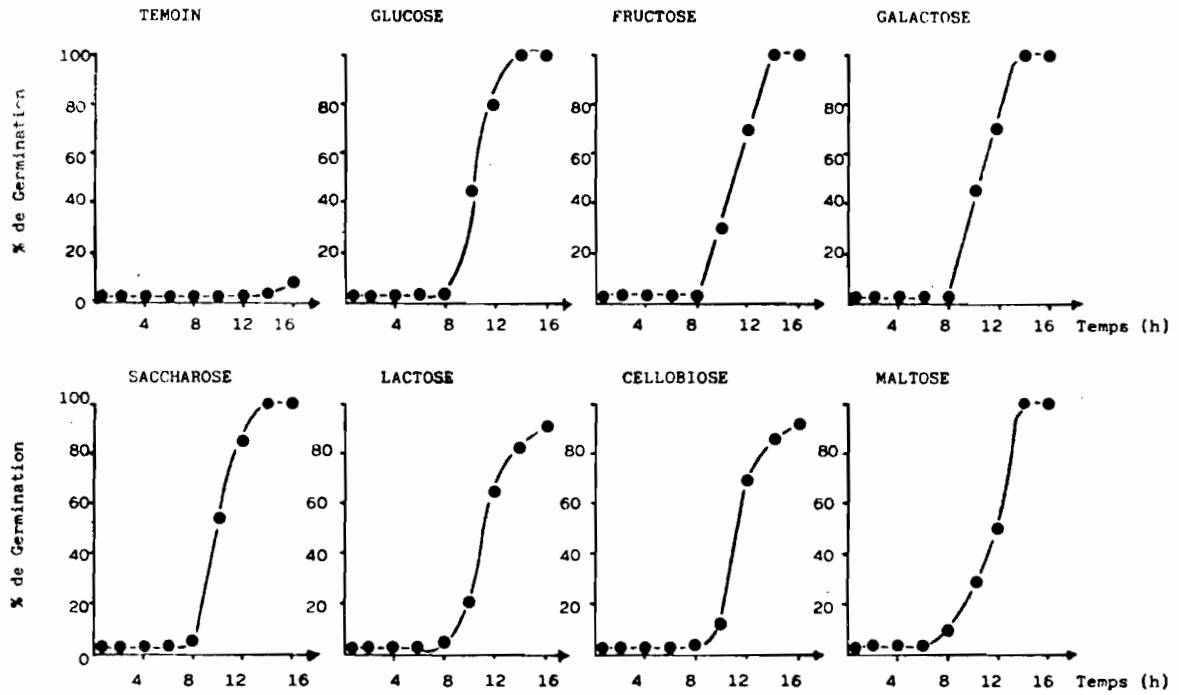


Fig. 17 : Cinétiques de germination de conidiospores de *T.harzianum* cultivé sur divers sucres simples et disaccharides en erlens agités à 29°C.

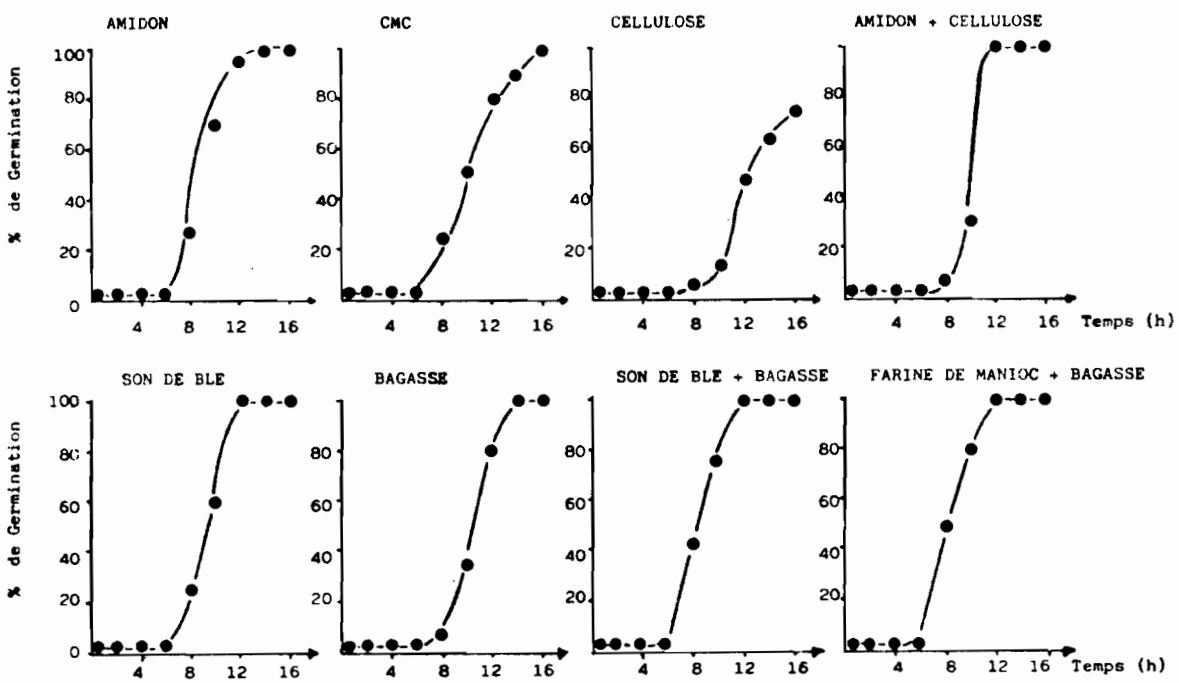


Fig. 18 : Cinétiques de germination de conidiospores de *T.harzianum* cultivé sur MMB contenant des polysaccharides ou des substrats cellulosiques naturels en milieu liquide agité à 29° C.

de blé ou mélange de ces deux substrats), la germination est beaucoup plus rapide que celle observée sur les produits cellulosiques purifiés (CMC et cellulose) (Fig. 18). En particulier sur son de blé, sur mélange de son de blé plus bagasse et également sur mélange de farine de manioc plus bagasse après 12 h de culture, toutes les conidiospores ont germé. On a observé que la courbe de germination des conidiospores cultivées sur bagasse était identique à celle obtenue sur saccharose. Ce qui laisse penser que le saccharose résiduel de la bagasse pourrait favoriser la germination. Par la suite, nous avons utilisé un mélange de son de blé et du produit cellulosique étudié dans un rapport de (2/8).

4.2.2. La multiplication végétative.

Cette étape comprend en réalité plusieurs parties. Nous n'examinerons que la plus importante correspondant à la phase de multiplication de type exponentiel du mycélium lorsqu'il développe de nombreuses ramifications et aboutit à une production importante de biomasse.

La détermination des paramètres de croissance pour les champignons filamenteux est plus difficile que pour les bactéries ou les levures. Le principal obstacle vient de la difficulté d'une mesure indirecte des densités des cultures par néphélométrie. Le mycélium s'agglomère et forme souvent des "pellets" dans le milieu de culture empêchant la mesure précise de la densité des cultures. Plusieurs auteurs envisagent l'utilisation des agents chimiques pour empêcher cette formation et mesurer directement la Densité Optique (DO) des cultures.

Pour *T. harzianum* il y a rarement formation de "pellets" ; de plus il a été récemment démontré que l'évolution de la DO était directement proportionnelle à la biomasse formée pour *T. reesei* (THEODOROU et Coll, 1983). Nous avons utilisé la méthode proposée par ces auteurs pour mesurer le taux de croissance ainsi que les rendements de croissance pour *T. harzianum* .

Les cultures ont été réalisées en fermenteur de 2 l sur le MMB autoclavé puis filtré et de nouveau stérilisé, afin d'obtenir un milieu parfaitement limpide. Les lectures des densités ont été faites au colorimètre en mesurant la DO à 530 nm. Sur les échantillons prélevés toutes les 2 heures nous avons directement mesuré le pH et la DO. Par la suite ces échantillons ont été centrifugés ; dans le surnageant on a mesuré la quantité de substrat résiduel ; dans le culot, repris deux fois dans de l'eau distillée, on a dosé le poids sec de la biomasse ainsi que la quantité de protéines.

Pour les calculs des rendements de croissance (R), (quantité de biomasse synthétisée par g de substrat

Tableau XVI: Croissance de T.harzianum sur le MMB contenant 1% de substrat carboné et 0,1 M de tampon Phosphate. Les rendements de croissance représentent le poids de biomasse formée (g) par gramme de substrat consommé.

Source de carbone	Croissance spécifique/ H		Rendements de croissance
	DO	Poids sec	
Glucose	0,22	0,21	0,47
Amidon	0,18	0,19	0,45

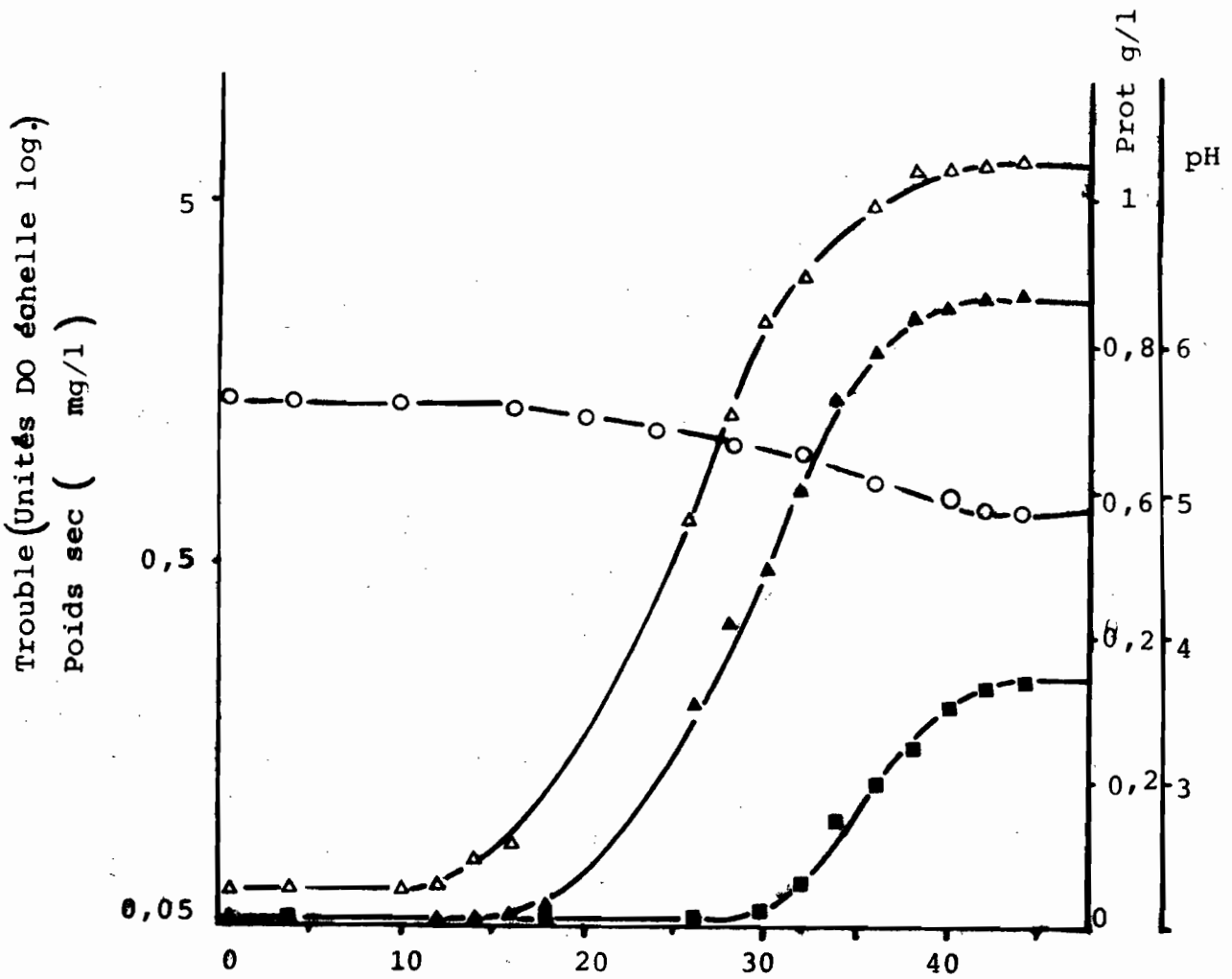


Fig. 19 : Culture de T.harzianum sur glucose en fermentation agitée à 29°C. Evolution des principaux paramètres : pH (o—o); Protéines (■—■); DO (△—△) et Poids sec (▲—▲).

réellement utilisé) nous avons utilisé la formule de MONOD (1942).

$$Y = \frac{(S0 - S)}{(X - X0)}$$

Y = Quantité de sucre consommé pour synthétiser un g de biomasse (inverse du rendement)

X0 = Concentration de la biomasse (Temps 0)
X = concentration de la biomasse (Temps t)
S0 = concentration du substrat (temps 0) ;
S = concentration du substrat (temps t),
R = 1/Y = rendement pondéral de croissance.

L'expérience résumée sur la Fig. 19 montre qu'il existe une correspondance linéaire entre les unités de Densité Optique et les unités pondérales de biomasse pour la culture de I. harzianum . Nous avons représenté sur la même figure l'évolution du pH, du substrat carboné ainsi que la quantité de protéines mycéliennes.

Sur le Tableau XVI on a repporté les rendements de croissance sur divers substrats solubles. Ces rendements sont élevés et proches de ceux obtenus par I. reesei (THEODORO et Coll, 1983).

4.2.3. La conidiogénèse.

La conidiogénèse consiste en une succession d'événements internes à la cellule mycélienne (prolifération du Réticulum endoplasmique et des vacuoles) aboutissant à la formation de conidiophores, la production et la libération de conidiospores ou conidies. (LARPENT, 1972 ; FEVRE et Coll. 1975). En fait la conidiogénèse des champignons filamenteux est un processus très complexe. Dans le chapitre V nous étudierons la physiologie de la sporulation de I. harzianum et plus particulièrement l'influence de la composition du milieu de culture sur la production quantitative de conidies.

4.3. PROTOTROPHIE.

I. harzianum cultivé en milieu synthétique sans vitamine (MMB), utilise totalement le glucose après 66 h de culture agitée à 29°C. (Tableau XVII). C'est donc une souche prototrophe qui n'exige pas de facteurs de croissance pour son développement.

4.4. TOLERANCE A LA TEMPERATURE.

Les Trichoderma sont des champignons filamenteux mesophiles tolérants à de basses températures (voisines de 10° C) mais leur mycélium est très sensible à des températures supérieures à 30°C (*). Pour la production de cellulases, la température optimum de la fermentation dépend principalement de la souche utilisée. Elle est de 29° C pour T. viride (STERNBERG, 1976) ; de 25-27°C pour T. reesei (POURQUIE et VANDECASTEELE ; 1984) de29-30°C pour T. harzianum (ROUSSOS, 1981 ; DESCHAMPS et Coll. 1985).

TABLEAU XVII : Utilisation des sucres par *T. harzianum* en culture agitée à 29°C pendant 66 h., sur milieu Minéral de Base à 2 g/l de substrat.

Source de Carbone	pH	Sucres Résiduels mg / l	Protéines du Mycélium mg / l	Activités Cellulasiques mg / gluc / l	Activités Amylasiques mg / gluc / l
Prototrophe	6,40	0	212	73	114
Glucose + Vitam.	6,60	0	217	70	107
D-Arabinose	5,45	1.642	34	0	0
D-Fucose	4,55	385	235	75	325
L-Fucose	6,00	0	250	70	350
Lactose	6,40	0	318	330	112
D. Ribose	6,60	0	215	90	510
Xylose	6,65	0	181	63	112
β - D - Fructose	5,85	2 X 1049	0	0	0
Cellobiose	5,40	0	230	100	850
Galactose	6,40	0	270	90	300
Maltose	5,80	2 X 905	17	90	375
Saccharose	6,60	0	276	68	496
Amidon	6,40	0	251	149	1480
Cellulose	5,45	500	119	675	44
Mannitol	6,40	0	265	0	680

4.5.TOLERANCE A LA SALINITE.

La croissance de I. harzianum sur le MMB contenant du glucose et des concentrations de NaCl comprises entre 0 et 100 g/l, a été suivie pendant 66 h de culture en milieu liquide à 29 °C. Les résultats obtenus sont donnés sur le Tableau XVIII. On constate que cette souche tolère des concentrations élevées, jusqu'à 80 g/l de NaCl. La totalité du substrat est consommée pour des concentrations inférieures à 50 g/l de NaCl. On notera que les valeurs du pH après 66 h. de culture sont inférieures à 3 pour les cultures contenant entre 20 et 40 g/l de NaCl. Il s'agit là d'un phénomène très particulier qui semble lié à la concentration de NaCl. A ces concentrations le NaCl peut exercer un pouvoir mutagène sur le microorganisme en particulier sur la conidiogénèse de I. harzianum . Nous verrons dans le chapitre de sporulation (5.5.3) qu'à partir de ces concentrations de NaCl il y a une formation de mutants blancs à la surface des boîtes de Pétri accompagnée d'une chute de rendement de sporulation. Cela peut être dû également a une variation du métabolisme lié à la sporulation. De toute façon l'explication ne semble pas claire et nécessiterait de développer des études spécifiques pour expliquer ce phénomène.

TABLEAU XVIII : Croissance de *T. harzianum* en fonction des milieux de culture contenant du glucose.

(Na Cl) g / l	Croissance	pH final	Protéines surnageant mg / l	Utilisation du Substrat %
0	+++	6,27	42	100
1	+++	6,14	41	97
5	+++	5,87	16	97
10	+++	5,38	14	97
20	+++	2,70	18	97
30	+++	2,58	27	97
40	+++	2,19	45	97
50	+++	3,53	15	84
60	+++	5,10	11	79
70	++	5,22	-	79
80	+	5,15	-	59
90	-	5,09	-	0
100	-	5,00	-	0

4.6. TOLERANCE AU PH.

Nous avons constaté que la souche de I. harzianum est capable de se développer sur les milieux très acides. Pour des valeurs initiales de pH de 1,5 on observe une croissance avec utilisation de 84 % de glucose. Pour des valeurs de pH supérieures à 2 et inférieures à 9,5 le développement normal de I. harzianum aboutit à l'utilisation complète de la source de carbone. (Tableau XIX). Les valeurs limites de pH initial pour la germination et la multiplication végétative de I. harzianum sont comprises entre 1,5 pour les milieux acides et 9,5 pour les milieux alcalins.

D'une manière générale on observe que le métabolisme de la croissance de I. harzianum conduit à une alcalinisation du milieu, ce qui n'est pas toujours le cas en particulier avec A. niger qui conduit à une acidification du milieu (RAIMBAULT, 1980).

TABLEAU XIX : Croissance de *T.harzianum* en fonction du pH des milieux de culture contenant du glucose. Conditions de culture agitées en erlenmeyer à 29°C pendant 84 heures .

pH initial	Croissance	Diamètre de Pellets (mm)	pH final	Protéines culot mg / l	Utilisation du Substrat %
1	-	-	1,26	0	0
1,5	++	-	N D	9	84
2	+++	-	3,31	101	99
3	+++	2,4	6,14	83	98
4	+++	2,4	6,27	79	99
5	+++	5,9	6,31	83	99
6	+++	4,6	6,38	74	99
7	+++	2,5	6,41	66	99
8	+++	6,10	6,49	94	99
9	++	1,3	7,18	65	99
9,5	++	1,3	7,58	10	82
10,0	-	-	8,71	0	0

4.7. BIOCHIMIE ET NUTRITION.

Le milieu minéral qui a été utilisé pour les études de croissance de I. harzianum en prototrophie en présence de 2 g/l de glucose, peut également servir de milieu minéral de base (MMB) pour l'étude de l'assimilation de différentes sources de carbone. Nous avons cependant choisi d'ajouter une solution de vitamines qui apporte les facteurs de croissance indispensables pour les microorganismes auxotrophes. Ce même MMB auquel on a substitué le Sulfate d'ammonium et l'urée par une autre source d'azote, a été utilisé pour l'étude de l'assimilation des différentes sources d'azote, au cours de la croissance de I. harzianum.

4.7.1. Source d'azote.

Nous avons utilisé un milieu de culture entièrement synthétique avec les sources d'azote suivantes : Nitrate, Nitrite, Ammoniaque, Urée ainsi qu'un mélange urée plus Sulfate d'Ammonium. Les meilleures cultures ont été obtenues sur le mélange d'urée et de sulfate d'ammonium. Les sels d'ammonium ainsi que l'ammoniac et l'urée sont très bien utilisés par I. harzianum. Il faut noter que le pH final est proche de la neutralité lorsque l'unique source d'Azote présente est sous forme de Nitrate, Nitrite, Urée ou d'un mélange Urée + Sulfate d'ammonium. Au contraire, on constate une forte acidification (pH 2,70) lorsque la source d'azote est l'ammoniaque ou un sel d'ammonium (Tableau XX). Nous avons choisi d'utiliser par la suite le mélange d'urée et de sulfate d'ammonium.

TABLEAU XX : Utilisation de différentes sources d'Azote par *T. harzianum* en culture agitée sur glucose à 29°C pendant 66 h.

Source d'Azote	pH	Sucres Résiduels mg/l	Protéines mg/l	Activités Amylasiques mg/gluc/l
Nitrate	6,85	0	141	0
Nitrite	6.30	1.170	104	0
Urée	6,30	0	211	145
Urée + Ammonium Sulfate	6,60	0	217	107
Ammoniaque	2,70	0	186	100
Ammonium Chlorure	2,70	0	175	145
Ammonium Phosphate	2,90	0	191	60
Ammonium Sulfate	2,70	0	185	95

L'assimilation du nitrate par I. harzianum se fait grâce à la biosynthèse de nitrate réductase. De même le nitrite étant également assimilé, cette souche synthétise une nitrite-réductase. Il faut noter que la culture sur nitrite est certes plus lente, mais le nitrite à la concentration utilisée n'inhibe pas la croissance de I. harzianum.

4.7.2. Source de Carbone.

I. harzianum se développe bien sur les sucres suivants : Glucose, D-Fucose, L-Fucose, Lactose, D. Ribose, Xylose, Cellobiose, Galactose, Saccharose, Amidon, Mannitol et Cellulose. Par contre il n'utilise pas les sucres suivants : D-Arabinose, β-D-Fructose et Maltose. (Tableau XVII).

Les rendements de production de protéines ont été différents suivant la nature des sucres utilisés. En particulier sur Lactose, Saccharose et Galactose on a obtenu des rendements relativement élevés alors que sur Cellulose et Xylose les rendements de production de protéines ont été plus faibles.

Les activités amylasiques présentes dans le surnageant ont été importantes pour les cultures sur Amidon. Cependant on a décelé une activité amylasique moyenne sur les substrats suivants : Cellobiose, Mannitol, D. Ribose et Saccharose. De ce fait le meilleur inducteur de l'amylase est certes l'Amidon, mais le Cellobiose, le Mannitol, le D. Ribose ainsi que le Saccharose peuvent également déclencher la biosynthèse de cette enzyme.

Les cellulases ont été produites essentiellement à partir des cultures sur cellulose. Cependant une activité cellulasique sensible a été détectée sur Lactose, Amidon et Cellobiose.

En utilisant la méthode mise au point précédemment (ROUSSOS, 1982) pour la description des champignons imparfaits, nous avons estimé quantitativement l'utilisation des sucres comme unique source de carbone et d'énérgie et mesuré le taux d'assimilation de différentes sources d'azote par I. harzianum. Pour cela nous avons dosé les sucres résiduels ainsi que les activités enzymatiques dans le surnageant et les protéines dans le culot des cultures.

Le milieu synthétique de Czapek n'a pas été employé car le nitrate qui est la source d'azote, n'est pas utilisé par l'ensemble des champignons imparfaits. D'autre part nous n'avons pas utilisé le milieu de Czapek modifié par DABINETT et WELLMAN (1978), ce milieu contenant de la L-Asparagine à 2 g/l comme source d'Azote ; à cette concentration, l'Asparagine peut être utilisée aussi bien comme source de Carbone que d'Azote. Pour ces raisons nous avons mis au point le MMB qui ne présente pas ces inconvenients et qui peut

être appliqué dans ce type d'étude à l'ensemble des champignons imparfaits.

4.7.3. Influence du pH sur la production de cellulases.

Le MMB contenant de la cellulose (2 g/l) a été utilisé dans cette étude ; le pH initial a été ajusté à des valeurs entre 2 et 9 avant autoclavage.

Sur le Tableau XXI on a reporté les résultats concernant la croissance de I. harzianum , l'utilisation du substrat, la production de cellulases, la concentration en protéines dans le surnageant ainsi que le pH final après 84 heures de culture agitée à 29°C.

Dans tous les cas une croissance positive a été observée pour des pH initiaux variant de pH = 2 à pH = 9. La production de cellulases est beaucoup plus élevée lorsque le pH initial est acide, avec un maximum pour un pH = 5. Pour des pH initiaux supérieurs à 6, la quantité de cellulases chute très fortement, de même que l'utilisation du substrat. (Tableau XXVII). Ces résultats indiquent que I. harzianum se développe bien sur des milieux très acides et que les cellulases sont produites préférentiellement en milieu acide.

TABLEAU XXI : Croissance et production de Cellulases de *T.harzianum* en fonction du pH initial des milieux de culture contenant de la cellulose. Cultures agitées à 29°C pendant 84 heures.

pH initial	Croissance	pH final	Protéines Surnageant mg / l	Utilisation du Substrat %	Production de Cellulases UI AOMC / l
2	+	5,7	80	93,5	194
3	++	5,7	11	98,5	192
4	++	5,8	15	99,0	192
5	++	5,7	15	98,0	248
6	++	5,9	13	98,0	70
7	++	6,7	14	89,0	37
8	++	6,9	15	78,0	28
9	+	7,6	10	N D	0

4.7.4. Présence de facteurs de germination dans les conidiospores.

Nous avons utilisé des conidiospores de *T. harzianum* lavées trois fois dans de l'eau distillée stérile et remises en suspension dans de l'eau après centrifugation. De même des conidiospores non lavées ont été utilisées à trois concentrations différentes (2,3 X 10^6 - 2,3 X 10^8 conidiospores / g de substrat). Pour l'inoculation un milieu entièrement synthétique dépourvu de peptone et d'extrait de levures a été utilisé contenant 7,5 g/l de cellulose microcristalline (ROUSSOS et RAIMBAULT 1982 b).

Les résultats démontrent que les conidiospores lavées ont perdu leur faculté de germer (Tableau XXII). L'examen microscopique révèle qu'il n'y a pas eu de germination des condiospores pour les trois essais réalisés avec des concentrations de 2,3 X 10^8 - 2,3 X 10^7 et 2,3 X 10^6 condiospores lavées / g de cellulose. Il existerait donc dans les spores un ou des facteurs de germination, solubles dans l'eau qui disparaissent dans les eaux de lavage. Il semblerait que ces facteurs soient liés à l'attaque de la cellulose car des conidiospores lavées et remises dans un milieu de culture contenant du glucose germent normalement. Cependant nous n'avons pas pu mesurer de quantités importantes de cellulases dans les suspensions de conidiospores.

TABLEAU XXII : Influence du lavage des conidiospores de *T.harzianum* sur la production de cellulases. CUltures agitées sur milieu de Mandels et Weber (1969) à 29°C pendant 90 h.

Inoculum Nb. de spores 2,3 X	Conidiospores non lavées			Conidiospores lavées		
	10^6	10^7	10^8	10^6	10^7	10^8
pH	5,05	3,75	3,20	5,80	6,05	5,80
Sucres Réducteurs mg/l	10	10	10	10	10	10
APF UI/l	37	57	67	0	0	0
ACMC UI/l	770	937	1067	0	0	0
Cellulose Residuelle g/l	9,8	8,5	6,7	10	10	10
Protéines du Mycélium mg/l	350	500	580	100	100	375

4.8. CODIFICATION DES CARACTERES.

La description de I. harzianum a été réalisée sur la base d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et nutritionnels (ROUSSOS ; 1982 c). Afin d'établir un fichier informatisé pour la recherche automatique des différentes souches de champignons filamenteux, ainsi que pour une éventuelle classification de ces souches, nous avons réalisé une codification des caractères étudiés :

Parmi les caractères morphologiques, la croissance apicale est donnée en mm/h, la taille des conidies et des phialides est mesurée en μ, le nombre de conidies produites par gramme de substrat carboné initialement présent dans le milieu de culture est donné en log 10, l'arrangement des conidies peut être en amas, en chaînes ou en conidies isolées. La forme des conidies peut être globuleuse, ovale ou arrondie, leur surface peut être lisse ou légèrement rugueuse. Les phialides peuvent être droites ou incurvées. La présence de métules, vesicules, stipes pour les conidiophores est signalée par oui ou non, de même que la formation de pellets pour les cultures en milieu liquide agité. Nous avons également tenu compte du type de conidiophores, pyramidal pour les Trichoderma , type aspergillaire pour les Aspergillus et type Penicillium avec les différents stades (I, II, III et IV) de bifurcation pour les Penicillium.

Les caractères physiologiques, biochimiques et nutritionnels ont ensuite été ainsi définis : à chaque caractère correspondent quatre niveaux de réponse quantitative (1 à 4) permettant l'influence de chaque caractère sur la quantité de protéines présentes dans le culot, la quantité des sucres résiduels présents dans le surnageant, la quantité d'amylases et cellulases. Un exemple de codification de ces réponses est donné sur le Tableau XXIII.

4.9. FICHIER D'IDENTIFICATION RAPIDE DE I. HARZIANUM .

Sur les Tableaux XXIII nous avons donnné la lecture d'une fiche de I. harzianum. Chaque fiche renferme en outre des rubriques indexées (caractères portant une astérisque) permettant une recherche rapide des principaux caractères du microorganisme.

4.10. CONCLUSION.

Au cours de ce chapitre on a vu les caractéristiques générales de la physiologie de la croissance et sa division en trois étapes successives pour I.harzianum ; on a étudié en particulier la germination des conidiospores et ses rapports avec la source de carbone. Il apparait que les

Trichoderma	harzianum			Th 015 CCM F-470
MORPHOLOGIE				
Croiss.Apicale *	1.25 mm/h			
Conidies Nb. *	3,25 L10			
Conidies Arrang.	Amas			
Conidies Forme	Globu			
Conidies Surface	Lisse			
Conidies Taille	3,1x2,5			
Phialides Forme	Incur			
Phialides Taille	6,0x3,0			
Métule	000			
Vésicule Taille	0000000			
Stipe Taille	0000000			
Cellule Podale	000			
Conidiophore	Trich			
Pellets *	Non			
PHYSIOLOGIE	PRO	SUC	AMY	CLA
pH 4 *				
pH 5	3	4	2	2
pH 6				
Temp.20°C.				
Temp.25°C.				
Temp.30°C. *	3	4	2	2
Temp.35°C.				
Temp.40°C.				
SOURCE CARBONE				
Proto.Glucose *	3	4	2	2
Vitam.glucose	3	4	2	2
D-Arabinose	1	2	1	1
L-Arabinose	3	2	2	1
D-Fucose	3	4	3	2
L-Fucose	3	4	3	2
Lactose	4	4	2	3
D-Ribose	3	4	3	2
Xylose	3	4	2	1
b-D-Fructose	1	2	1	1
Cellobiose	3	4	3	2
Galactose	4	4	3	2
Maltose	1	3	3	2
Saccharose *	3	4	3	2
Amidon *	4	4	4	2
Cellulose *	2	4	1	3
CMC-Cellulose	1	4	1	2
Mannitol	4	4	3	1
SOURCE AZOTE				
Nitrate Sodium	2	4	1	1
Nitrite Sodium *	2	2	1	1
Ammoniaque	3	4	2	1
Urée	3	4	2	1
Ammonium-Cl.	3	4	2	1
Ammonium-Phos.	3	4	1	1

Codification des caractères

PRO : Protéines du culot en mg

0- 49 = 1
50-149 = 2
150-249 = 3
250-349 = 4

SUC : Sucres du surnageant en mg

2000-1750 = 1
1749-1000 = 2
999- 500 = 3
499- 0 = 4

AMY : Amylases en mg/l de glucose libérés après 5 min à 50°C

0- 99 = 1
100- 249 = 2
250- 999 = 3
sup.1000 = 4

CLA : Cellulases (ACMC) mg/l Glu libérés après 30 min à 50°C

0- 49 = 1
50- 149 = 2
150- 749 = 3
sup. 750 = 4

TABLEAU XXIII: Lecture de la fiche de la souche *T. harzianum* .

liaisons glucosidiques β-1,4 influencent fortement la cinétique de germination. Cependant l'utilisation d'un mélange cellulose-amidon ou de susbstrats cellulosiques naturels permet d'obtenir une germination plus rapide et plus uniforme.

La mesure directe de la Densité Optique des cultures a permis de reconnaitre facilement les phases de multiplication végétative du mycélium (latence, germination, phase exponentielle, ralentissement et phase stationnaire). De même il a été montré pour I. harzianum qu'il existe une bonne corrélation entre la Densité Optique et la biomasse formée.

I. harzianum est une souche prototrophe se développant à des températures comprises entre 10-37°C. Ce microorganisme tolère des valeurs de pH acides (2-9) et de salinité élevée (0 à 80 g/l de NaCl) pour sa croissance. La synthèse de cellulases est nettement plus élevée dans des milieux de culture acides.

De plus, ce champignon utilise une vaste gamme de sucres comme source de carbone et d'énergie, ainsi qu'une variété importante de sels minéraux azotés y compris le nitrite.

Les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques ont été codifiés afin d'établir un fichier d'identification rapide de I. harzianum.

Ces différents enseignements nous permettent de mieux connaître la physiologie de cet organisme, de connaître ses capacités et ses limites de croissance de façon à définir les conditions de culture optimales (pH, salinité, température, nature des sources de carbone et d'azote). Cette étude nous a permis de confirmer les bonnes performances de notre souche de I. harzianum , par rapport aux autres espèces de Trichoderma en vue de la dégradation de la cellulose et de la production de cellulases.

CHAPITRE V - PHYSIOLOGIE DE LA SPORULATION.

5.1. INTRODUCTION.

La conidiogénèse est une étape physiologique très importante pour les champignons imparfaits. Cette étape correspond à la formation et à la libération de conidiospores, formes de résistance et de reproduction de ces microorganismes.

Il est admis que son déclenchement est induit par un facteur limitant qui disparait du milieu de culture, lorsque le mycélium est âgé. La nature de ce facteur est très variable. On suppose que l'épuisement de la source de Carbone ou d'Azote est généralement ce facteur limitant. Cependant il ne faut pas oublier les autres facteurs physicochimiques capables de déclencher la conidiogénèse tels que pH, CO2, Oxygène, Température, Humidité ou l'apparition de métabolites secondaires.

Un développement normal du mycélium et une bonne conidiogénèse, sont des conditions préalables à la production importante de conidiospores. Le nombre de conidiospores produites par un champignon filamenteux est principalement fonction de la quantité de la source de carbone et d'azote présente dans le milieu de culture. C'est ainsi que lorsqu'on change la nature ou la quantité de la source de carbone ou d'azote du milieu de culture optimisé pour Aspergillus nidulans , on observe une diminution de production de conidiospores (MARTINELLI,1976). Le même phénomène a été observé pour A. ochraceus , Fusarium moniliforme , Septomyxa affinis et Stachylidium theobromae (VEZINA et Coll. 1965).

L'effet d'induction-inhibition de la conidiogénèse d' A. niger a été mis en évidence par GALBRAITH et SMITH (1969). De même l'induction du rythme endogène de sporulation chez A. niger est influencée par le rapport glucose/potassium et par les oligoéléments présents dans le milieu de culture (JEREBZOFF et all., 1976).

Les sels minéraux, à une concentration élevée, peuvent avoir des effets opposés sur la croissance et la conidiogénèse des champignons filamenteux (GINDRAT, 1977 ; SLAYMAN et TATUM,'1964 ; LILLY, 1965). De même l'aération et l'humidité influencent la production quantitative de conidiospores chez Penicilium roqueforti (MAHEVA et col 1984).

Cependant un équilibre entre la composition du milieu de culture et les conditions physicochimiques de l'environnement doit être défini pour chaque espèce. Car un milieu de culture optimisé pour la production de conidiospores d'une espèce peut ne pas être idéal pour une

autre (VEZINA et Coll. 1965).

L'étude de la conidiogénèse de I. harzianum que nous avons réalisée a porté sur la production quantitative de conidiospores produites pour cette souche cellulolytique, sur la physiologie de la sporulation de I. harzianum en fonction du temps d'incubation, de la présence de sels minéraux dans les milieux de culture et sur la concentration de la source de carbone ou d'Azote des milieux de culture.

5.2. INFLUENCE DU MODE D'INOCULATION.

Avant d'entreprendre cette étude, il a été nécéssaire de standardiser le mode d'inoculation des milieux de culture. Pour cela, nous avons expérimenté deux méthodes d'inoculation.

Pour la méthode d'inoculation dans la masse, une quantité détérminée d'une suspension de conidiospores (3 X 10^7 spores / g de substrat carboné) a été introduite dans les erlens contenant le milieu de culture G maintenu en surfusion à 50 ° C. Après inoculation, les milieux ont été homogénéisés et refroidis rapidement pour permettre la solidification. Afin d'obtenir ainsi une inoculation homogène dans la masse du milieu de culture solidifié.

TABLEAU XXIV: Production comparée de conidiospores de *T.harzianum* en fonction du mode d'inoculation en surface ou dans la Masse du milieu de culture G en erlen. Les résultats sont exprimés en Nombre (X 10^9) de conidiospores produites par erlen et par gramme de substrat (Ω).

TEMPS	SURFACE		MASSE		RAPPORT MASSE / SURFACE
Jours	erlen	Ω	erlen	Ω	Ω
5	3,29	4,51	5,00	7,04	1,56
7	4,00	5,48	5,63	7,71	1,41
9	5,19	7,11	6,27	8,25	1,16
12	4,57	6,26	5,08	7,15	1,14
14	2,96	4,05	5,40	6,92	1,71
20	5,53	7,58	7,70	10,27	1,35
25	4,72	6,47	8,20	10,51	1,62
30	6,17	8,46	8,45	10,83	1,28

Pour la méthode d'inoculation en surface, nous avons déposé une quantité déterminée (1 ml) d'une suspension de conidiospores à la surface du milieu G déjà solidifié. A l'aide d'un étaloir, nous avons alors réparti cette suspension à la surface du milieu pour obtenir une distribution uniforme.

Le Tableau XXIV rapporte la production comparée de conidiospores de I. harzianum en fonction du mode d'inoculation (en surface ou dans la masse du milieu G). On doit noter que l'homogénéité des résultats est bien meilleure dans le cas de l'inoculation dans la masse, alors que pour l'inoculation en surface, la variabilité des mesures est bien plus élevée.

L'indice de sporulation pour l'inoculation dans la masse est toujours supérieur à celui obtenu pour l'inoculation en surface. D'ailleurs, les rapports des indices de sporulation ($\mathfrak{R}$) MASSE / SURFACE, montrent qu'en moyenne il y à 30 % de conidiospores en plus lorsque l'inoculation se fait dans la masse du milieu de culture.

Nous avons donc choisi, pour la suite de cette étude, d'inoculer dans la masse tous les milieux de culture utilisés.

5.3. INFLUENCE DE LA QUANTITE DE LA SOURCE DE CARBONE.

La composition des différents milieux de culture utilisés lors de cette étude, est donnée dans le Tableau VI. Nous avons utilisé la farine de manioc comme substrat carboné à 10 concentrations variant de 1 à 100 g / l. Il faut mentionner que le rapport source de Carbone / sels minéraux, a été maintenu constant pour les différentes concentrations de la source de Carbone.

Les numérations de conidiospores de I. harzianum produites en fonction de la quantité croissante de la source de carbone ont été réalisées sur des cultures âgées de 7 et 15 jours.

Le Tableau XXV montre l'évolution de cette production. Tout d'abord, pour les cultures âgées de 7 jours, les valeurs obtenues sont faibles et varient de 0,80 à 10,3 X 10^9 spores, alors que la concentration en substrat varie de 1 à 100 g/l. En outre les variations de l'indice de sporulation est très importante. Les meilleurs rendements sont obtenus avec des concentrations faibles en substrat, ce qui confirme l'hypothèse de l'inhibition de la conidiogénèse par des concentrations élevées en source de Carbone. Ceci est vérifié si l'on compare les indices de sporulation obtenus avec des concentrations faibles de substrat (1 à 10 g) à ceux obtenus pour des concentrations supérieures (15 à 100 g / l).

Par contre, après 15 jours de culture, la production

de conidiospores par erlen est plus stabilisée et suit l'accroissement du substrat, exception faite pour la dernière valeur de celui-ci (100 g/l). D'ailleurs, la valeur de l'indice de sporulation obtenu pour 100 g de substrat est nettement différente des autres.

Sur ce même Tableau XXV on a repporté également le rapport de l'indice de sporulation obtenu après 15 jours de culture sur celui de 7 jours. En règle générale, après 15 jours de culture, le nombre de conidiospores est doublé pour les concentrations de 5, 15, 33, 40 et 50 g/l de substrat. Pour les concentrations faibles (1 g/l) le substrat devient facteur limitant très rapidement, et l'indice de sporulation obtenu après 15 jours est inférieur à celui obtenu après 7 jours. De même, pour des concentrations élevées en substrat (100 g/l), l'indice de sporulation reste faible, même après 15 jours de culture. A cette concentration, le rendement de sporulation obtenu est le plus faible pour l'ensemble des milieux de culture ; ceci indique une forte inhibition de la conidiogénèse de *T. harzianum* à partir de cette concentration.

Nous avons donc choisi pour la suite de nos travaux d'utiliser un milieu de culture contenant 40 g/l de farine de manioc. A cette concentration, le nombre total de conidiospores produites après 15 jours d'incubation est le plus élevé, avec un indice de sporudation également élevé.

TABLEAU XXV : Production comparée de conidiospores de *T.harzianum* en fonction de la quantité croissante de la source de carbone pour une culture en erlen de 7 et 15 jours.

Manioc g/l	Manioc g/erlen	Nb. spores après 7 j. X 10^9 erlen	Nb. spores après 7 j. X 10^9 g/manioc Ω	Nb. spores après 15 j. X 10^9 erlen	Nb. spores après 15 j. X 10^9 g/manioc Ω	Rapport Ω 15 j. / Ω 7 j.
1	0,03	0,80	26,66	0,58	19,33	0,73
5	0,13	1,69	13,00	3,43	26,38	2,03
10	0,25	4,05	16,20	5,42	21,68	1,34
15	0,38	2,66	7,00	6,92	18,21	2,60
20	0,50	2,31	4,62	11,40	22,80	4,94
25	0,63	3,75	5,95	13,00	20,63	3,47
33	0,83	5,81	7,00	15,00	18,07	2,58
40	1,00	9,12	9,12	18,40	18,40	2,02
50	1,25	10,30	8,24	20,50	16,40	1,99
100	2,50	3,36	1,34	18,40	7,36	5,49

5.4. INFLUENCE DE LA QUANTITE DE LA SOURCE D'AZOTE.

La composition des différents milieux de culture utilisés pour cette étude est donnée dans le Tableau VII. Nous avons utilisé 6 milieux différents (G, B, H, D, E et F), dans lesquels la source d'Azote a été un mélange d'Urée et de (NH4)2SO4 à des concentrations différentes. Cependant le milieu H ne diffère du milieu B, que par l'addition de 1 g/l de CaCl2. Pour l'ensemble de ces milieux, la concentration de la source carbonée a été maintenue constante (40 g/l).

Les numérations de conidiospores de I. harzianum produites en fonction de la quantité d'Azote, ont été réalisées à partir de cultures âgées de 7 et 20 jours.

Les relations qui existent entre la composition chimique du milieu de culture et les rendements de sporulation obtenus après 7 et 20 jours de culture en erlen de I. harzianum sont portées sur le Tableau XXVI.

TABLEAU XXVI : Production comparée de conidiospores de *T. harzianum* en fonction de la quantité décroissante de la source d'Azote pour des cultures en erlen de 7 et 20 jours.

Milieux	Rapport C/N	Indice de sporulation X 10^9 spores	
		7 jours	20 jours
G	7,10	7,71	10,27
B	14,20	7,38	24,40
H	14,20	26,20	28,30
D	20,90	14,80	20,90
E	27,36	7,18	20,00
F	32,53	0,16	11,80

Lorsque dans les milieux de culture la concentration de la source de Carbone est maintenue stable et que l'on fait varier la concentration de la source d'Azote, on constate que la sporulation est influencée par la concentration de la source d'Azote. Lorsque cette concentration est très faible, la sporulation est inhibée pendant 16 jours environ; par contre, pour des concentrations élevées en Azote, l'indice de sporulation reste le plus faible même après 20 jours de culture.

Nous avons constaté précédemment que les faibles concentrations en carbone induisent une sporulation précoce pour I. harzianum. Par contre, les concentrations élevées en Carbone, inhibent la conidiogénèse pendant les 7 premiers jours. Nous observons ici, que le phénomène inverse se produit pour les concentrations d'Azote. Lorsque celles-ci sont faibles, la conidiogénèse est inhibée pendant 16 jours; par contre, pour des concentrations élevées en Azote, on obtient assez rapidement une production de conidiospores, les indices de sporulation restant faibles. Il y aurait donc une inhibition partielle exercée par des concentrations élevées en Azote sur la sporulation de I. harzianum.

A ce stade de l'étude, nous pouvons constater que lorsque les valeurs du rapport molaire C/N du milieu de culture sont comprises entre 14,2 et 20,0 on n'observe pas de différences importantes les valeurs de l'indice de sporulation. En dehors de ces valeurs du rapport C/N, un phénomène d'induction-inhibition se manifeste, provoqué par la source d'Azote comme cela a été déjà décrit pour la conidiogénèse d' A. niger (GALBRAITH et SMITH ; 1969).

On constate également que lorsque le rapport molaire C/N du milieu de culture est égal à 14,20 on obtient les valeurs les plus élevées de l'indice de sporulation. Nous avons donc utilisé par la suite, un rapport molaire C/N de 14,2 pour la composition des milieux de culture pour la production de conidiospores de I. harzianum en quantités élevées.

5.5. CINETIQUE DE PRODUCTION DE CONIDIOSPORES.

Pour cette étude nous avons utilisé les milieux de culture A, B, C, D, E, F et G, dont la composition est portée sur le Tableau VII. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogrammes sur les figures 20 et 21.

Avant de commenter ces résultats, il convient de préciser que les quantités des milieux de culture étaient variables suivant les erlens et que les résultats seront présentés sous deux formes : la première colonne des figures correspond au nombre total de conidiospores produites par erlen au temps choisi ; elle est suivie de l'indice de sporulation (ℜ) pour chaque détérmination.

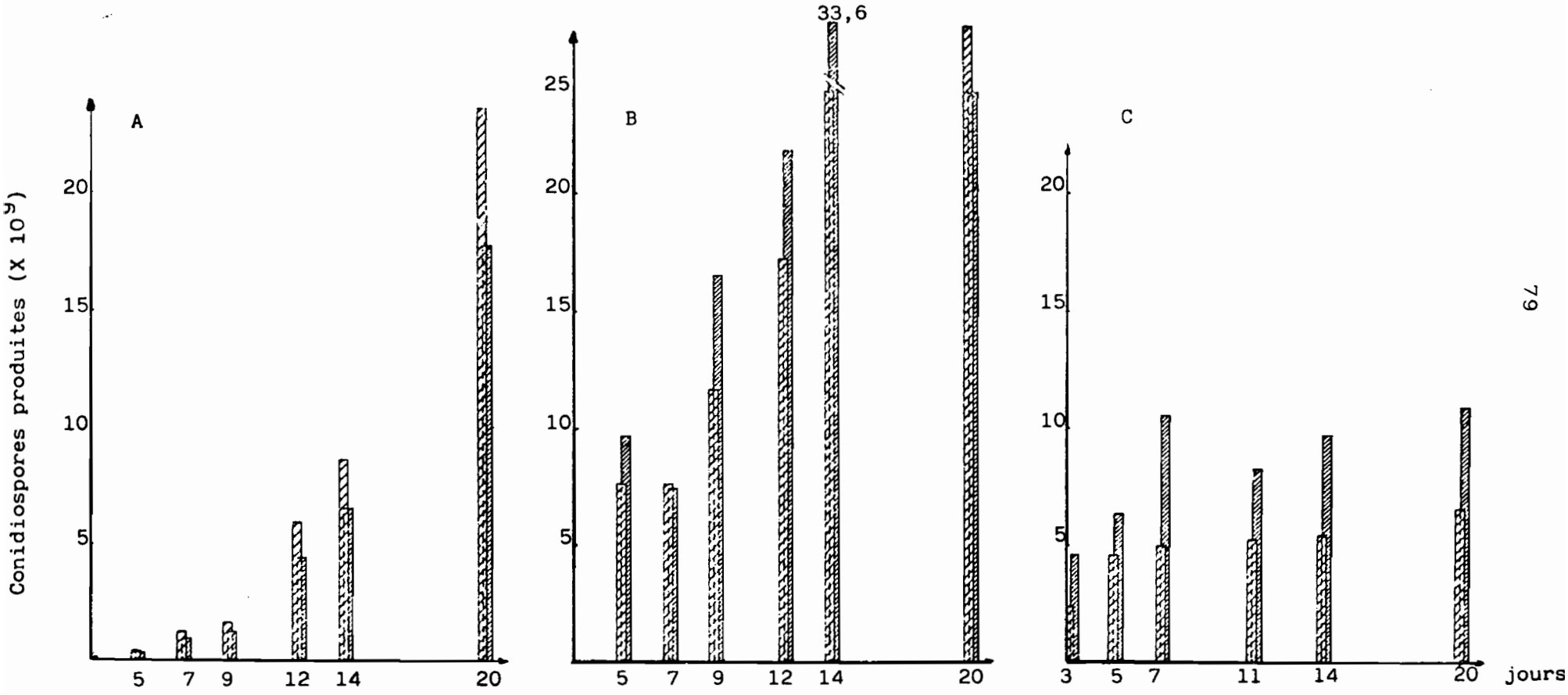


Fig. 20: Production de conidiospores de T. harzianum, cultivé sur les milieux A, B et C en fonction du temps. La première colonne représente le nombre total de conidiospores produites par erlen, la seconde représente l'indice de sporulation (ℜ).

Les numérations de conidiospores de I. harzianum produites en fonction du temps ont été réalisées à partir des cultures âgées de 3 à 30 jours. Cependant sur les figures suivantes, nous avons porté uniquement les résultats relatifs aux numérations obtenues jusqu'au 20ème jour de culture car après cette période, un seuil était atteint pour la plupart des cultures.

5.5.1. Influence de la concentration du substrat.

Si l'on compare la cinétique de production des conidiospores de I. harzianum cultivé sur les milieux A et C (Figure 20), on constate que lorsque la source de Carbone est disponible en quantité pléthorique (100 g/l), le processus de conidiogénèse est inhibé pendant les premiers jours de culture (3, 5, 7 et 9 jours). Le phénomène inverse se produit lorsque la même source de Carbone est fournie en quantité limitée. En effet, après 3 jours de culture sur le milieu C (20 g), la conidiogénèse a déjà été induite. Après 5 jours de croissance de I. harzianum sur les milieux A et C, l'indice de sporulation (♀) pour le milieu c'est 20 fois supérieur à celui du milieu A. Des valeurs maximales pour l'indice de sporulation sont rapidement atteintes après 7 jours pour le milieu C alors que pour le milieu A, il faut attendre plusieurs semaines.

Il semble que la concentration du substrat utilisé comme source de Carbone influence fortement la conidiogénèse de I. harzianum . Lorsque cette concentration est faible, il y a induction précoce de la conidiogénèse. Les conidiospores sont produites des les premiers jours de culture. Il en est de même pour l'indice de sporulation. La production maximum de conidiospores est atteinte à la fin de la première semaine de culture. Par contre lorsque la concentration du substrat est pléthorique, on observe une inhibition de la conidiogénèse pendant la même période ; après une semaine de culture, il apparait une induction tardive de la conidiogénèse qui s'exprime par une production croissante de conidiospores à partir du 7ème jour. L'indice de sporulation maximum est atteint au dela de 30 jours de culture.

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

Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus sur le Milieu B, dont la composition est intermédiaire entre celle des Milieux A et C. On constate en effet une conidiogénèse précoce obtenue après 5 jours de culture, une production de conidiospores croissante et

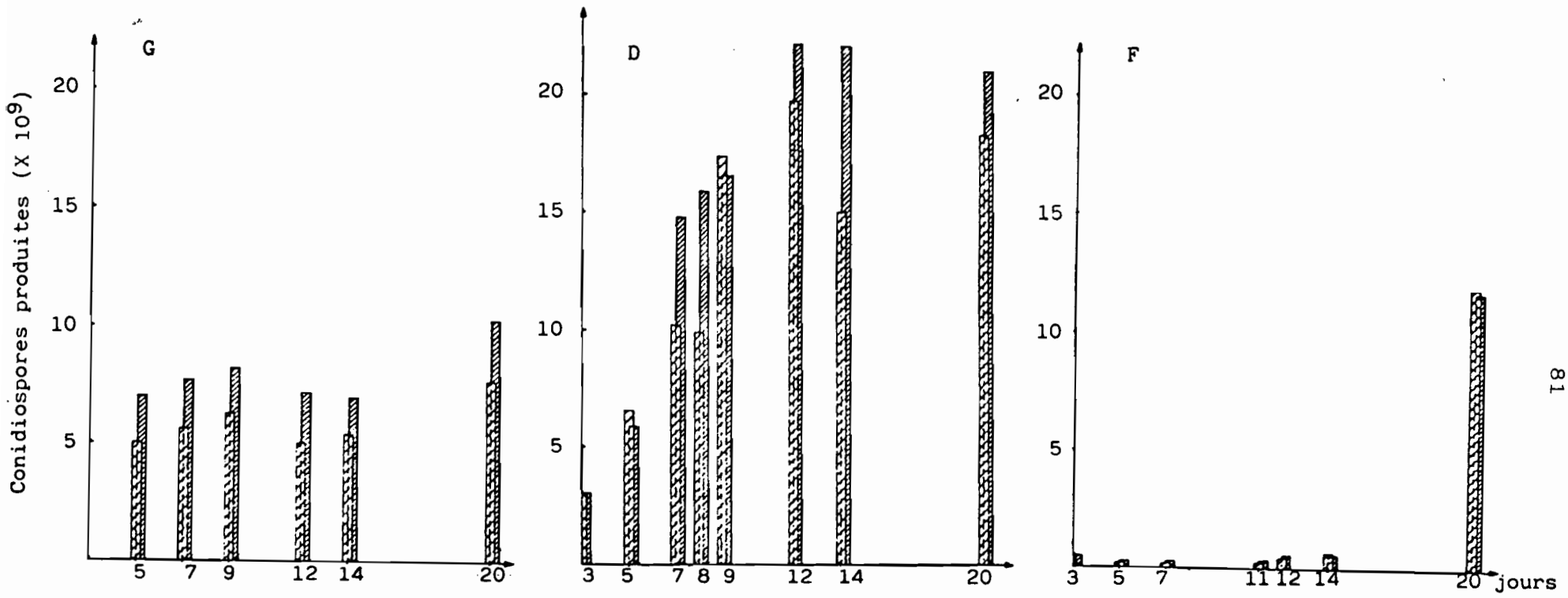


Fig. 21 : Production de conidiospores de T. harzianum, cultivé sur les milieux G, D et F en fonction du temps. La première colonne représente le nombre total de conidiospores produites par erlen, la seconde représente l'indice de sporulation (Ω).

l'indice de sporulation qui varie linéairement à partir du 7ème jour pour atteindre des valeurs maximales à partir du 14ème jour (Fig. 20).

5.5.2. Influence de la concentration de la source d'Azote.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la concentration d'azote influence la conidiogénèse de I. harzianum. Nous avons donc suivi la cinétique de production de conidiospores de I. harzianum , sur différents milieux de culture dont le rapport C/N varie de 7 à 32.

Lorsque la concentration en Azote du milieu de culture est élevée avec un rapport C/N compris entre 7 et 17 (Milieux A, B, C fig. 20) la conidiogénèse est principalement influencée par la source de Carbone. Cependant, lorsque la quantité de substrat carboné est maintenue fixe et que l'on fait varier la concentration de l'Azote total disponible dans le milieu de culture (B, D, E et F), on observe deux phénomènes (Fig. 20 et 21) :

- Une baisse sensible de la production de conidiospores qui suit la diminution de la concentration de l'Azote total disponible dans le milieu de culture. C'est le cas notamment pour les milieux D et E dont le rapport C/N est respectivement de 20,8 et 27,3.

- L'indice de sporulation atteint son maximum le 12ème jour pour le milieu D et le 20ème jour pour le milieu E. Quand la concentration d'Azote contenue dans un milieu de culture diminue, on observe un phénomène d'inhibition de la conidiogénèse.

Ce phénomène est également confirmé par les résultats obtenus avec le milieu F (fig. 21). En effet, lorsque dans un milieu de culture la quantité de la source de Carbone est élevée et la concentration d'Azote est très faible (rapport C/N 32,5), on constate une inhibition de la conidiogénèse. Cette inhibition dure environ 15 jours (fig. 6). Après cette période, la production massive de conidiospores se produit en l'espace de quelques jours.

Il est important de signaler que les quantités de conidiospores produites après 25 et 30 jours de culture sur les milieux B, D, E et F, sont très voisines. Pour ces quatre milieux, l'indice de sporulation est proche de 20 X 10^9 spores / gramme de substrat Carboné initial.

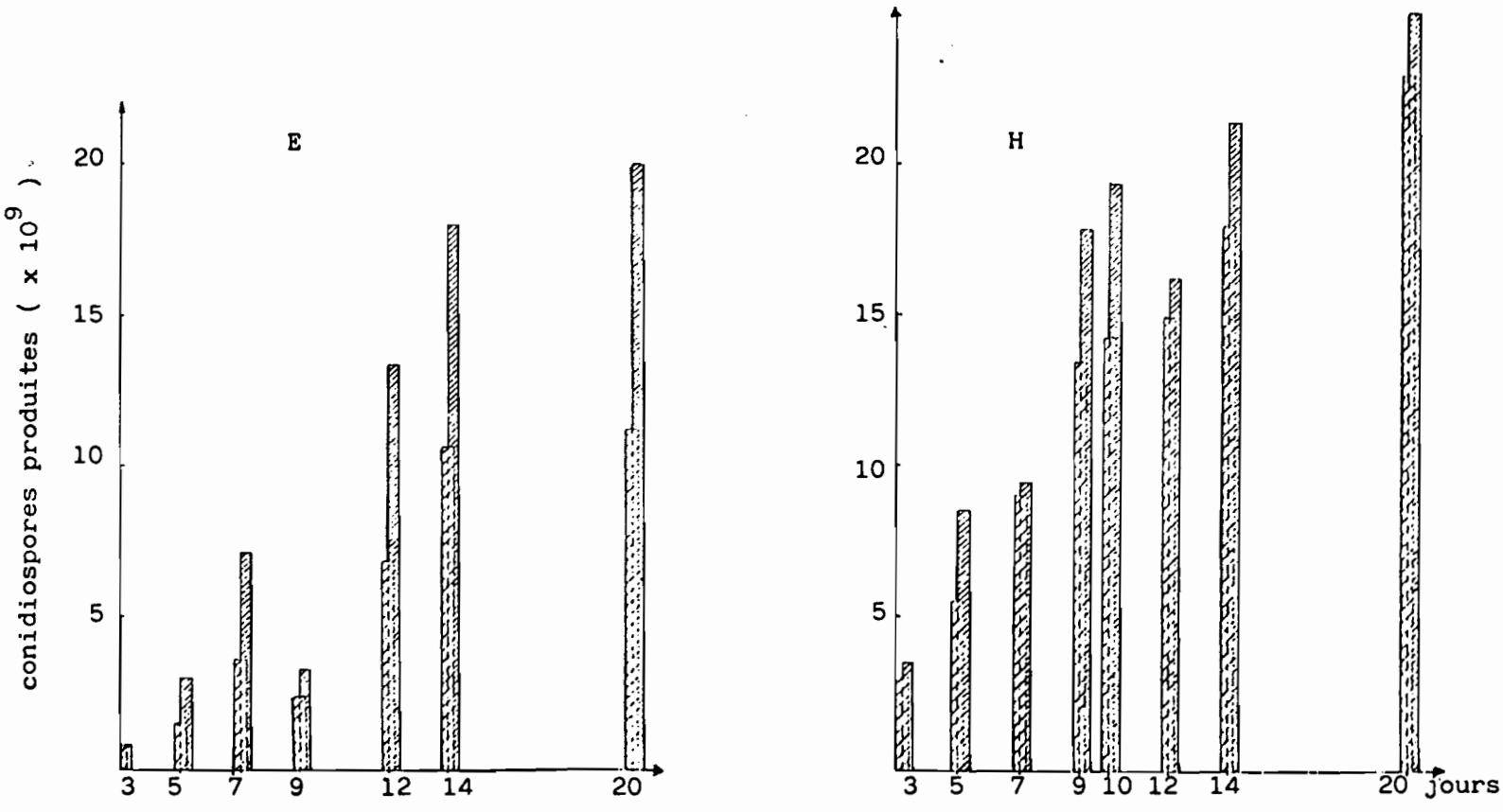


Figure 22 : Production de conidiospores de T.harzianum , cultivé sur les milieux E et H en fonction du temps d'incubation. La première colonne représente le nombre total de conidiospores produites par erlen , la seconde représente l'indice de sporulation.

Nous pouvons formuler l'hypothèse suivante pour expliquer l'influence de l'azote sur le déclenchement de la sporulation :

Lorsque dans un milieu de culture, la source de Carbone est présente à une concentration moyenne (40 g/l) et que dans ce milieu la concentration d'Azote total disponible est très faible, la conidiogénèse est inhibée pendant plusieurs semaines. L'Azote disponible serait d'abord utilisé pour la croissance exclusive du mycélium. La conidiogénèse interviendrait très tardivement avec utilisation d'une grande partie de l'Azote assimilé par le mycélium.

Lorsque l'Azote est fourni en quantité pléthorique dans le milieu de culture, la conidiogénèse n'est pas inhibée, par contre l'indice de sporulation maximum est atteint très rapidement. Les valeurs de cet indice sont cependant faibles et restent stables en fonction du temps (fig. 22).

5.5.3. Influence de la salinité.

Pour étudier l'influence de trois sels (KCl,NaCl et CaCl2) sur la sporulation de I. harzianum on a utilisé le milieu B auquel des concentrations croissantes en sels ont été ajoutées. Les cultures ont été réalisées en erlen avec des concentrations en sels variant de 0 à 50 g/l.

- Effets de NaCl.

Le Tableau XXVII regroupe les résultats obtenus lors de l'étude de la production de conidiospores de I. harzianum en fonction de la concentration croissante en Chlorure de Sodium.

Il apparait que les faibles concentrations en NaCl (5 et 10 g/l) n'influencent pas considérablement la sporulation. Alors qu'à partir de 20 g/l de NaCl, concentration critique, la production de conidiospores est inhibée pendant 3 jours. C'est également à cette concentration que le plus grand nombre de "mutants blancs" apparaissent à la surface des cultures.

L'étude cinétique de la production de conidiospores en fonction de la salinité a montré la présence de conidiospores dans tous les milieux mais à des temps variables d'incubation. Cette production apparait tardivement (après 10 jours de culture) pour les concentrations élevées en NaCl (40 g/l) et reste très faible. Les indices de sporulation sont faibles et stables en fonction du temps pour des concentrations élevées en NaCl. Ces mêmes indices augmentent en fonction du temps pour des concentrations faibles en NaCl.

On note également un changement de couleur de la culture avec des concentrations élevées en NaCl. Pour les faibles concentrations de NaCl (10-30 g/l) les cultures sont vertes. Pour des concentrations plus élevées la couleur devient jaune. On n'a pas utilisé des concentrations de NaCl plus fortes car à partir de 80 g/l de NaCl il n'y a pas de germination de l'inoculum.

TABLEAU XXVII : Effets de la concentration de NaCl sur la sporulation de *T.harzianum* cultivé sur le milieu B + NaCl en erlen. Les résultats expriment l'indice de sporulation (X 10^9 conidiospores).

Temps jours	Concentration de (NaCl) en g/l						
	0	5	10	20	30	40	50
3	6,45	4,75	0	0	0	0	0
5	15,25	15,12	7,50	5,27	2,65	0	0
7	19,75	17,37	13,12	9,25	5,44	0	0
10	31,25	23,05	14,12	4,63	4,75	3,56	2,01
12	23,35	30,62	19,37	7,62	5,62	6,05	1,31
17	31,50	25,75	30,62	14,06	10,31	7,05	1,93
20	42,50	32,25	30,85	16,12	11,34	6,21	1,71

- Effets de KCl.

L'effet "antisporulant", terme déjà employé par GINDRAT (1977), des ions K+ présents à concentration élevée dans les milieux de culture a été vérifié également pour des cultures de I. harzianum . Sur le Tableau XXVIII on a porté les résultats d'une étude cinétique sur les effets de la concentration de KCl sur la sporulation de I. harzianum. Ce microorganisme se comporte exactement de la même façon que sur les milieux contenant du NaCl. La concentration critique est de 20 g/l. A cette concentration il y a apparition de très nombreux mutants blancs accompagnés d'une diminution de la sporulation pour des concentrations plus élevées. (ROUSSOS et Coll. 1985)

Les sels de NaCl ou de KCl agissent de la même manière non seulement pour I. harzianum mais également pour I. album. On a vu que pour I. album lorsque KNO3 est présent dans le milieu de culture à 21 g/l, la production de conidiospores est 100 fois moins élevée que celle obtenue avec 10 g/l (MICHOUD 1983).

TABLEAU XXVIII : Effets de la concentration de KCl sur la sporulation de *T harzianum* cultivé sur le milieu B + KCl en erlen. Les résultats expriment l'indice de sporulation (X 10^9 conidiospores).

Temps / Jours	Concentration de (KCl) en g/l.						
	0	5	10	20	30	40	50
3	10,25	7,75	6,06	0	0	0	0
5	16,37	15,12	12,62	7,00	3,25	0	0
7	28,12	22,00	22,00	8,37	5,62	0,86	0,03
10	33,62	38,37	29,62	13,87	9,25	2,37	0,34
12	33,12	27,37	25,75	15,87	9,42	3,20	1,85
17	41,37	37,25	32,75	18,00	18,25	4,69	1,56
20	38,37	41,12	32,12	10,75	6,75	4,39	1,1

- Effets de CaCl2.

On vient de constater que les sels de NaCl et de KCl incorporés dans les milieux de culture, même à faible concentration (5 g/l), influencent la sporulation de I. harzianum en diminuant les rendements de sporulation.

Le milieu de base qui a été utilisé contient du KH2PO4 (2 g/l) pour apporter principalement du Phosphore nécéssaire au développement du microorganisme et assurer l'effet tampon. Cependant la présence de faibles quantités d'ions K+ diminue les rendements de sporulation. Afin d'annuler cet effet "antisporulant", on a expérimenté différentes concentrations de CaCl2 additionnées au milieu de base (milieu B).

On remarque que le Chlorure de Calcium influence la sporulation de manière tout à fait différente de celle observée pour les chlorures de Potassium et de Sodium (Tableau XXIV).

Tout d'abord les faibles concentrations de CaCl2 (1 ; 2,5 et 5 g/l) favorisent la sporulation. Pour des concentrations élevées (20 et 30 g/l de CaCl2), il y a une diminution de la production de conidiospores de I. harzianum et un changement de couleur des cultures qui virent du vert au jaune.

TABLEAU XXIX : Effets de la concentration de $CaCl_2$ dans un milieu de culture sur la sporulation de *T.harzianum* en fonction du temps. Les résultats expriment l'indice de sporulation (X 10^9 conidiospores).

Temps d'incubation Jours	Concentration de $CaCl_2$ dans le milieu de culture (en g/l)						
	0	1	2,5	5	10	20	30
3	11,99	12,20	12,93	3,35	2,00	1,52	2,09
5	15,44	24,63	18,73	4,13	13,56	6,51	9,32
7	32,69	38,54	32,99	7,60	24,90	2,50	11,96
10	34,24	43,20	43,82	33,11	39,65	12,31	4,80
14	38,17	57,18	50,08	42,57	27,13	24,32	12,59
17	42,57	44,45	58,43	51,20	38,12	29,21	18,50
20	35,89	48,42	62,47	59,41	36,17	34,08	17,11

Les meilleurs rendements de sporulation ont été obtenus avec une concentration de 2,5 g/l de CaCl2. Pour cette concentration on a obtenu une augmentation des rendements de sporulation proche de 75 % après 20 jours de culture. L'indice de sporulation est très élevé et proche de 6,25 X 10^10 conidiospores produites par gramme de substrat (ROUSSOS et Coll. 1985).

Si l'on compare ces résultats avec ceux précédemment obtenus en milieu liquide non agité pour différentes souches de champignons filamenteux cultivés sur glucose (ROUSSOS et RAIMBAULT 1982a) on constate que le rendement de sporulation pour I. harzianum est amélioré de 80 %. D'autre part cette souche cellulolytique produit environ 200 fois plus de spores que I. reesei .

Il est difficile de comparer les résultats de sporulation obtenus pour I. harzianum avec ceux de la littérature. Tout d'abord, la totalité des études rencontrées dans la littérature ont été qualitatives et basées principalement sur la couleur des cultures pour exprimer la sporulation (verte pour les Trichoderma (GINDRAT ; 1977) noire pour Aspergillus niger GALBRAITH et SMITH , 1969). D'autre part, il est faux de comparer les rendements de sporulation obtenus sur différents milieux de culture pour un genre, par exemple Trichoderma avec ceux d'un autre genre, par exemple Penicillium. En effet chaque champignon filamenteux se comporte différemment vis-à-vis de la pression osmotique d'un milieu de culture qui est fonction principalement de la nature et la concentration du substrat ainsi que des sels minéraux, sans parler des conditions de culture et de l'environnement.

Les effets des concentrations élevées de sels sur la croissance, la sporulation et la pigmentation de différentes espèces de Trichoderma ont été étudiés par GINDRAT (1977). En milieux gélosés contenant du NaCl (5 % = 856 mM) l'ensemble des souches présente une croissance apicale ralentie, une sporulation réduite et une absence de coloration typique du récto des colonies. La concentration "albinisante" de NaCl ou de KCl dans le milieu varie selon les souches. Chez Trichoderma sp (souche intermédiaire entre I. harzianum et I. viride), une concentration en CaCl2 de 90 à 270 mM annule l'effet antisporulant de 856 mM de NaCl et stimule la conidiation en milieu sans NaCl. Puisqu'une concentration de 856 mM de NaCl abaisse le potentiel osmotique des milieux utilisés de -1,2 à -41 bars, l'effet du CaCl2 a été étudié chez Trichoderma sp. Après 3-4 jours, la croissance maximale est observée entre -1,2 et -10 bars. Elle est réduite de moitie à environ -30 bars, et nulle vers -90 bars. La pigmentation est absente à -32 bars (NaCl) ou -41 bars (KCl). Pigmentation et sporulation sont intenses en milieu ajusté à -31 bars avec du CaCl2. Quant au Sodium, il est toxique à haute concentration (GINDRAT, 1977).

L'effet d'induction de la sporulation chez P. notatum par Ca++ a déjà été démontré par PITT et POOLE en 1981. Ces auteurs ont mis en évidence le phénomène d'induction de la sporulation de P. notatum lorsque la source d'Azote est le NaNO3 (6,0 g/l) et que le milieu contient du KH2PO4 (1,5 g/l) et du CaCl2 (10 m Moles Ca++). A cette concentration en ions Ca++ l'indice de sporula ion pour P. notatum est 20 fois supérieur à celui obtenu sur un milieu dépourvu de CaCl2.

La sporulation d'un certain nombre de champignons appartenant au groupe d' Aspergillus glaucus (A. chevalieri , A. amstelodami , A. repens et A. ruber), en fonction de la pression osmotique a été étudiée par CURRAN (1971). La production de cléistothecium, formes de reproduction sexuée, est généralement inhibée par une pression osmotique supérieure à 450 bars, qui peut être obtenue par l'utilisation de Glucose, Sucrose, Chlorure de Potassium ou chlorure de Sodium dans le milieu de culture. La production des têtes conidiennes est augmentée pour A. chevalieri et A. chevalieri var. intermedius lorsque la pression osmotique est supérieure à 150 bars ; ceci n'est pas valable pour les espèces d' A. amstelodami , A.manginii , A.repens ou A. ruber (CURRAN ; 1971).

5.6. CONCLUSION.

L'étude de la conidiogénèse de I. harzianum , cultivé en erlen sur différents milieux de culture à base de farine de manioc, a permis d'examiner les principaux paramètres capables d'influencer la production massive de conidiospores.

Ces paramètres ont été étudiés séparément, afin d'apprécier l'effet de chacun d'eux sur la sporulation de I. harzianum.

Tous les paramètres considérés jouent un rôle important au niveau de la germination des conidiospores,et les variations observées reflètent l'importance de ces facteurs non seulement sur la conidiogénèse mais également sur la croissance végétative du champignon.

Il a été montré que la production de conidiospores est augmentée de 50 % lorsque la méthode d'inoculation dans la masse du milieu de culture est pratiquée par rapport à l'inoculation en surface de mêmes milieux.

La concentration de la source de Carbone présente dans les milieux de culture est le paramètre qui influence le plus la production de conidiospores ; chez I. harzianum il a été démontré que le nombre total de conidiospores produites est directement proportionnel à la concentration de la source de carbone (farine de manioc). Lorsque les valeurs de celles-ci sont inférieures à 50 g/l, la production de conidiospores se fait avec des rendements élevés. Au contraire, lorsque les

concentrations en substrat carboné sont supérieures ou égales à 50 g/l, même si le nombre total de conidiospores produites reste supérieur, les rendements de sporulation commencent à diminuer.

Le nombre de conidiospores produites n'est pas proportionnel à la quantité d'Azote présente dans les milieux de culture, mais la concentration d'Azote influence quand même la régulation de la conidiogénèse de I. harzianum. L'étude cinétique de la production des conidiospores de I. harzianum a révélé l'existence de phénomènes d'induction-inhibition exercés par la concentration en azote. Pour de faibles concentrations en azote, la conidiogénèse est inhibée pendant 15 jours. Pour des concentrations élevées en Azote les rendements de sporulation obtenus sont plus faibles. Les meilleurs indices de sporulations sont obtenus avec un rapport C/N proche de 14.

Des phénomènes d'induction-inhibition exercés par la concentration de la source de carbone ont été mis en évidence. Pour des concentrations faibles en Carbone, on note une induction précoce de la conidiogénèse alors que pour des concentrations élevées en Carbone on observe une inhibition de la production de conidiospores pendant plusieurs jours.

Les sels minéraux en général (NaCl, KCl et CaCl2) à des concentrations élevées (20-70 g/l) inhibent la sporulation, alors que pour des concentrations plus faibles on observe l'effet opposé. Les ions K+ et Na+ incorporés dans le milieu de culture provoquent une diminution de la pression osmotique et de ce fait inhibent la sporulation. A faible concentration les ions Ca++ (1 à 10 g/l) augmentent le potentiel osmotique et exercent un effet inducteur sur la sporulation. Les meilleurs rendements de sporulation ont été obtenus pour une concentration de 2,5 g/l de CaCl2 (Milieu H, fig. 22).

CHAPITRE VI - PRODUCTION D'INOCULUM EN FERMENTEUR A DISQUES.

6.1. INTRODUCTION.

L'utilisation croissante de champignons filamenteux dans des domaines aussi variés que les fermentations alimentaires, l'industrie pharmaceutique et la bioindustrie (production de biomasse, d'enzymes ou de molécules biologiques par biosynthèse ou hémisynthèse) nécéssite de disposer de quantités importantes de conidiospores.

Ces conidiospores constituent le départ de toutes ces applications puisqu'elles servent de forme de conservation ou au démarrage de l'opération. Elles interviennent de façon massive dans le procéssus lui-même soit en tant qu'inoculum soit en tant que spores elles-mêmes pour réaliser les transformations de bioconversion souhaitées (VEZINA et Coll. 1968).

Différentes techniques sont connues pour produire ces conidiospores. La plus ancienne consiste à cultiver le microorganisme à la surface d'un milieu gélosé, en boîte de Pétri au laboratoire, ou en fioles de Roux pour les applications pratiques.

La technique de production de conidiospores en plateaux fait appel à la culture du champignon sur des substrats végétaux tels que son de blé, paille et divers produits ou résidus amylacés disposés en couche de quelques centimètres d'épaisseur et placés dans des étuves d'incubation (VEZINA ; 1975).

Plus récemment on a démontré la possibilité de produire des conidiospores de champignons filamenteux dans des cultures liquides en utilisant des fermenteurs stérilisables et extrapolables industriellement (BRODERICK et col.1982). Il s'agit sans doute d'un progrès réel, mais cela n'est possible que dans des conditions particulières et avec un nombre limité de champignons. D'autre part la suspension recueillie contient non seulement les conidiospores, mais également une quantité de métabolites et tous les débris cellulaires qui peuvent être génants par la suite.

Parmi les nombreux dispositifs de fermenteurs qui ont été proposés pour la culture des microorganismes en milieu liquide, on trouve des fermenteurs à disques rotatifs (MEANS et coll. 1962, ALERMAN et col. 1983) dont le principe d'utilisation est basé essentiellement sur la rotation permanente de disques tout au long de l'incubation et qui plongent alternativement dans le milieu nutritif liquide et dans l'atmosphère.

Pour la présente étude nous avons utilisé un nouveau procédé de production massive de conidiospores de I. harzianum . Ce procédé allie l'avantage de la culture de surface sur un milieu solidifié à l'utilisation d'un fermenteur à disques rotatifs particulier (RAIMBAULT et ROUSSOS 1985). Le principe d'utilisation de ce fermenteur à disques permet d'obtenir une très grande surface de sporulation, une répartition homogène du milieu de culture stérilisé dans le fermenteur, une aération régulée tout au long de la croissance de I. harzianum , une récolte aisée de conidiospores par simple lavage des surfaces. La Biomasse mycélienne reste emprisonnée dans le milieu solidifié. Toutes les opérations se font dans le même appareil, assurant ainsi une simplicité d'utilisation et une asépsie stricte.

Avant de présenter les résultats obtenus, nous allons rappeler brièvement les particularités de cet appareil, afin de mieux comprendre les différences qui apparaissent au niveau des résultats.

Dans chaque fermenteur la quantité de milieu de culture est variable. Elle est comprise entre 500 et 600 g de milieu par fermenteur.

La durée d'incubation des différentes cultures a été généralement de 8 jours, exception faite pour les milieux A (13 jours) et C (18 jours).

Le fermenteur ainsi chargé avec le milieu de culture approprié et inoculé dans la masse a été placé dans une pièce non climatisée à proximité des erlens qui ont servi pour l'étude d'optimisation. Contrairement aux erlens, le fermenteur à disque a été aéré tout au long de la culture, grâce à un balayage forcé par un flux d'air stérile, humidifié par barbotage. Le débit d'aération a été maintenu constant à 100 l/h.

Tous les milieux de culture, dont la composition figure au Tableau VII, ont été utilisés pour cette étude de production de conidiospores de I. harzianum dans un fermenteur à disques.

6.2. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT.

Le nombre total de conidiospores de I. harzianum obtenues dans le fermenteur à disques a été de 57, 44 et 15,5 X 10^10 pour 100, 40 et 20 g de farine de manioc présents dans les milieux A, B et C respectivement (fig. 23).

Cette production élevée de conidiospores a été obtenue avec des rendements différents. En effet, les valeurs des

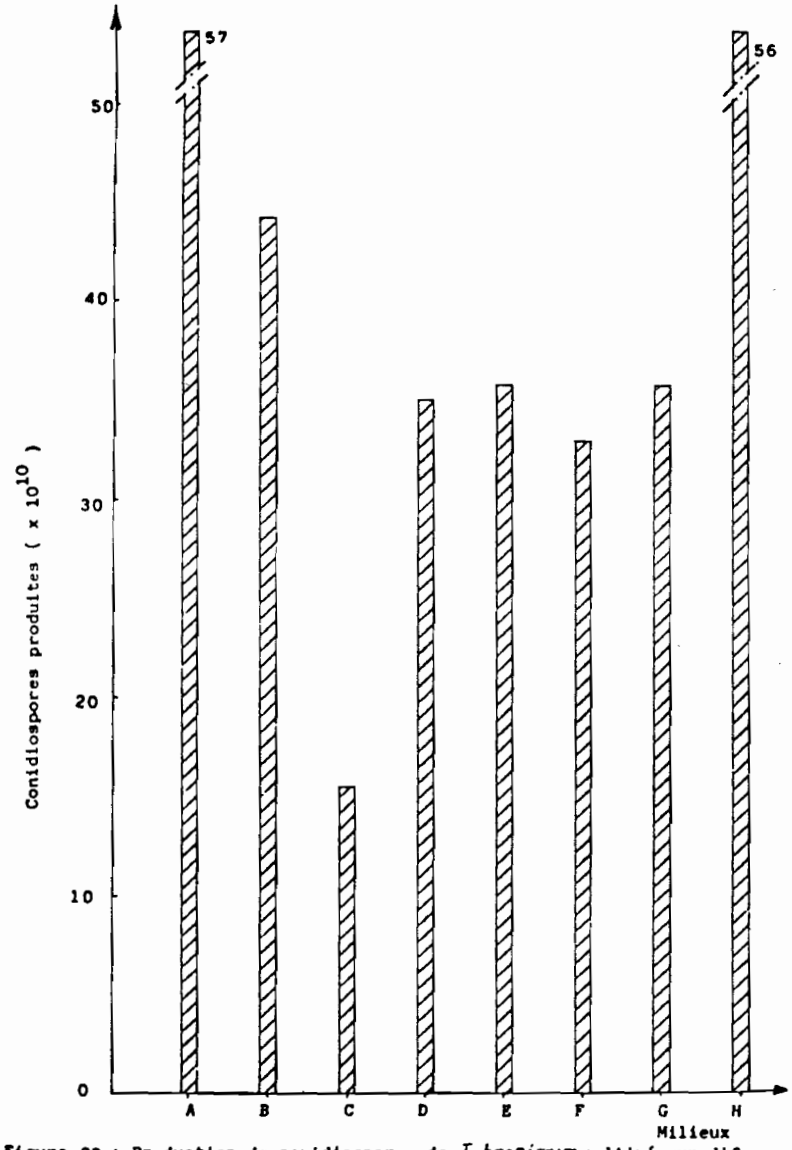


Figure 23 : Production de conidiospores de *T.harzianum* cultivé sur différents milieux de culture dana un fermenteur à disques.Les résultats expriment le nombre total de conidiospores produites par fermenteur.

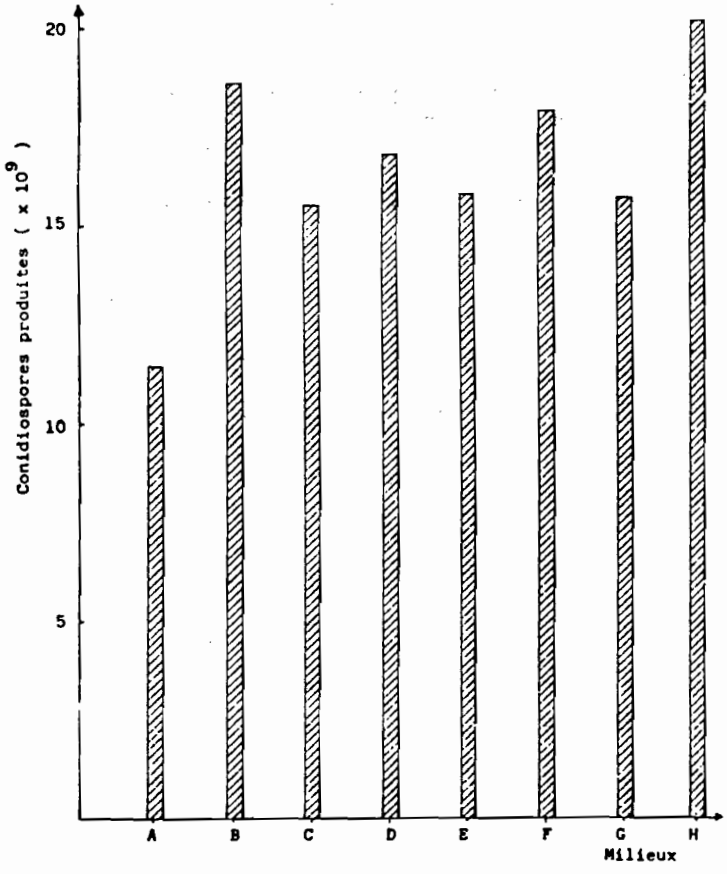


Figure 24 : Production de conidiospores de *T.harzianum* , cultivé sur différents milieux de culture dans un fermenteur à disques Les résultats expriment le nombre de conidiospores produites par gramme de substrat (Ω).

indices de sporulation $\mathfrak{R}$ ont été de 11,4, 18,6 et 15,5 X 10^9) pour les milieux respectifs A, B et C (fig. 24).

Malgré les effets d'induction-répression dûs principalement à la concentration de la source de Carbone, la production globale de conidiospores de I. harzianum dans un fermenteur à disques est proportionnelle à la quantité de substrat carboné du milieu de culture.

6.3. Influence de la concentration de la source d'Azote.

Pour cette étude nous avons utilisé les milieux B, D, E, F et G, dont la composition a été donnée au Tableau VII. La production globale de conidiospores de I. harzianum par fermenteur est importante avec des valeurs très proches. Ces valeurs sont comprises entre 33 et 44 X 10^10 conidiospores pour les 5 milieux (fig. 23). Les indices de sporulation $\mathfrak{R}$ obtenus sur ces milieux imposent la même remarque (fig. 24) ; ces indices sont en effet caractérisés par des valeurs élevées, de 15,7 à 18,6 X 10^9 conidiospores produites par gramme de farine de manioc.

Selon ces résultats, il semble que lorsque I. harzianum est cultivé dans un fermenteur à disques, sur des milieux différents, le nombre de conidiospores produites après 8 jours d'incubation soit étroitement lié à la quantité de la source de Carbone initialement présente.

Lorsque la quantité de la source de Carbone est identique pour les milieux B, D, E, F et G et lorsque pour ces mêmes milieux la quantité de la source d'Azote varie de 1 à 6, les indices de sporulation obtenus ($\mathfrak{R}$) ne reflètent pas cette évolution.

Il faut remarquer que les effets d'inhibition dûs à des concentrations élevées d'Azote (milieu G) existent, mais ils sont très atténues. De même, les effets d'inhibition dûs à des concentrations très faibles d'Azote (milieu F) qui ont été observés ont disparu pour les cultures en fermenteur à disques. Pour le milieu F, en effet, la production est de 33 X 10^10 conidiospores / fermenteur avec un indice de sporulation $\mathfrak{R}$ comparable à celui du milieu B. Cependant, le milieu B contient 3 fois plus d'Azote.

Pour tenter de donner une explication à ce phénomène, On peut dire que l'aération des milieux de culture au cours de la croissance de I. harzianum soit le seul paramètre qui différencie les cultures en erlen de celles réalisées dans le fermenteur à disques. En effet, lorsque les cultures sont aérées dans le fermenteur à disques, le développement du mycélium est beaucoup plus rapide. Cette croissance rapide masquerait les effets d'induction-inhibition qui ont été

observés lors des cultures en erlen. Nous venons de voir que ces phénomènes d'inhibition existent mais ils sont très atténués (Milieu G fig. 24).

6.4. INFLUENCE DE L'AERATION.

Pour les expériences précédentes, les cultures de I. harzianum dans un fermenteur à disques, ont reçu une aération fixe de 100 l/h. Afin d'étudier l'influence de l'aération sur la production de conidiospores de I. harzianum, les cultures ont été réalisées dans un fermenteur à disques de 4,4 litres, avec un débit d'aération allant de 0 à 100 litres/heure. Ce débit permet le renouvellement de l'air du fermenteur de 0 à 25 fois par heure.

Les cultures ont été incubées à la température du Laboratoire (15-20 ° C) pendant 6 jours. Les résultats sont portés sur le Tableau XXX.

Les cultures n'ayant pas reçu d'aération n'ont pas produit de conidiospores, ce qui est tout à fait normal étant donné que I. harzianum est un microorganisme aérobie stricte. L'optimum de production de conidiospores est obtenu avec une aération de 20 l/h correspondant à 5 fois le renouvellement de l'air du fermenteur par heure. Il est intéressant de constater également que pour une aération plus importante du fermenteur, les rendements de sporulation diminuent. Cette diminution est inversement proportionnelle au débit de l'aération des cultures. Nous pensons que la diminution des rendements de sporulation pour une aération importante des cultures serait principalement dûe à la dilution du taux de CO2 présent dans le fermenteur.

TABLEAU XXX : Influence de l'aération sur la production de conidiospores de *T.harzianum*. Les cultures ont été faites dans un fermenteur à disques de 4 litres contenant 600 g du milieu H, à la température du Laboratoire (15-20°C) pendant 6 jours.

Aération : litres / heures	Nb. de Renouvellements de l'air du fermenteur	PRODUCTION DE CONIDIOSPORES		
		Nb. Total	Indice de Sporulation (Ω)	Nb. de spores / cm^2
0	0	0	0	0
4	1	$6,07 \times 10^{11}$	$2,53 \times 10^{10}$	$1,22 \times 10^{8}$
20	5	$8,67 \times 10^{11}$	$3,61 \times 10^{10}$	$1,75 \times 10^{8}$
40	10	$7,30 \times 10^{11}$	$3,25 \times 10^{10}$	$1,47 \times 10^{8}$
70	17,5	$6,68 \times 10^{11}$	$2,78 \times 10^{10}$	$1,35 \times 10^{8}$
100	25	$6,25 \times 10^{11}$	$2,60 \times 10^{10}$	$1,26 \times 10^{8}$

6.5. CINETIQUE DE PRODUCTION DES CONIDIOSPORES.

L'étude de la physiologie de la sporulation de I. harzianum en erlen et ensuite en fermenteur à disques nous a permis d'apprécier l'influence des principaux facteurs sur la production de conidiospores. Cette étude serait incomplète si on ne rapportait pas à la suite la synthèse des conditions optimales retenues ainsi que la cinétique de production des conidiospores en fermenteur à disques.

Tout d'abord le Tableau XXXI résume les conditions optimales de culture retenues pour la production de conidiospores de I. harzianum dans un fermenteur à disques (Composition et quantité du milieu de culture par fermenteur, inoculation, incubation, aération) ainsi que les rendements de production de conidiospores. Le fermenteur équipé de 35 disques espacés de 10 mm est chargé avec 600 ml de milieu de culture. Après stérilisation, inoculation et répartition du milieu chaque disque est chargé avec environs 17 g de milieu de culture uniformément inoculé. L'incubation se fait à la température du laboratoire (20-25 ° C) ; les cultures sont aérées avec un débit de 40 l/h d'air humide. Ce débit d'aération permet de renouveler 10 fois le volume d'air du fermenteur par heure.

Sur les figures 25 et 26 on a représenté les cinétiques de production de conidiospores de I. harzianum cultivé sur le milieu optimisé (Milieu H) dans le fermenteur à disques en fonction du temps. A partir du 4ème jour de culture, des quantités très importantes de conidiospores sont produites (3 X 10^11). Cette production évolue linéairement pour atteindre les valeurs maximales après le 6ème jour. A partir du 8ème jour, on note une diminution régulière de cette production (Fig. 25).

Les indices de sporulation portés sur la Fig. 26 montrent que les meilleurs rendements de production de conidiospores de I. harzianum sont obtenus le 7ème jour de culture. Au total il y a une production de 7,3 X 10^11 conidiospores par fermenteur, ce qui correspond à 1,47 X 10^8 conidiospores produites par cm2.

TABLEAU XXXI : Conditions optimales pour la production de conidiospores de *T.harzianum* dans un fermenteur à disques de 4 litres.

COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE.

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

QUANTITE DE MILIEU PAR FERMENTEUR DE 4 LITRES : 600 ml.

STERILISATION : Autoclavage 40 min. à 110°C

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

INCUBATION : Température du Laboratoire (15-28°C)
Aération 20 l/h d'air humide
Durée 6-7 jours

RECOLTE DES CONIDIOSPORES : Dans 2 litres d'eau additionnée de Tween 80

NOMBRE TOTAL DES SPORES : $8,67 \times 10^{11}$ conidiospores/fermenteur

RENDEMENT DE SPORULATION : $3,61 \times 10^{10}$ conidiospores/g

NOMBRE DE CONIDIOSPORES/cm^2: $1,75 \times 10^8$ conidiospores/cm^2

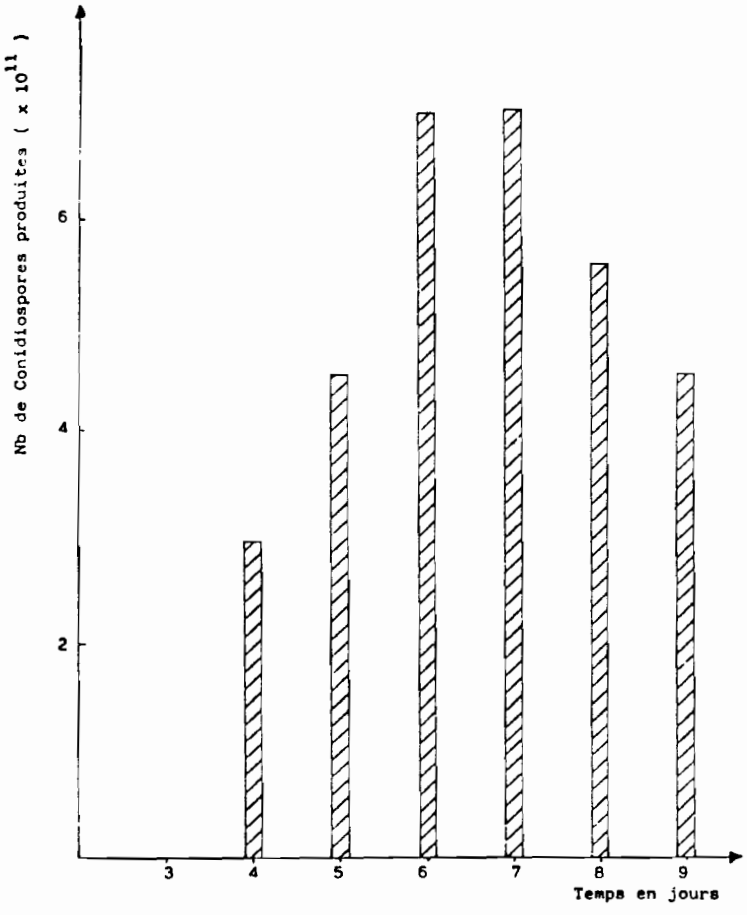


Figure 25 : Production de conidiospores de *T.harzianum* , cultivé sur le milieu H dans un fermenteur à disques en fonction du temps d'incubation.Les résultats expriment le nombre Total ds conidiospores produites par fermenteur.

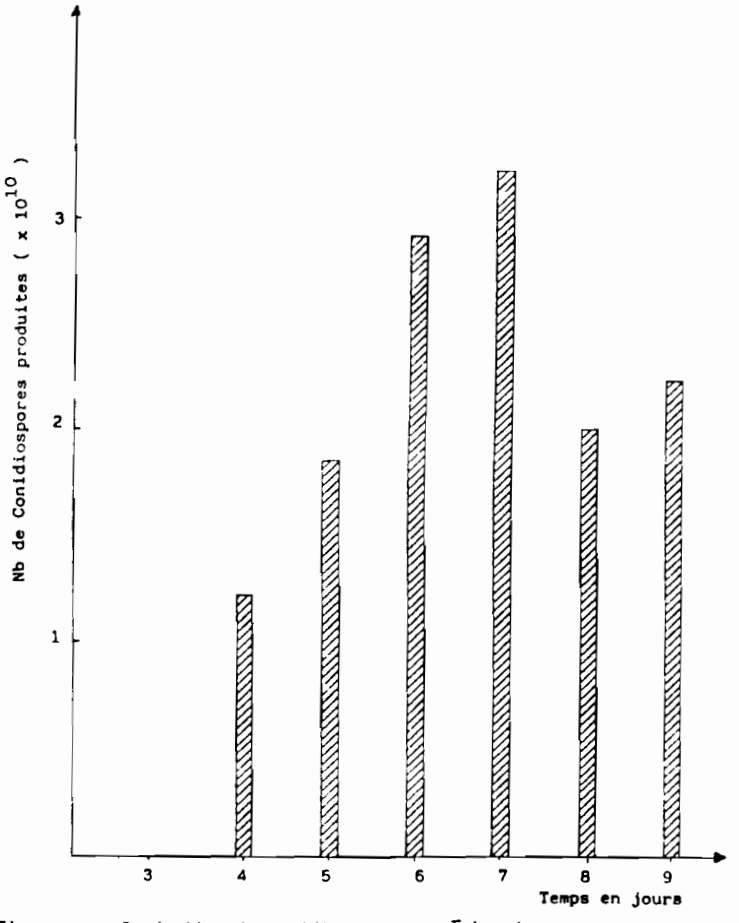


Figure 26 : Production de conidiospores de *T.harzianum* , cultivé sur le milieu H dans un fermenteur à disques, en fonction du temps d'incubation. Les résultats expriment le nombre de conidiospores produites par gramme de substrat (Ω).

6.6. CONSERVATION, VIABILITE, CONDITIONNEMENT.

6.6.1. Conservation.

Les méthodes classiques de conservation des conidiospores de champignons filamenteux (congélation à -18°C ; dans l'azote liquide à -196 °C ; lyophilisation) sont couramment utilisées dans le Laboratoire pour la préservation des microorganismes de collection (BUTLER, 1980 ; TOMMERUP et KIDBY, 1979 ; DAHMEN et Coll. 1983). Cependant toutes ces méthodes s'appliquent à des quantités très faibles de conidiospores et nécéssitent un investissement important en appareillage ou en fonctionnement.

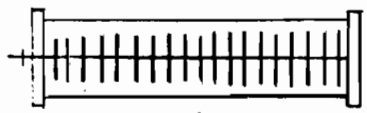
Pour ces raisons nous avons expérimenté une nouvelle méthode de conservation par séchage sous vide d'une suspension de conidiospores, en utilisant un rotavapor. Afin de faciliter la récupération des conidiospores séchées qui restent collées contre les parois du recipient, nous avons également utilisé un support insoluble dans l'eau.

Pour l'ensemble des échantillons nous avons utilisé le même vide ainsi que la même vitesse de rotation de l'axe du rotavapor. Les températures du bain marie pour l'évaporation de l'eau ont été de +30, +40, +50 et +60°C. Les résultats obtenus lors du traitement au rotavapor de 100 ml d'une suspension contenant 12,69 X 10^9 conidiospores de *T. harzianum* ont été rapporté dans le Tableau XXXII.

TABLEAU XXXII : Traitement au Rotavapor à différentes températures de 100 ml d'une suspension contenant 12,69 X 10^9 conidiospores de *T.harzianum*. Le support utilisé a été de la bagasse de canne finement broyée et préalablement stérilisée (1,5 % p.v.)

No. Echantillon	Température du Bain-Marie	Support g/100 ml	Temps Evaporation min.	Poids de l'échantillon sec	Conidiospores récupérés X 10^9	% de Récupération
S 40	40°C	0	48	0,1279	2,66	21,10
S 50	50°C	0	43	0,1218	6,99	55,47
S 60	60°C	0	36	0,1228	9,62	76,34
C 30	30°C	1,5	65	1,7072	10,60	84,28
C 40	40°C	1,5	42	1,4230	7,42	58,92
C 50	50°C	1,5	49	1,3530	5,97	47,38
C 60	60°C	1,5	36	1,4680	9,45	75,00
Témoin	-	0	-	100 ml	12,69	100,00

SPORULATEUR

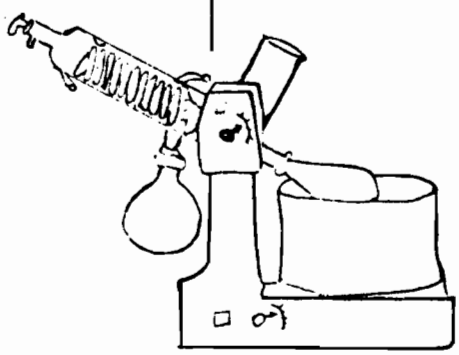


Production de conidiospores dans un fermenteur à disques.

COLLECTE

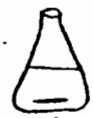
Suspension de conidiospores dans de l'eau contenant du tween 80 (0,1 %)

SECHAGE



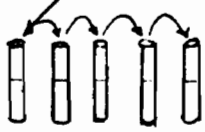
Utilisation d'un rotavapeur pour sécher les conidiospores à différentes températures en présence ou en absence d'un support (bagasse de canne à sucre 1,5%)

CONTROLE



Suspension de conidiospores séchées (eau + tween 80)

DE



Dilutions 10^{-2} - 10^{-6}

VIABILITE

Inoculation, culture et numération de conidiospores viables.

Fig. Schéma de différentes étapes de séchage et de contrôle de viabilité de conidiospores de *T. harzianum* séchées dans un rotavapeur.

Le taux de récupération des conidiospores séchées est élevé. En moyenne il est de 51 % pour les échanttillons sans support et de 66 % pour les échantillons contenant 1,5 g de bagasse de canne. Il apparait clairement que l'utilisation d'un support augmente de 30 % les rendements de récupération des conidies.

6.6.2 Viabilité.

Pour s'assurer que cette méthode de conservation ne détériore pas les conidiospores de I. harzianum nous avons vérifié leur viabilité le lendemain du séchage. Sur le Tableau XXXIII sont portés les résultats de numération des colonies de I. harzianum apparues sur le milieu de DOUGLAS et Coll. (1979) après 6 jours d'incubation de 0,2 ml des suspensions dilutions de différents lots de conidiospores séchées. Le temoin que nous avons utilisé est la suspension initiale de conidiospores et n'a subi aucun traitement. Pour le calcul du pourcentage de germination des conidiospores, nous prendrons comme référence ce temoin.

On constate que lorsque la température du bain-marie augmente pendant le séchage, la viabilité des conidiospores diminue. Cependant la présence du support dans la suspension de conidiospores améliore significativement les rendements de viabilité. En particulier pour le séchage des conidiospores à 50 °C le rapport de viabilité de celles séchées en présence du support sur celles dépourvues de support est voisin de 25.

Cette méthode de conservation par séchage sous vide à la température de +40 °C permet de maintenir 40 % de conidiospores viables. Toutefois pour améliorer les rendements de récupération ainsi que les rendements de viabilité des conidiospores conservées de cette façon il

TABLEAU XXXIII: Viabilité de conidiospores séchées au rotavapor. Des parties aliquotes, de différents lots de conidiospores séchées ont été remises en suspension dans 50ml (SM). Après une série de dilutions, o,2 ml de chaque dilution ont été étalés à la surface d'une boîte de pétri contenant le milieu de DOUGLAS et Coll.(1979). Les chiffres qui apparaissent dans ce tableau représentent le nombre de colonies qui est en corrélation avec le % de spores viables.

Echantillon	Témoin	SANS SUPPORT			AVEC SUPPORT			
		S 40	S 50	S 60	C 30	C 40	C 50	C 60
Nb de colonies X 10^6, pour 50 ml de SM	200	37,5	3,95	2,25	80	77,5	40	11,5
Poids sec de spores g/50ml	(10 ml)	0,026	0,024	0,025	0,171	0,142	0,135	0,147
Poids des lots de spores séchées	–	0,128	0,122	0,123	1,707	1,423	1,353	1,468
Spores variables après traitement X 10^7	200	18,7	1,62	1,12	80	77,5	40	11,5
% viabilité	100	9,35	0,81	0,56	40	38,75	20	5,75

apparait évident d'optimiser les conditions d'utilisation du support. De même il est nécéssaire de réaliser une cinétique de viabilité des conidiospores ainsi séchées après plusieurs mois de conservation.

6.6.3. Conditionnement.

L'inoculation des différents substrats en milieu solide s'opère avec des suspensions concentrées de conidiospores. Afin d'utiliser toujours des conidiospores en bon état et aisément maniable, nous avons récolté les conidiospores du fermenteur à disques le jour même de l'inoculation. La moitié seulement des conidiospores ainsi produites est utilisée pour l'inoculation du substrat à fermenter en zymotis ; on envisage de sécher au rotavapor la partie restante en présence d'un support.

6.7. Conclusion.

A la suite de cette étude, nous avons défini un milieu et des conditions de culture optimums pour produire dans un fermenteur à disques le maximum de conidiospores de I. harzianum dans un minimum de temps avec des rendements de sporulation particulièrement élevés. La synthèse de ces conditions ainsi que les résultats obtenus sont portés sur le Tableau XXXI. Il a été montré que l'aération des cultures de I. harzianum en fermenteur à disques, avec de l'air stérile et humide, est un facteur très important qui favorise le développement du mycélium ainsi qu'une sporulation précoce et abondante. L'étude cinétique de la sporulation de I. harzianum cultivé en fermenteur à disques a fait apparaitre que les rendements optimums de production de conidiospores sont obtenus après 6 ou 7 jours alors que pour les cultures non aérées en erlen, les meilleurs rendements sont obtenus après 20 jours d'incubation.

Au total il y a eu une production de 8,67 X 10^11 conidiospores de I. harzianum par fermenteur après 6 jours d'incubation à la température du laboratoire (15 - 22°C). L'indice de sporulation (Ω) a été de 3,61 X 10^10 conidiospores / g de substrat initialement présent dans le milieu de culture, ce qui correspond à 1,75 X 10^8 conidiospores formées par cm2. Le poids d'une conidiospore de I. harzianum étant de 1 X 10 - 11 g, le rendement pondéral global rapporté au substrat carboné (poids de spores / g) est très élevé et proche de 36 %.

Une nouvelle technique de conservation par séchage des suspensions de conidiospores a été mise au point en utilisant un rotavapor. Il a été démontré que l'utilisation d'un support (de la bagasse de canne à sucre finement broyée) améliore nettement les rendements de récupération et de viabilité des conidiospores séchées par cette méthode.

CHAPITRE VII - CROISSANCE DE I. HARZIANUM EN MILIEU SOLIDE.

7.1. INTRODUCTION.

Le terme "fermentation en milieu solide" a été utilisé par RAIMBAULT (1980) pour désigner "toute fermentation dans laquelle le substrat n'est pas liquide". Ce terme est la traduction des expressions "Solid-state fermentation" ou "Solid-substrat fermentation" employées par différents auteurs anglophones (HESSELTINE, 1972 ; TENGERDY et Coll., 1984 ; AIDOO et Coll., 1982 ; MOO-YOUNG et Coll., 1983).

Selon ces auteurs, la fermentation en milieu solide se rapporte strictement à la croissance et au métabolisme de microorganismes cultivés sur des substrats insolubles. Il y a une certaine confusion avec l'ancienne terminologie de "culture en surface" qui peut s'appliquer à des substrats solides (gélosés ou non) et liquides et se réfère principalement au mode de culture. En pratique, les fermentations en milieu solide concernent les cultures de microorganismes sur des substrats insolubles humidifiés, caractérisés par une absence de tout liquide sous forme libre. L'eau, indispensable pour la croissance du microorganisme, se trouve sous forme adsorbée ou complexée à l'intérieur de la matrice solide. L'humidité des substrats inoculés dépend de leur pouvoir d'absorption ; pour les substrats amylacés, l'humidité optimum est de 55 % environ ; pour les substrats cellulosiques elle avoisine les 75 %.

Récemment, une technique fiable de culture en milieu solide a été mise au point qui permet l'étude du développement séléctif du mycélium sur un milieu solide amylacé au niveau du laboratoire (RAIMBAULT et GERMON, 1976 ; ALAZARD, 1979 ; RAIMBAULT, 1980 ; RAIMBAULT et ALAZARD, 1980).Cette technique est basée sur le préconditionnement du substrat solide sous forme granulaire poreuse gélatinisée, uniformément inoculé avec une suspension de spores d' A. niger contenant aussi les sels minéraux. Grâce à un dispositif d'incubationtrès simple, et à des conditions séléctives de croissance pour A. niger , il a été possible de contrôler les principaux paramètres qui influencent le développement du mycélium en milieu solide dans des conditions non stériles. En fin de fermentation, le produit obtenu contient 20 % de Protéines et 25 % de sucres résiduels (RAIMBAULT ; 1980)

L'adaptation de cette technique de fermentation en milieu solide aux substrats cellulosiques a donné des résultats prometteurs (ROUSSOS, 1981 ; GIULIANO, 1982 ; ROUSSOS et SEDHA, 1983 ; ROUSSOS et HANNIBAL, 1984). Nous développerons dans ce chapitre l'optimisation des conditions

de culture de I. harzianum en milieu solide ainsi que la fermentation de divers substrats cellulosiques au niveau du Laboratoire.

7.2. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE EN COLONNE.

Un mélange de paille et de son de blé (Roussos, 1981), a été utilisé pour la culture de I. harzianum en milieu solide. Les paramètres suivants ont été plus particulièrement étudiés :

- composition du substrat : un mélange de paille et de son de blé utilisé dans les proportions 80/20. Le son de blé est ajouté à la paille pour apporter une source d'azote protéinique supplémentaire pour le champignon ainsi qu'une source de Carbone (amidon) facilement assimilable par le microorganisme, permettant une germination homogène de l'inoculum (ROUSSOS et Coll. 1985)

- la quantité d'inoculum qui permet la germination de la totalité des conidiospores et pour laquelle la production de cellulases est optimale, se situe aux environs de 3 X 10^7 spores/g de Substrat Poids Sec (ROUSSOS et RAIMBAULT 1982 b.)

- le conditionnement du substrat : cette étude qui concerne l'influence de divers prétraitements de résidus lignocellulosiques en vue de leur future utilisation pour les fermentations en milieu solide a été réalisée en collaboration avec VIDAUD (1981).

Les résultats obtenus ont permis de définir les conditions essentielles de mise en oeuvre de la fermentation en milieu solide des substrats lignocellulosiques:

- utilisation d'un substrat broyé d'une taille inférieure à 1 mm.

- traitement du substrat en milieu imprégné, de façon à augmenter l'accessibilité de la cellulose aux cellulases et à éviter les pertes importantes de matière qui peuvent être une source de pollution.

- traitement du substrat imprégné avec une solution minérale. Ce traitement peut être uniquement thermique (110° C pendant 30 min) en absence ou en présence de soude à 1 % . Dans ce cas il faut par la suite neutraliser et ajuster le pH à la valeur adéquate après autoclavage (VIDAUD et Coll. 1982).

Les autres paramètres choisis sont les suivants :

- Humidité du substrat inoculé : 70 %
- pH initial : 6,0

- température d'incubation : 29°C

- débit d'air : 7 l / h / incubateur.

Dans ces conditions, les résultats obtenus avec un mélange de paille et de son de blé ont été (ROUSSOS, 1981) :

1770 UI d'APF / 100 g SPS et 17.280 UI d'ACMC / 100 g SPS.

Afin d'optimiser la production de cellulases de I. harzianum cultivé en milieu solide sur un mélange identique, GIULIANO (1982) a étudié l'influence des principaux paramètres de la croissance (humidité initiale du substrat, température, pH initial du milieu de culture).

7.2.1. Humidité initiale du substrat.

La teneur en eau du substrat joue un rôle capital lors de la fermentation en milieu solide car qu'elle influe de façon directe la germination de l'inoculum et la croissance du mycélium mais également la porosité du substrat, elle-même liée à la diffusion de l'air.

Les humidités suivantes ont été testées : 55 %, 67 %, 74 % et 80 %, les autres paramètres étant fixés pour à pH 5,8, aération 7 l/h et température à 30°C.

Les résultats sont reportés sur la Fig. 27). L'optimum d'humidité initiale du substrat se situe aux alentours de 74 %. Lorsque l'humidité initiale du substrat est faible (55 - 65 % d'eau), la germination des conidiospores est très tardive. Elle ne se réalise dans de bonnes conditions que lorsque l'humidité du produit atteint des valeurs voisines de 70 % pour les produits lignocellulosiques. En conséquence, la production de cellulases est très tardive sur des substrats dont l'humidité initiale est inférieure à 65 %. Au contraire, avec un substrat trop humide (80 % d'eau et plus), la germination de conidiospores démarre rapidement, mais la sporulation est précoce. Il semblerait donc que l'excès d'humidité du substrat constitue un environnement peu favorable au développement mycélien. En particulier à ce taux élevé d'humidité, l'eau occupe une grande partie des espaces libres, espaces réservés au passage de l'air et aux échanges gazeux. Le facteur limitant serait donc dans ce cas, le transfert d'oxygène.

7.2.2. Température de fermentation.

La souche que nous avons utilisée est un microorganisme mesophile; elle se développe à partir de 10°C (ROUSSOS et Coll. 1985) mais ne supporte pas des températures supérieures à 35 °C. Les températures de 25 C, 30°C et 35°C ont été testées par la production de cellulases en milieu solide (Fig. 27). Les conditions de culture choisies ont été les suivantes : humidité initiale du substrat 74 %, pH = 5,8 ; aération : 7 l/h.

La température correspondant aux activités cellulasiques optimales est de 30°C. Cette température est très proche de celle utilisée pour la production de cellulases par différentes souches de Trichoderma (STERNBERG, 1976, PURQUIE et Coll 1984, ROUSSOS et Coll. 1982 b).

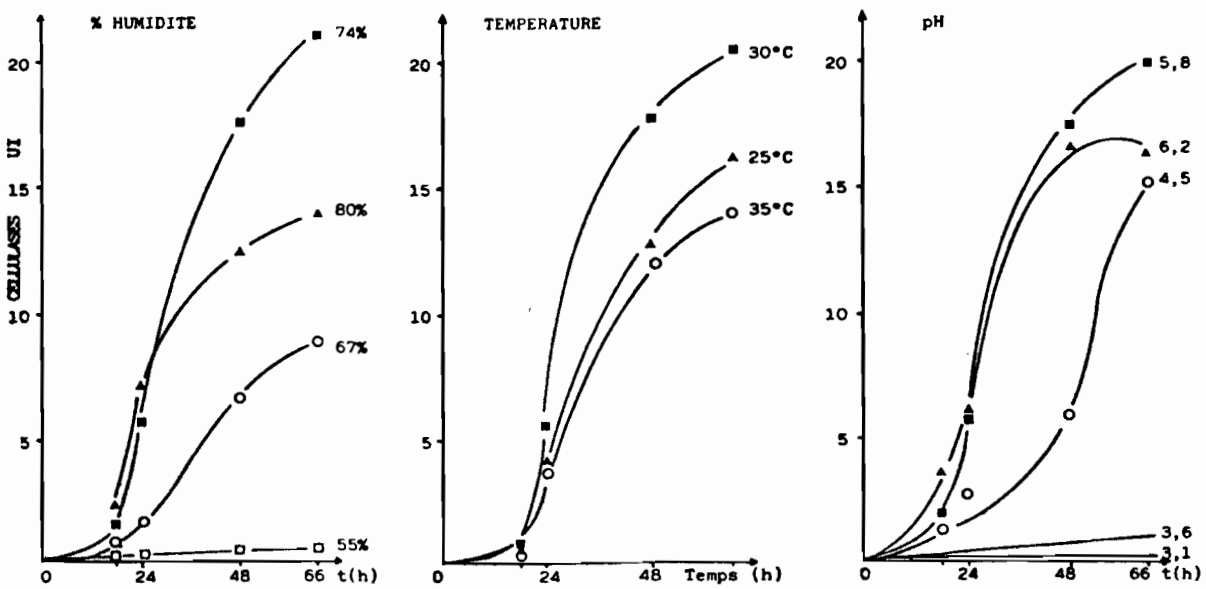


Figure 27 : Cinétiques de production de cellulases de *T.harzianum* cultivé en milieu solide sur paille et son de blé en fonction de l'humidité initiale du substrat inoculé, de la température d'incubation ainsi que du pH initial des milieux de culture. Les résultats représentent la production de cellulases, (ACMC x 1000 UI / 100g SPS).

7.2.3. pH de la solution minérale.

Contrairement aux bactéries, les champignons filamenteux se développent sur des milieux de culture acides plutôt que sur des milieux alcalins. En particulier I. harzianum est capable de produire des cultures abondantes sur des milieux liquides très acides (pH = 2) et de produire des cellulases sur ces milieux acides contenant de la cellulose (cf. 4.7.3). Il est donc important de travailler dans des conditions de pH limites afin d'éliminer les éventuels contaminants bactériens, tout en opérant dans des conditions favorables pour la croissance et non stériles.

Pour cette expérience l'humidité initiale du substrat a été de 74 %, l'aération de 7 l/h, la température de 30°C et les pH suivants ont été testés : 3,1 ; 3,6 ; 4,5 ; 5,8 et 6,2. Pour obtenir les différentes valeurs du pH initial, on a fait varier le pH de la solution minérale. Il faut signaler que la paille de blé et, en général, les substrats lignocellulosiques sont caractérisés par un pouvoir tampon élevé.

Les résultats ont montré qu'à pH 3,1 et 3,6 le champignon ne se développe pas. Les conidiospores ne germent pas après 66 h. Par contre il a été démontré (Fig. 34) que le pH optimum pour la production de cellulases est 5,8. (DESCHAMPS et Coll. 1985).

Ces résultats ne sont pas en contradiction avec ceux obtenus pour les cultures en milieu liquide avec des valeurs de pH plus faibles. En effet on a remarqué (ROUSSOS et HANNIBAL 1984) en mesurant le pH d'un jus d'extrait obtenu par préssage du produit lignocellulosique fermenté, que les valeurs étaient inférieures de 1 à 1,5 unités pH à celles obtenues sur les échantillons traités dans les conditions standards. En réalité le champignon ne s'est jamais développé sur des substrats dont le pH réel a été voisin de 2.

7.2.4. Concentration en sels de la solution minérale.

Lors des études précedentes sur l'hydrolyse de la cellulose par des moisissures (ROUSSOS, 1981) et la production de cellulases de I. harzianum cultivé sur bagasse (ROUSSOS et SEDHA, 1983) nous avions utilisé les mêmes concentrations en sels (Sulfate d'ammonium, Urée, Phosphate monopotassique) que celles de la solution minérale utilisée par RAIMBAULT et ALAZARD (1981) pour la culture d' A. niger sur farine de manioc. Il nous a semblé important d'étudier si la quantité de sels (17 g pour 100 g de substrat) n'était pas trop importante. Nous avons donc utilisé des dilutions au 1/2 et au 1/3 de cette solution minérale (Tableau IX). Pour cette expérience l'humidité initiale du substrat a été de 70 %,

l'aération de 7 l/h, la température de 29°C et le pH initial proche de 5,80.

Les résultats obtenus (Tableau XXXIV) démontrent qu'il y a une chute importante de la production de cellulases lorsque la concentration en sels minéraux diminue. La faible concentration en sels minéraux du milieu de culture affecte principalement la croissance active du mycélium. En effet des observations au microscope ont révélé que la germination de l'inoculum a été identique pour les trois cultures, comme le développement du mycélium était normal pendant quelques heures. Par contre, la conidiogénèse a été rapidement induite pour la dilution A/3 et plus tardivement pour la dilution de la solution minérale A/2. Des conidiospores ont été liberées dans le milieu avant 44 h pour les deux dilutions. Il apparait qu'il n'est pas conseillé de diluer la solution minérale ceci pour deux raisons principales : il faut maintenir une production élevée de cellulases; il faut retarder la sporulation.

TABLEAU XXXIV: Evolution du pH et de la production de cellulases au cours de la croissance de *T. harzianum* en milieu solide (colonne), sur un mélange de bagasse et de son de blé en utilisant la solution minérale A ainsi que deux dilutions de celle-ci A/2 et A/3. Les ACMC sont exprimées en UI/100 g SPS.

Temps	Solution A		Solution A/2		Solution A/3	
Heures	pH	ACMC	pH	ACMC	pH	ACMC
0	5,80	0	6,10	0	5,70	0
6	5,85	0	6,04	0	5,20	0
20	5,56	50	5,80	0	4,72	722
24	4,86	124	5,22	0	4,12	3.559
30	4.50	3.162	5,12	6.467	4,46	2.704
44	6,26	17.464	4,80	8.556	4,76	3.250

7.3. CULTURE SUR DIVERS SUBSTRATS LIGNOCELLULOSIQUES.

Ayant défini les conditions essentielles de mise en oeuvre de la fermentation en milieu solide de la paille de blé selon la méthode de RAIMBAULT et ALAZARD (1981) nous avons par la suite étudié divers substrats lignocellulosiques (paille, son de blé, pulpes de betterave, bagasse) pour suivre la croissance de I. harzianum sur ces substrats. Cette étude nous a permis de généraliser la culture en milieu solide à l'ensemble des substrats lignocellulosiques et d'etendre ainsi les applications de cette technique.

7.3.1. CROISSANCE SUR PAILLE ET SON DE BLE.

La croissance de I. harzianum cultivé sur un mélange de paille et de son de blé a été suivie pendant 70 h en utilisant, comme conditions de culture, les paramètres précédemment optimisés (humidité : 74 % ; température : 30°C et pH = 5,8).

Les résultats (fig. 28) montrent que le maximum d'activité cellulasique est obtenu après 66 h de culture et s'élève à 1.810 UI d'APF et 19.800 UI d'ACMC / 100 g SPS.

Le prétraitement du substrat ajusté à 50 % d'humidité avec la solution Minérale, est réalisé par autoclavage à 110° C pendant 45 min. Ceci permet d'éliminer un grand nombre de microorganismes présents initialement sur la paille et le son de blé. L'inoculation homogène et abondante du substrat avec 3 X 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. Nous n'avons d'ailleurs jamais observé de contamination du produit fermenté par d'autres champignons filamenteux que celui qui a été inoculé.

TABLEAU XXXV : Composition moyenne des pulpes de betteraves

Matière sèche	20 %
dont Cendres	5 %
Matières volatiles	95 %
Eau	80 %

Analyse élémentaire (rapportée à la matière sèche)		Analyse Organique (rapportée à la matière sèche)	
Carbone	40 %	Cellulose	20 %
Phosphore	0,37 %	Hemicellulose	15 %
Azote	1,80 %	Sucres simples	30 %
C/N	22	Pectines	10 %
		Protéines	10 %
		Lipides	8 %

La germination des conidiospores est terminée après 17 h de culture. La croissance active du mycélium aboutit à la formation d'un mycélium foisonnant colonisant préférentiellement le son de blé. Assez rapidement, après 45 h de culture, il y a apparition de formes de reproduction asexuées (phialides) qui libèrent des conidiospores dans le milieu après 60 h de fermentation. Ceci est dû, sans doute, à l'épuisement du substrat facilement assimilable. La formation des phialides peut être retardée par un prétraitement du substrat plus drastique (ROUSSOS et SEDHA, 1983).

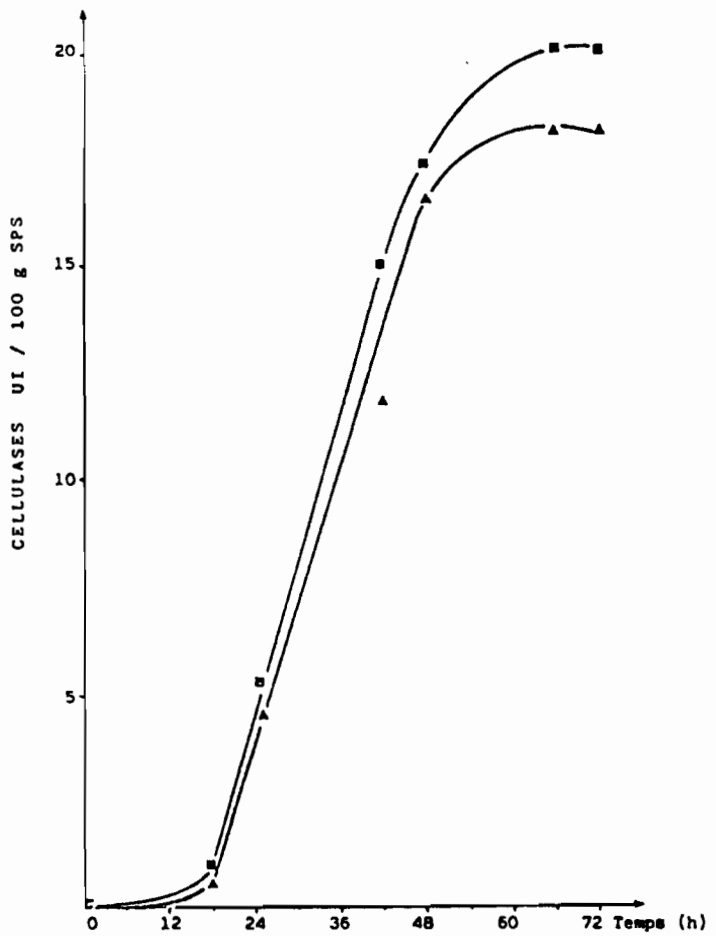


Figure 28 : Cinétique de production de cellulases de *T. harzianum* cultivé en milieu solide sur un mélange de paille et de son de blé. Les résultats expriment les activités cellulasiques : les ACMC x 1000 UI (■-■) et les APF x 100 UI (▲-▲)

7.3.2. Croissance sur son de blé.

L'utilisation de son de blé sans prétraitement comme substrat pour la croissance de I. harzianum en fermentation solide, n'a pas donné une culture abondante. Au contraire, une microflore bactérienne s'est assez rapidement développée provoquant la lyse du mycélium. A la suite de ces observations nous avons envisagé un prétraitement du son de blé en imprégnation avec la solution minérale à 110°C pendant 45 min. Des problèmes de texture et de densité de ce substrat nous ont amené à utiliser une humidité initiale plus faible (60 %). Les autres paramètres ont été: pH : 6,0, température : 29 °C, aération : 7 l/h/colonne .

Sur la fig. 29 nous avons reporté les résultats obtenus en fermentation solide pendant 60 heures. L'observation microscopique révèle une germination homogène et rapide des conidiospores. Après 24 h de culture, le mycélium commence à envahir le substrat. La croissance rapide du mycélium qui développe de très nombreux branchements aboutit, à une prise en masse du substrat fermenté après 40 h de culture.

Les activités cellulasiques sont libérées dans le milieu après 24 h. Les quantités de cellulases produites après 48 h de culture sont faibles : 6.100 UI ACMC et 2.067 UI APF. Le rapport ACMC/APF est de 3. On constate donc que la quantité des enzymes et leur nature sont différentes de celles obtenues à partir d'un mélange de paille et de son de blé. Ce qui est tout à fait normal étant donné que le microorganisme utilise préférentiellement l'amidon que la cellulose d'autre part le glucose inhibe la biosynthèse des cellulases.

La teneur initiale en protéines du son de blé est de 21,91 g/100 g SPS. Après 50 h de fermentation en milieu solide, ce taux passe à 32,49 g de protéines pour 100 g SPS au départ. Ce résultat entraine un certain nombre de commentaires.

Tout d'abord le prétraitement à la chaleur du substrat a provoqué la destruction d'une grande partie de la microflore bactérienne naturellement présente dans le son de blé ; l'hydratation du substrat sous préssion à température élevée a été uniforme, permettant ainsi la répartition homogène de la solution minérale à l'intérieur des capillaires. La gélatinisation de l'amidon a été favorisée, ainsi que l'accessibilité de la cellulose en augmentant par ce traitement les zones amorphes de la cellulose, facilitant ainsi l'action des endoglucanases.

Le microorganisme rencontrant alors des conditions favorables pour sa croissance, se développe en utilisant préférenciellement les sucres par rapport aux protéines. On peut parler dans ce cas d'un enrichissement du substrat en

protéines mycéliennes. Cet enrichissement est important car le taux de protéines passe de 21,91 g à 32,49 g/100 g de SPS après 48 heures de culture. Cependant la mesure des protéines par la méthode de LOWRY et Coll. (1951) ne donne pas des résultats très exacts. Divers composés du son de blé peuvent interférer et fausser les analyses. Plusieurs mesures ont donc été réalisées sur des échantillons au temps zero.

Par contre la production de cellulases est faible principalement par suite des phénomènes d'inhibition exercés par le glucose, principal produit de l'hydrolyse de l'amidon. Il serait donc préférable d'utiliser ce procédé pour un enrichissement en protéines du son de blé plutôt que pour la production de cellulases.

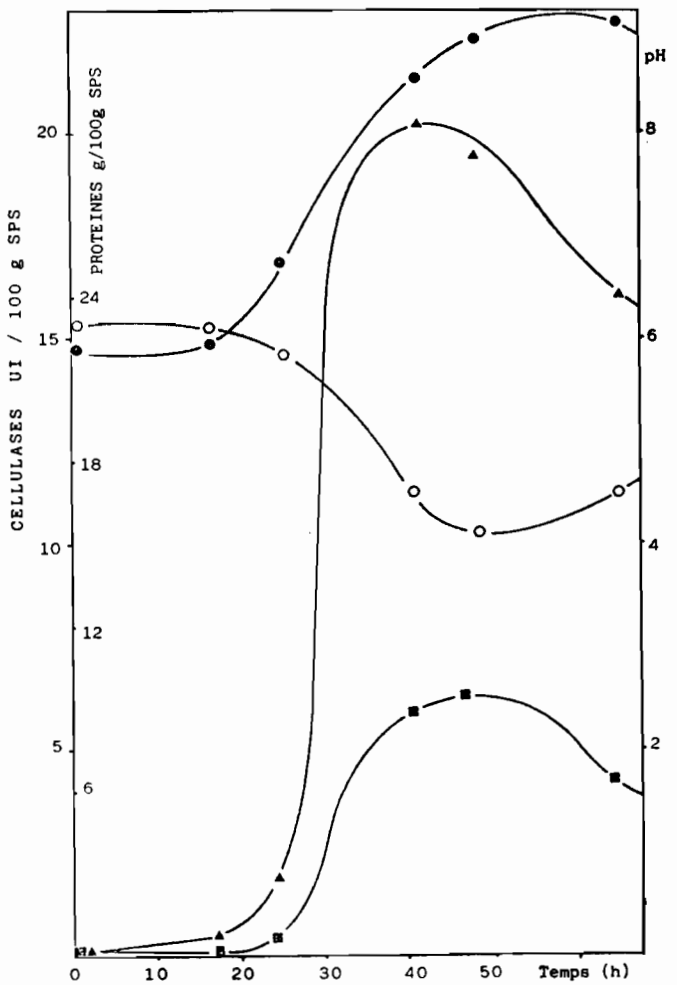


Figure 29: Croissance de *T.harzianum* cultivé sur son de blé en milieu solide. pH (o-o) ; Protéines (●-●) ; ACMC x 1000 UI (■-■) et APF x 100 UI (▲-▲).

7.3.3. Croissance sur pulpes de betterave.

La France figure parmi les grandes puissances sucrières. Ses sucreries sont alimentées avec des betteraves en métropole et de la canne dans les zones tropicales. Dans les régions du Nord, la culture de la betterave sucrière tient la première place des cultures industrielles. Les sous-produits sont diversement utilisés : les melasses servent à la fabrication de levures et de métabolites ; les pulpes sous produit solide riche en cellulose, sont utilisées après ensilage ou séchage, pour la nutrition des animaux digastriques. Elles sont ajoutées en faibles quantités dans leur rations alimentaires. L'utilisation de ce sous-produit comme substrat pour la croissance de champignons filamenteux cellulolytiques pourrait amener de nouveaux débouchés. La composition moyenne des pulpes de betterave est donnée au Tableau XXXV. La cellulose, les hemicelluloses ainsi que les sucres simples représentent 65 % du poids sec. Les pectines, les protéines et les lipides sont également présents en quantités plus faibles ; les pulpes sont dépourvues de lignine.

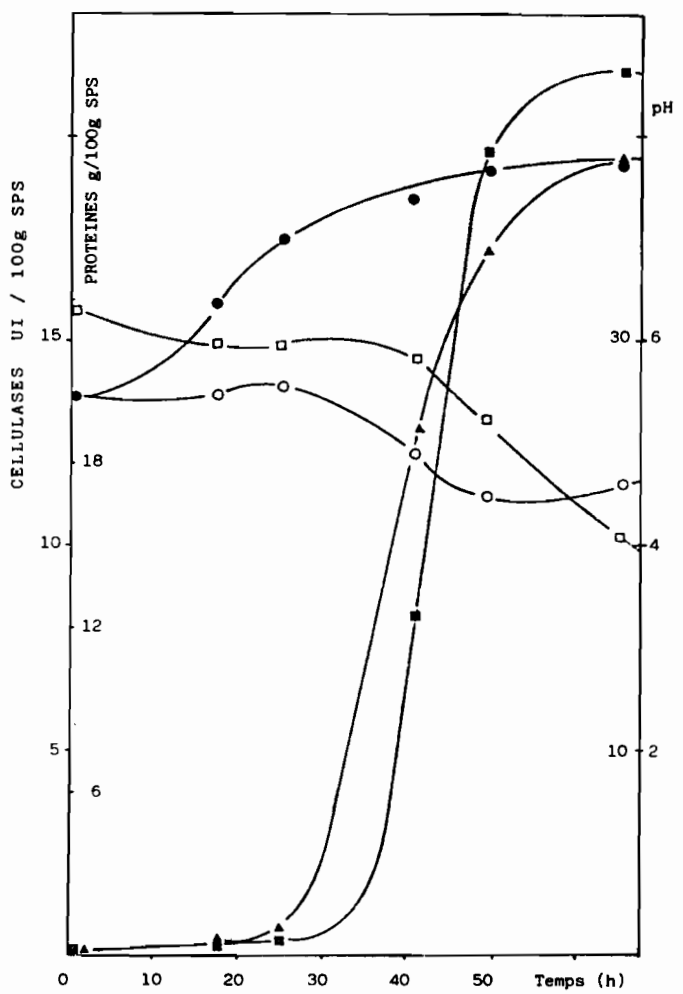


Figure 30 : Croissance de *T.harzianum* cultivé en milieu solide sur cossette de betterave. Protéines (●-●) ;pH (O-O) ACMC x 1000 UI (■-■) et APF x 100 UI (▲-▲) .

Nous avons étudié l'utilisation des pulpes de betterave par culture de I. harzianum en milieu liquide et solide (ROUSSOS et Coll. 1983). Sur la fig. 30 sont portés les résultats concernant l'évolution du pH, des protéines, des sucres Totaux et des activités cellulasiques au cours de la croissance de I. harzianum en milieu solide.

Les variations du pH ne sont pas très importantes. Sa lente remontée en début de croissance est principalement dûe à l'hydrolyse de l'urée tandis que sa diminution pendant la phase de croissance active du mycélium est provoquée par l'assimilation des ions NH4+ entrainant l'accumulation des ions H+ (STERNBERG 1976). Lors d'une étude sur la production de cellulases par I. harzianum cultivé sur cellulose microcristalline en fermentation liquide, il avait été observé qu'une diminution rapide du pH provoque un arrêt de la croissance du mycélium ; les auteurs avaient proposé de réguler le pH au cours de la fermentation (ROUSSOS et RAIMBAULT, 1982 b). Dans le cas présent il n'est pas nécéssaire de réguler le pH car la pulpe de betterave exerce un effet tampon (fig. 30).

Ces pulpes de betterave paraissent être un excellent substrat pour la croissance de I. harzianum ,qui se développe en utilisant préférentiellement les sucres et non pas les protéines. En effet, en fin de fermentation, la teneur en sucres diminue de 50 % et celle des protéines a augmenté de 9 %. En outre, grâce au pouvoir tampon des pulpes, il n'est pas nécéssaire de réguler le pH pendant toute la durée des cultures.Le produit fermenté enrichi en protéines et en cellulases pourrait donc être utilisé pour la production de cellulases (CONTRERAS et Coll. 1982 ; ROUSSOS et Coll. 1983) mais également en alimentaltion animale (MUINDI et HANSSEN, 1981 b).

Le procédé INRA-DIJON développé en vue de l'enrichissement en protéines des pulpes de betterave par fermentation en milieu solide repose sur l'utilisation des pulpes brutes sorties de l'usine sans aucun prétraitement, à 20 % de matière sèche (DURAND, 1983). Après 50 h de culture de I. album ,le substrat est enrichi à environ 18-20 % de protéines. Cependant comme le substrat ne subit aucun prétraitement, une microflore abondante s'y développe favorisée par une humidité très élevée. Ce procédé INRA-DIJON est confronté au problème du développement des contaminants (PEPE, 1984). Le mycélium de I. album , utilisé pour ensemencer le fermenteur, est produit sur un milieu dépourvu de cellulose. Il en résulte une phase de latence importante nécéssaire à la synthèse et à l'excretion des enzymes cellulolytiques par le mycélium au cours de la fermentation. Cette latence, qui dure environ 20 h, favorise le développement des contaminants représentés essentiellement par des bactéries et des levures. La population de cette microflore contaminante est de l'ordre de 10^5 bactéries et de 10^4 levures par gramme de pulpe à la sortie de l'usine.

Elle évolue très rapidement au cours de la phase d'adaptation du mycélium pour atteindre après 25 h de culture 10^10 bactéries et autant de levures (PEPE, 1984). Au cours de la multiplication active du mycélium, le développement de la microflore contaminante se ralentit. En fin de fermentation, le nombre de germes contaminants est bien supérieur à 10^11 germes/g de pulpes. Un prototype de 1 tonne (capable de traiter 200 Kg de pulpes de betterave matière sèche) a été construit par la société NORDON. Ce prototype devrait permettre d'obtenir des lots d'Aliments Fermentés Enrichis en Protéines pour des tests sur animaux.

7.3.4. Croissance sur bagasse de canne à sucre.

Les conditions générales retenues pour la croissance de I. harzianum sur un mélange de bagasse et de son de blé figurent sur le Tableau XXXXII. Les incubateurs contenant 20 g de substrat inoculé à 72 % d'humidité ont été placés dans un bain marie à 29 C. L'aération des cultures a été obtenue par passage forcé d'air saturé en eau à travers le substrat, avec un débit de 5 l/h/incubateur.

La cinétique d'évolution des principaux paramètres (pH, humidité, production de cellulases) au cours de la croissance de I. harzianum est représentée sur la Fig. 31. Les cellulases apparaissent dans le milieu après 28 h de culture ; le maximum de leur production est obtenu après 48 h. L'humidité du produit augmente régulièrement au cours de la fermentation pour gagner 4 à 5 unités en fin de culture.

L'évolution du pH au cours de la croissance de I. harzianum sur bagasse mélangée avec du son de blé est similaire à celle observée précédemment pour des cultures sur paille et son de blé ou sur pulpes de betterave. Pendant la période de germination des conidiospores, le pH reste stable. Au cours de la multiplication active du mycélium, les valeurs du pH diminuent très rapidement (entre 16-24 h de culture) pour atteindre des valeurs minimales inférieures à 5. La remontée du pH correspond à la phase de libération des cellulases dans le milieu de culture, après 28 h (fig. 31). La bagasse exercant un pouvoir tampon et les valeurs de pH ne descendant pas au-dessous de 4,8, il n'est pas apparu nécessaire de réguler le pH au cours de la croissance de I. harzianum sur ce substrat.

Le bilan global ramené à 100 g SPS pour la production de cellulases en colonne après 48 h de culture est le suivant :

- 1.605 UI APF
- 20.443 UI ACMC.

Le rapport ACMC/APF est voisin de 13.

7.4. CONCLUSION.

L'objectif de cette étude était d'adapter la technique de culture de *T. harzianum* en milieu solide pour les substrats lignocellulosiques ainsi que d'optimiser les conditions de croissance de *T. harzianum* cultivé sur ces substrats en vue d'améliorer la production de cellulases.

Divers substrats ont été étudiés (paille et son de blé, pulpe de betterave, bagasse). Pour les substrats lignocellulosiques, paille et bagasse, il a paru nécessaire d'ajouter une faible quantité de son de blé pour favoriser la germination synchrone des conidiospores ainsi que le développement initial du mycélium en lui fournissant des sucres facilement assimilables. De même, le prétraitement du substrat imprégné d'une solution minérale à 50 % d'humidité par passage à l'autoclave à 110° C pendant 1 heure, favorise le développement de *T. harzianum* en milieu solide.

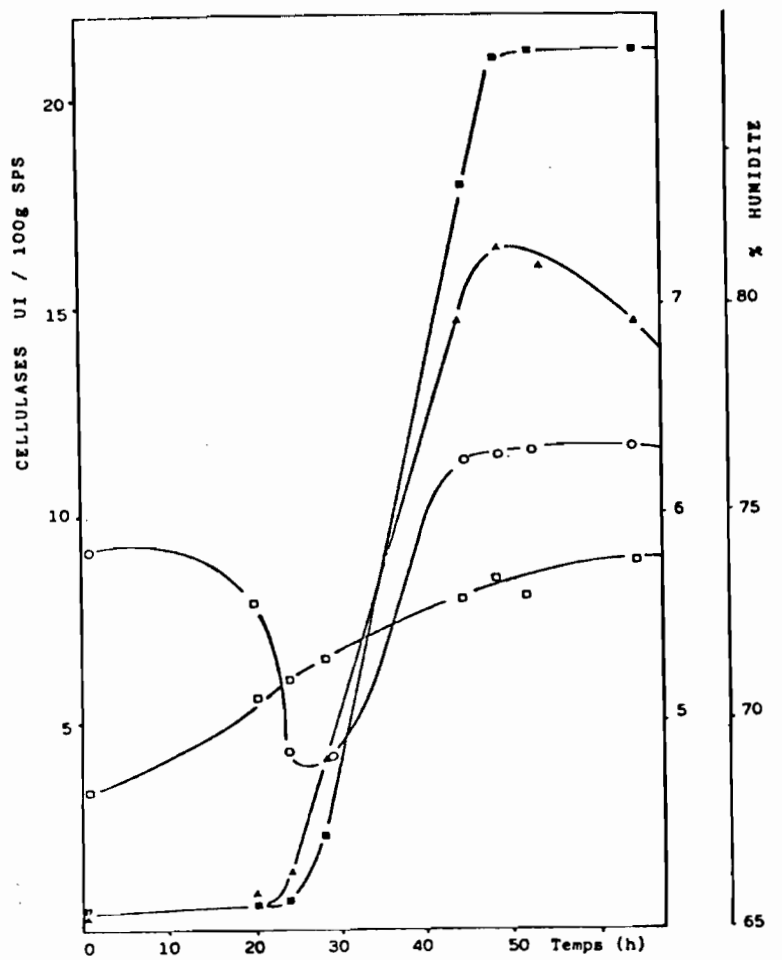


Figure 31 : Croissance de *T. harzianum* cultivé en milieu solide sur un mélange de bagasse et du son de blé. Humidité (□-□); pH (○-○); ACMC x 1000 UI (■-■) et APF x 100 UI (▲-▲).

L'étude de l'influence des facteurs de l'environnement (température, humidité, pH) nous a permis d'obtenir de nombreux renseignements concernant la conduite de la fermentation en milieu solide sur substrats lignocellulosiques. A partir des ces résultats, on a déterminé les conditions optimales de fermentation pour la croissance de I. harzianum sur mélange de paille et de son de blé. Ces conditions ont été retenues pour l'expérimentation sur les autres substrats utilisés.

Les résultats obtenus font apparaitre que l'enrichissement en protéines des pulpes de betterave ou du son de blé est possible par fermentation en milieu solide en utilisant I. harzianum. Le produit obtenu après 50 h de fermentation contient plus de 30 % de protéines mais également des cellulases en quantités importantes, ce qui pourrait éventuellement être mis à profit en alimentation animale.

La croissance de I. harzianum sur les substrats lignocellulosiques, bagasse et paille de blé, aboutit après 50 h à la production de quantités importantes de cellulases. Cependant il a été difficile de mesurer les quantités de protéines biosynthétisées car le dosage des protéines au Biuret n'a pas été possible par suite d'interférences avec des substances contenues dans la paille et dans la bagasse. Nous nous sommes donc intéressés uniquement à la production de cellulases de I. harzianum produites en culture solide sur bagasse de canne à sucre et paille de blé.

Les résultats obtenus nous amènent à faire les remarques suivantes :

- On constate que la production maximale de cellulases est obtenue entre 48 et 60 h de culture.
- l'évolution du pH est en relation avec la croissance du microorganisme et la production des cellulases. Aux valeurs minima de pH correspond le début de biosynthèse et de libération de cellulases. il semble donc important de mesurer ce paramètre afin de suivre indirectement la croissance et de contrôler la production des cellulases de I. harzianum en milieu solide.

La diminution du pH, au cours de la culture en milieu solide, est compensée par le pouvoir tampon élevé du substrat et la composition de la solution minérale. Il n'est donc pas nécessaire de réguler le pH au cours de ce procédé.

CHAPITRE VIII - PRODUCTION DE CELLULASES EN MILIEU SOLIDE.

8.1. INTRODUCTION.

La bioconversion de la cellulose offre une alternative intéressante pour la valorisation des déchets urbains et agroindustriels, en fournissant des carburants de substitution, des protéines microbiennes ou des métabolites à haute valeur ajoutée tels que enzymes et antibiotiques.

Cependant la rentabilité économique de toutes ces transformations biologiques est étroitement liée à la production de cellulases ainsi que les technologies enzymatiques de la saccharification de la cellulose. Pour donner un ordre de grandeur, dans les différents procédés d'hydrolyse des déchets cellulosiques pour la production de glucose, le coût de production des cellulases représente à lui seul à peu près 50 % du cout total (PEREZ et Coll. 1980). Pour cette raison des efforts importants ont été réalisés en recherche pour réduire le prix de revient des cellulases, en particulier en séléctionnant des mutants hyperproducteurs de cellulases (MONTENECOURT et EVELEIGH, 1979 ; PURQUIE et VANDECASTEELE, 1984).

Nous avons utilisé la technique de fermentation en milieu solide pour la culture de I. harzianum sur divers substrats cellulosiques pour la mise au point d'un nouveau procédé de production et d'extraction de cellulases biosynthétisées par ce champignon filamenteux au cours de sa croissance.

8.2. PRODUCTION DE CELLULASES AU LABORATOIRE.

La bagasse brute a été utilisée à la sortie de l'usine pour la production de cellulases de I. harzianum au Laboratoire. Aussi bien pour les fermentations en milieu liquide qu'en milieu solide il y a eu une prolifération importante des bactéries naturellement présentes dans la bagasse. L'inoculum nécéssitant 16 heures de latence devient alors peu compétitif devant le nombre important de bactéries et la fermentation n'est plus contrôlée. Il a été ainsi nécessaire d'évaluer la microflore hétérotrophe aérobie de la bagasse.

8.2.1. Microflore hétérotrophe aérobie de la bagasse.

Le dénombrement des bactéries hétérotrophes aérobies, des champignons cellulolytiques ainsi que de la microflore fongique totale a été réalisé à partir de la bagasse fraîche (à la sortie des moulins) et de la bagasse ayant séjourné en tas pendant 15 jours à l'extérieur de l'usine. Les résultats sont rapportés dans le Tableau XXXVI.

La population de bactéries hétérotrophes aérobies domine largement celle des champignons. Elle est de l'ordre de 2,6 X 10^6 pour les bactéries par gramme de bagasse fraiche pour 1,1 X 10^4 champignons. Après 15 jours de stockage de la bagasse à l'extérieur de l'usine, les populations sont beaucoup plus importantes et atteignent les valeurs suivantes : 1,9 X 10^6 bactéries pour 9,9 X 10^9 champignons. Les populations de champignons cellulolytiques ont également suivi cette évolution. Le nombre de bactéries a été multiplié par 700 fois, celui des champignons totaux par 900. C'est cependant la population des Champignons Cellulolytiques qui à le plus proliféré (2.269).

L'humidité semble le facteur essentiellement responsable de cette prolifération. Cette humidité, faible au départ (44,4 %), s'élève à 59,6 % après 15 jours de stockage.

Ces résultats démontrent qu'il existe une population microbienne contaminante importante dans la bagasse fraiche. Cette population augmente très vite en fonction du temps de stockage et de l'humidité. Il est indispensable de tenir compte de cette microflore et de son évolution.

Pour la mise au point de notre procédé de production et d'extraction des cellulases de I. harzianum , nous avons utilisé de la bagasse fraiche comme matière première. Cette bagasse a été séchée pour son stockage ; elle a subi un prétraitement pendant 45 min avant d'être inoculée avec des conidiospores de I. harzianum.

TABLEAU XXXVI : Microflore hétérotrophe aérobie de la bagasse fraîche (à la sortie des moulins) et de la bagasse stockée en tas pendant 15 jours à l'extérieur de l'usine.

	BACTERIES	CHAMPIGNONS	
	Totales	Totaux	Cellulolytiques
Nombre par g Poids Sec de Bagasse fraîche	$2,63 \times 10^6$	$10,8 \times 10^3$	$2,66 \times 10^3$
Nombre par g Poids Sec de Bagasse Stockée	1.88×10^9	9.90×10^6	5.90×10^6
Humidité de la bagasse Fraîche :	44,4 %		
Humidité de la bagasse Stockée :	59,6 %		

8.2.2. Production de cellulases en milieu liquide.

Les cultures ont été réalisées pendant 68 heures dans un fermenteur BIOLAFITTE de 2 litres contenant 1.250 ml du milieu de culture dont la composition est donnée au Tableau IX. Les conditions de culture sont décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes.

Les résultats concernant l'évolution du pH et des activités cellulasiques au cours de la croissance de *T. harzianum* cultivé sur bagasse en milieu liquide sont décrits à la fig. 32.

Le pH, n'étant pas régulé au cours de la fermentation, a diminué à partir de la 15ème heure jusqu'à une valeur minimale de 3,6, après 28 h de culture, il s'est ensuite stabilisé. Cette faible valeur du pH ne semble pas affecter la croissance de ce microorganisme.

Les cellulases sont produites et libérées dans le milieu de culture après 30 h. Cette production augmente linéairement. En fin de fermentation il y a eu production de : 1.517 UI APF/100 g SPS d'Activité Papier Filtre (APF) ; 11.988 UI ACMC/100 g SPS d'Activité Carboxyméthyl Cellulose (ACNC).

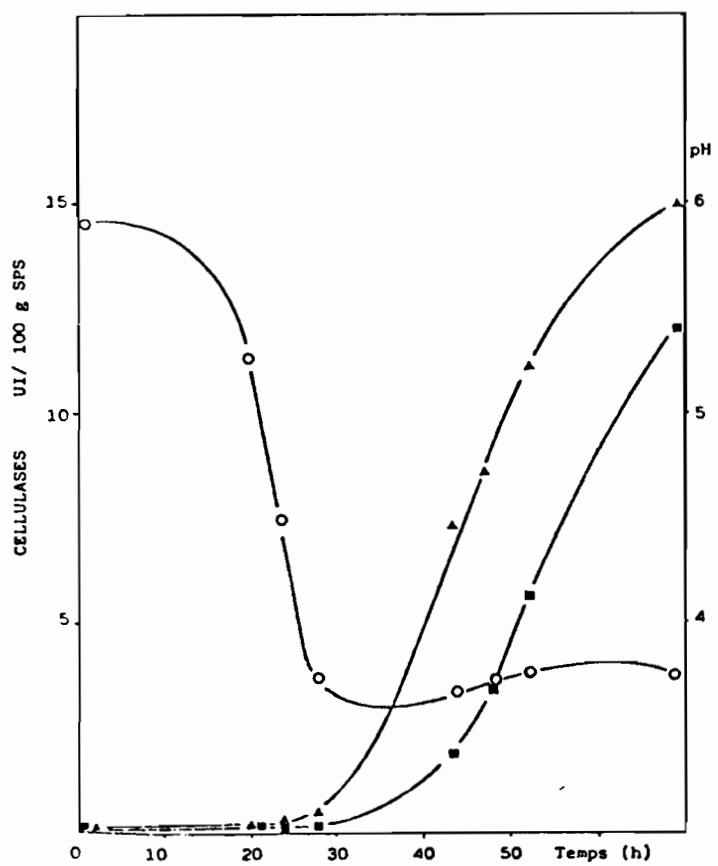


Figure 32 : Cinétique de production de cellulases de *T.harzianum* cultivé en milieu liquide sur mélange de bagasse et de son de blé. Evolution du pH (O-O); des ACMC x 1000(■-■) et des APF x 100 (▲-▲).

Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues en fermentation en milieu liquide à partir de cellulose microcristalline (ROUSSOS et RAIMBAULT, 1982), de paille de blé (ROUSSOS, 1981) ou de pulpes de betterave (ROUSSOS et Coll. 1983). Un prétraitement de la bagasse à la soude (1 %) et un chauffage à 120°C pendant 1 heure améliore nettement cette production (ROUSSOS et SEDHA, 1983).

8.2.3. En milieu solide statique.

Les résultats obtenus au cours de la croissance de *T. harzianum* cultivé en colonne sur un mélange de bagasse et de son de blé ont été reportés dans le Tableau XXXVII; la fermentation a duré 68 h. La production de cellulases a été très importante. Elle augmente en fonction du temps pour atteindre un maximum après 48 h. Les Cellulases sont biosynthétisées au cours de la croissance active du mycélium. Elles sont libérées à l'extérieur de la cellule mycélienne au fur et à mesure de leur production qui atteint son seuil maximum lorsque les premières phialides apparaissent sur le mycélium (50 h). La quantité des ACMC reste ensuite stable alors que celle des APF diminue légèrement.

La fermentation doit donc être arrêtée après 48 h et les cellulases extraites de l'ensemble du produit fermenté. A ce moment il n'y a pas encore production de conidiospores. D'autre part, les cellulases se trouvant à l'extérieur de la cellule, il ne semble pas nécessaire de rompre la paroi du mycélium pour récupérer les enzymes (ROUSSOS et RAIMBAULT, 1982).

TABLEAU XXXVII : Cinétique d'évolution de différents paramètres (pH, humidité, cellulases) au cours de la croissance de *Trichoderma harzianum* en milieu solide (en colonne)

Echantillon	Temps heures	pH	Poids total colonne	% humidité	% Poids sec	Activité Papier Filtre UI/100 g SPS	Activité CMC UI/100 g SPS
0	0	5,80	20,0	68,3	31,7	29	587
1	20	5,56	20,0	70,7	29,3	220	675
2	24	4,86	19,8	71,0	29,0	145	639
3	28	4,50	19,9	71,4	28,6	408	2 214
4	44	6,26	20,0	72,8	27,2	1 466	17 889
5	48	6,28	20,2	73,5	26,5	1 644	20 942
6	52	6,26	19,8	72,7	27,3	1 570	21 052
7	68	6,28	19,9	73,9	26,1	1 340	21 036

SPS = Substrat Poida Sec APF = Activité Papier Filtre ACMC = Activité CarboxyMéthyl Cellulase

8.2.4. En milieu solide agité.

A partir des résultats expérimentaux obtenus au Laboratoire, nous avons vérifié l'extrapolation de la technique de fermentation en milieu solide statique en colonne était possible en utilisant un fermenteur agité de capacité plus grande. Pour cela nous avons utilisé un mélangeur de type petrin de boulangérie de 15 litres. Ce matériel a été modifié et adapté pour la fermentation en milieu solide (DESCHAMPS et Coll, 1980) par la mise en place d'un double fond permettant l'introduction d'air par l'intermédiaire des orifices, de 0,5 mm de diamètre, percés dans le fond de la cuve. Nous avons utilisé les conditions de culture suivantes : Substrat : mélange de paille et de son de blé 600 g de matière sèche ; Prétraitement : substrat imprégné avec la solution minérale et autoclavé à 110°C pendant 45 min ; Humidité initiale : 72 % ; Aération : 25 l/h/fermenteur avec de l'air saturé en eau ; Agitation : Toutes les heures pendant 2 min ; Température : 22°C (température ambiante)

L'évolution des différents paramètres est reportée sur la fig. 33. Le valeur du pH reste stable pendant les 50 premières heures, puis diminue légèrement. Le pouvoir tampon du substrat permet d'éviter l'utilisation d'un système de régulation du pH. L'observation microscopique révèle que 90 % des conidiospores ont germé après 20 h de culture ; le mycélium commence à envahir le substrat après 40 h. Cependant l'élévation de la température au sein du produit, dûe au métabolisme de la croissance de I. harzianum , n'est pas importante. Les calories produites sont rapidement éliminées lors de l'agitation. Par contre, l'humidité du produit diminue de 71,7 % à 67,3 % après 90 h. Cette perte d'humidité est dûe à l'évaporation de l'eau en surface du produit fermenté. Il est donc conseillé d'utiliser un couvercle afin d'éviter une contamination extérieure et de diminuer l'évaporation en surface.

La libération des cellulases dans le milieu déute après 20 h. La production de cellulases est plus lente en petrin qu'en colonne. Ceci semble du principalement à la température d'incubation plus basse (22°C) qu'en colonne (29° C), et qui provoque un ralentissement de la germination et de la croissance de I. harzianum . Le taux maximum de production est atteint après 80 h de culture. Les valeurs obtenues sont sensiblement supérieures à celles de la fermentaion en milieu solide statique de la paille et son de blé. Pour 100 g SPS ou a obtenu une production de 25.630 UI ACMC et 2.490 UI APF ; le rapport ACMC/APF est voisin de 10.

Ces résultats démontrent qu'il est tout à fait possible d'augmenter les rendements de production de cellulases en utilisant un procédé de fermentation en milieu solide agité à basse température ; cependant le taux de production maximum de cellulases n'est obtenu qu'après 80 h

de culture. La fermentation en milieu solide agité de produits lignocellulosiques dans ces conditions non stériles a abouti à un enrichissement de 10 % du produit en protéines. Les sucres Totaux contenus dans le substrat ont diminué de 26 % après 90 h de fermentation (Fig. 33).

En utilisant le fermenteur agité contenant 30 fois plus de substrat que les colonnes, qui ont servi à optimiser les conditions de culture des divers substrats lignocellulosiques par fermentation en milieu solide, on a montré que l'extrapolation de ce procédé était possible au niveau pilote expérimental. Nous avons par la suite extrapolé la culture en colonne d'un facteur de 800 fois avec un fermenteur agité de type Petrin et d'un facteur de 2.500 fois avec un fermenteur statique de type Zymotis.

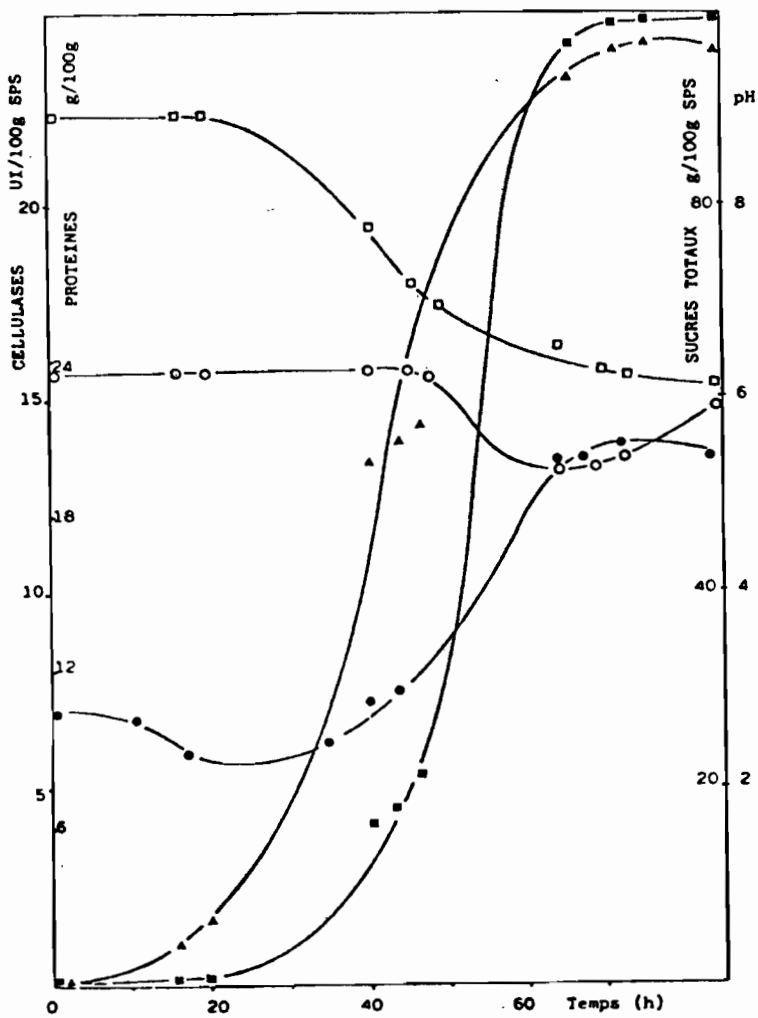


Figure 33 : Culture de *T.hamzianum* sur mélange de paille et de son de blé en milieu solide agité (pétrin de 12 litres).pH(o-o) Protéines (●-●) ; Sucres Totaux (□-□) ; Cellulases : ACMC x 1000 UI (■-■) et APF x 100 UI (▲-▲) .

8.2.5. Production comparée de cellulases (liquide-solide).

La fermentation en milieu liquide agité a été réalisée dans un fermenteur BIOLAFITTE de 2 litres et la culture en milieu solide en colonne selon la technique déjà décrite.

La composition du milieu de culture, la solution minérale et le substrat, ont été identiques dans les deux cas. Les pulpes de betterave ont été utilisées comme substrat de fermentation. Les conditions de culture (inoculation, température d'incubation, aération, pH initial) étaient identiques. Seule l'humidité du produit (99 % pour les fermentations liquides, 70 % pour les cultures solides) était différente.

Sur la fig. 34 ont a reporté les résultats obtenus. La phase de latence, correspondant à la germination des conidiospores, est légèrement plus courte pour les cultures en milieu liquide. Ce qui implique par la suite un décalage de la croissance de 4 à 6 h entre les deux modes de culture. L'évolution du pH est identique dans les deux cas. On observe une légère augmentation au début de la fermentation, ensuite une chute rapide au cours de la croissance active et enfin une remontée du pH en fin de fermentation. Dans les deux cas les valeurs maxima des activités cellulasiques correspondent aux valeurs minima de pH.

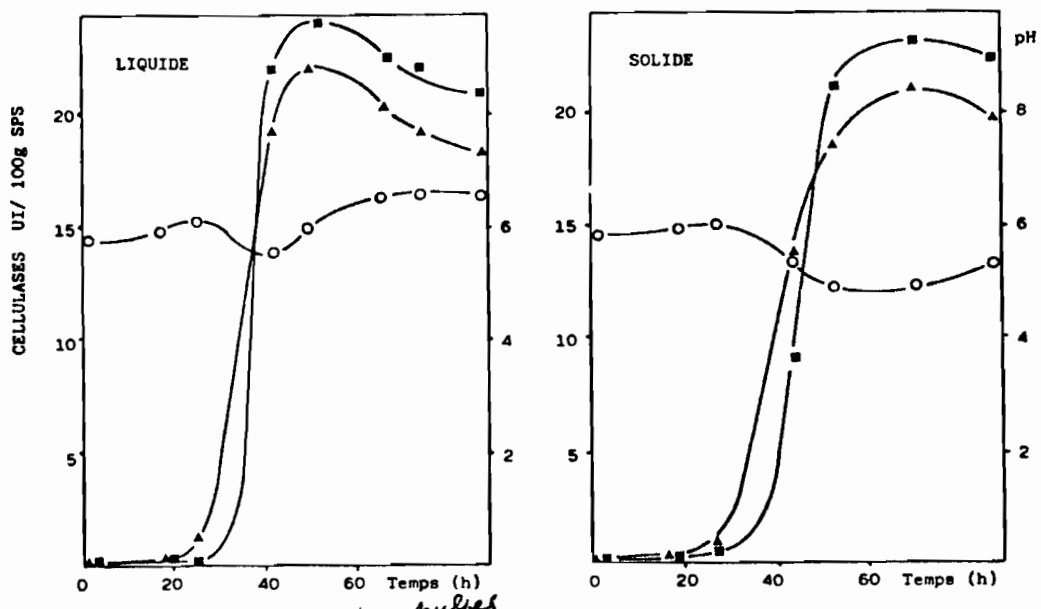


Figure 34 : Culture de *T.harzianum* sur cossette de betterave. Production comparée de cellulases en milieu liquide et en milieu solide. Les résultats expriment l'évolution du pH (o-o) ; et des cellulases : ACMC x 1000 UI (■-■) et APF x 100 UI (▲-▲).

L'étude comparative de la cinétique d'apparition et de production de cellulases en milieux solide et liquide ne fait pas apparaître de différences importantes concernant les quantités d'enzymes synthétisées. Toutefois, en milieu liquide la germination des conidiospores ainsi que la production des protéines et des cellulases se font avec quelques heures d'avance (ROUSSOS et Coll. 1983). Les cellulases apparaissent dans le milieu après 24 h de fermentation. Les valeurs maximales sont atteintes après 50 et 60 h de culture. La nature des cellulases parait identique si l'on considère que le rapport Activité Coarboxyméthylcellulose / Activité Papier Filtre est voisin de 10 dans les deux cas. Les cellulases obtenues à partir de la culture en milieu solide paraissent moins sensibles à l'action des protéases car en fin de croissance, leur production présente un palier alors qu'elle chute sensiblement en milieu liquide (ROUSSOS et Coll. 1983).

Le bilan global de production de cellulases pour 100 g SPS initial est de 2.000 UI APF et 22.000 UI ACMC pour une culture en milieu solide et 2.200 UI APF et 24.000 UI ACMC pour une culture en milieu liquide. Ces résultats démontrent que la production de cellulases de I. harzianum en milieu solide peut être réalisée avec de bons rendements tout au moins lorsque cette souche est cultivée sur pulpes de betterave.

8.3. PRODUCTION DE CELLULASES AU NIVEAU PILOTE.

8.3.1. En fermenteur agité.

La fermentation en milieu solide agité de la paille de blé additionnée de son de blé a été réalisée dans un fermenteur type Petrin de 65 litres (ASTHER 1982). Nous rapportons ici brièvement les résultats obtenus :

Au cours de la croissance de I. harzianum cultivé sur mélange de paille et son de blé dans un fermenteur agité il a été possible de suivre l'évolution des paramètres suivants :

La germination des conidiospores commence après 8 h d'incubation. Les premières ramifications du mycélium apparaissent des la 18ème heure. C'est à partir de ce moment que les différents paramètres suivis évoluent d'une manière significative. Pour sa croissance active, le microorganisme utilise les sucres réducteurs contenus dans le substrat ainsi que les sels minéraux azotés. Ceci provoque une diminution régulière des sucres et une chute de la valeur du pH (Fig. 35).

Il faut noter que T. harzianum utilise d'abord les sucres facilement assimilables (sucres réducteurs, amidon, hemicelluloses) ; il y a ensuite biosynthèse et libération des cellulases dans le milieu pour l'hydrolyse de la cellulose en sucres simples. L'optimum de production des cellulases est atteint après 65 h.

La production de biomasse a été estimée par le dosage des acides aminés totaux selon la méthode de MOLRASCH (1967) et non pas par la méthode de LOWRY et Coll. (1951), car les résultats obtenus avec celle-ci sont incohérents et difficilement interprétables (ASTHER, 1982). La quantité totale d'acides aminés au début de la fermentation a été de 6,5 % SPS ce qui correspond à la valeur obtenue avec le dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldhal. Au cours de la croissance active du mycélium, la teneur en aminoacides du produit fermenté augmente régulièrement pour atteindre 11,5 % SPS après 25 h de fermentation. Cette valeur se maintient constante par la suite (Fig. 35).

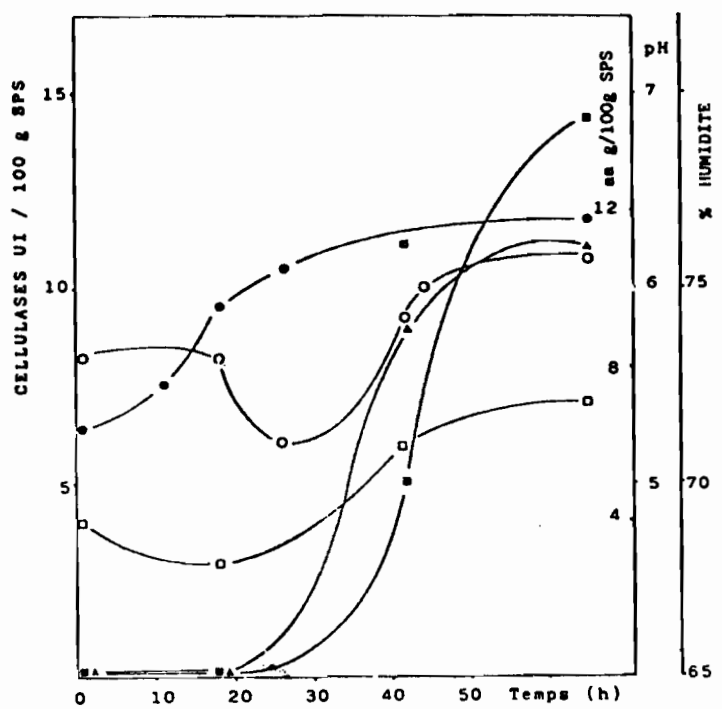


Figure 35 : Cinétique de production, au niveau pilote expérimental (Pétrin de 65 l) des cellulases de *T. harzianum* cultivé en milieu solide agité sur un mélange de paille et son de blé. Humidité (□-□); pH (O-O) Aminoacides (●-●); ACMC x 1000 UI (■-■) et APF x 100 UI (▲-▲) .

Sur la même figure on peut également observer l'évolution de l'humidité du substrat. Une diminution se produit au cours de la phase de latence. Pendant cette période, la quantité d'eau évaporée n'a pas été totalement compensée par l'eau apportée par aspersion au cours des cycles d'agitation. Lorsque la croissance démarre, les cycles de refroidissement deviennent plus rapprochés et l'humidité augmente pour atteindre 72 % en fin de fermentation. Les cycles de refroidissement forcé ont été régulés par la commande du point de consigne de la température à partir de la 25ème h jusqu'à la 50ème h de fermentation.

La biosynthèse des cellulases, en particulier des endo-cellulases (ACMC) se fait avec beaucoup de retard (50 h) pour les cultures en fermenteur agité par rapport aux cultures en colonne. Après 65 h de fermentation on obtient : 1000 UI d'APF/100 g SPS ; 14500 UI d'ACMC/100 g SPS.

Le bilan de la fermentation de 3,75 Kg du mélange de paille et son de blé par I. harzianum dans un fermenteur agité est le suivant :

- enrichissement en protéine du substrat 5,1 %
- utilisation des sucres totaux 40 %.

8.3.2. En fermenteur statique.

Un nouveau type de fermenteur statique de grande capacité (Zymotis) a été utilisé pour la culture de I. harzianum sur bagasse mélangée à du son de blé en milieu solide. Une demande de brevet d'invention a été déposée par l'IRCHA à l'ANVAR (PREBOIS et Coll. 1985). Les premières expérimentations ont été réalisées pour l'enrichissement en Protéines des pulpes de pomme de terre, résidu de féculérie, en utilisant une souche de A. niger . Ce même fermenteur a été utilisé en Martinique pour la production de cellulases de I. harzianum cultivé sur bagasse.

La bagasse a été broyée à l'aide d'un broyeur à marteaux puis séchée. Toutes le expériences ont été réalisées avec le même lot de substrat, et les sels minéraux (sulfate d'ammonium et Urée) sont des produits industriels utilisés pour la préparation d'engrais. La solution minérale a été préparée avec de l'eau du robinet.

L'inoculum provenait d'une culture de 7 jours sur farine de manioc de I. harzianum dans un fermenteur à disques.

Le préconditionnement du substrat a été réalisé sur des lots de 4 Kg SPS. Le substrat prétraité et inoculé à 72 % d'humidité a été introduit dans le fermenteur. Une faible quantité de substrat inoculé a servi pour la préparation des

colonnes, afin de comparer la croissance de I. harzianum dans les deux types de fermenteurs en milieu solide statique.

Sur le Tableau XXXVIII on a comparé la production de cellulases de I. harzianum cultivé sur mélange de bagasse et de son de blé en colonne et en Zymotis. Le Zymotis a été chargé avec des quantités croissantes de substrat uniformément inoculé. La répartition du substrat a été identique dans les différents compartiments du fermenteur. En fonction de la quantité totale de produit introduite dans le fermenteur, la hauteur du produit variait de 18 cm (14 Kg poids humide) à 54 cm (43 Kg poids humide).

TABLEAU XXXVIII : Production comparée de cellulases de *T harzianum* cultivé sur bagasse en milieu solide en colonne et en Zymotis après 48 h de fermentation à 29°C.
Les Activités Enzymatiques sont exprimées en UI / 100 g SPS.

	EN ZYMOTIS					EN COLONNE			
Substrat/ Humidité	Hauteur du produit	pH	Humidité %	APF	ACMC	pH	Humidité	APF	ACMC
12,1 Kg à 67 %	18 cm	6,25	69	1.908	13.354	6,33	69,5	1.608	13.136
26,3 Kg à 69,6 %	36 cm	6,30	69,9	1.032	12.526	5,95	72,0	1.460	13.164
35,7 Kg à 72 %	45 cm	5,73	72,3	1.344	12.803	5,18	72,2	1.276	12.561
41,4 Kg à 71 %	54 cm	5,77	72,7	803	7.416	5,77	72,6	550	7.185

Les résultats obtenus après 48 h de fermentation en milieu solide ne montrent pas de différence significative entre les deux types de fermentateurs. Bien au contraire, le développement du microorganisme ainsi que la production de cellulases sont identiques. Pourtant les rendements de production de cellulases sont légèrement plus faibles que ceux obtenus précédemment en colonne (1.605 UI APF et 20.443 UI ACMC cf. 7.3.4). Cette diminution peut être dûe au changement de prétraitement du substrat. Pour l'expérience précédente (cf. 7.3.4.) 100 g de substrat ont été autoclavés pendant 45 min. à 110 C, alors que pour les fermentations au niveau pilote, 4.0 Kg n'ont été autoclavés que pendant 3 heures. Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus avec la charge de 41,4 Kg de substrat dans le fermenteur. En effet, dans ce cas le substrat n'a été autoclavé que pendant 2 heures et les rendements de production de cellulases sont nettement inférieurs. On aurait pu attribuer cette diminution à l'effet de la hauteur du substrat dans le fermenteur. Mais cette hypothèse n'est pas valable car les résultats de production de cellulases en colonnes réalisées parallélement au zymotis avec le même substrat, sont également faibles et similaires à ceux obtenus

en zymotis. Le prétraitement du substrat est donc très important pour la croissance du microorganisme. Afin de diminuer le temps du traitement thermique pour des quantités importantes de bagasse, on peut envisager de coupler ce traitement avec un traitement alcalin (NaOH à 1 %) et acidifier par la suite le milieu de culture avant son inoculation.

Sur la fig. 36 on peut observer l'évolution des principaux paramètres (Humidité, pH, production de cellulases) au cours de la croissance respective de I. harzianum en colonne et en Zymotis. Le Zymotis a été chargé avec 35,7 Kg de substrat à 72 % d'humidité initiale occupant une hauteur de 45 cm dans les différents compartiments. Les colonnes contenaient 18 g du même substrat inoculé, sur une hauteur de 18 cm.

La germination des conidiospores est plus rapide en Zymotis qu'en colonne. Cette constatation est valable pour les fermentations dont la hauteur du substrat dans le Zymotis est supérieure à 18 cm. De même, la température du produit fermenté augmente assez rapidement et en quelques heures atteint 40 °C lorsque la hauteur du produit dans le Zymotis est supérieure à 18 cm. Nous avons donc augmenté le débit d'air et connecté le système de refroidissement.

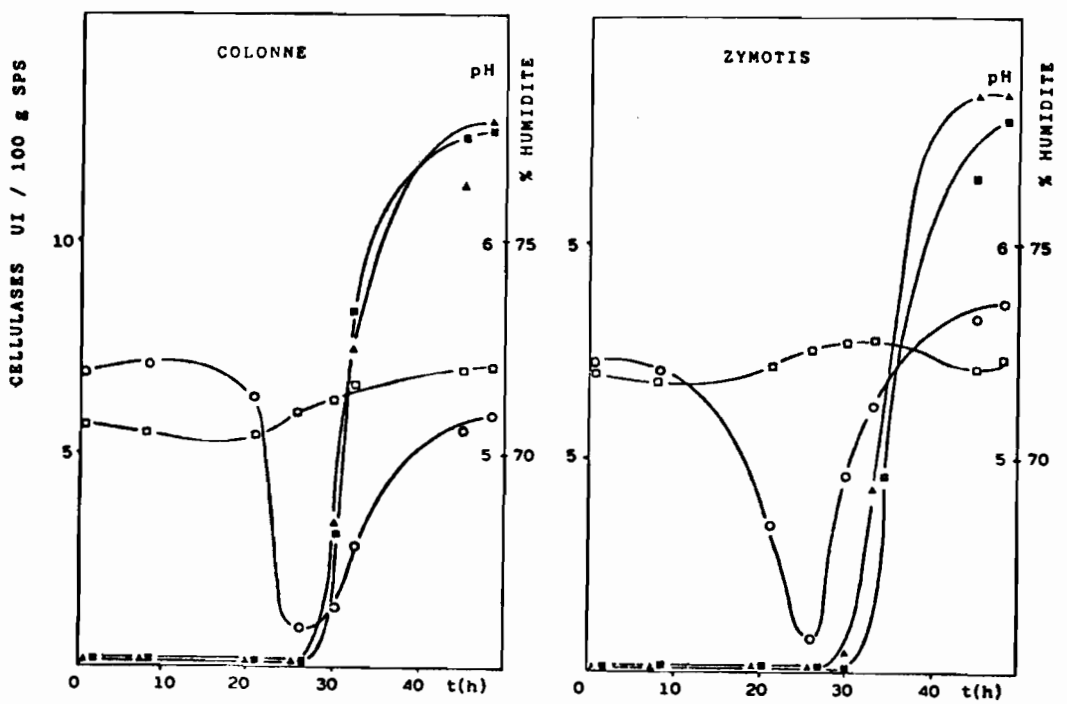


Figure 36 : Production comparée de cellulases de *T.harzianum* cultivé sur un mélange de bagasse et de son de blé en milieu solide statique en colonne et en Zymotis. pH (o-o); Humidité (□-□) Activités cellulasiques : ACMC x 1000 UI (■-■) et APF x 100 UI (▲-▲) .

L'aération du produit a été de 400 l/h/compartiment au cours des 13 premières heures, puis de 800 l/h/compartiment par la suite pour les cultures en Zymotis.

En début de fermentation le produit est rechauffé pendant 14 h et sa température maintenue à 29°C. Par la suite l'élimination des calories excédentaires est obtenue par le système de refroidissement. Une température de 26°C du liquide de refroidissement permet le maintient de la température optimale du produit dans le fermenteur à 29°C.

L'apparition des cellulases dans le milieu de culture correspond aux valeurs minimales du pH pour les cultures en colonne. On constate un retard de 3 heures dans la culture en zymotis.

C'est après 48 heures de culture de I. harzianum sur bagasse que la production des cellulases est la plus élevée (Fig. 36). C'est donc à ce moment que la fermentation en Zymotis est stoppée et que le produit fermenté est pressé afin de récupérer les cellulases on obtient alors 1.344 UI APF et 12.803 UI ACMC/100 g SPS.

Le bilan global de production de cellulases de I. harzianum en Zymotis chargé avec 4, 8 et 10 Kg de substrat est rapporté sur le Tableau XXXIX. Cette production est directement proportionnelle à la quantité de substrat et la hauteur du produit dans le fermenteur n'affecte pas cette production. Ces résultats prometteurs permettent d'envisager l'utilisation de ce nouveau biofermenteur pour la fermentation des substrats lignocellulosiques et en particulier pour la production de cellulases de I. harzianum

TABLEAU XXXIX : Bilan de production de cellulase de *T. harzianum* en Zymotis chargé avec 4 ; 8 et 10 Kg de substrat poids sec.

Charge du Zymotis SPS	Hauteur du Produit dans le Zymotis	Production de cellulases UI/Zymotis	
		APF	ACMC
4 Kg	18 cm	76.320	534.000
8 Kg	36 cm	82.560	1.002.000
10 Kg	45 cm	134.400	1.280.300

8.4.EXTRACTION DES CELLULASES ET DES METABOLITES SOLUBLES.

Pour la réalisation de ce travail, on s'est inspiré des recherches faites par SEBO (1975) sur la séparation du plasma cellulaire des éléments structuraux des cellules végétales.

C'est donc après 48 h de culture que le produit fermenté est réparti en lots de 500 g. Ces lots sont ensuite pressés à l'aide d'une presse hydraulique afin d'extraire les cellulases. Globalement, à partir d'un lot de 500 g de produit fermenté humide on obtient, après 2 mn 30 de pressage à 220 bar, une fraction insoluble de 210 g contenant 120 g de matière sèche et une fraction soluble de 290 ml contenant la plus grande partie des cellulases. La fraction insoluble est reprise dans 290 ml d'eau et pressée à nouveau, ce qui fournit une fraction insoluble de 210 g contenant 109,7 g de Matière Sèche et une seconde fraction soluble de 290 ml. Les bilans correspondants sont rapportés sur les Figures 37 et 38

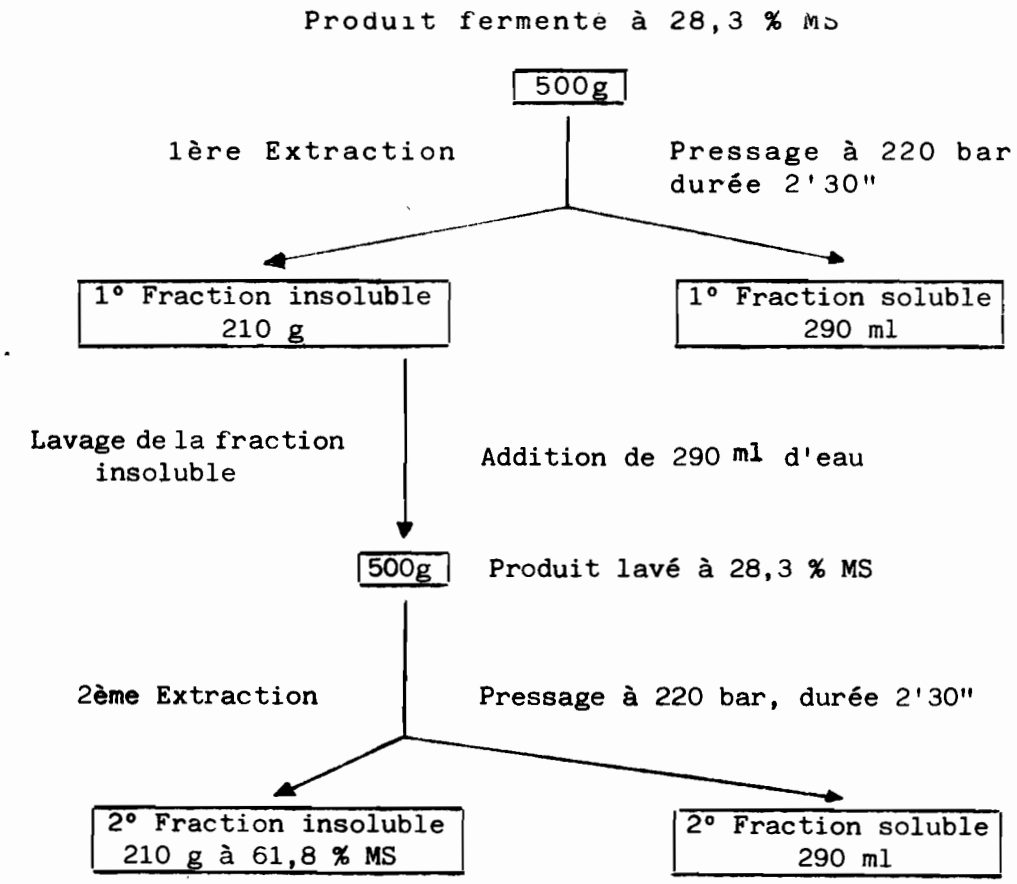


Fig. 37 : Extraction de cellulases avec une presse hydraulique.

Tout d'abord, lors du premier pressage on extrait 67,5 % des cellulases. Le second pressage de la fraction insoluble réhydratée permet d'extraire les 80 % de cellulases résiduelles. Au total, 93,5 % des cellulases produites au cours de la fermentation en milieu solide de la bagasse ont été récuperées. De plus ces enzymes sont présentes dans une solution hautement concentrée. Sur le Tableau XXXX on donne les concentrations des cellulases présentes dans les deux fractions solubles obtenues après pressage. Pour la première fraction soluble on obtient 82,0 UI ACMC/ml et 5,6 UI APF/ml et dans la deuxième fraction 26,6 UI ACMC/ml et 2,49 UI APF/ml. Les cellulases de la deuxième fraction soluble sont donc 3 fois plus diluées.

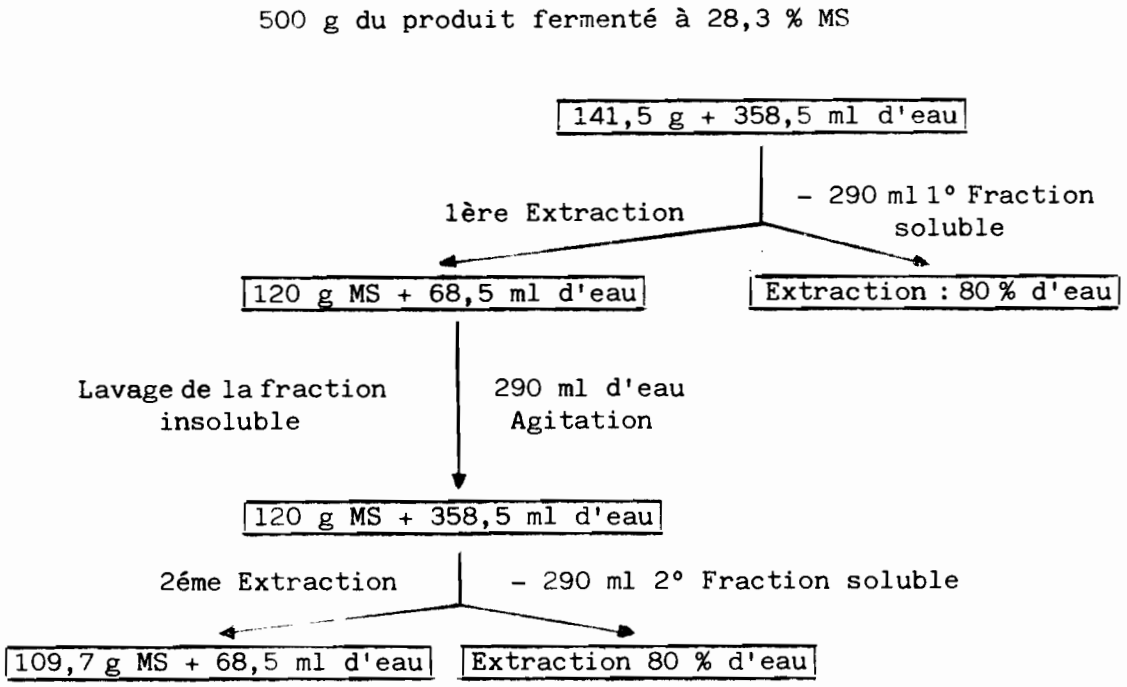


Fig. 38 : Bilan pondéral des différentes fractions obtenues au cours de l'extraction de cellulases avec une presse hydraulique.

8.5. CONDITIONNEMENT DES CELLULASES.

La fraction soluble directement récuperée à la sortie de la presse a été filtrée afin d'eliminér les particules solides en suspension et on a ajouté du Merthiolate de Sodium (1 g/l) pour permettre sa conservation au réfrigérateur à +4 C pendant plusieurs semaines sans perte d'activité (STENBERG, 1976).

La plus grande partie de la fraction soluble a été congélée le jour même de l'extraction. Elle a été par la suite lyophilisée. Le conditionnement par du concentré d'enzymes par lyophilisation parait être le meilleur choix. Outre la conservation de ces enzymes sans pertes d'activité (Tableau XXXX) on réalise une concentration supplémentaire de 13 fois pour la première fraction soluble et de 28 fois pour la deuxième fraction soluble.

TABLEAU XXXX : Quantité de cellulases présentes dans les deux fractions solubles avant et après lyophilisation pour 500 g du produit fermenté à 28,3 % MS.

	Quantité	Poids	Activités Enzymatiques (cellulases)			
	ml	g	UI ACMC/ml	UI APF/ml	UI ACMC Totales	UI APF Totales
AVANT LYOPHILISATION :						
1° Fraction soluble	290		82	5,61	23,780	1.626
2° Fraction soluble	290		26,6	2,49	7,720	722
APRES LYOPHILISATION :						
1° Fraction soluble	250	18,5	1.110/g	63/g	20,535	1.165
2° Fraction soluble	250	8,87	758/g	52/g	6.723	461

8.6. ENSILAGE DE LA FRACTION INSOLUBLE.

L'ensilage est une méthode de conservation des fourrages qui favorise l'action d'une catégorie de microorganismes anaérobies appartenant au grand groupe des bactéries lactiques. Ces ferments lactiques conduisent, grâce à des modifications biochimiques, à la formation d'un produit qui conserve toute sa valeur alimentaire, tout en gardant son état physique initial.

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

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

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

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

Durant ces dernières décennies, l'ensilage a connu un développement important grâce à l'extention des cultures du mais, dans les pays tempérés. Par contre, il a été peu pratiqué en milieu tropical. Quelques essais infructueux sont pour une part à l'origine de ce manque d'intérêt. Pourtant, dans ces régions tropicales, une saison pluvieuse, l'hivernage, succède une saison sèche, au cours de laquelle la production de fourrage est largement déficitaire et la technique d'ensilage pourrait alors être très bénéfique. Récemment une étude de l'évolution microbiologique et des caractéristiques fermentaires des ensilages de canne à sucre et de sorgho en climat tropical humide, a été réalisée par CELANIE (1982). De cette étude, il ressort que le sorgho constitue le meilleur support au développement de l'activité lactique. Quant à la canne à sucre, bien qu'elle présente une bonne aptitude à l'ensilage, elle ne remplit pas les conditions favorables à la mise en place d'une conservation stabilisée. Ceci est dû principalement à la fermentation du saccharose par les levures qui produisent une importante quantité d'alcool.

Notre étude a porté sur l'ensilage de la fraction insoluble de la bagasse fermentée. Ce substrat est pauvre en

sucres libres mais enrichi en Azote. Sa composition chimique est donc différente de la composition de la canne à sucre brute. Nous avons testé principalement 4 conservateurs d'ensilage, pour obtenir une bonne conservation, en protégeant plus particulièrement la fraction protéique de ce sous-produit provenant d'une fermentation en milieu solide de la bagasse.

Pour l'ensilage de la Fraction Insoluble (F.I.) obtenue après extraction des cellulases de la bagasse fermentée en zymotis, il était nécessaire de disposer de quantités importantes de F.I. La charge maximale du zymotis ne dépassant pas 12 Kg SPS, nous avons été amenés à utiliser ce fermenteur quatre fois pour obtenir une quantité suffisante de la F.I. à conserver.

Le produit à ensiler (F.I.) provient donc de quatre fermentations différentes (Z58, Z68, Z77 et Z87). De même, la confection des silos a été réalisées dans la journée au cours de laquelle le produit fermenté était traité (par un seul préssage à 230 bar pendant 1 min) pour séparer les cellulases de la F.I. Les valeurs moyennes de Matière Sèche (M.S.) des F.I. obtenues sont proches de 53,8 %. De ce fait une quantité non négligeable de la fraction soluble (F.S.) reste sur la F.I. Cette F.S. résiduelle contient en particulier 25 % des cellulases produites au cours de la fermentation de la bagasse par I. harzianum. (Tableau XXXXI).

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

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

Sur les Tableaux XXXXII et XXXXIII sont reportés quelques précisions concernant la confection des silos à partir de la F.I. pour obtenir une matière sèche voisine de 35 et 45 % respectivement. Sur ces Tableaux nous avons mentionné l'origine de la F.I., la nature ainsi que la concentration du conservateur, la quantité de la F.I. introduite dans le mélangeur, la quantité d'eau contenant le conservateur qui a été ajoutée à la F.I. pour ramener l'humidité du produit à conserver aux environs de 65 et 55 %. Avant la fermeture des silos, une partie aliquote a été prélevée pour mesurer la matière sèche.

Deux séries d'ensilage ont été réalisées en utilisant quatre conservateurs différents (Protéinor, ENSIPRON, Mélasse, A.I.V.) : une série à 35 % de MS et l'autre à 45 % de MS ont été faites afin de pouvoir comparer l'influence de l'humidité sur la qualité de l'ensilage.

L'ouverture des silos est intervenue après 6 mois de conservation. Nous avons pesé les quantités désilées. Sur le Tableau XXXXIV on a noté le bilan pondéral de l'ensemble de 16 ensilages réalisés à partir des F.I. Pour les 8 premiers la M.S. avant ensilage a été ramenée aux alentours de 35 % alors que pour les 8 derniers elle a été proche de 43 %. On observe une perte normale en poids, environ 15 % pour l'ensemble des ensilages.

TABLEAU XXXXII : Confection des silos à partir de la Fraction Insoluble (F.I.) de la bagasse fermentée pour obtenir une Matière Sèche voisine de 35 % .

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

Cependant cette perte a été plus importante pour les ensilages secs par rapport aux autres qui ont été plus humides. Lorsque les ensilages ont été contamines en surface, la partie contaminée a été éliminée avant l'homogénéisation du produit pour le prélèvement est des échantillons. Pour le calcul des pertes totales, nous avons inclus les déchets ainsi éliminés.

En considérant les pertes totales, on constate que les valeurs obtenues sont très proches pour l'ensemble des ensilages à l'exception du No. 12 pour lequel on observe une perte de 41 %. Pour les ensilages fourragers, une perte de 10-15 % est tout à fait normale.

Les analyses chimiques ont été faites au laboratoire de Zootechnie de l'INRA-GUADELOUPE sur les produits désilés après 6 mois de conservation à la température ambiante (Mai-Octobre 1984).

Lors de l'ouverture des silos, le même processus expérimental (figure 13) a été appliqué à l'ensemble des ensilages. On a estimée la quantité des déchets avant homogénéisation du produit conservé. Sur des échantillons représentatifs, la matière sèche (M.S.) ainsi que la Matière Azotée Totale (MAT) ont été déterminées. Environ 100 g du produit ensilé ont été pressés. Le pH a été mesuré ; l'Azote soluble (NH3), l'acide lactique ainsi que les acides gras volatils (AGV) ont été déterminés sur des échantillons du jus de pressage additionnés d'un stabilisateur chimique.

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

Echantillon Nº	F.I.	Conservateurs	Quantité Produit (F.I.) Kg	Quantité Eau l	Poids total Kg	Matière Sèche %	Date mise en silos
9	Z 58	PROT. 2 %	3,9	1,1	5,1	41,5	24/5/84
10	Z 58	PROT. 3 %	3,9	1,1	5,0	41,6	24/5/84
11	Z 58	PROT. 4 %	3,9	1,1	5,1	41,6	24/5/84
12	Z 77	ENSI. 3 %	3,9	1,1	5,2	41,9	13/6/84
13	Z 77	ENSI. 4 %	3,9	1,1	5,1	43,4	13/6/84
14	Z 77	A.I.V. 10 %	3,9	1,1	5,1	42,9	13/6/84
15	Z 87	MELA. 50 %	4,0	1,0	5,0	46,2	20/6/84
16	Z 87	Témoin	4,4	1,1	5,5	44,9	20/6/84

Sur le Tableau XXXXV sont reportés les résultats d'analyses chimiques réalisées sur des échantillons représentatifs lors de l'ouverture des silos. Nous écartons de la discussion l'échantillon No. 12 correspondant à la F.I. Z77 additionnée d'Ensipron à 3 % pour lequel les résultats sont abhérents aussi bien pour la MAT particulièrement élevée que pour la concentration en éléments nutritifs. Ces résultats sont la conséquence d'une perte de Matière Sèche importante. Pour les autres ensilages, les valeurs de pH sont assez voisines et fluctuent entre 4, 10 et 4,45. De même le pourcentage d'Azote Total est compris entre 12-15 % de MS. Ces valeurs sont tout à fait normales pour les ensilages. Il est intéressant de remarquer que la concentration d'Azote soluble, rélativement faible, ne représente que 10 % de l'Azote Total. Ceci n'est pas très important car l'azote soluble donnera très rapidement de l'ammoniac dans le rumen. Par contre l'Azote fixé sera dégradé plus lentement dans le rumen pour donner également de l'ammoniac. Nous n'avons pas pu déterminer la "fermentécibilité" c'est à dire la vitesse de dégradation de l'Azote fixé dans le rumen.

TABLEAU XXXXIV : Bilan matière avant et après ensilage de la Fraction Insoluble (F.I.) obtenue par pressage de la bagasse fermentée en Zymotis.

No. Ensilage	M.S. Départ %	Poids Sec Départ Kg	M.S. Désilage %	Poids Sec Final Kg	Pertes en %	Pertes Totales y compris Déchets %
1	32,7	1,635	29,60	1,428	12,7	16,5
2	32,5	1,625	31,55	1,504	7,5	10,1
3	30,6	1,530	27,40	1,431	6,5	7,3
4	30,2	1,510	26,92	1,292	14,4	15,8
5	33,0	1,650	28,80	1,568	5,0	5,8
6	34,1	-	-	-	-	-
7	36,2	1,810	28,96	1,406	22,3	22,8
8	31,8	1,622	28,61	1,371	15,5	18,4
9	41,5	2,075	38,28	1,788	13,9	14,0
10	41,6	2,080	37,57	1,728	17,0	17,7
11	41,6	2,080	38,34	1,739	16,4	18,6
12	41,9	2,095	27,86	1,347	35,7	41,0
13	43,4	2,170	38,13	1,818	16,2	17,5
14	42,9	2,145	39,56	1,898	11,5	16,0
15	46,2	2,310	40,57	1,974	14,6	15,1
16	44,9	2,469	42,62	2,240	9,3	9,9

La production d'acide Lactique a été importante pour les F.I. additionnées de Mélasse (échantillons No 7 et No 15). Cependant la présence de saccharose favorise également la production de quantités non négligeables d'alcool Des résultats similaires ont été obtenus avec de la canne à sucre ensilée (CELANIE, 1982). Nous n'avons pas remarqué pour l'acide lactique produit, une nette différence avec les divers conservateurs utilisés. En particulier l'utilisation du Protéinor qui est un bioconservateur à base de ferments lactiques, n'a pas donné de meilleurs résultats que les autres conservateurs.

Il faut noter cependant que la F.I. ensilée se conserve normalement. Parmi les divers conservateurs utilisés, il n'y a pas de différence significative au niveau de la production d'AGV et d'acide lactique. De plus l'Azote fixé représente 90 % de l'Azote Total.

TABLEAU XXXXV : Résultats des analyses chimiques réalisées à l'ouverture des ensilages après 6 mois de conservation.

No. Ensilage	PH	AZOTE			AGV	Acide Acétique	Alcools	Acide Lactique
		M.A.T.	A. SOLUBLE					
		% MS	% MS	% NIP	g % MS	g % MS	g % MS	g % MS
1	4,21	14,6	1,62	11,0	5,66	4,76	2,14	42,8
2	4,10	13,5	ND	ND	5,42	4,49	1,30	37,0
3	4,25	ND	ND	ND	12,98	12,19	1,32	36,0
4	4,37	14,7	1,79	12,2	12,76	11,67	3,26	29,6
5	4,45	ND	ND	ND	7,17	6,18	2,47	30,4
6	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-
7	4,15	15,5	2,21	14,2	9,57	8,59	29,93	49,55
8	ND	ND	ND	ND	6,24	5,74	1,75	46,41
9	4,40	11,7	ND	ND	6,93	5,80	0,32	35,63
10	4,47	11,4	ND	ND	5,65	4,65	0,50	33,23
11	4,39	13,2	ND	ND	8,04	6,92	0,80	35,38
12	4,40	17,1	2,67	15,6	5,18	4,14	0,52	45,31
13	5,50	12,1	ND	ND	3,73	3,08	0,81	12,00
14	4,12	13,9	1,39	10,0	2,14	1,83	0,00	5,50
15	4,40	12,6	ND	ND	3,96	3,37	19,04	42,77
16	4,11	12,9	ND	ND	48,47	4,24	1,34	37,29

8.7. CONCLUSION.

Le procédé de fermentation en milieu solide, appliqué aux substrats lignocellulosiques, donne des résultats particulièrement intéressants pour la culture de champignons filamenteux cellulolytiques pour la production de cellulases. Au laboratoire tous les substrats lignocellulosiques (qui ont été expérimentés (paille de blé, son de blé, pulpes de betterave, bagasse de canne à sucre) ont donné des résultats positifs avec I. harzianum .

L'étude comparée des fermentations en milieu liquide et en milieu solide de pulpes de betterave avec I. harzianum ne fait pas apparaitre de différences significatives au niveau de la production des cellulases.

L'analyse de la microflore hétérotrophe aérobie naturelle de la bagasse a montré l'existence d'une microflore très importante de l'ordre de 2,5 millions de bactéries par gramme de bagasse poids sec. Afin de maitriser la croissance préférentielle de I. harzianum et en même temps appliquer un prétraitement à la cellulose contenue dans la bagasse, le substrat a été autoclavé à 110°C avant l'inoculation avec des conidiospores de I. harzianum .

A partir des résultats obtenus en colonne au laboratoire, le passage au niveau pilote expérimental a été réalisé en utilisant un nouveau fermenteur statique(Zymotis). L'étude en parallèle de la croissance de I. harzianum en colonne et en Zymotis ne fait pas apparaitre de différence significative au niveau de la production des cellulases. Cela confirme l'efficacité du Zymotis ainsi que la validité de l'extrapolation.

L'utilisation du Zymotis par la fermentation de la bagasse de canne à sucre a permis la production d'une quantité importante de produit fermenté. Afin de récupérer les enzymes et les métabolites présents dans le produit fermenté une nouvelle méthode d'extraction a été mise au point. Par pressage à 230 bar on extrait environs 80 % de cellulases. La portion insoluble est conservée par ensilage pendant plusieurs mois et constitue un fourrage d'une qualité moyenne.

Ces résultats très prometteurs nous autorisent à envisager la valorisation biotechnologique non seulement de la bagasse mais également d'un grand nombre de substrats lignocellulosiques par la production de fourrages mais aussi de métabolites fongiques à haute valeur ajoutée.

En particulier la culture de microorganismes sur support cellulosique par fermentation en milieu solide ouvre de nombreuses perspectives d'utilisation de ce procédé. L'addition d'inducteurs solubles dans le milieu de culture, absorbé sur le support, permetra d'élargir la gamme d'enzymes et de métabolites obtenus par fermentation en milieu solide.

CONCLUSIONS GENERALES.

L'hydrolyse de la cellulose par les moisissures est un processus complexe qui exige la participation d'au moins trois types d'enzymes (Cellulases) :

- l'endo - β - 1,4 - glucanase
- l'exo - β - 1,4 - glucanase
- la β - 1,4 glucosidase (cellobiase)

Les cellulases sont des enzymes adaptatives. Leur biosynthèse est controlée par un mécanisme inducteur-répresseur, elle est induite par le cellobiose et le sophorose et à un degré moindre par le lactose. Le meilleur inducteur pour la production de cellulases par Trichoderma est la cellulose. Le glucose réprime la synthèse des cellulases.

L'efficacité de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose dépend largement de son accessibilité aux enzymes extracellulaires sécretées par les moisissures. Le contact direct entre ces enzymes et le substrat cellulosique est une condition essentielle de l'hydrolyse. Comme la cellulose est un substrat insoluble et de structure complexe qui ne peut pas pénétrer dans la cellule, ce contact ne peut se réaliser qu'après diffusion des enzymes à l'exterieur du mycélium.

Les cultures en milieu liquide présentent l'inconvenient de diluer considérablement les enzymes cellulolytiques synthétisées par le microorganisme et de limiter les contacts entre les substrats insolubles et ce microorganisme. L'attaque de la cellulose non soluble par les enzymes spécifiques diluées n'est donc pas efficace. Dans ces conditions, les cultures en milieu solide pourraient présenter des avantages intéressants puisque le champignon filamenteux se développe au contact du substrat. Les enzymes excrétées directement sur le substrat vont pouvoir l'hydrolyser avec plus d'efficacité. En retour les sucres réducteurs libérés au cours de l'hydrolyse du substrat insoluble pourront être mobilisés rapidement par le microorganisme pour son développement. Le système de culture en milieu solide parait donc plus apte pour la croissance de microorganismes adaptés à des tels substrats insolubles.

Dans le cas des substrats lignocellulosiques (paille des céréales, bagasse), les hemicelluloses et la lignine forment une matrice entourant la cellulose, la masquant ainsi des enzymes cellulolytiques. Les différents prétraitements physico-chimiques appliqués à ces substrats aboutissent à la rupture des liaisons lignine-cellulose-hemicelluloses et à l'augmentation des zones amorphes de la chaine glucidique. La diffusion des enzymes est ainsi améliorée et les points d'attaque des cellulases sont augmentés.

L'étude de l'influence de divers prétraitements physico-chimiques appliqués à des résidus lignocellulosiques a permis de définir les conditions de mise en oeuvre de la fermentation en milieu solide de ces substrats :

- Utilisation du substrat broyé d'une taille inférieure à 2,5 mm.
- Traitement du substrat en milieu imprégné et non pas en suspension dans une solution alcaline, de facon à éviter les pertes importantes de matière, par ailleurs source de pollution.
- Traitement du substrat à 50 % d'humidité, par la chaleur à 110 C pendant 30 min.

Une étude préliminaire nous a permis de sélectionner, parmi les souches de champignons filamenteux cellulolytiques de notre collection, une souche de Trichoderma harzianum présentant des caractéristiques satisfaisantes pour la production de cellulases à partir des substrats cellulosiques par fermentation en milieu solide. Cette souche produit des quantités élevées de cellulases, possède une croissance apicale rapide (1,2 mm/h), peut coloniser des substrats solides assez rapidement et produit des quantités importantes de conidiospores (3,5 X 10^10 conidiospores/g de substrat). De plus, T. harzianum est un antagoniste puissant vis-à-vis d'un certain nombre de champignons phytopathogènes, il produit des enzymes spécifiques (β - 1,3 glucanases) capables d'hydrolyser la paroi cellulaire des sclérotes (formes de résistance) de champignons phytopathogènes.

L'étude de la physiologie de la croissance a mis en évidence que T. harzianum est un microorganisme prototrophe, d'une grande souplesse d'adaptation, capable de se développer dans des conditions extrêmes (pH : 2 à 8 ; température de 10 à 35 C°; salinité de 0 à 80 g de NaCl/l).

L'utilisation d'un milieu de culture entièrement synthétique nous a permis de démontrer que T. harzianum est un microorganisme prototrophe assimilant bien le nitrate, l'urée, l'ammoniaque, les sels d'ammonium et plus faiblement le nitrite. De même, les Glucose, D-Fucose, Lactose, D. Ribose, Xylose, Cellobiose, Galactose, Saccharose, Amidon, Cellulose, Mannitol sont utilisés comme unique source de carbone et d'énérgie.

Les principales étapes physiologiques de la croissance de T. harzianum sont la germination des conidiospores, la multiplication végétative du mycélium, la sporulation ou conidiogénèse et la dormance. La germination des conidiospores de T. harzianum commence avec l'apparition du tube germinatif après 8 heures de culture. La cinétique de germination est directement influencée par la nature du substrat carboné du milieu de culture. En particulier cette cinétique est nettement ralentie lorsque T. harzianum est

cultivé sur cellulose microcristalline (liaisons glucidiques -1,4). Au cours de la multiplication végétative, le mycélium développe de très nombreuses ramifications. La durée de cette étape est fonction des conditions ainsi que de la composition des milieux de culture. En général elle dure 40 heures.

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. L' étude de la physiologie de la sporulation de I. harzianum a permis de comprendre comment les différents facteurs (environnement, composition du milieu de culture, mode d'inoculation, temps d'incubation) influencent la production de conidiospores et de définir les conditions optimales de production de conidiospores.

Il a été démontré que le mode d'inoculation, la concentration de la source de carbone et d'azote, les sels NaCl, KCl et CaCl2, l'aération des cultures, la durée d'incubation sont les principaux facteurs qui influencent quantitativement la production de conidiospores de I. harzianum . De même la lumière favorise le développement de la couleur verte caractéristique de ces conidiospores. La composition optimale du milieu de sporulation a été définie. La production maximale de conidiospores est obtenue après 20 jours de culture en erlen sans aération, avec un rendement de 5,0 X 10^10 conidiospores/g de farine de manioc.

Un procédé nouveau a été mis au point pour la production de spores de champignons filamenteux en utilisant un nouveau dispositif. Ce procédé allie l'avantage de la culture de surface sur un milieu solidifié, à l'utilisation d'un fermenteur à disques rotatifs particulier dont le principe d'utilisation a été fondamentalement modifié de facon à obtenir une grande surface de sporulation et à permettre de récolter aisément les spores par simple lavage des disques. La biomasse mycélienne reste emprisonnée dans le milieu solidifié, toutes les opérations peuvent être réalisées dans le même appareil stérilisable, assurant une grand simplicité d'utilisation et une asepsie stricte.

Dans ce fermenteur à disques, le maximum de production de conidiospores de I. harzianum a été obtenu après 7 jours d'incubation avec 7,3 X 10^11 conidiospores produites ce qui correspond à un rendement de 3,25 X 10^10 conidiospores/g de farine de manioc, initialement présente dans le milieu de culture. Le poids d'une conidiospore de I. harzianum étant de 1 X 10-11 g, le rendement pondéral global rapporté au substrat carboné (poids des conidiospores / g) est très élevé et proche de 36 %.

Une nouvelle technique de conservation par séchage à +40 C sous vide des conidiospores a été expérimentée en utilisant un rotavapor. Il a été démontré que l'utilisation d'un support inerte (bagasse finement broyée et stérile)

améliore nettement les rendements de récupération et de viabilité des conidiospores séchées par cette méthode.

La méthode de fermentation en milieu solide est basée sur le conditionnement du substrat insoluble uniformément inoculé par des spores de champignons filamenteux apportées dans la solution minérale contenant de l'urée, KH2PO4 et (NH4)2SO4. L'humidité du milieu de culture est élévée sans que pour autant il y ait d'eau en excès (teneur en eau entre 70 et 74 %).

L'utilisation de substrats tels qu'un mélange de bagasse et de son de blé de paille de blé et de son de blé ou les pulpes de betterave, fournit des résultats particulièrement intéressants. I. harzianum se développe très bien sur ces substrats prétraités, même dans des conditions de fermentation non aseptiques. La production de cellulases est élevée, sensiblement égale pour les trois substrats étudiés. Pour 100 g de substrat poids sec on obtient après 48 h de fermentation, une production de 2.000 UI d'Activité Papier Filtre et 20.000 UI d'Activité Carboxyméthyl cellulose. En outre, grâce au pouvoir tampon élevé de la paille, de la bagasse ou des pulpes de betterave, il n'est pas indispensable de réguler le pH pendant toute la durée de la fermentation ; le développement relativement lent de I. harzianum sur ces substrats ne provoque pas d'échauffement trop important de la masse et les calories peuvent être assez facilement éliminées.

La cinétique comparée de biosynthèse des cellulases en milieu solide et en milieu liquide ne montre pas de différences significatives au niveau des rendements de production des différentes enzymes. Ceci est tout à fait encourageant et nous permet d'envisager la production de cellulases de I. harzianum par fermentation en milieu solide.

Le procédé de production de cellulases par I. harzianum que nous avons décrit comprend cinq étapes.

- Préconditionnement du substrat par broyage et traitement thermique.
- Inoculation avec une suspension de conidiospores, le produit étant amené à 72 % d'humidité.
- Fermentation aérobie statique avec passage continu d'un flux d'air humidifié à travers la masse du produit pendant 48 h.
- Extraction des cellulases par pressage du produit fermenté.
- Conditionnement des deux fractions obtenues : évaporation de la fraction soluble permettant d'obtenir les cellulases sous forme de poudre sèche, ensilage de la fraction insoluble pour stabiliser le sous-produit et permettre son utilisation éventuelle en alimentation animale.

Nous avons enfin vérifié que l'extrapolation de la technique de fermentation solide statique est expérimentalement possible grâce à l'utilisation d'un fermenteur statique (zymotis) à l'échelle pilote de 20-50 Kg de capacité.

Le Zymotis est un nouveau biofermenteur statique pour la culture de microorganismes en milieu solide. L'aération des cultures se fait par le bas de la cuve, assurant ainsi une bonne oxygénation du milieu. La régulation de la température s'opère par une série d'échangeurs thermiques transférant les calories et délimitant des compartiments de fermentation. La cuve du fermenteur est munie d'un couvercle mobile permettant la récupération et l'analyse des gaz en sortie de l'appareil ; l'ensemble étant isolé du milieu ambiant permet d'éviter les risques importants de contamination et de réaliser des bilans de fermentation assez précis.

Le zymotis une fois chargé peut contenir 50 Kg de substrat cellulosique à 72 % d'humidité, ce qui représente 2.500 colonnes de laboratoire, donc une extrapolation très significative au niveau expérimental.

Pour une fermentation en zymotis de 12 Kg poids sec d'un mélange de bagasse et de son de blé, nous avons obtenu après 48 h de culture de I. harzianum une production globale de :

- 164.520 UI d'Activité Papier Filtre
- 1.623.240 UI d'Activité Carboxyméthyl-cellulose.

La conservation par ensilage de la Fraction Insoluble (F.I.) obtenue après extraction des cellulases produites par I. harzianum au cours de la fermentation en milieu solide de la bagasse a montré que cette F.I. se conserve normalement. Les 4 conservateurs d'ensilage utilisés ont donné des résultats similaires en protégeant particulièrement la fraction protéique et en stabilisant l'ensilage. Il n'y a pas eu, au cours de la conservation, de perte importante en poids de matière sèche, le pH a été maintenu acide avec une production normale, pour les produits lignocellulosiques, d'acide lactique. La concentration d'azote soluble représente 10 % de l'azote Total ce qui confirme la bonne protection de la fraction protéique au cours de la conservation par ensilage.

Ces résultats sont très prometteurs ; ils autorisent à envisager l'utilisation de I. harzianum pour la production massive de cellulases. Par ailleurs, la production massive de conidiospores de I. harzianum en condition contrôlées peut conduire à des applications pratiques dans le domaine de la lutte biologique contre les phytoparasites des cultures, mais également pour l'extraction et la purification de nouveaux antibiotiques, les Trichorzianines, présents dans les conidiospores de ce champignon filamenteux.

BIBLIOGRAPHIE

AIDOO, K. E., HENDRY, R., WOOD, B. J. B. (1982). Solid substrate fermentations. Adv. Appl. Microbiol. 28 : 210-236.

AIT, N., CREUZET, N., CATTANEO, J. (1979). Characterization & purification of thermostable β- glucosidase from *Clostridium thermocellum*. Biotechnol. Biophys. Res. Commun. 90 : 537-546.

ALAZARD. D. (1979). Production d'amylase et de protéase par *Aspergillus niger* cultivé en milieu solide. Etude comparative avec la production en milieu liquide. DEA de biochimie, Université de Paris VII, 36 p.

ALLEN, P. J. (1965). Metabolic aspects of spore germination in fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 3 : 313-342.

ALLEN, A. L., ANDREOTTI, R. L. (1982). Continuous culture of *Aspergillus phoenicis* QM 329 for the production of cellobiase. Biotechnol. Bioeng. 24 : 2747-2751.

ALLERMANN, K., FOGH, S., OLSEN. L. (1983). The disc fermenter as a tool for immobilization of filamentous fungi. Pasteur biosciences 83. Coll. Int. Biotechnol. 6-9 Sept. 1983, Paris.

ANDER P. ERIKSSON K. E., YU H. S. (1983). Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*. Europ. J. Biochem. 90 : 171-181.

ASTHER, M. (1982). Production d'aliments fermentés enrichis en protéines à partir de substrats lignocellulosiques par fermentation en milieu solide. DEA microbiol. Univ. Aix Marseille II. 35 p.

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

BACHET, B., BRASSY, C., MORIZE, I., SURCOUF, E., NORMON, J. P., BODO, B., REBUFFAT, S. (1983). Crystallization and preliminary X-ray diffraction results of Trichorzianine A 1, a peptide with nineteen residues from *Trichoderma harzianum*. J. Mol. Biol. 170 : 795-796.

BESSE, J. (1969). L'alimentation du bétail. Collection d'enseignement agricole. J. B. BAILLIERE., ed., Paris.

BIANCHI A. (1971). Ecologie et taxonomie des bactéries hétérotrophes aérobies des sédiments marins. Leur participation à la dégradation des matières organiques. Thèse Doct. d'état. Université d'Aix-Marseille II. 291 p.

BOIRIE, M., PONS, B. J., RENAUD, C. (1983). Production, modes d'action et applications d'une nouvelle préparation à activité biopesticide à base de *Trichoderma*. Les antagonismes microbiens, 24ème Colloque SFP, Bordeaux 26-28 Mai 1983, Ed. INRA (Les colloques de l'INRA No. 18 : 255-262).

BRODERICK, A. J., GREENSHIELDS, R. N. (1982). Semi-continuous and continuous production of *Aspergillus niger* spores in submerged liquid culture. J. Gen. Microbiol. 128 : 2639-2645.

BUTLER, E. E. (1980). A method for long-time culture storage of *Rhizoctonia solani*. Phytopathol. 70 : 820-821.

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

CANNEL, E., MOO-YOUNG, M. (1980). Solid state fermentation systems I. Process Biochem. 15 : 2-7.

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

CERRI, C. L. (1983). Utilisation agricole des résidus des industries de sucre et de l'alcool au Brésil. Conférence au CTCS, Décembre 1983.

CHET, I., ELAD, Y. (1983). Mecanism of mycoparasitism. Les antagonismes microbiens, 24ème colloque SFP, Bordeaux 26-28 Mai 1983, Ed. INRA (Les colloques de l'INRA No. 18 : 35-40).

CONTRERAS, I., GONZALEZ, R., RONCO, A., ASENJO, J. A. (1982). Cellulolytic enzymes for the hydrolysis of leached beet cossette. Biotechnol. Lett. 4 : 51-56.

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

CRAWFORD D. I. (1978). Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. Appl. Environ. Microbiol. 35 : 1041-1045.

CURRAN, P. M. T. (1971). Sporulation in some members of the *Aspergillus glaucus* group in reponse to osmotic pressure, illumination and temperature. Trans. Br. Mycol. Soc. 57 : 201-211.

DABINETT, P., E., WELLMAN, A. M. (1978). Numerical taxonomy of certain genera fungi imperfecti and ascomycotina. Can. J. Botan. 56 : 2031-2049.

DAHMEN, H., STAUB, Th., SCHWINN, F. J. (1983). Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. Phytopathol. 73 : 241-246.

DAIGNEAULT-SYLVESTRE, N., KLUEPFEL, D. (1979). Method for the rapid screening of cellulotytic streptomycetes and their mutants. Can. J. Microbiol. 25 : 858-860.

DESCHAMPS, F., MEYER, F., PREBOIS, J. P. (1980). Mise au point d'une unité pilote de fermentation aérobie en milieux solides. Colloque annuel, Soc. Microbiol. Ind. Fr. INSA Toulouse 13-14 Mars.

DESCHAMPS, F. GIULIANO, C., ASTHER, M., HUET, M. C., ROUSSOS, S. (1985). Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid state fermentation reactors under non-aseptic conditions, Biotechnol. Bioeng. 27: 1385 - 1388.

DESHPANDE, R., ERIKSSON, K. E., PETTERSSON, B. (1978). Production, purification and partial characterization of 1,4 - β - glucosidase enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*. Eur. J. Biochem. 90 : 191-198.

DOMS, K. H., GAMS, W. ANDERSON, T. H. (1980). Compendium of soil fungi Vol. I et II. Academic Press, London.

DOUGLAS, K. A., HOKING, A. D., PITT, J. I. (1979). Dichloran rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. Appl. Environ. Microbiol. 37 : 959-964.

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

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28 : 350-356.

DUBOS, B., ROUDET, J., BULIT, J., BUGARET, Y. (1983). L'utilisation du *Trichoderma harzianum* dans la pratique viticole, pour lutter contre la pourriture grise *(Botrytis cinerea)*. Lesantagonismes microbiens, 24ème colloque SFP, Bordeaux 26-28 Mai 1983, Ed. INRA (Les colloques de l'INRA Nº. 18 : 289-296).

DUBOURDIEU, D. (1982). Recherches sur les polysaccharides secrétés par *Botrytis cinerea* dans la baie du raisin. Thèse Doctorat es-Sciences, Université de Bordeaux II.

DUBOURDIEU, D. (1983). Dégradation du glucane de *Botrytis cinerea* par les β-(1 – 3) glucanases de *Trichoderma* sp. Les antagonismes microbiens, 24ème colloque SFP, Bordeaux 26-18 Mai 1983, Ed. INRA (les colloques de l'INRA No. 18 : 41-50).

DURAND, A. (1983). Les potentialités de la culture à l'état solide en vue de la production de microorganismes filamenteux. Les antagonismes microbiens, 24ème colloque SFP, Bordeaux 26-28 Mai 1983, Ed. INRA (Les colloques de l'INRA No. 18 : 263-277).

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

ELLISON, P. J., HARRAOWER, K. M., CHILVERS, G. A., OWENS, J. D. (1981). Patterns of sporulation in *Trichoderma viride*. Trans. Br. Mycol. Soc. 76 : 441-445.

ENARI, T. M., MARKKANEN, P. (1977). Production of cellulolytic enzymes by fungi. Adv. Biochem. Eng. 5 : 1-24.

ERIKSEN, J., GOKSOYR, J. (1976). The effect of temperature on growth and cellulse (β-1,4-endoglucanase) production in the compost fungus *Chaetomium thermophile* var. *dissitum*. Arch. Microbiol. 110 : 233-238.

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

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

ERIKSSON, K. E., HAMP, S. G. (1978). Regulation of endo-1,4-β- glucanase production in *Sporotrichum pulverulentum*. Eur. J. Biochem. 90 : 183-190.

FAHNRICH, P. IRRGANG, K. (1982 a). Some characteristics of the cellulolytic enzyme system of *Chaetomium cellulolyticum*. Biotechnol. Lett. 4 : 519-524.

FAHNRICH, P. IRRGANG, K. (1982 b). Conversion of cellulose to sugars and cellobionic acid by the extracellular enzyme system of *Chetomium cellulolyticum*. Biotechnol. Lett. 4 : 775-780.

FAUCONNIER R.,BASSEREAU D. (1970).La canne à sucre. Maisonneuve et Larose, eds., Paris.

FERCHAK, J. D., PYE E. K. (1983 a). Effect of glucose and other sugars on the β-1,4-glucosidase activity of *Theremonospora fusca*. Biotechnol. Bioeng. 25 : 2855-2864.

FERCHAK, J. D., PYE E. K. (1983 b). Effect of cellobiose, glucose, ethanol and metal ions on the cellulase enzyme complex of *Theremonospora fusca*. Biotechnol. Bioeng. 25 : 2865-2872.

FEVRE, M., TURIAN, G., LARPENT, J. P. (1975). Bourgeonnements et croissance hyphale fongiques. Physiol. Vég. 13 : 23-38.

FLIESS, A., SCHUGERL, K. (1983). Charaterization of cellulases by HPLC separation. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17 : 314-318.

FROSSARD, R., OERTLI, J. J. (1982). Growth and germination of fungal spores in guttaton fluids of Barley grown with different nitrogen sources. Trans. Br. Mycol. Soc. 78 : 239-245.

FUJITA, T., TAKAISHI, Y., OKAMURA. (1981). New peptide antibiotics, Trichopolyns I and II from *Trichoderma polysporum*. J. C. S. Chem. Comm. 1981 : 585-587.

GALBRAITH, J. C. SMITH, J. E. (1969). Sporulation of *Aspergillus niger* in submerged liquid culture. J. Gen. Microbiol. 59 : 31-45.

GALLO, B. J., ANDREOTTI, R., ROCHE, C., RYU, D., MANDELS, M. (1978). Cellulase production by a new mutant strain of *Trichoderma reeseiMCG* 77. Biotechnol. Bioeng. Symp. 8 : 89-101.

GHOSE, T. K. (1977). Cellulase biosynthesis and hydrolysis of cellulase substances. Adv. Biochem. Eng. 6 : 39-76.

GHOSE, T. K., SAHAI, V., (1979). Production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM 9414 in fed-batch and continuous flow culture with cell recycle. Biotechnol. Bioeng. 21 : 283-196.

GHOSE, T. K., BISARIA, R. S. (1979). Studies on the mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulosic substances. Biotechnol. Bioeng. 21 : 131-146.

GINDRAT, D. (1977). Effets de concentrations élevées de sels sur la croissance, la sporulation et la pigmentation de *Trichoderma* spp. Can. J. Microbiol. 23 : 607-616.

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

GIULIANO, C., ASTHER, M., KHAN, A. W. (1983). Comparative degradation of cellulose and sugar formation by three newly isolated mesophilic anaerobes and *Clostridium thermocellum*. Biotechnol. Lett. 5 : 395-398.

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

GONG, C. S., TSAO, G. T. (1979). Cellulase and biosynthesis regulation. Annual reports on fermentation processes, Vol. 3. Academic Press New-York, pp 111-140.

HAGERDAL, B. G. R., FERCHALK J. D., KENDALL-PYE E. (1978). Cellulolytic enzyme system of *Thermoactinomyces* sp. grown on microcristalline cellulose. Appl. Environ. Microbiol. 36 : 606-612.

HALLIWELL, G., GRIFFIN, M. (1973). The nature and mode of action of the cellulolytic component C_1 of *Trichoderma koningii* on native cellulose. Biochem. J. 135 : 587-594.

HALLIWELL, G. GRIFFIN, M. (1978). Affinity chromatography of the cellulase system of *Trichoderma koningii*. Biochem. J. 169 : 713-715.

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

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

HESSELTINE, C. W. (1965). A millenium of fungi, food and fermentation. Mycologia 57 : 149-157.

HESSELTINE, C. W. (1972). Solid state fermentation. Biotechnol. Bioeng. 14 : 517-532.

HITCHNER, E. V. (1978). Use of a cellulase derepressed mutant of *Cellulomonas* in the development of a single cell protein product from cellulose. North Carolina State University at Raleigh P. H. D. 1978 ; 84 pp.

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

IKEDA, R., YAMAMOTO, T., FUNATSU, M. (1973 b). Chemical and enzymatic properties of acid-cellulase produced by *Aspergillus niger*. Agr. Biol. Chem. 37 : 1169-1175.

JEREBZOFF, S., JEREBZOFF - QUINTIN, S., LAMBERT, E. (1976). L'induction du rythme endogène de sporulation chez *Aspergillus niger* : rôles du rapport glucose/potassium et de micro-éléments. Physiol. Plant. 36 : 279-286.

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

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

LARPENT, J. P. (1972). Les substances morphogènes chez les champignons. Actes du 97ème Congrès National des Sociétés Savantes, Nantes 1972.

LILLY, V. G. (1965). Chemical constituents of fungal cells. The fungi, Vol. I, Ainsworth and Sussman, eds.

LOEWENBERG, J. R. (1984). Sophorose induction of an intracellular β-glucosidase in *Trichoderma*. Arch. Microbiol. 137 : 53-57.

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

MAHEVA, E., DJELVEH, G., LARROCHE, C., GROS, J. B. (1984). Sporulation of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation. Biotechnol. Lett. 6 : 97-102.

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

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

MANDELS, M., STERNBERG, D., ANDREOTTI, R. E. (1975). Growth and cellulase production by *Trichoderma*. In : symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. The Finnish National Fund dor Research and Development, Helsinki 12-14 Mars 1975. Bailey, Enari et Linko ed.

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

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

MANDELS, M. (1982). Cellulases. In : "annual reports on fermentation processes" (G. T. TSAO, M. C. FLICKINGER and R. K. FINN, eds) Vol. 5 : pp. 35-38. Academic press.

MARTENILLI, S. D. (1976). Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged culture. Trans. Br. Mycol. Soc. 67 : 121-128.

MEANS, C. W., SAVAGE, G. M., REUSSER, F., KOEPSELL, H. J. (1962). Design and operation of a pilot plant fermentor for the continuous propagation of filamentous microorganisms. Biotechnol. Bioeng. 4 : 5-16.

MEYER, F. DESCHAMPS, F. (1979). Nouveaux fermenteurs pour milieux solides. Brevet français No. 79.02.625.

MICHOUD, L. (1983). Production de spores de *Trichoderma album* en culture en surface. Mise au point de bioréacteurs. Etude de la germination. DEA. Université de DIJON - ENSBANA. 25 p.

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

MOLRASCH, L. C. (1967). Amino acid measurement. Anal. Biochem. 18 : 64-71.

MONOD J. (1942). Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann et Cie Paris, 221p.

MOO-YOUNG, M., Mac DONALD, D. G., LING, A. (1981). Improved economics of the waterloo SCP process by increased growth rates. Biotechnol. Lett. 3 : 154-157.

MONTENECOURT, B. S., EVELEICH, D. E. (1977). Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. Appl. Environ. Microbiol. 34 : 777-782.

MONTENECOURT, B. S., EVELEIGH, D. E.(1979). Production and characterization of high yieldding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. TAPPI Annual meeting proc., New-York, pp. 101-108, 12-14 Mars 1979.

MONTENECOURT, B. S., KELLEHER, T. J., EVELEIGH, D. E., PETTERSSON, L. G. (1980). Biochemical nature of cellulases from mutants of *Trichoderma reesei*. Biotechnol. Bioeng. Symp. 10 : 15-26.

MONTENECOURT, B. S., NHLAPO, S. D., TRIMIÑO-VASQUEZ, H., CUSKEY, S., SCHAMHART, D. H., EVELEIGH, D. E. (1981). Regulatory controls in relation to over-production of fungal cellulases in trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals. A. HOLLAENDER and Coll. Ed., Plenum press, London.

MUINDI P. J., HANSSEN, J. F. (1981 a). Nutritive value of cassava root meal enriched by *Trichoderma harzianum* for chickens. J. Sci. food Agric. 32 : 647-654.

MUINDI, P. J., HANSSEN, J. F. (1981 b). Protein enrichment of cassaca root meal by *Trichoderma harzianum* for animal feed. J. Sci. food agric. 32 : 655-661.

NISIZAWA, T., SUZUKI, H., NAKAYAMA, M., NISIZAWA, K. (1971) Inductive formation of cellulase by sophorose in *Trichoderma viride*. J. Biochem. 70 : 375-385.

NISIZAWA, T., SUZUKI, H., NISIZAWA, K.(1972). Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. J. Bioechem. 71 : 999-1007.

OGAWA, K., TOYAMA, H., TOYAMA, N. (1982 a). Cellulase system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Bull. agric. Miyazaki University 29 : 191-202.

OGAWA, K., TOYAMA, H., TOYAMA, N. (1982 b). Native cellulose hydrolysing cellulase of *Trichoderma reesei*. J. Ferment. Technol. 60 : 349-355.

OKUDA, T., FUJIWARA, A., FUJIWARA, M. (1982). Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitrile antibiotics. Agric. Biol. Chem. 46 : 1811-1822.

OLIVIER, J. M., GERMAIN R. (1983). Etude des antibiotiques volatils des *Trichoderma*. Les antagonismes microbiens, 24ème colloque SFP, Bordeaux 26-28 Mai 1983, ed. INRA (Les colloques de l'INRA No. 18 : 17-34).

PALLAS, G. (1983) Caractérisation des souches de *Trichoderma* DEA. Université de Bordeaux II 26 p.

PAMMENT, N., ROBINSON, C. W., HILTON, J., MOO-YOUNG, M. (1978). Solid-state cultivation of *Chaetomium cellulolyticum* on alkali-pretreated sawdust. Biotechnol. Bioeng. 20 : 1735-1744.

PARK, J. T., JOHNSON, M. J. (1949). A subdetermination of glucose. J. Biol. Chem. 181 : 149-151.

PEPE, P. A. (1984). Enrichissement protéique de la pulpe de betterave par culture de *Trichoderma album* en milieu solide. Evolution des populations microbiennes au cours du procédé. Mémoire ingénieur ENSBANA. Université de Dijon, 33 p.

PEREZ, J., WILKE, C. R., BLANCH, H. W. (1980). Economics of sugar production with *Trichoderma reesei*.Rutgers C 30. Lawrence Berleley report 11.489.

PETTERSSON, L. G. (1975). The mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulose by *Trichoderma viride*. In "symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose" (BAILEY, M., ENARI, T. M. et LINKO M. eds)., SITRA, HELSINKI, 12-14 mars 1975.

PITT, D., POOLE, P. C. (1981). Calcium-induced conidiation in *Penicillium notatum* in submerged culture. Trans. Br. Mycol. Soc. 76 : 219-230.

POCHON J., BARJAC H. de (1958). Traité de microbiologie des sols. Dunod, Paris, 1958, 685 p.

PONCHET, I. (1983). Reconnaissance et domestication de l'antagonisme microbien. Les antagonismes microbiens, 24ème colloque SFP, Bordeaux 26-28 mai 1983. Ed. INRA (Les colloques de l'INRA No. : 1-5.

POURQUIE, J., VANDECASTEELE. J. P. (1984). Conversion des composés lignocellulosiques par hydrolyse enzymatique et fermentation acétone-butanol. In "Biotechnologie" (R. SCRIBAN, ed), Technique et Documentation Lavoisier, Paris, pp. 575-591.

PREBOIS, J. P., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S. (1985). Biofermenteur statique pour la culture de champignons filamenteux en milieu solide. Demande de brevet déposée à l'ANVAR.

RAMASAMY K. (1980). On the mechanism of cellulose degradation by a *Pseudomonas* isolated from activated sludge. Agricultura 28 : 473-619.

RAIMBAULT, M. GERMON, J. C. (1976). Procédé d'enrichissement en protéines de produits comestibles solides. Brevet français A.N.V.A.R. No. 76.06.677.

RAIMBAULT, M. (1980). Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé. Thèse d'Etat. Univ. Paul SABATIER, Toulouse, 291 p.

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

RAIMBAULT, M. ROUSSOS, S. (1985). Procédé de production de spores de champignons filamenteux. Brevet français No. 85.08555.

REESE, E.T., MAGUIRE, A. (1971). Increase in cellulase yields by addition of sulfactans to cellobiose cultures of *Trichoderma viride*. Dev. Ind. Microbiol. 12 : 212-224.

REESE, E.T. (1976). History of the cellulase program at the U. S. army Natick development center. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 : 9-20.

RICARD, J. (1983a). Décennie de traitements curatifs des arbres fruitiers contre la maladie du Plomb par les *Trichoderma* IMI 206039 et 206040. Les antagonismes microbiens, 24ème colloque SFP, Bordeaux 26-28 mai 1983, ed. INRA (Les colloques de l'INRA No. 18 : 119-129).

RICARD, J. (1983b). Traitement de la graphiose de l'orme par les granulés *Trichoderma*. Les antagonismes microbiens, 24ème colloque SFP, Bordeaux 26-28 mai 1983, ed. INRA (Les colloques de l'INRA No. 18 : 303-304)

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

ROSEMAIN, R (1983). Schéma "Sous-produits à sucre". Note interne CTCS. Sept. 1983.

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

ROUSSOS, S. (1981). Etude de 1'hydrolyse de la cellulose par les moisissures cultivées en milieu solide. Rapport d'élève chercheur ORSTOM. 81 p.

ROUSSOS, S. RAIMBAULT, M. (1982 a). Hydrolyse de la cellulose par les moissisures. I. Screening des souches cellulolytiques. Ann. Microbiol. 133 B : 455-464.

ROUSSOS, S. (1982). Mise au point d'une méthode pour l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et nutritionnels des champignons imparfaits. Cah. ORSTOM Sér. Biol. 45 : 25-34.

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

ROUSSOS S., SEDHA, R. K (1983). Production comparée de cellulases de *Trichoderma harzianum* et de *Chaetomium cellulyticum* cultivés sur bagasse prétraitée en fermentation en milieu solide et liquide. Coll. Int. Biotechnol. " Biosciences 83" Paris 6-9 sept. 1983, Poster.

ROUSSOS, S., HANNIBAL, L. (1984). Valorisation biotechnologique de la bagasse par la production au niveau pilote d'enzymes de champignons filamenteux cellulolytiques. Rapport CORDET c. 100. 48 p. + 4 annexes.

ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., VINIEGRA, G. (1985 a). Efectos de sales minerales sobre la esporulación de *Trichoderma harzianum*. XVI Congreso nacional de microbiología. Durango 11-15 de agosto 1985. Mexique. Asociación mexicana de microbiología ed.

ROUSSOS, S., AVILES, J., SERRANO, L., AQUIAHUATL M. N., RAIMBAULT, M., VINIEGRA, G. (1985 b) Fisiología del crecimiento de un hongo filamentoso cellulolítico : *Trichoderma harzianum*. XVI Congreso nacional de microbiología, Durango 11-15 de agosto 1985. Mexique. Asociación Mexicana de microbiología ed.

ROUSSOS, S. OLMOS, A., AQUIAHUATL, M. A., RODRIGUEZ, W. RAIMBAULT, M., VINIEGRA, G (1985 c). Un método de secado y de conservación de las esporas de *Trichoderma harzianum*. XVI Congreso nacional de microbiología, Durango 11-15 de agosto 1985. Mexique. Asociación mexicana de microbiología.

RYAN, F. J., BEADLE, G. W., TATUM, E. L. (1943). The tube method of measuring the growth rate of *Neurospora*. Amer. J. Botan. 30 : 784-799.

SAONO, S. (1984). Lactic fermentation in traditional foods of Indonesia. In simposio internacional : las fermentaciones lécticas en la industria alimentaria. México D. F., 27-29 Nov. 1984, G. VINIEGRA ed.

SASSON, A. (1983). Les Biotechnologies - défis et promesses. UNESCO ed.

SASSON, A. (1984). Biotechnologies et tiers-monde. Biofutur 21 : 31-33.

SEBO, J. (1975). Press-extraction of green plants for separation of the cell sap and the fiber fraction, p. 65-72. In "symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose". M. BAILEY, T. M. ENARI, and M. LINKO (ed.). The finnish national fund for research and developpement (SITRA), Helsinki 12-14 mars, Finland.

SENEZ, J. C. (1979). Pour une politique nationale en matière de protéines alimentaires. Le Progrès Scientifique 203 : 5-32.

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

SLAYMAN, C. W., TATUM, E. L. (1964). Potassium transport in *Neurospora*. Intracellular sodium and potassium concentrations and cation requirements for growth. Biochem. Biophys. Acta 88 : 578-592.

SMITH, J. E., BERRY, D. R. (1975). The filamentous fungi. I. Industrial mycology. Edward Arnold ed., London.

STERNBERG, D. (1976). β - glucosidase of *Trichoderma* : its biosynthesis and role in saccharification of cellulase. Appl. Environ. Microbiol. : 648-644.

STERNBERG, D. (1976). Production of cellulase by *Trichoderma*. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 : 35-53.

STERNBERG, D. (1976). A method for increasing cellulase production by *Trichoedrma viride*. Biotechn. Bioeng. 18 : -1751-1760.

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

STERNBERG, D. MANDELS, G. R. (1979). Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. J. Bacteriol. 139 : 761-769.

STEWART, J. C., LESTER, A., MILBURN, B., PARRY, J. B. (1983) Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. Biotechnol. Lett. 5 : 543-548.

SU, T. M., PAULAVICIUS. (1975). Enzymatic saccharification of cellulose by thermophilic actinomyces. Appl. Polym. Symp. 28 221-236.

SUSSMAN, A. S. (1971). Activators of fungal spore germination. In " The fungal spore". Weber and Hess, ed., London.

THEODOROU, M. K., BAZIN, M. J., TRINCI, A. P. J. (1983). Growth of *Trichoderma reesei* on glucose-mineral salts media containing ammonium sulphate or urea as the sole source of nitrogen. Microbios 36 : 157-167.

THIVEND, P. FONTY, G., GRENET, E. (1980). Degradation de la cellulose et des autres polyosides pariétaux dans le tube digestif des ruminants. In "Colloque cellulolyse microbienne", Marseille 23-24 mai 1980, (BELAICH, CREUSET, FARDEAU et VILLEMINOT, eds.)

THOMKE, S., RUNDGREN, M., ERIKSSON, S. (1980) Nutritional evaluation of the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* as a feed stuff to rats, pigs, and sheep. Biotechnol. Bioeng. 22 : 2285-2303.

TOMMERUP, I. C., KIDBY, D. K. (1979) Preservation of spores of vesicular arbuscular endophytes by L-drying. Appl. Environ. Microbiol. 37 831-835.

TOYAMA, N. (1976). Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp. No 6 : 207-219.

TRINCI A. P. J. (1972). Culture turbidity as a measure of mold growth. Trans. Br. Mycol. Soc. 58 : 467-473.

TURIAN, G. (1971). Spores in ascomycetes, their controlled differentiation. In "The fungal spore", Weber and Hess ed., London.

ULMER, D. C., TENGERDY, R. P., MURPHY, V. G. (1981). Solid state fermentation of steam-treated feed lot waste fibers with *Chaetomium cellulolyticum*. Biotechnol. Bioeng. Symp. 11 : 449-461.

VANDESCASTEELE, J. P., POURQUIE, J. (1984). Production de l'acétone-butanol-ethanol. Les deux procédés IFP. Biofutur 21 : 33-39.

VEZINA, C., KARTAR, S., SEHGAL, S. N. (1965). Sporulation of filamentous fungi in submerged culture. Mycologia 57 : 722-736.

VEZINA, C., SEGHAL, S. N., SINGH, K. (1968). Transformation of organic compunds by fungal spores. Adv. Appl. Microbiol. 10 : 221-268.

VEZINA, C., SING, K. (1975). Transformation of organic compounds by fungi spores. In "The filamentous fungi". I. Industrial mycology, (SMITH and BERRY, eds.), Edward Arnold, Londres.

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

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 cinquième année, Université de CLERMONT FERRAND II. 43 p.

VIRTANEN, A. I. (1937). The microbiology of ensilage production. In Comptes-rendus des journées d'études sur la conservation des fourrages. Association française de zootechnie, p. 119-132.

WARZYWODA, M., FERRE, V., POURQUIE, J. (1983). Development of a culture medium for large-scale production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei*. Biotechnol. Bioeng. 25 : 3005-3010.

WASE, D. A. J., VAID, A K (1983). Isolation and mutation of a highly cellulolytic strain of *Aspergillus fumigatus*. Process Biochem. : 35-37.

WEBER M., FOGLIETTI, M. J., PERCHERON, F. (1980) Fonctionnement d'une préparation cellulasique de *Trichoderma viride* par chromatographie d'affinité sur cellulose réticulée. J. Chrom. 188 : 377-382.

WOOD, T. M., (1975). Properties and mode of action of cellulases. Bioetechnol. Bioeng. 5 : 111-137.

WOOD, T. M., Mc CRAE (1975). The cellulase complex of *Trichoderma koningii*. In : "Symp. on enzymatic hydrolysis of cellulose", (BAILEY, M. ENARI, T. et LINKO, M, eds.), SISTRA Helsinki. 1975. pp 231-254.

WOODWARD, J., ARNOLD, S. L. (1981). The inhibition of β-glucosidase activity in *Trichoderma reesei* C 30 cellulase by derivaties and isomers of glucose. Biotechnol. Bioeng. 23 : 1553-1562.

EVALUATION ECONOMIQUE DU PROCEDE ORSTOM DE PRODUCTION DE CELLULASES EN ZYMOTIS.

PRECONDITIONNEMENT DE LA BAGASE

Paille	Mélangeur	6 F
Bagasse	15 min/50t/min	6 F
Son de blé		4 F
Sulfate d'Ammonimum		
KH_2PO_4		
Urée	Autoclavage 4h/110°C	6 F
Kg total PS		
Eau	Mélageur 10 min/50T/min	1 F
Kg M. humide	10 Kw electricité	20 F
		37 F

INOCULATION

	Melangeur + aspersion 15 min/50t/min	
14 litres susp. spores	½ sporulateur	20 F

Kg M. H à 72%

FERMENTATION EN ZYMOTIS 48 h

Chargement	120 F
Aération-Humidification	
Refroidissement - Rechauffement	
Mesure de CO_2	

PRESSAGE LYOPHILISATION

Pressage	230 bar/1h 20 Kg FI 28 litres FS	50 F
Lyophilisation	2,3 Kg poudre sèche	200 F

MATERIEL UTILISE

Autoclave	100.000 F
Broyeur	5.000 F
Mélangeur	15.000 F
2 Sporulateurs	25.000 F
1 Zymotis	90.000 F
1 Presse hydraulique	30.000 F
1 Atomisateur	50.000 F
1 Bâtiment	50.000 F
1 Vehicule	40.000 F
	405.000 F

Fonctionnement utilisés	357 F
Personnel	
1 technicien 10.000F/mois	1.250 F
Administration	1.250 F
Amortissement	1.000 F
Divers	143 F
TOTAL	4.000 F
Coût de Revient	4.000 F pour 1.600.000 UI

4.000 F 1.600.000 UI d'ACML
1 UI ACMC revient à 0,0025 F
1 UI APF revient à 0,025 F