

République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Biotechnologie microbienne



Réf :

Mémoire de fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
Master
Thème

**Optimisation de la production d'enzymes fongiques par
biodégradation de la biomasse lignocellulosique; application à
la saccharification du chêne de liège**

Présenté par :

HADDAD Katia et BELKHATMI Zahra

Soutenu le 26-06-2023

Devant le jury composé de :

Mme AZZOUZ Zahra	MAB	Promotrice
Mr KECHA Mouloud	Professeur	Président
Mme BOUCHERBA Nawel	Professeur	Examinatrice

Année universitaire : 2022/2023

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mon cher père

A ma chère mère

*Qui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler
pour que je puisse atteindre mes objectifs*

A ma chère grand-mère à qui je souhaite une bonne santé

A mes frères, SYFAX ET GAIA à qui je souhaite un avenir radieux

A ma famille, mes proches

A mes chères cousines plus particulièrement IMANE, LYDIA ET MAYA

A ma plus belle rencontre de l'année ZAZA

*A mes cher(e)s ami(e)s GHANOU, MOULOUD, RAFIK, NESRINE, SGHIRA, SONIA, et
SHAIMA qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite plus de succès*

A tous ceux qui me sont chers...

KATIA

Dedicaces

Je dédier ce travail :

Mes chers parents qui ont toujours été présents à mes côtés, me soutenant et faisant d'immenses sacrifices pour moi.

A mes grands-parents et toute ma famille merci pour votre soutien.

Je tiens à dédier une mention spéciale à ma cousine, mon amis d'enfance et meilleure amie,

***Zahra**, qui a toujours été là pour moi et qui a su me soutenir de manière*

Inconditionnelle. Que notre amitié continue de grandir et que nous partageons encore de nombreux moments précieux ensemble.

*A tous mes amis spécialement à **SISSA**, **SOPHY** et à mon binôme **KATIA**.*

*Et surtout à **Mouloud** et **Rafik** qui ont été d'une aide précieuse.*

A tout ce qui nous ont aidé à la réalisation de ce projet par un simple geste et conseil.

Zahra

Remerciements

Nous exprimons notre profonde gratitude au Dieu tout-puissant pour nous avoir donné le courage d'accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier Mme Azzouz Z pour son accompagnement précieux et son soutien indéfectible tout au long de la réalisation de ce travail. Sa bienveillance, ses conseils éclairés et ses qualités humaines exceptionnelles, et nous lui avons témoigné de notre profonde reconnaissance.

Nous remercions également Mr Kecha M, professeur à l'université de Béjaia qui nous a fait l'honneur de présider ce jury, ainsi que Mme. Boucherba N, professeur à l'université de Béjaia, pour le temps qu'elle a bien voulu consacrer à lire et à juger ce travail en tant qu'examinatrice.

On exprime toute notre sympathie à toutes les personnes du laboratoire de microbiologie Appliquée (LMA) pour leur amitié, leur aide et l'excellente ambiance de travail qu'ils ont fournie et un immense merci également aux ingénieurs de laboratoire.

Enfin, nous exprimons notre profonde reconnaissance à tous nos enseignants pour le savoir qui nous ont été transmis tout au long de notre parcours d'apprentissage au sein de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Nous tenons à remercier vivement tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation et la réussite de ce modeste travail.

Mes remerciements s'adressent en premier lieu au Professeur Kecha M. directeur du laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) pour nous avoir accueillis au sein de son laboratoire.

Nous remercions toutes personnes qui nous ont aidées à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

Liste des figures	Pages
Figure 1: les constituant principaux de la biomasse lignocellulosique	4
Figure 2: Représentation schématique de la structure chimique de la cellulose	5
Figure 3: Structure de la lignine	6
Figure 4: Représentation schématique de l'action des cellulases sur la cellulose	8
Figure 5: Détermination de taux d'humidité des substrats par dessiccateur infra-rouge	17
Figure 6: Processus de la fermentation solide ; Préparation de substrat (a), Humidification(b), Stérilisation (c), Inoculation (d), et Incubation (e).	18
Figure 7 : Principaux caractères culturaux des souche d' <i>Aspergillus niger</i> BG (a) et la souche <i>Trichoderma afroharzianum</i> (b) sur milieu PDA (a et c) après 7 jours d'incubation à 28°C	25
Figure 8 : Aspect des cultures d'A. Niger BG (a) T. Afroharzianum TH (b) après fermentation solide de la biomasse lignocellulosique	27
Figure 9 : Résultats de la production d'enzymes endo-exo-glucanase (a), endoxylanase (a) et B-gluco-Xylosidase et lignine peroxydase (b) par fermentation en milieu solide de chêneliège, de pin, de sapin et d'eucalyptus avec les souches TH et BG.	28
Figure 10 : Réponses réelles en fonction des réponses prédites pour les activités enzymatiques a :Endoglucanase, b:Exoglucanase, c : B-glucosidase, d : B-xylosidase, e : Endoxylanase	33
Figure 11 : Analyse des surfaces des réponses pour la production d'endoglucanase par fermentation du chêne de liège avec la souche <i>Aspergillus niger</i> strain BG. Interaction entre par temps d'incubation et la température d'incubation (a), temps d'incubation et l'effet de l'humidité (b), la température d'incubation et l'effet de l'humidité (c)	37
Figure 12: Analyse des surfaces des réponses pour la production d'exoglucanase par temps d'incubation et la température d'incubation (a), temps d'incubation et l'effet de l'humidité (b), la température d'incubation et l'effet de l'humidité (c)	38
Figure 13: Analyse des surfaces des réponses pour la production de b-glucosidase par temps d'incubation et la température d'incubation (a), temps d'incubation et l'effet de l'humidité (b), la température d'incubation et l'effet de l'humidité (c)	39
Figure 14 : Diagramme de surface des réponses endoxylanase et B-xylosidase pour les modèles de l'intersection entre : le temps d'incubation et la température d'incubation (a), temps d'incubation	40
Figure 15 : Rendement de saccharification du chêne de liège non traité et chêne de liège traité par l'ajout des extraits enzymatiques produite par fermentation solide de chêne de liège	43
Figure 1 : courbe d'étalonnage de glucose à 2g/L	annexe
Figure 2 : courbe d'étalonnage de xylose	annexe
Figure 3 : Diagramme de surface des réponses endoxylanase et B-xylosidase pour les modèles de l'intersection entre : l'humidité et la température (a) pour la réponse endoxylanase. Et l'interaction entre la température et le temps d'incubation (b), la température d'incubation et le taux d'humidité (c),pour la réponse B-xylosidase	annexe

Liste des tableaux	Pages
Tableau n°1: voie de dégradation de la biomasse lignocellulosique	7
Tableau n°2: variables indépendantes et leurs différents niveaux dans BBD.	22
Tableau n°3: BBD pour 15 séries d'expériences testées pour optimiser la production des cellulases et xylanases d' <i>A.niger</i> strain BG sur le chêne de liège	23
Tableau n°4: plan d'expérience RSM et réponse correspondantes par la matrice BBD des activités cellulases et xylanases de <i>A.niger</i> strain BG avec le chêne de liège.	30
Tableau n°5: coefficients de régression estimés pour le modèle polynomial quadratique et l'analyse de variance (ANOVA) pour les résultats expérimentaux de la production de endo-exo-glucanase , endoxylanase et B-xylosidase.	32
Tableau n°6: valeurs prédites et expérimentales de la production d'endo-exo-glucanase, Bglucosidase, endoxylanase et B-xylosidase dans les conditions optimale	42
Tableau n°1: milieux PDA (agar pomme de terre-dextrose) (saint-Germain, 2013)	annexe
Tableau n°2: milieux mendels et weber (mandels and weber, 1969)	Annexe
Tableau n°1: Tampon citrate de sodium (50mM, pH5) (Zhang et al., 2009)	Annexe
Tableau n°2: Réactif DNS (Ghose, 1987)	Annexe

Liste des abréviations

- **GHs** : Glycoside Hydrolases
- **LiP** : lignine peroxydase
- **MnP** : manganèse peroxydase
- **VP** : peroxydase polyvalente
- **LMA** : Laboratoire de Microbiologie Appliquée.
- **BG** : *Aspergillus niger* strain BG
- **TH** : *Trichoderma afroharzianum*
- **PDA** : Potato- Dextrose- Agar.
- **SSF** : solide state fermentation
- **RSM** : Réponse Surface Methodology
- **DOE** : Design of Experiments
- **BBD** : Box-Behnken design
- **pH** : Potentiel Hydrogène
- **ABTs** : 2,2'-Azinobis [3-éthyl-2,3-dihydrobenzothiazole-6-sulfonate] de diammonium
- **CMC** :carboxymethyl cellulose.
- **CMCases** : Carboxymethyl cellulose.
- **pPN-X** : p-nitrophényl-β-D-xylopyra-noside
- **pPN-G** : p-nitrophényl-β-D-glucopyranoside
- **p/v** :poids par volume
- **DNS** :3,5-acide dinitrosalicylique.
- **OFAT** : One Factor at A Tme
- **PDA** : Potato- Dextrose- Agar.
- **nm** : nanomètre.
- **p value** :probability value
- **3D** : : tridimensionnelle.
- **rpm** : révolutions per minute

Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des abréviations

SOMMAIRE

Introduction générale 1

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La biomasse lignocellulosique	3
1. Composition de la biomasse lignocellulosique	3
1.1. La cellulose	4
1.2. Hémicellulose	5
1.3. Lignine	5
2. Dégradations de biomasse lignocellulosique	7
3. Hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique	8
3.1. Les cellulases	8
3.2. L'hémi-cellulases	9
3.3. Les ligninases	9
4. Les souches productrices de complexes lignocellulolytiques	10
4.1. Le genre <i>Trichoderma</i>	11
4.2. Le genre <i>Aspergillus</i>	11
II. La valorisation de la biomasse lignocellulosique	11
1. Les Voies de Valorisation de la biomasse lignocellulosique	11
2. Biodégradation de la biomasse lignocellulosique par fermentation solide	13
3. Optimisation de la production d'enzymes par plan d'expérience RSM	14
4. Saccharification et la bioconversion de la biomasse	15

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Production des enzymes lignocellulolytiques par fermentation solide de la biomasse lignocellulosique	16
1. Le matériel biologique : Les souches fongiques	16
1.1. Remise en culture	16
1.2. Préparation de la solution sporale	16
2. Préparation des substrats pour fermentation	17
3. Production d'enzymes par Fermentation solide	17
3.1. Le milieu Mandels	17
3.2. Mise en œuvre de la fermentation solide	18
4. Dosage de l'activité enzymatique	19
4.1. Dosage de l'activité ligninasiq ue	19
4.2. Dosage des activités cellulases et xylanases	19
4.3. Activité β -glucosidase et β -xylosidase	20
II. Optimisation de la production d'enzymes lignocellulolytique par fermentation de chêne de liège en utilisant le Plan Box Behnken	21
I. Saccharification de la biomasse lignocellulosique	23
1. Délignification de la biomasse lignocellulytique	23
2. Hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulolytique	24

3. Dosage des sucres réducteurs	24
---------------------------------------	----

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Production d'enzymes lignocellulolytiques par fermentation solide	26
1. Caractérisation biochimique et moléculaire des souches <i>Trichoderma afroharzianum</i> isolat AZ 12 et <i>Aspergillus niger</i> BG.....	26
2. Production de cellulases et de Xylanases par fermentation solide de la biomasse lignocellulolytiques	26
II. Optimisation de la production des cellulases et xylanases d' <i>Aspergillus niger</i> BG par fermentation solide à base de chêne-liège	29
1. Analyses de variances pour la production d'enzymes lignocellulosique	31
1.1. Signification du modèle	31
1.2. Coefficient de détermination R^2	34
1.3. Significativité des effets des facteurs	34
2. Validation du modèle	41
III. Saccharification de la biomasse lignocellulosique	43
1. Prétraitement de la biomasse	43
2. Saccharification de chêne de liège	43
Conclusion générale et perspectives.....	45
Références bibliographiques	
Annexes	

INTRODUCTION

La biomasse lignocellulosique est reconnue depuis longtemps comme une matière première prometteuse pour la production de biocarburants et d'autres biomatériaux, y compris les enzymes lignocellulolytiques (Asgher, et al., 2016).

Elle constitue une alternative prometteuse aux énergies fossiles, offrant une solution durable face à la demande croissante en énergie, en raison de sa disponibilité, de son faible coût et de sa capacité à être renouvelée. En effet La biomasse lignocellulosique représente une des ressources d'énergies renouvelables les plus abondantes sur terre, et certainement une des moins coûteuses (Ogier et al., 1999).

Elle regroupe divers matériaux végétaux tels que les résidus agricoles, les déchets forestiers et industriels, ainsi que les cultures énergétiques spécifiées, ce qui en fait une ressource abondante. En effet, le bois de chêne est l'une des espèces les plus répandues, avec 26% de (INFC, 2005).

L'exploitation forestière produit d'importants volumes de résidus ligneux qui résultent d'une élimination obtenue et polluante qui est susceptible d'entraîner des impacts environnementaux négatifs.

Elle constitue une alternative prometteuse aux énergies fossiles, offrant une solution durable face à la demande croissante en énergie, en raison de sa disponibilité abondante, de son faible coût et de sa capacité à être renouvelée.

Cependant, la conversion efficace de la biomasse lignocellulosique en composés valorisable reste un défi majeur en raison de sa complexité structurale. Elle est composée essentiellement de trois polymères (la cellulose, l'hémicellulose et la lignine), dont les teneurs sont variables d'une espèce végétale à l'autre et qui forment une matrice résistante à la dégradation (Ogier et al., 1999).

Vu que la lignine est difficilement biodégradable, cela nécessite de prétraiter de la biomasse lignocellulosique. La saccharification de la biomasse lignocellulosique constitue une étape clé dans le processus de conversion, permettant la libération des sucres simples nécessaires à la production des bioproduits.

Les champignons du genre *Aspergillus* ont émergé comme des producteurs potentiels d'enzymes lignocellulosique grâce à leur capacité unique à sécréter une grande variété d'enzymes lorsqu'ils sont cultivés sur des substrats solides. En effet Les champignons et les

levures ont été considérés comme des micro-organismes appropriés pour la fermentation sur milieu solide selon les critères théoriques (**KAYSER, 1921**)

La fermentation sur milieu solide offre plusieurs avantages, notamment une meilleure stabilité des enzymes, une plus grande production et une facilité de récupération des enzymes, qui jouent un rôle clé dans la dégradation des structures complexes de la biomasse lignocellulosique. En général, les coproduits agro-industriels sont considérés comme les substrats les plus intéressants pour les processus de FSS) (**Asgher, et al., 2016**).

Ce travail s'inscrit dans la mouvance actuelle d'exploitation des déchets lignocellulosiques pour produire des enzymes cellulolytiques et xylanolytiques avec un prix de revient compétitif dans la production des biocarburants de 2^{ème} génération.

Le premier chapitre de ce document rapporte une synthèse bibliographique sur la biomasse lignocellulosique, les enzymes lignocellulolytiques, l'importance des cellulases et xylanases dans l'industrie des fermentations ainsi que quelques généralités sur les moisissures sources d'enzymes xylanolytiques et cellulolytiques.

Le deuxième chapitre, présente la partie expérimentale de ce travail, décrivant le matériel et les techniques utilisées pour réaliser l'optimisation par la méthode de surface de réponse (RSM) de la production d'enzymes lignocellulolytiques par la souche *Aspergillus niger*, par le biais de la biodégradation de chêne de liège sous fermentation solide,

Le troisième chapitre présente et discute les résultats obtenus dans la phase d'optimisation ou dans la phase de saccharification du chêne-liège.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique représente la matière organique renouvelable la plus abondante sur terre (**Chen et al., 2015**). Elle est issue de différentes sources végétales telles que les résidus agricoles, les déchets forestiers, les résidus de transformation du bois, les graminées, les herbacées, et autres.

Elle se compose de cellulose (homopolymère d'unités D-glucosyles liées en β -1,4), d'hémicelluloses (polymère complexe ramifié composé de différents types de sucres tels que du D-glucose, du D-xylose, du D-mannose, du D-galactose, du L-rhamnose ou du L-arabinose) et de lignine (biopolymère de monolignols constituant un réseau tridimensionnel hydrophobe complexe) qui sont les constituants majeurs des parois des cellules végétales.

Cette biomasse, dont la diversité de structures permet de nombreuses applications en chimie verte peut être utilisée de deux manières différentes (**Isikgor & Remzi Becer, 2015**):

- Elle offre une alternative prometteuse pour la production de biocarburants.
- Elle peut également être utilisée pour la production de produits chimiques (biosourcés), tels que les acides organiques, les polymères et les solvants, qui sont utilisés dans de nombreuses industries (**Eloutassi et al., 2014**).

1. Composition de la biomasse lignocellulosique

Cette biomasse composée de trois éléments principaux : la cellulose, qui est un polysaccharide linéaire de glucose, les hémicelluloses, qui sont des polysaccharides ramifiés composés de sucres à 5 et 6 atomes de carbone, et la lignine, qui est un polymère aromatique complexe. En général, la biomasse lignocellulosique telle que le bois et la paille contient en moyenne 45% de cellulose, 25% d'hémicelluloses et 25% de lignine, (Figure 1). (**Wertz et al., 2015**).

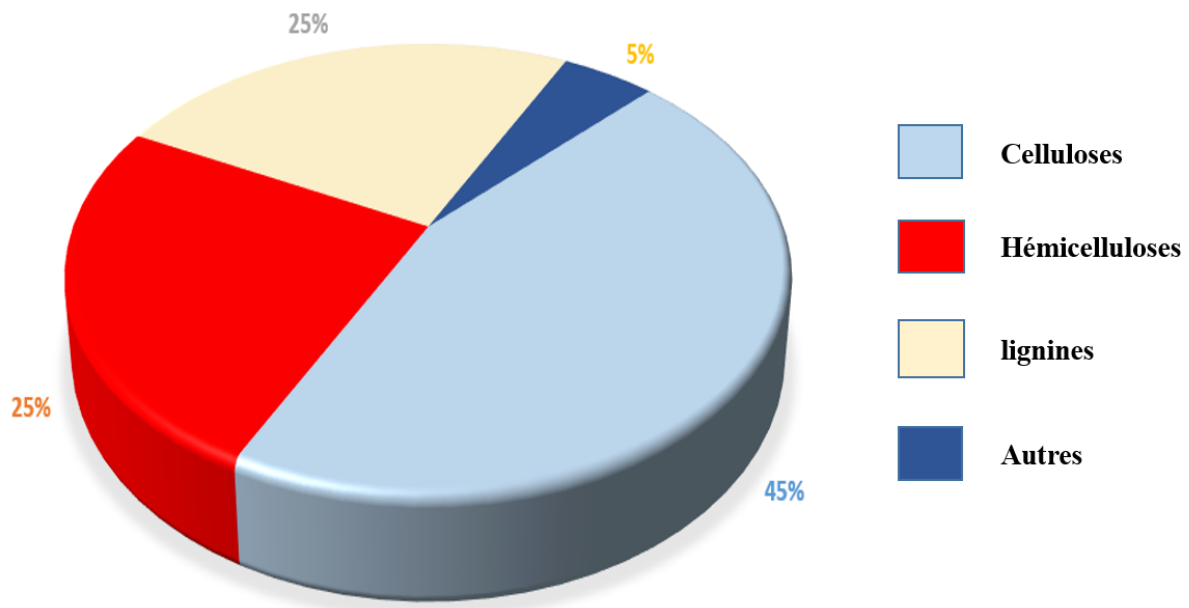


Figure 1: Les constituants principaux de la biomasse lignocellulosique (Binod et al., 2011)

1.1. La cellulose

La cellulose est un homopolymère linéaire de glucose lié en β -1,4 (Figure 2) dont le motif répété, aussi appelé anhydrocellobiose peut s'écrire (Glc-1,4-Glc). Ce polymère peut notamment être caractérisé par son degré de polymérisation, ce qui correspond au nombre moyen d'unités monomériques enchainées pour former une chaîne polymérique. Il peut être considéré équivalent à la longueur moyenne des chaînes du polymère, qui est compris entre 100 et 25000 selon les auteurs (Malherbe & Cloete, 2002; Percival Zhang et al., 2006).

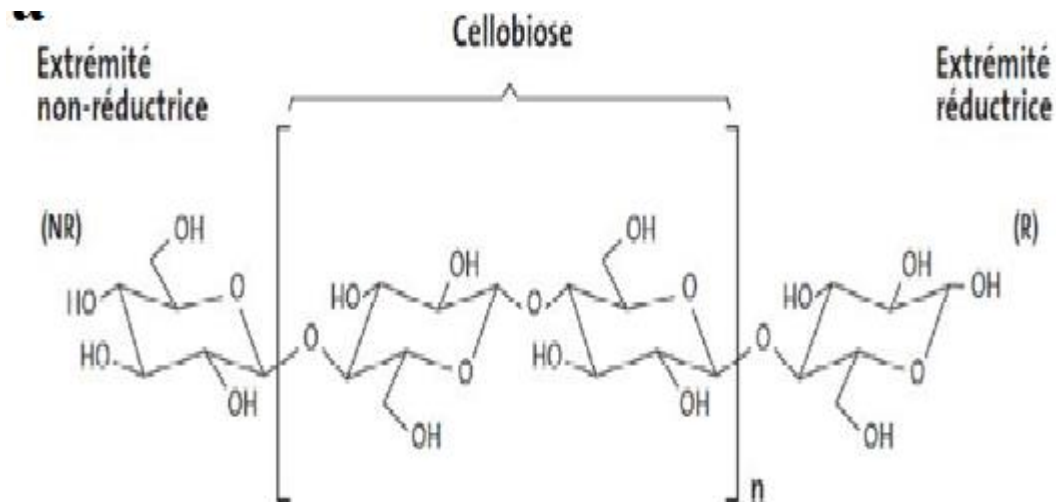


Figure n°2 : Représentation schématique de la structure chimique de la cellulose (BERLIOZ, 2007)

1.2. Hémicellulose

La présence d'hémicellulose dans la biomasse végétale est un élément aussi important que celle de la cellulose et de la lignine. Constituée d'une variété de polysaccharides complexes, tels que le xylane, le mannane, le glucane et l'arabinoxylane, l'hémicellulose joue un rôle crucial dans la structure, la croissance et le développement des cellules végétales. En interagissant avec la cellulose et la lignine, l'hémicellulose favorise le renforcement des parois cellulaires des plantes, leur donnant ainsi une certaine résistance mécanique.

Les hémicelluloses sont des hétéropolymères d'hexoses, de pentoses et d'acide glucuronique. Différents sucres peuvent être présents dans ces polymères, tels que le xylose, le glucose, le mannose, le galactose et l'arabinose. La composition en différents sucres diffère d'une lignocellulose à l'autre, mais de manière générale le xylane est le constituant majoritaire de l'hémicellulose (Zahra, 2016). Le xylane, polymère de xylose lié en β -1,4 est alors le motif répété du polymère avec un degré de polymérisation allant de 100 à 200 (Malherbe & Cloete, 2002).

1.3. Lignine

Les lignines sont des polymères hautement condensés, formés par la déshydrogénation et la polymérisation de trois alcools à noyaux phénylpropane C6-C3 : les alcools trans- p-coumarylique, transconiférylique et transsinapylique (Figure 3). Elles s'incrument dans tout l'espace disponible dans les parois en association étroite avec les différents polysaccharides et confère aux parois végétales des propriétés d'imperméabilité et de résistance aux attaques

microbiennes. La lignine constitue le principal obstacle à la disponibilité des glucides pour les microorganismes (Wertz et al., 2015)

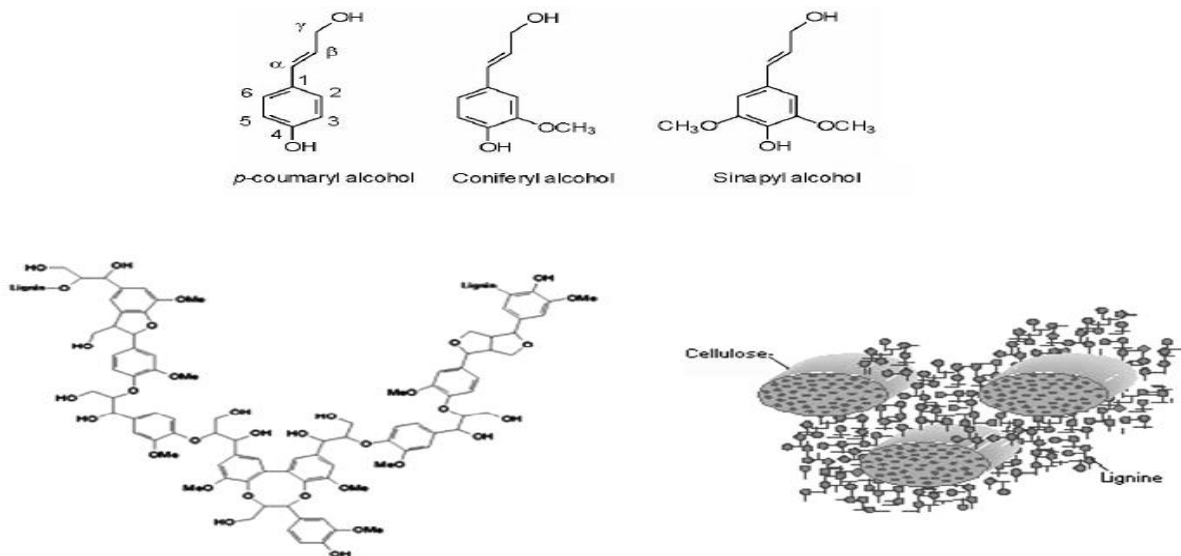


Figure 3 : Structure de la lignine (Mussatto Solange.I et al., 2012)

2. Dégradations de biomasse lignocellulosique

La dégradation des végétaux est depuis longtemps un des grands challenges pour les êtres vivants, mais également pour la recherche et l'industrie. Les végétaux ne sont pas faciles à dégrader, car ils sont pauvres en azote et constitués de molécules complexes. Mis à part les quelques sels minéraux, sucres et protéines contenus dans les cellules végétales, les végétaux sont constitués à 90% de lignocellulose. Ce composé est le constituant principal de la paroi végétale des plantes terrestres, de ce fait il constitue une ressource abondante et renouvelable pour un grand nombre d'organismes (Cragg et al., 2015). La lignocellulose est aussi d'un fort intérêt pour la recherche sur les biocarburants et autres « bioproduits », car elle représente une ressource importante de matière première pour la production de produits biochimiques (Himmel, 2009).

La dégradation du complexe lignocellulosique s'effectue selon plusieurs voies (Tableau 1).

Tableau n°1 : Voie de dégradation de la biomasse lignocellulosique

Voie de dégradation	principe de processus	Application de la dégradation de biomasse
Biologique (KHELFA, 2009)	La dégradation biologique de la biomasse lignocellulosique permet aux micro-organismes tels que des bactéries, des champignons ou des enzymes de transformer des matières premières biologiques en produits biocarburants, des produits chimiques, des aliments fermentés, etc. (KHELFA, 2009)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ La fermentation alcoolique qui conduit à la formation d'éthanol. ✓ L'hydrolyse enzymatique. ✓ La production de biodiesels par la transesterification.
Thermochimique	La conversion thermochimique utilise la chaleur pour décomposer la matière organique en produits chimiques utiles et comprennent plusieurs méthodes comme la pyrolyse, la gazéification, la combustion etc... (KHELFA, 2009)	<p>La production de gaz permanent comme le CH₄ par la pyrolyse.</p> <p>Transformation de matière organique en gaz de synthèse par le processus de gazéification.</p>
Hydrolytique	Le processus implique principalement la conversion de la structure lignocellulosique en sucres fermentescibles par hydrolyse, suivi de la fermentation de ces sucres et finalement de la distillation du bouillon fermenté (Chapitre 10 - Hydrolyse de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol (Binod et al., 2011)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ La production de bioéthanol après avoir dégradé la biomasse lignocellulosique en sucre simple. ✓ L'obtention de sucres à partir de cette matière première hétérogène nécessite une perturbation physique ou chimique. L'hydrolyse chimique est généralement réalisée à l'aide d'acides. Les acides minéraux concentrés tels que H₂SO₄ et HCl sont couramment utilisés pour ce processus.

3. Hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique

La dégradation enzymatique de la biomasse lignocellulosique est un processus complexe, qui implique l'action de plusieurs types d'enzymes agissant en synergie pour décomposer les différents composants de la matière végétale.

En effet, l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique commence par l'action d'exoenzymes, qui attaquent la paroi végétale aléatoirement ou à des positions spécifiques, provoquant une diminution du degré de polymérisation du substrat. Cela conduit à la formation de courtes chaînes d'oligosaccharides solubles dans l'eau. Les endo-enzymes interviennent ensuite en clivant les liaisons terminales de ces chaînes d'oligosaccharides, libérant des unités monosaccharidiques, telles que le glucose, le xylose, l'arabinose, le galactose et le mannose, des extrémités réductrices et non réductrices.

Parmi les enzymes impliqués dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique :

3.1. Les cellulases

La dégradation de la cellulose nécessite l'intervention de trois types de cellulases :

- Les endocellulases (BC 3.2.1.74) qui clivent de façon aléatoire les chaînes intérieures de glucose
- Les exocellulases, aussi appelées cellobiohydrolases (BC 3.2.1.176, BC 3.2.1.91, BC 3.2.1.74), qui libèrent la cellobiose (*i.e.* polymère constitué de deux unités de glucoses) à partir des chaînes terminales
- Les β -glucosidases (BC 3.2.1.21) qui libèrent les monomères de glucose à partir de la cellobiose.

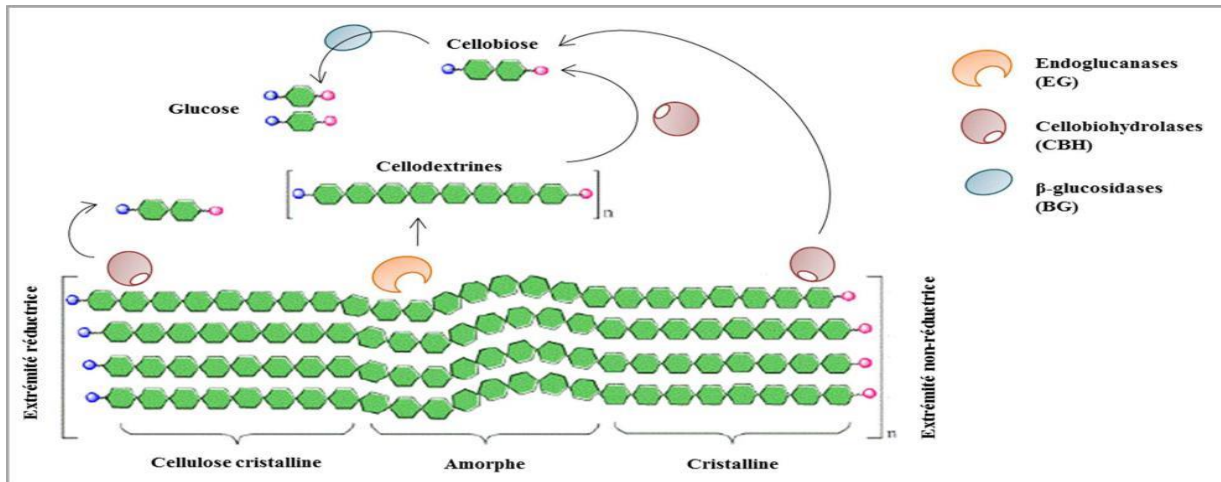


Figure n°4 : Représentation schématique de l'action des cellulases sur la cellulose (Chastel, 2020).

3.2. L'hémi-cellulases

La dégradation de l'hémicellulose est un processus complexe qui implique plusieurs enzymes différentes.

La dégradation de l'hémicellulose implique une grande diversité de CAZymes car sa composition varie d'une plante à une autre, et même d'un tissu à un autre au sein d'une plante, les hémicellulases peuvent être classées en trois catégories ;

- Les endo-hémicellulases qui clivent les différents polymères aléatoirement au niveau de leurs chaînes de monomères.
- Les exo-hémicellulases qui libèrent les monomères de sucre à partir des courtes chaînes.
- Les enzymes de débranchement, ou enzymes accessoires, qui clivent les chaînes latérales des polymères ou des oligosaccharides associés.

De plus, les hémicellulases se différencient entre elles par le substrat visé par l'enzyme. Par exemple les endoxylanases (EC 3.2.1.8) et les xylosidases (EC 3.2.1.37) dégradent le xylane, alors que les endomannanases (EC 3.2.1.78) et les mannosidases (EC 3.2.1.25) dégradent le mannane, de même les xyloglucanases (EC 3.2.1.151) dégradent préférentiellement le xyloglucane. L'ensemble de ces hémicellulases se classe parmi les GHs au sein des CAZymes (Souza, 2013).

3.3. Les ligninases

La lignine est un hétéropolymère constitué d'unités de phénylpropane reliées entre elles par des liaisons carbone-carbone (C-C) et aryle-éther (C-O-C). Sa dégradation

constitue une première étape importante dans la dégradation de la lignocellulose, car ce composé protège la plante contre les attaques enzymatiques (Argyropoulos & Menachem, 1998). La dégradation de la lignine implique de multiples réactions oxydatives et d'hydrolyse afin de dépolymériser les parties phénoliques et non phénoliques. La plupart des enzymes connues aujourd'hui pour dégrader la lignine sont issues des champignons lignivores et de plusieurs bactéries (Bugg et al., 2011; de Gonzalo et al., 2016; López-Mondéjar et al., 2019; Pollegioni et al., 2015).

Les champignons dégradent la lignine en sécrétant des enzymes appelées collectivement « ligninases ». Les ligninases peuvent être classées en phénol oxydases (laccase) ou en hème peroxydases : lignine peroxydase (LiP), manganèse peroxydase (MnP) et peroxydase polyvalente (VP).

- **Les laccases** : Elles catalysent l'oxydation des polyphénols et des phénols, elles sont capables de décomposer la lignine en utilisant un mécanisme d'oxydation par transfert d'électrons.
- **Les peroxydases** : Ces enzymes sont de type oxydase, elles catalysent des réactions d'oxydoréduction en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) comme co-substrat. Deux d'entre elles ont été extraites des champignons et ont été identifiées comme responsables de la délignification dans ces organismes. Il s'agit de la lignine peroxydase et du manganèse peroxydase (elle utilise H₂O₂ pour oxyder Mn²⁺).

4. Les souches productrices de complexes lignocellulolytiques

La capacité de dégradation des parois cellulaires végétales (lignocellulose) ou capacité lignocellulolytique est très répandue chez les micro-organismes. Les champignons filamenteux jouent un rôle important dans la production industrielle de protéines et d'enzymes. Elles sont utilisées pour produire un grand nombre d'enzymes tel que cellulases, xylanases, chitinases, amylases, protéases, et autres (Braaksma et al., 2010). Certaines de ces Souches industrielles produisent plus de 100 g/l de cellulases et hémicellulases (Gao et al., 2013).

Les Principaux genres des moisissures productrices de lignocellulases appartiennent au groupe des Ascomycètes et Basidiomycètes. Les champignons cellulolytiques sont regroupés en espèces de pourriture blanche, de pourriture brune et de pourriture molle, Les champignons de la pourriture blanche, environ 2000 espèces, principalement des Basidiomycètes peuvent métaboliser la lignine ; ceux de la pourriture brune, environ 200

espèces de Basidiomycète également dégradent les composants de la cellulose et hémicelluloses et exercent peu d'effets sur la lignine. Les espèces de la pourriture molle (Ascomycètes) possèdent des capacités intermédiaires, elles sont capables de dégrader la cellulose et l'hémicellulose rapidement, mais la lignine plus lentement (**Moore et al., 2011**).

Les moisissures des genres *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* et *Phanerochaete* ont été rapportés comme étant les meilleurs producteurs de cellulases et les enzymes brutes produites par ces micro-organismes sont commercialisées (**Dashtban et al., 2009**).

4.1. Le genre *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* appartient au grand groupe des champignons imparfaits. Les espèces de ce genre produisent des quantités importantes d'exo-enzymes capables d'hydrolyser complètement la cellulose en glucose (**Makut & Godiya, 2010**). Les cellulases de *T. reesei* présentent l'avantage de posséder les trois classes d'enzymes, Les cellulases de *T. reesei* sont commercialisées par la firme NOVO ENZYME (**Ogier et al., 1999**).

4.2. Le genre *Aspergillus*

Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont capables de produire des cellulases Cependant, ces cellulases sont généralement riches en endoglucanases et β -glucosidases mais pauvres en exoglucanases, par conséquent une action limitée sur la cellulose microcristalline.

II. La valorisation de la biomasse lignocellulosique

La production annuelle de biomasse lignocellulosique dans le monde est estimée à plus de 200 milliards de tonnes (**Polizeli et al., 2023**) en Algérie spécifiquement, la biomasse lignocellulosique est en voie de développement avec un potentiel important compte tenu de la superficie forestière et agricole du pays, cette dernière offrant une opportunité de valorisation en vue de la production d'énergie et de produits de haute valeur ajoutée.

La biomasse lignocellulosique est constituée de résidus forestiers, agricoles, agro-industriels et alimentaires, qui représentent des sources d'énergie abondantes, renouvelables et peu coûteuses. Cependant, ces déchets lignocellulosiques s'accumulent en grandes quantités et posent des problèmes environnementaux. Cette matière se compose principalement de sucres polymères tels que la cellulose et l'hémicellulose, ainsi que de lignine. Ces composants chimiques peuvent être recyclés et valorisés dans de nombreux produits de grande valeur, tels

que l'éthanol, les additifs alimentaires, les acides organiques, les enzymes, etc (**Maitan-Alfnas et al., 2015**).

1. Les Voies de Valorisation de la biomasse lignocellulosique

La valorisation de cette biomasse peut s'effectuer par diverses voies :

- Soit comme une ressource naturelle de structures polymériques organisées et directement exploitables pour leurs propriétés fonctionnelles avérées, comme biomatériaux ou pour l'habillement par exemple. C'est le cas du bois, du chanvre ou encore du coton qui sont composés quasi-exclusivement de cellulose. La cellulose, de par sa structure simple et son abondance naturelle, est également largement exploitée dans divers domaines comme le papier ou les biomatériaux (**Dhepe & Fukuoka, 2008**). Plus récemment, de nouvelles applications à base de cellulose sous sa forme cristalline ont vu le jour (**Sanga Pachuau, 2015**). Mahmoud et al, ont par exemple couplé des nano-cristaux de cellulose à des nanoparticules d'or pour créer des supports d'immobilisation de protéines (**Mahmoud et al., 2009**).
- Soit comme un réservoir de polymères, d'oligomères et de molécules, qui peuvent servir de précurseur dans diverses applications de la chimie ou comme molécules fermentescibles pour la production de bioéthanol (**Alvira et al., 2010**). La décomposition de cette biomasse lignocellulosique en monomères fermentescibles ouvre la voie aux conversions biotechnologiques et la diversité des molécules présentes dans ce type de biomasse élargit considérablement le spectre des molécules biosourcées disponibles (**Dumon et al., 2012**). Parmi la variété des produits qu'il est possible d'obtenir à partir du D-glucose extrait de la cellulose, l'acide lactique, l'éthanol, l'acide acétique et l'acide lévulinique, obtenus par voies microbienne ou chimique sont des composés particulièrement intéressants pour de nombreuses industries (**Kamm & Kamm, 2004**). L'exploitation, longtemps plus marginale, des pentoses, présents uniquement dans les hémicelluloses, est en voie de développement. Ce retard est dû à une complexité et une diversité plus grande des structures polysaccharidiques présentes dans l'hémicellulose.
- Par voie de conséquence, cette complexité nécessite un arsenal enzymatique large, et de nombreuses études se consacrent à la découverte de ces biocatalyseurs ou à leur optimisation (**Dumon et al., 2012**).

- La valorisation récente des pentoses est aussi passée par la mise au point de procédés de synthèse enzymatique de xylo-oligosaccharides qui possèdent un intérêt nutritionnel, entre autres comme prébiotiques (**Grootaert et al., 2007**). Un autre composant de l'hémicellulose, l'acide férulique possède des propriétés antioxydantes (**Graf, 1992**), intéressantes pour l'industrie cosmétique, alimentaire et pharmaceutique (**Horbury et al., 2016**) et qui peut également être utilisé comme précurseur dans la synthèse de vanilline (**Gallage et al., 2014**).

2. Biodégradation de la biomasse lignocellulosique par fermentation solide

Les enzymes interviennent dans la bioconversion de la biomasse sont une série d'hydrolases induites par la biomasse et les cellulases, les ligninases, les xylanases, les pectinases, etc. sont les enzymes les plus courantes et pouvant utiliser la biomasse comme substrat pour leur production. Les champignons filamenteux, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* et autres sont impliqués dans la majorité des processus de production d'enzymes. En particulier, les espèces *Trichoderma* et *Aspergillus* sont connues pour leur capacité à sécréter des niveaux élevés d'enzymes (**Chen, 2013**).

Cependant, la bioconversion de la biomasse fait référence au processus de fermentation solide (SSF) pour qu'il n'y a pas besoin d'un apport d'oxygène, et il y a moins d'émission de dioxyde de carbone et une plus faible consommation d'eau et d'énergie dans la biodégradation à l'état solide.

La fermentation en milieu solide peut être utilisée pour obtenir des composés à valeur ajoutée tels que des enzymes, des champignons, des biopesticides, des biocarburants, des acides aminés, des biosurfactants, des acides organiques, des arômes, des colorants, des composés aromatiques, des métabolites secondaires biologiquement actifs et d'autres substances d'intérêt pour l'industrie alimentaire (**Silvério, 2013**).

La fermentation en milieu ou en phase solide (SSF) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux et des champignons supérieurs, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique (**Ho, 2005**). D'un point de vue fondamental, la fermentation en milieu solide est définie comme une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou presque d'eau libre et diffère de la fermentation en milieu liquide, où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand

volume d'eau, et de la fermentation en milieu submergé où le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide (**Pandey 2003; Duchiron et al., 2019**). La principale différence entre ces procédés réside dans la variation des proportions et de l'équilibre entre les phases solide, liquide et gazeuse.

Le développement des champignons filamenteux en SSF se fait par extension et ramification des filaments formant le mycélium. Après l'inoculation d'un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. A partir de ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules (de la matrice solide) ou dans les espaces interparticulaires à la recherche de composés nutritifs, notamment dans les pores remplis de liquide. A des taux normaux d'humidité, les espaces entre les filaments aériens sont remplis de gaz (aérobie), tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d'eau (anaérobie). Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Pour finir, les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (**Ho, 2005; Rahardjo et al., 2006**)

3. Optimisation de la production d'enzymes par plan d'expérience RSM

L'optimisation est un terme fréquemment employé pour décrire la recherche des conditions optimales d'une procédure, afin de produire la réponse la plus précise et la plus fiable possible. Cela implique de trouver les paramètres clés qui affectent les résultats de la procédure et de les ajuster de manière à obtenir les meilleurs résultats.

Un plan d'expériences, également appelé Design of Experiments (DOE), consiste en une série d'essais méthodiquement organisés pour déterminer l'influence de différents paramètres sur les performances d'un système étudié. Cette méthode statistique s'applique à de nombreuses disciplines et industries. Les plans d'expériences sont souvent utilisés en conjonction avec l'optimisation par RSM (surface de réponse) pour améliorer les performances d'un système étudié, en minimisant le nombre d'expériences nécessaires pour obtenir des résultats précis et significatifs.

La méthodologie de surface de réponse (RSM) consiste en une technique mathématique et statistique qui est basée sur l'ajustement de modèles empiriques aux données expérimentales obtenues dans le cadre d'un plan d'expérience (Bezerra et al., 2008a).

Afin d'optimiser un système étudié, des fonctions polynomiales linéaires ou carrées sont utilisées pour décrire ce système et ainsi permettre l'exploration des conditions expérimentales (modélisation et ajustement) jusqu'à ce que l'objectif soit atteint.

Après identification des facteurs significatifs, des plans d'expérience plus perfectionnés sont couramment utilisés pour déterminer les conditions d'exploitation optimales. Parmi ces plans, on peut citer les plans à trois niveaux tels que le plan de Box-Behnken (BBD) (Bezerra et al., 2008a).

La matrice de Box-Behnken est une méthode de conception expérimentale qui utilise des facteurs codés à trois niveaux (-1, 0 et +1) pour estimer les interactions des modèles de second ordre. Cette méthode consiste à réaliser des expériences avec un nombre minimum d'essais, tout en obtenant le maximum d'informations utiles à partir des résultats (Bezerra et al., 2008a).

4. Saccharification et la bioconversion de la biomasse

La lignocellulose peut être convertie en produits énergétiques, tels que l'éthanol, le méthane et l'hydrogène, par la fermentation de micro-organismes. Un bon processus de fermentation nécessite non seulement un microorganisme efficace mais aussi des conditions et un équipement optimal pour exercer un potentiel de production suffisant. Les procédés de fermentation de l'éthanol carburant utilisant la lignocellulose comme matière première sont très différents de ceux de l'amidon et du sucre. Par exemple, l'hydrolysate de biomasse contient souvent des composants nuisibles aux micro-organismes de fermentation. De plus, l'hydrolysate contient davantage de xylose (Chen et al. 2009). La lignocellulose doit être hydrolysée et fermentée après prétraitement pour obtenir de l'éthanol et d'autres produits biosourcés. Le premier processus est l'hydrolyse, puis la fermentation est utilisée, ce qui est appelé saccharification et fermentation séparées.

Lors de la saccharification industrielle, les sucres fermentescibles sont libérés de la biomasse lignocellulosique au cours d'un processus en deux étapes. La première étape consiste à utiliser des prétraitements physiques et/ou chimiques pour rendre les polysaccharides plus accessibles à l'hydrolyse enzymatique. La deuxième étape consiste à

traiter la cellulose exposée avec des cocktails d'enzymes cellulolytiques commerciaux, généralement produits à partir de champignons filamenteux tels que *Trichoderma reesei*, qui dégradent ensuite la cellulose et les hémicelluloses en sucres simples (Navarro et al., 2010).

L'une des grandes complexités de cette dégradation enzymatique est l'aspect synergique de la catalyse progressive de la cellulose. Ce modèle synergique est basé sur le cas le plus étudié des cellulases de *T. reesei*. Les endoglucanases découpent tout d'abord aléatoirement la cellulose dans les régions amorphes accessibles. Les exocellulases récupèrent les extrémités libres des polymères de cellulose afin de progressivement les hydrolyser sous forme de cellodextrines hydrosolubles. Enfin, les β -glucosidases achèvent la saccharification en catalysant la production de glucose à partir du cellobiose en solution (Zhang et al., 2009). L'autre intérêt de cette synergie est aussi de progressivement dégrader les produits de catalyses antérieures afin de limiter l'effet d'inhibition lié à leur accumulation, en particulier sur les endo et exoglucanases.

MATERIEL ET METHODES

1. Production des enzymes lignocellulolytiques par fermentation solide de la biomasse lignocellulosique

Les souches d'*Aspergillus niger* BG et *Trichoderma afroharzianum* (TH) ont été utilisées pour produire des complexes enzymatiques de type lignocellulosique, ces deux souches fongiques ont été obtenues auprès du laboratoire de microbiologie appliquée "LMA" (Université de Bejaia). Ces souches sont isolées d'une parcelle forestière parsemée d'oliviers dans la région d'IGHRAM à Akbou, Bejaia, située au Nord-Est de l'Algérie (Azzouz et al., 2020a, 2020b).

Afin de sélectionner le substrat de fermentation et la souche de moisissure les plus performants pour la production de cellulase et d'hémicellulase, des fermentations en milieu solide ont été réalisées à 28°C pendant 7 jours avec des substrats lignocellulosiques tels que le chêne-liège, pin, sapin et l'eucalyptus. Le substrat et la souche qui se sont avérés les plus performants ont ensuite été intégrés dans le processus d'optimisation de la production de ce type d'enzymes.

1. Le matériel biologique : Les souches fongiques

1.1. Remise en culture

La remise en culture des souches d'*Aspergillus niger* BG et *Trichoderma afroharzianum* (TH) a été systématiquement effectuée à partir des cryotubes servant à l'inoculation d'une série de boîte de Pétri contenant le milieu gélosé PDA, c'est un milieu de culture qui contient divers nutriments essentiels qui favorisent la croissance des champignons. Ce milieu comprend principalement de la pomme de terre et du dextrose (Westphal et al., 2021), les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 7 jours.

1.2. Préparation de la solution sporale

Après une semaine de culture à 28°C, des suspensions de conidies sont prélevées en aspergeant les milieux avec une solution d'eau distillé tween à 0,1%, puis en grattant la surface avec une pipette, la solution sporale récupérée à l'aide d'une pipette électrique (Pipet Controller, Accumax) est versée dans des flacons stériles, puis bien agiter et conservée afin de pouvoir être utilisée comme inoculum. Ces suspensions ont ensuite servi à ensemercer les cultures principales en milieu solide. le comptage des spores a été effectué dans une chambre de comptage Malassez (Marienfeld, Allemagne) (Handa et al., 2014; Ang et al., 2015).

2. Préparation des substrats pour fermentation

Les substrats de chêne-liège, pin, sapin et l'eucalyptus utilisés dans cette étude sont récoltés au niveau des Forêts dans la région de SIDI-AICH (Bejaia).

Tous les substrats sont lavés à l'eau distillée, séchés dans l'étuve (Muve incubator EN055, Turquie) à 70°C pendant 24 heures (h) puis broyés en petites particules à l'aide d'un mixeur (BOMANN, Allemagne) (Narra et al., 2014; TAO et al., 2010; Menezes et al., 2017).

La veille du lancement de la fermentation, le taux d'humidité des substrats sont déterminées à l'aide d'un dessiccateur (MOISTURE BALANCE MOC -120H, Allemagne).



Figure 5: Détermination de taux d'humidité des substrats par dessiccateur infra-rouge.

3. Production d'enzymes par Fermentation solide « SSF »

3.1. Le milieu Mandels

Ce milieu a servi de complément aux cultures en milieu solide. Il est composé de 0,30 g d'urée, de 2,0 g de K₂HPO₄, de 1,4 g de (NH₄)₂SO₄, de 1,40 g de sulfate d'ammonium, de 0,30 g de MgSO₄ heptahydraté, de 0,30 g de CaCl₂, de 5,0 mg de FeSO₄ heptahydraté, de 1,6 mg de MnSO₄ dihydraté, de 1,4 mg de ZnSO₄ heptahydraté, de 2,0 mg de CoCl₂ et d'eau déminéralisée qsp 1 L (Mandels & Weber, 1969).

3.2. Mise en œuvre de la fermentation solide

La fermentation solide a été réalisée en ensemençant une série de fioles d'Erlenmeyers de 500 mL à col large contenant 10 g de substrat sec que ce soit le chêne-liège, pin, sapin et l'eucalyptus, les erlens sont ensuite humidifiés à 70% avec le milieu Mandels du pH 5 (Sandhu et al., 2013). Après traitement thermique (Advantage-Lab) à 121°C pendant 20 minutes et refroidissement, les erlens ont été inoculés à un taux de 1.10^7 spores/g de substrat

avec les solutions sporales des souches d'*Aspergillus niger* BG et *Trichoderma afroharzianum* (TH). Les cultures sont ensuite incubées durant 7 jours à 28°C (étuve, Muve incubator EN055, Turquie), puis les complexes enzymatiques produits ont été extraits en homogénéisant 10 g de chêne-liège, pin, sapin et l'eucalyptus fermentés avec 100 mL d'eau déminéralisée, suivi d'une l'homogénéisation. Cette étape est très importante pour récupérer le maximum d'enzymes qui adhèrent fortement à la fraction hemicellulosique et cellulosique du substrat solide. La suspension obtenue a ensuite été centrifugée (Rotina 380R, Allemagne) à 10 000 g et 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré et conservé à 4°C avant utilisation.

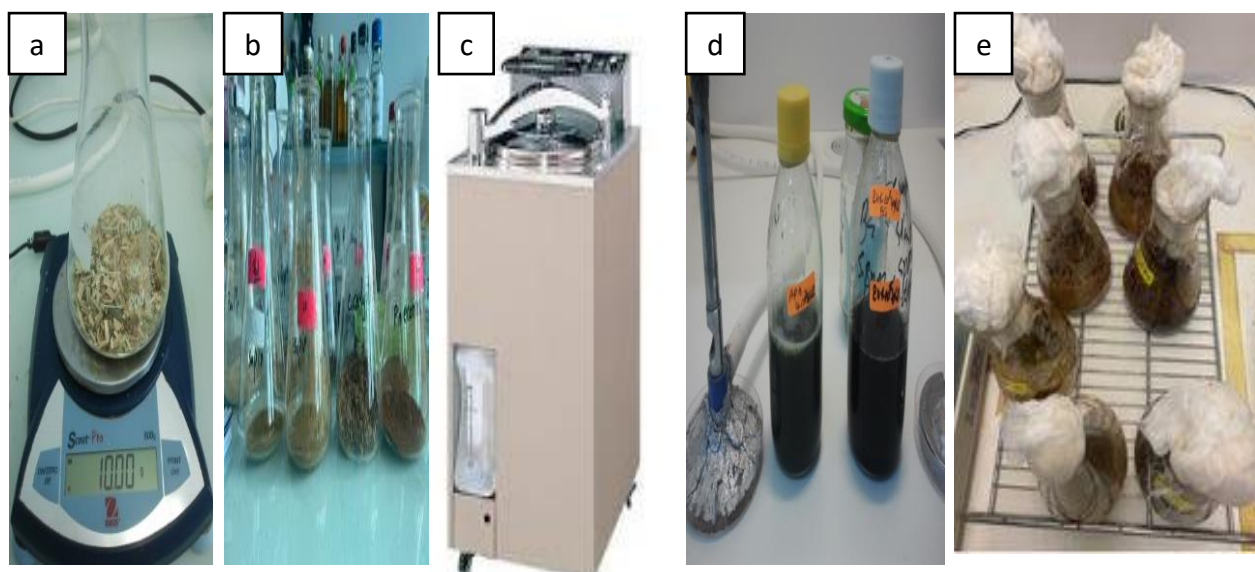


Figure n°6: Processus de la fermentation solide ; Préparation de substrat (a), Humidification (b), Stérilisation (c), Inoculation (d), et Incubation (e).

4. Dosage de l'activité enzymatique

4.1. Dosage de l'activité ligninasiq

a. Dosage de l'activité lignine peroxydase

Le test d'activité de la lignine peroxydase a été réalisé avec le substrat ABTs (L'acide 2,2'-azino-bis -3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique, Sigma-Aldrich) par mélange de 850µl d'ABTs avec 100µl de H₂O₂, ensuite en ajoutant 50µl d'extrait enzymatique. L'absorbance est mesurée immédiatement à une longueur d'onde de 465nm (**Sumiati et al., 2022**).

b. Dosage d'activité laccasique

L'activité laccasique est mesurée en mélangeant dans un tube à hémolyse, 950µl d'ABTs et 50µl de l'extrait enzymatique, l'absorbance est directement mesurée juste après contact de l'enzyme avec l'ABTs à une longueur d'onde de 436nm (**Sumiati et al., 2022**).

c. Calcule de l'activité laccasique et lignine peroxydase

Les activités enzymatiques de types ligninases ont été calculées en utilisant la méthode décrite par, (**Yanto et al., 2019**)selon l'équation suivante :

$$\text{Activité Enzymatique (U/mL)} = \frac{[(\text{Abs (t min)} - \text{Abs (0 min)}) * \text{Volume total (mL)} * 10^3]}{[\varepsilon * \text{Volume enzyme (mL)} * t \text{ (min)}]}$$

Dans cette équation, ε représente l'absorptivité molaire de 36 000 M⁻¹ cm⁻¹. Les valeurs d'Abs (t min) et Abs (0 min) correspondent respectivement aux absorbances mesurées à t = 1 min et t = 0 min. Le facteur de correction 10³ est utilisé pour convertir les résultats en unités de µmol/mol.

4.2. Dosage des activités cellulases et xylanases

Les activités avicelase (activité exocellulase), β-1,4-endoxyylanase et de la β-1,4 endo-glucanase ont été mesurées par dosage de sucres réducteurs libérés par la méthode de **Bailey et al., (1992)** avec les modifications suivantes : 0.1 mL de complexe enzymatique sont ajoutées à 0.9 mL de tampon de citrate de sodium (50 mM, pH 5,0) (annexe I) contenant 2 % d'Avicel (Merck, Kenilworth, NJ) ou 2% de xylane de hêtre ou 2 % de carboxy-méthyl-cellulose (CMC, Serva, Heidelberg, Allemagne), comme substrats pour l'avicelase, β-1,4-endoxyylanase et la β-1,4-endoglucanase, respectivement. Des cinétiques d'hydrolyses ont ensuite été réalisées durant 10 minutes à 50°C pour déterminer les sucres réducteurs libérés.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose ou en xylose contenue dans le mélange réactionnel. Ces concentrations de sucre réducteur sont déterminées par référence à des courbes étalons (**Annexe**) établie avec des concentrations variables en glucose et en xylose (0,2 à 2 mg/ml) à partir d'une solution mère à 2 g/l. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm.

Absorbance = Absorbance de l'enzyme – Absorbance témoin enzyme

Les absorbances des échantillons sont converties en concentration de glucose libéré à partir de la courbe d'étalonnage.

Activité endoglucanase ou exoglucanase= (mg de glucose libéré / 0.18016 mg/ μ mol) / (0.1 ml* 10 min)

Activité endoxylanase= (mg de xylose libéré / 0.15013 mg/ μ mol) / (0.1 ml* 10 min)

= μ mol min⁻¹ml⁻¹

= U / ml

Une unité «Avicelase, xylanase ou endoglucanase» a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une μ mole de sucres réducteurs, équivalent au xylose ou au glucose par minute dans les conditions du test (Miller, 1959).

4.3. Activité β -glucosidase et β -xylosidase

Les activités β -glucosidase et β -xylosidase ont été déterminées en utilisant le p-nitrophényl- β -D-glucopyranoside (pPN-G ; Sigma-Aldrich) et p-nitrophényl- β -D-xylopyranoside (pPN-X ; Sigma-Aldrich) respectivement. La libération de p-nitrophénol ($\epsilon_{410}=15,200$ M⁻¹cm⁻¹) est mesurée par spectrophotométrie à 410nm. Le mélange réactionnel est composé de 100 μ l, de tampon citrate de sodium 50 mM (pH 5) contenant 3,5mM (0.2%) de pNPG ou pNPX et de 100 μ l de la dilution appropriée de l'extrait brut de culture. Les essais sont incubés à 50°C pendant 10 min et les réactions sont arrêtées par l'addition de 500 μ l de 2% Na₂CO₃ (Norkrans, 1957). Une unité d'activité β -xylosidase ou β - glucosidase a été définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 μ mol de pNPX ou pNPG par minute respectivement.

II. Optimisation de la production d'enzymes lignocellulolytique par fermentation de chêne de liège en utilisant le Plan Box

Behnken

Le chêne de liège est sélectionné comme le substrat adéquat pour la fermentation en milieu solide (SSF) qui a donné une meilleure production de xylanases et cellulases avec la souche *Aspergillus Niger* BG, dont les fermentations sont réalisées pendant sept jours. Ce substrat le plus performant est incorporé dans la culture pour l'étape d'optimisation par la méthodologie de la surface de réponse (RSM) qui est un outil expérimental stratégique efficace qui permet de déterminer des interactions entre les différents paramètres étudiés (Sandhu et al., 2013)

La production de xylanases et de cellulases à partir de chêne de liège sous SSF a été optimisée par RSM. Le plan Box-Behnken (BBD) permet d'estimer les effets principaux de certains facteurs simultanément (Wahid & Nadir, 2013).

Les paramètres préliminaires sont sélectionnés en fonction de la littérature et des résultats enregistrés par (Azzouz et al., 2022a).

A: temps d'incubation, B: température d'incubation, C: Humidité, (Tableau n°2), les facteurs d'influence élevés et leurs niveaux ont été confirmés. 15 expériences en triplicatas du point central ont été utilisés (Tableau 2) pour ajuster les modèles polynomiaux basés sur un plan de Box-Behnken (BBD, 3 variables) réalisés par le logiciel Design Expert 10® (Version10.0.5.0.USA).

Tableau n°2 : Variables indépendantes et leurs différents niveaux dans BBD.

Study Type	Response Surface			Randomized		
Design Type	Box-Behnken		Runs15			
Design Mode	Quadratic		No Blocks			
Factor	Name	Units	Type	Minimum	Maximum	Mean
A	Incubation time	Day	Numeric	3,00	11,00	7
B	Temperature	°C	Numeric	24,00	32,00	28
C	Moisture	%	Numeric	50,00	90,00	70
Response	Name	Units	Obs	Analysis Polynomial		
R1	Endoglucanase	U/gds	15			
R2	Exoglucanase	U/gds	15			
R3	B-glucosidase	U/gds	15			
R4	Endoxylanase	U/gds	15			
R5	B-xylosidase	U/gds	15			

Des plans expérimentaux BBD à trois niveaux (-1, 0, +1), et trois facteurs ont été testés et le nombre d'essais (N) prévu a été défini selon l'équation (1) :

$$N = 3k \cdot (k-1) + C_0 \tag{01}$$

k est le nombre de facteurs et C_0 est le nombre de points centraux (3).

Les données d'essai sont ensuite ajustées par le modèle de surface de réponse (RSM) pour découvrir la relation entre les facteurs contrôlables et les facteurs de réponse (Xie et al., 2020).L'analyse de régression des données pour ajuster une équation polynomiale du second ordre (modèle quadratique) a été effectuée selon l'équation générale Eq 2, qui a été utilisée pour prédire les conditions optimales du processus de production.

$$R = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (2)$$

Où R représente les surfaces de réponse, β_0 est le terme constant (intercept), β_i , β_{ii} et β_{ij} sont respectivement les coefficients linéaires, quadratiques et d'interaction, , tandis que X_i , X_i^2 et $X_i X_j$ sont des variables linéaires, quadratiques et le terme d'interaction des variables, respectivement, et ε est le résidu associé aux expériences (l'erreur de prédiction, représente la différence entre les valeurs R mesurées et prédites et quantifie la variabilité aléatoire dans notre conception de l'expérience. R a été utilisé pour effectuer des analyses de régression et l'analyse de l'ANOVA pour la régression.

Tableau n°3 : BBD pour 15 séries d'expériences testées pour optimiser la production des cellulase et xylanases d'*A. niger* BG sur le chêne de liège

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Run	A:Incubation time Day	B:Temperature °C	C:Moisture %
1	3	28	50
2	7	32	50
3	11	28	90
4	7	24	50
5	7	28	70
6	7	28	70
7	7	28	70
8	3	28	90
9	3	24	70
10	7	32	90
11	11	32	70
12	11	24	70
13	11	28	50
14	7	24	90
15	3	32	70

Le modèle d'équation a été appliqué aux données expérimentales pour obtenir le modèle proposé. Les coefficients correspondants des variables, les interactions entre les variables et les graphiques de surface de réponse ont été donnés par logiciel statistique Design Expert10. L'analyse statistique de la signification des estimations des coefficients a été effectuée par le test Fisher (F-test). Les valeurs optimales des variables sélectionnées ont été obtenues en résolvant l'équation de régression et en analysant les graphiques de surface de

réponse, le modèle proposé a été validé en effectuant de nouveaux essais en triplicata proposé par logiciel Design Expert10(Dai et al., 2011; Handa et al., 2014; Srivastava et al., 2018).

II. Saccharification de la biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique peut être convertie en sucres fermentescibles par l'action synergique d'enzymes comprenant des exo- et endoglucanases et des β -glucosidases , ainsi que par l'action synergique d'enzymes comprenant des exo- et endoxylanaseet des β -xylosidase et d'autres enzymes auxiliaires (Guo et al., 2018).

Dans ce contexte, Les cellulases et xylanases (extraits enzymatique) produites par la souche *A. niger* BG ont été étudié pour leurs capacités à saccharifier la cellulose et l'hémicellulose de la biomasse lignocellulosique ressource renouvelable abondante dans la biosphère. Ce sont les principaux composants de cette biomasse, qui peuvent être hydrolysé en glucose et en xylose pour être ensuite transformés en bioéthanol.

1. Délignification de la biomasse lignocellulytique

L'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose native ne solubilise pas parfaitement la cellulose et l'hémicellulose, des prétraitements sont généralement appliqués pour améliorer l'accessibilité du substrat (Saha et al., 2005). Le peroxyde alcalin a été développé avec succès pour le prétraitement de la lignocellulose, et il s'est avéré efficace pour éliminer la lignine (Chen et al., 2008).

Le chêne de liège est utilisé dans ce travail, cette biomasse lignocellulosique a été séchée dans une étuve à 70 °C/ 24 h.

Afin d'améliorer l'accessibilité des enzymes à la biomasse, un prétraitement à l'hydroxyde de sodium (NaOH) a été effectué selon la méthode de Silva et al. (2011). Brièvement, le chêne de liège est trempé dans une solution de NaOH à 0,5% (p/v) jusqu'à un rapport solide, liquide de 1 :20. Un traitement thermique est effectué ensuite à 50 °C dans un agitateur à 200 rpm pendant 1 h. Le matériau prétraité est refroidi dans un bain de glace, et le pH est ajusté à 5 par l'ajout d'une solution d'acide sulfurique à 72 %. Ensuite, la matière solide est séparée par centrifugation à 12.000 g et 4 °C puis séchée dans l'étuve. Cette matière première a été utilisée pour la saccharification (Azzouz et al., 2021)

2. Hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulolytique

La conversion de la biomasse lignocellulosique en sucres fermentescibles nécessite une action synergique des enzymes, comprenant des exo- et endoglucanases, ainsi que des β -glucosidases. De plus, Ces interactions enzymatiques sont essentielles pour dégrader cette biomasse et permettre la libération des sucres nécessaires à la fermentation. En complément, d'autres enzymes auxiliaires peuvent également jouer un rôle important dans ce processus de conversion enzymatique(**Guo et al., 2018**).

La capacité de l'enzyme à saccharifier la biomasse lignocellulosique a été évaluée en mesurant la quantité de glucose libérée à partir de chêne de liège traité et non traité. L'extrait enzymatique utilisé dans cette étude est produit par fermentation de la souche fongique *A. niger*.

Le chêne de liège (5g) traité et non traité a été saccharifié dans deux flacons iso contenant 100 mL d'une solution enzymatique dans un tampon citrate de sodium (0,5%), pH 5.

Après avoir réalisé la stérilisation de l'enzyme par filtration à travers un filtre de 0,45 et 0.22 μ m dans le but d'éliminer les champignons et les bactéries, 3 mL de cet extrait enzymatique (2 U/mL) ont été ajoutés à chaque flacon.

Les réactions ont été effectuées dans un Shaker à 40 °C et à 150rpm pendant 0min,1h,2h,3h,4h ,5h,6h,7h,8h, 24 h, 48h et 72 h. Cette configuration de conditions de réaction permet d'assurer l'activité enzymatique optimale et de favoriser la dégradation efficace de la cellulose et hémicellulose présente dans le chêne de liège (**Kane et al., 2022**)

Le glucose et le xylose libre ont été mesurés à différents temps de réaction en utilisant la méthode de Miller, (1959).

3. Dosage des sucres réducteurs

La concentration en sucres réducteurs a été estimée avec la méthode de Miller (**Miller, 1959**). Pour cela, 50 μ L d'échantillon ont été ajoutés à 450 μ L d'eau distillé avec 750 μ L de réactif DNS, puis homogénéiser au vortex et mis à chauffer à 100°C pendant 5 minutes. Après refroidissement dans un bain d'eau glacée, une lecture de l'absorbance à 540 nm est effectué à l'aide un spectrophotomètre 540nm. Une solution de glucose a servi de référence pour la réalisation d'une gamme d'étalonnage allant de 0 à 2 g/L.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. Production d'enzymes lignocellulolytiques par fermentation solide

3. Caractérisation biochimique et moléculaire des souches *Trichoderma afroharzianum* isolat AZ 12 et *Aspergillus niger* BG

Les caractères macroscopiques des deux souches sont étudiés sur le milieu PDA, le plus communément utilisé. Les principaux caractères cultureux des colonies à savoir : l'aspect du mycélium, la surface des colonies ainsi que la couleur de la pigmentation au revers des boîtes se révèlent comme suit :

- La souche *Aspergillus niger* BG présente ; une croissance rapide, Un mycélium d'aspect velours, blanc cotonneux au départ devenant poudreux avec l'apparition de spores noires (Fig. 7-a).
- La souche *Trichoderma afroharzianum* (TH) présente ; une croissance très rapide et le mycélium envahit facilement le milieu. Le mycélium aérien est cotonneux blanc puis vert olive après sporulation (Fig. 7-b).

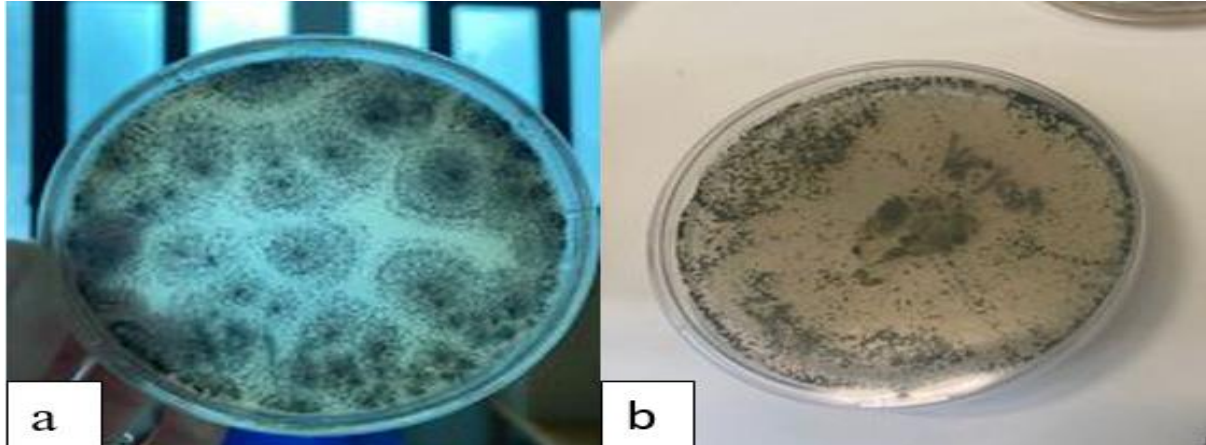


Figure 7 : Principaux caractères cultureux des souche d'*Aspergillus niger* BG (a) et la souche *Trichoderma afroharzianum* (b) sur milieu PDA (a et c) après 7 jours d'incubation à 28°C

4. Production de cellulases et de Xylanases par fermentation solide de la biomasse lignocellulolytiques

La production de Lignocellulases est un facteur important dans l'hydrolyse de matières lignocellulosique. Il est également essentiel de rendre le procédé économiquement viable.

Beaucoup de travaux rapportent la production de lignocellulases à partir de matières lignocellulosique (Bano et al., 2013; Goldbeck et al., 2013; Soni et al., 2010). Les mycètes les plus utilisés dans l'industrie de fabrication des enzymes appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Trichoderma* et *Penicillium*. Ils présentent des capacités de production et de sécrétion élevés; correspondant à plus de 50 % des études relatives aux cellulases, *Trichoderma reesei* peut atteindre des rendements de cellulases de 40 g /L (Moore et al., 2011; Passos et al., 2018).

La culture solide en erlens repose sur une distribution homogène des spores de mycètes à l'intérieur des substrats lignocellulosique. La préparation d'un substrat poreux est nécessaire pour assurer une bonne aération et une croissance rapide du mycélium. Le pH acide et une charge importante de l'inoculum sporal favorisent cette croissance. L'humidité joue également un rôle important dans la croissance des mycètes et la production des enzymes dans les SSF(Zahra, 2016).

La fermentation solide avec la biomasse lignocellulosique, comme le chêne-liège, pin, sapin et l'eucalyptus nous a permis de tester les souches d'*Aspergillus niger* BG et la souche *Trichoderma afroharzianum* TH, Elles sont caractérisées par leurs capacités de production de cellulases et de xylanases sur cette biomasse testée. L'aspect des cultures fongiques étudiées sur milieu solide après 7 jours d'incubation est représenté dans la figure 8.

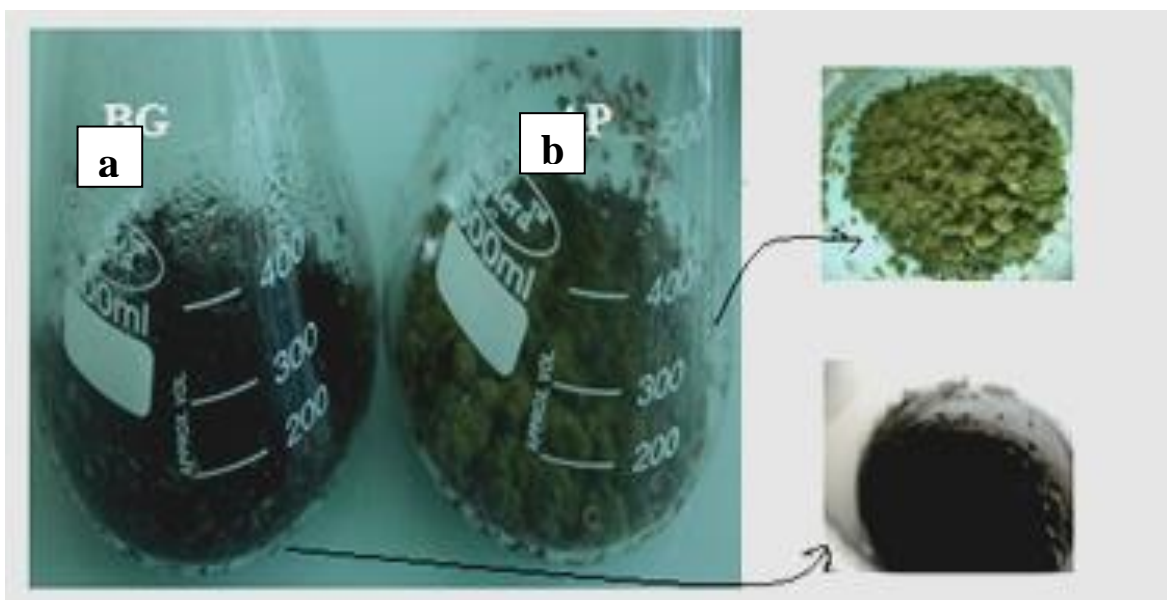


Figure8 : Aspect des cultures d'*A.niger* BG (a) *T. afroharzianum* TH (b) après fermentation solide de la biomasse lignocellulosique

Dans le cadre de cette étude, les enzymes de type lignocellulosique sont produites par fermentation solide de la biomasse comme le chêne-liège, pin, sapin et l'eucalyptus avec les

souches fongiques d'*A. Niger* et *T. afroharzianum* après 7 jours de fermentation à 28°C, ensuite, les activités enzymatiques sont mesurées et les résultats trouvés sont illustré dans la figure 9.

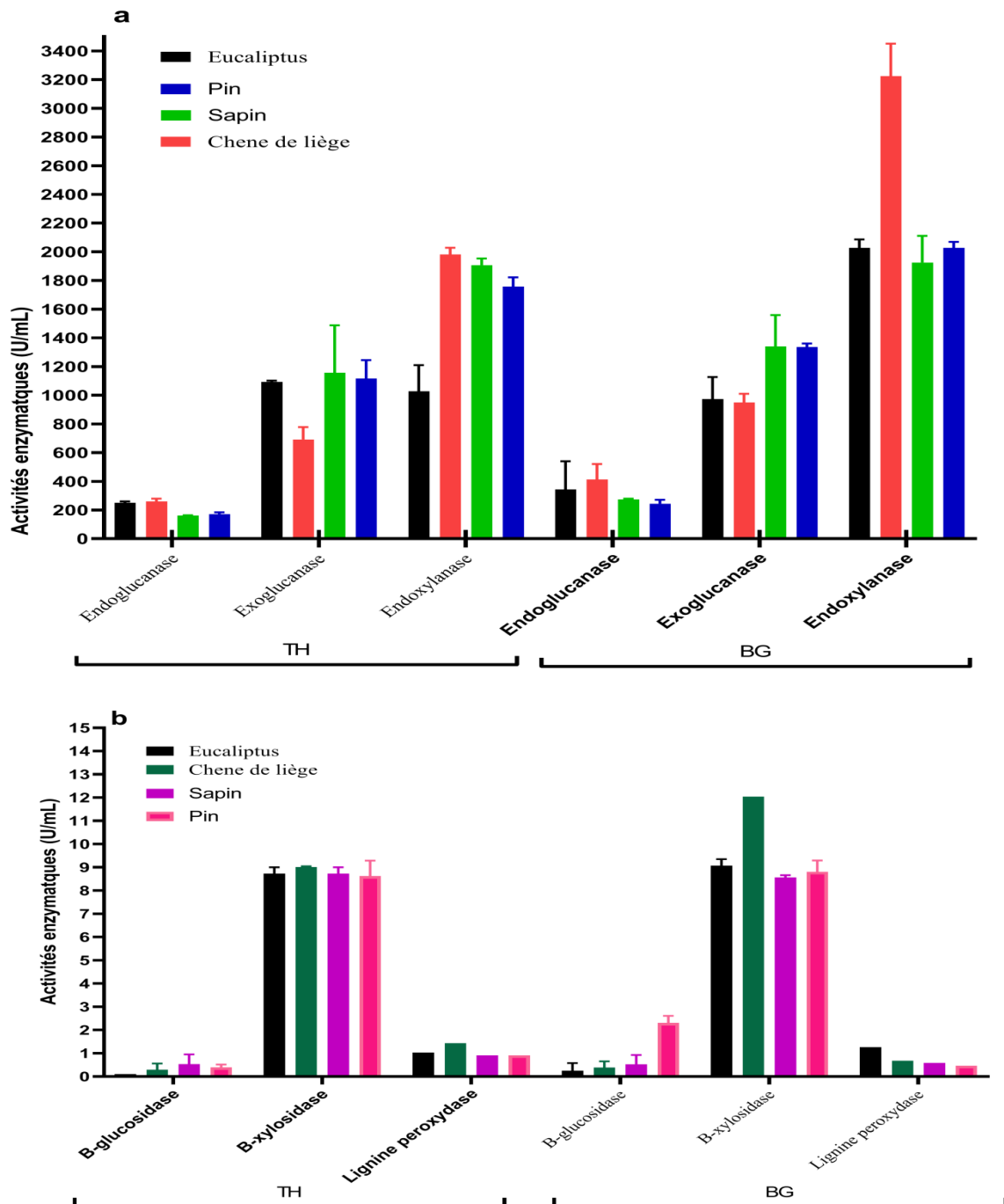


Figure 9: Résultats de la production d'enzymes endo-exo-glucanase (a), endoxylanase (a) et B-gluco-Xylosidase et lignine peroxydase (b) par fermentation en milieu solide de chêne-liège, de pin, de sapin et d'eucalyptus avec les souches TH et BG.

La souche BG révèle une activité endoglucanase plus élevée que la souche TH (figure 9-a) vis-à-vis des différents substrats testés, alors que les activités enzymatiques sont faibles pour

les substrats de sapin et de pin, et ce pour les deux souches (figure 9-a-b). En outre, la souche BG a montré des activités exoglucanase (Figure 9-a) et B-glucosidase (Figure 9-b) significativement plus élevées par rapport à la souche TH sur le substrat de chêne-liège (Figure 9-a-b), ce qui indique que ce substrat possède un potentiel plus important pour la production d'enzymes lignocellulolytiques. La figure 9 montre également une activité maximale de l'endoxyanase et de la B-xylosidase (figure 9-a-b) lorsque la souche BG est cultivée sur le substrat de chêne-liège. En revanche, l'activité maximale de la lignine peroxydase est observée avec la souche TH lorsqu'elle est cultivée sur le substrat de chêne-liège (Figure 9-b).

On peut conclure que la souche BG produit des activités appréciables avec de chêne-liège par rapport à la souche TH. Ces résultats ont permis de choisir la souche BG pour l'optimisation de la production des enzymes de type cellulases et xylanases par fermentation solide avec le substrat chêne-liège.

II. Optimisation de la production des cellulases et xylanases d'*Aspergillus niger* BG par fermentation solide à base de chêne-liège

Suite à un screening des substrats visant à identifier le substrat le plus performant en combinaison avec la souche la plus efficace, le chêne-liège a été utilisé comme substrat pour la production de cellulase et de xylanase par la souche BG en fermentation solide.

En outre, la variation des conditions opératoires telles que le temps d'incubation, le niveau d'humidité et la température d'incubation a permis d'optimiser les enzymes cellulase et xylanase dans la fermentation solide.

Les variables influençant la réponse ont été déterminées à l'aide de la méthode OFAT, en se référant à l'étude menée par (Azzouz et al., (2022a)).

La matrice BBD (Box-Behnken Design) et les résultats correspondants des expériences RSM sont présentés dans le tableau 1, comme meilleure conception pour l'optimisation de la surface de réponse. La production a été sélectionnée avec trois facteurs, dont le temps d'incubation (A), la température d'incubation (B), et le taux d'humidité (C).

Le tableau ci-dessus présente la matrice BBD (Box-Behnken Design) ainsi que les résultats correspondants des expériences RSM (Réponse Surface Methodology) en tenant compte des trois facteurs.

Tableau n°4 : Plan d'expérience RSM et réponses correspondantes par la matrice BBD des activités cellulases et xylanases de *A.niger* BG avec le chêne de liège.

Factor 1	Factor 2	Factor 3	Response 1	Response 2	Response 3	Response 4	Response 5	
Run	A:Incubation time	B:Temperature	C:Moisture	Endoglucnase	Exoglucanase	B-glucosidase	Endoxylanase	B-xylosidase
	Day	°C	%	U/mL	U/MI	U/mL	U/mL	U/MI
1	3	28	50	223	10,4074	1	3280	1,46
2	7	32	50	145	2,08148	17	2010	6,50493
3	11	28	90	318	11,7951	7,07	2649	7,51
4	7	24	50	302	5,5	17	3343	5,62993
5	7	28	70	251	10,0605	17,6957	2570,1	7,03454
6	7	28	70	252	11	17	2519,83	6,41283
7	7	28	70	238	10,4	17,41	2582,67	6,93092
8	3	28	90	292	20,81	1,9	3826	4,33816
9	3	24	70	341	15,26	3	4304	1,38158
10	7	32	90	223	18,73	17,0855	1866,31	6,71217
11	11	32	70	226	9,71	11,9276	2744	5,63224
12	11	24	70	271	7	14,677	4122,2	5,27763
13	11	28	50	157	1,39	14,1151	3704	7,29474
14	7	24	90	317	11,1	18,1332	3192,2	6,45888
15	3	32	70	238	20,81	4	3292	2,27039

Les résultats obtenus par le plan BBD indiquent que les activités endoglucanase et exoglucanase ont atteint des valeurs maximales de 341 U/ml et 15,26 U/ml respectivement dans l'essai no. 9. Ces résultats ont été obtenus avec une période d'incubation de 3 jours, à une humidité de 70% à une température de 24°C,

En revanche, des activités minimales ont été enregistrées dans les essais n°2 et n°13, avec des valeurs de 145 U/ml et 1,39 U/ml respectivement. Ces faibles activités ont été observées pendant une période d'incubation de 7 jours et 11 jours, à des températures de 32°C et 28°C, avec une humidité de 50% respectivement

Les activités maximales des enzymes β -glucosidase, β -xylosidase et xylanase ont été obtenues avec une période d'incubation de 7 jours, 11 jours et 7 jours, respectivement, et des températures d'incubation de 24°C et 28°C, On a enregistré des valeurs maximales de 18,1332 U/mL, 4122,2 U/mL et 7,03454 U/mL. Par contre, des activités minimales ont été observées dans l'essai numéro 1, avec des valeurs respectives de 1 U/mL pour la β -glucosidase, 3280 U/mL pour la β -xylosidase et 1,46 U/mL pour les xylanases, pendant une période d'incubation de 3 jours à 28°C et à une humidité de 50%.

1. Analyses de variances pour la production d'enzymes lignocellulosique

1.1. Signification du modèle

La valeur p est généralement interprétée par rapport à un niveau de confiance de 5 % (Patten & Streiner, 2021). En effet, plus p-value d'un paramètre est faible, plus ce paramètre est significatif (Asgher et al., 2016).

L'analyse de la variance (ANOVA) pour les modèles est présentée dans le tableau 2. Cette dernière a démontré que les modèles sont significatifs avec un p-value < 0.05 Les résultats obtenus indiquent que les p-values pour les activités endoglucanase (R_1), exoglucanase (R_2), B-glucosidase (R_3), endoxylanase (R_4) et B-xylosidase (R_5) sont respectivement de 0,0367, 0,0001, 0,0003, 0,0008 et 0,0001 (tableau 5). Ces p-values sont inférieures à 0,05, ce qui indique que ces activités sont statistiquement significatives à un niveau de confiance de 95 %. En effet, les paramètres étudiés ont un impact significatif sur la production de ces enzymes. Une augmentation ou une diminution spécifique d'un paramètre peut entraîner une variation significative de la production de l'enzyme correspondante. Cela signifie que les variables du modèle ont un effet significatif sur les réponses.

Les valeurs F de "Lack of Fit (> 0.05) implique que les Lack of Fit pour les 5 réponses 1, R2, R3, R4, et R5 ne sont pas significatifs par rapport à l'erreur pure. Un manque d'ajustement (lak of fit) non significatif est une bonne chose, nous voulons que les modèles s'ajustent. Cela signifie que les équations de régression peuvent bien être valide (He et al., 2018a), ses équations sont capables d'expliquer de manière adéquate les variations observées dans les données. Une régression significative et un manque d'ajustement non significatif présent dans le modèle étaient bien adaptés aux expériences. (Bezerra et al., 2008b).

La Fig. 10 montre une bonne corrélation entre la production réelle et prédite des enzymes endoglucanase (Fig.10-a), exoglucanase (Fig.10-b), B-glucosidase (Fig.10-c), endoxylanase (Fig.10-d) et B-xylosidase (Fig.10-e) d'*Aspergillus niger* BG par fermentation en milieu solide du chêne de liège, et la distribution linéaire indique un modèle bien ajusté. Ces figures démontrent que les modèles sont assez réaliste puisqu'il montre que l'écart entre les valeurs expérimentales et prédites sont très faible (**He et al., 2018b**).

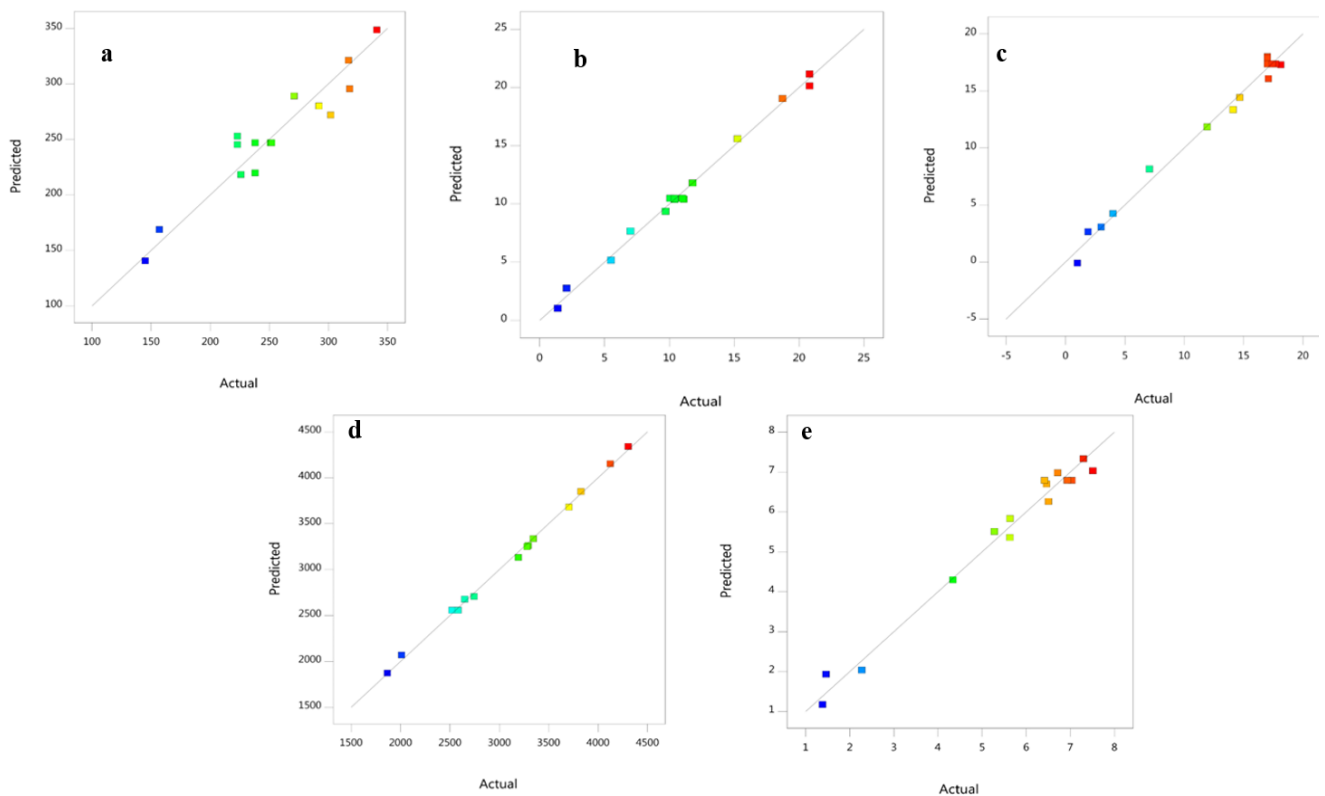


Figure 10 : Réponses réelles en fonction des réponses prédites pour les activités enzymatiques. **a:** Endoglucanase, **b:** Exoglucanase, **c :** B-glucosidase, **d :** B-xylosidase, **e :** Endoxylanase.

D'après la figure 10, les points sont dispersés de manière homogène autour de la droite de régression. Les modèles peuvent être donc jugé de qualité suffisante (**Nadia & M., 2016**)

Les modèles générés ont été utilisés par la suite pour étudier l'effet de divers paramètres et leurs interactions sur l'activité xylanase, le modèle pour la réponse prédite pourrait être exprimé par les équations polynomiales quadratiques (sous la forme de facteurs codés) et ont été réalisés comme suit Eqs (3,4,5,6 et 7) :

$$R = \beta_0 + \beta_1 X_A + \beta_2 X_B + \beta_3 X_C + \beta_5 X_A X_B + \beta_6 X_A X_C + \beta_7 X_B X_C + \beta_8 X_A + \beta_9 X_B^2 + \beta_{10} X_C^2 / \beta = \text{Cste}$$

$$R1=247-15.25A- 49.88B+40.38C+14.50AB+23AC+15.75BC+11.38A^2+10.63B^2-10.88C^2 \quad (3)$$

$$R2=10.49 - 4.67A+1.56B+5.38B - 0.7100AB+ 0.0006AC+ 2.76BC+ 2.23A^2 + 0.4802B^2+ 1.61C^2(4)$$

$$R3= 17.37 + 4.74A- 0.3496B-0.6158C-0.9373AB -1.99AC-0.2619 BC-10.13A^2 + 1.16B^2 1.22C^2 \quad (5)$$

$$R4= 2557.53 - 185.35 A - 631.14B-100.44C - 91.55AB - 400.25AC+1.78BC + +909.95A^2+148.07B^2 - 102.73C^2 \quad (6)$$

$$R5= 6.79 + 2.03A+ 0.2965B+ 0.5162C - 0.1336AB - 0.6657AC- 0.1554BC-2.16 A^2- 0.9883B^2 + 0.522C^2 \quad (7)$$

Où R_1 , R_2 , R_3 , R_4 et R_5 : les réponses des activités Endoglucanase, Exoglucanase, B-glucosidase, Endoxylanase et B-xylosidase, A le temps d'incubation, B est la température et C'est le taux d'humidité. Le signe positif devant les termes indique un effet synergique, tandis que le signe négatif indique un effet antagoniste. Les valeurs négatives d'un coefficient estimé dénotent une influence négative des paramètres sur le produit enzymatique.

Lorsque les variables du modèle ne sont pas significatives, elles sont exclues de l'équation polynomiale quadratique du modèle (**Bagewadi et al., 2016**).

Les équations 3, 4, 5, 6 et 7 représentent les modèles simplifiés en termes de facteurs codés. Elles permettent de prédire les réponses R_1 , R_2 , R_3 , R_4 et R_5 pour des niveaux spécifiques de chaque facteur. Les équations codées sont utiles pour évaluer l'importance relative des facteurs en comparant les coefficients associés.

1.2. Coefficient de détermination R^2

D'après (Vaillé & Goupy, 2006), le coefficient de détermination R^2 est un paramètre statistique qui permet d'évaluer la validité du modèle étudié. Il mesure à la fois la corrélation entre les variables et la signification statistique du modèle par le coefficient de détermination R^2 (W. Chen et al., 2012; Khusro et al., 2016) des réponses R_1, R_2, R_3, R_4 et R_5 .

Ces modèles quadratiques se sont avérés avoir des valeurs de coefficient de détermination (R^2) de 0.909, 0.990, 0.987, 0.997 et 0.981 respectivement pour les réponses R_1, R_2, R_3, R_4 et R_5 , qui sont proche de 1, indique que 90.9%, 99%, 98.7%, 99.7% et 98.1% des variabilités des réponses peuvent être exprimées par le modèle et ces résultats confirment l'efficacité de ces modèles, ce qui signifie que 90.9%, 99%, 98.7%, 99.7% et 98.1% de la variation totale des résultats observés a été attribuée aux variables indépendantes. Par conséquent, les valeurs élevées de R^2 obtenue dans ce modèle de régression indiquent un bon accord entre les activités enzymatiques prédites et réelles.

1.3. Significativité des effets des facteurs

a. Effet linéaire

Le test ANOVA a été utilisé pour chaque variable, et les résultats ont montré que les effets linéaires, Les résultats obtenus montrent que le facteur, temps d'incubation (A), a un effet significatif sur les réponses R₂, R₃, R₄ et R₅ avec des p-values inférieures à 0,05. Le facteur température (B) a un effet significatif sur les réponses R₁, R₂, et R₄ avec des p-values inférieures à 0,05, concernant le facteur l'humidité (C) a un effet significatif sur les réponses R₁, R₂, R₄ et R₅ avec des p-values inférieures à 0,05, ce qui met en évidence le grand impact de ces facteurs sur la production d'enzyme. En contrepartie, le facteur temps d'incubation et humidité n'est pas significatif sur la réponse R₁ et R₃ respectivement. Concernant la température d'incubation on a enregistré des p-values >0.05 dans les réponses R₃ et R₅, ce qui conclut que ce dernier n'est pas significatif sur la production de B-glucosidase et B-xylosidase.

Les résultats obtenus pour l'activité de la xylanase ont été similaires, indiquant une interaction significative entre la température d'incubation et l'activité de la xylanase (**Azzouz et al., (2022b)**) ainsi que des résultats similaires ont été obtenue pour la production d'endoglucanase dans laquelle l'humidité a un effet significatif sur sa production (**Narra et al., 2014**)

b. Effets quadratiques

L'effet quadratique A² (temps d'incubation* temps d'incubation), ayant une P-value significatif de 0.0026, 0.0001, 0.0003, 0.0001 pour les réponses R₂, R₃, R₄ et R₅, par contre pour la réponse R₁ la p-value est de 0,4753 qui est non significatif pour cette réponse.

Pour l'effet quadratique B² (température*température), les p- values sont significatifs pour les réponses R₄, R₅ avec des p-values de 0.0046 et 0.0105. Les p-value sont non significatifs pour les réponses R₁, R₂ et R₃ avec des p-value de 0.5035, 0.2857 ,0.1249respectivement.

Pour l'effet quadratique C²(Humidité*Humidité) les p-values sont non significatifs pour les réponses R₁, R₃, R₅ avec des p-values de 0.4940, 0.1094, 0.0891. Mais elles sont significatives pour R₂ et R₄ avec des p-values de 0.0102 et 0.0197.

c. Effet d'interaction entre les paramètres étudiés

La relation entre les paramètres et les réponses peut être comprise en étudiant les tracés de surface de réponse tridimensionnels (3D) pour les activités d'endoglucanase (R₁), exoglucanases (R₂), B-glucosidase (R₃), endoxylanases (R₄), B-xylosidase (R₅), ces réponses ont été générées à

partir des modèles quadratiques prédit. Le graphe de la surface de réponse en 3D peut également être utilisé pour déterminer le niveau optimal de chaque variable. Tout en maintenant les autres variables à leur niveau optimal, l'axe Z (se référant à l'activité étudié) en fonction de deux variables quelconques a été construit dans le graphe de la surface de réponse. Cela permet d'optimiser les conditions expérimentales et d'améliorer les rendements enzymatiques.

➤ **Activité endoglucanase (R₁)**

Les résultats obtenus montrent que les interactions entre le temps d'incubation et la température (AB), le temps d'incubation et l'humidité (AC) et l'interaction entre la température et l'humidité (BC) sont non significative pour la production d'endoglucanases avec des *p*-values sont respectivement de 0.3530, 0.1654, 0.3169. Cela indique que cette interférence n'influence pas sur la réponse.

L'interaction entre les variables : AB, AC et BC sont représentées dans la Figure 11 a-c.2, par la surface de réponse. Les couleurs bleu, vert et orange indiquent respectivement. Les activités endoglucanases, basses, intermédiaires et hautes.

La Fig.11 a-c illustre les combinaisons des effets des variables indépendantes sur l'activité d'endoglucanase, avec les données obtenues à partir du graphique de réponse de surface, on peut observer une tendance de l'activité CMCases en fonction de temps d'incubation (A) et de et la température (B) (Fig. 11-a), l'interaction entre le temps d'incubation (A) et le taux d'humidité (C) (Fig. 11-b), et l'interaction entre la température (B) et le taux d'humidité (C) (Fig. 11-c).

Ces paramètres ont une influence insignifiante sur la production de l'endoglucanase. L'optimisation des paramètres de fermentation a permis d'obtenir des valeurs de température, de taux d'humidité et de temps d'incubation permettant d'obtenir l'activité enzymatique souhaitée. Dans les études menées par (**Nishio, Tai, and Nagai (1979)**), la durée de la fermentation et la teneur en humidité varient généralement entre 35 et 75 % et peuvent changer en fonction de l'évaporation et de l'activité métabolique. Pour la durée de fermentation, le niveau élevé du taux d'humidité diminue la porosité et la dispersion de l'oxygène, tandis qu'une faible humidité peut influencer négativement la croissance des micro-organismes en raison de la diminution de la solubilité des nutriments causée par une rapide évaporation de l'eau. De plus, la température d'incubation influence la formation du produit, la croissance des micro-organismes et la germination des spores (**Handa et al., 2014; Lonsane, 1992**).

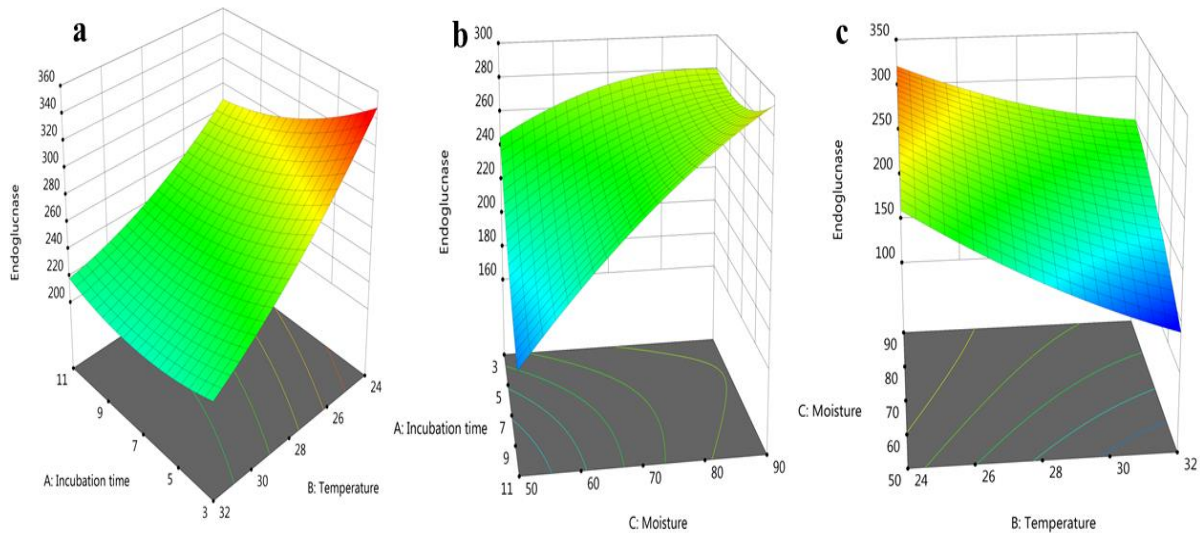


Figure 11 : Analyse des surfaces des réponses pour la production d'endoglucanase par fermentation du chêne de liège avec la souche *Aspergillus niger* BG. Interaction entre par temps d'incubation et la température d'incubation (a), temps d'incubation et l'effet de l'humidité (b), la température d'incubation et l'effet de l'humidité (c).

➤ **Activité d'exoglucanase (R₂)**

Les résultats obtenus montrent que les interactions entre le temps d'incubation vs la température (AB) et le temps d'incubation vs l'humidité (AC) sont non significatives pour la production d'exoglucanases avec des *p*-values respectivement de 0.125, 0.998. Ces paramètres ont une influence insignifiante sur la production d'exoglucanase.

Par contre l'interaction entre la température et l'humidité (BC) est hautement significative avec un *p*-value de 0.008. L'interaction des paramètres significatifs et non significatifs et les effets sur la réponse d'exoglucanase ont été étudiés avec des diagrammes de surfaces de réponse tridimensionnels (Fig. 12 a-c) basés sur l'analyse de régression de BBD. La variation de la réponse (production d'exoglucanase) et la signification de *p*-value (0,008) pour l'interaction entre BC (la température et l'humidité) ont prouvé la présence d'interactions positives entre ces deux variables (Fig. 12-c).

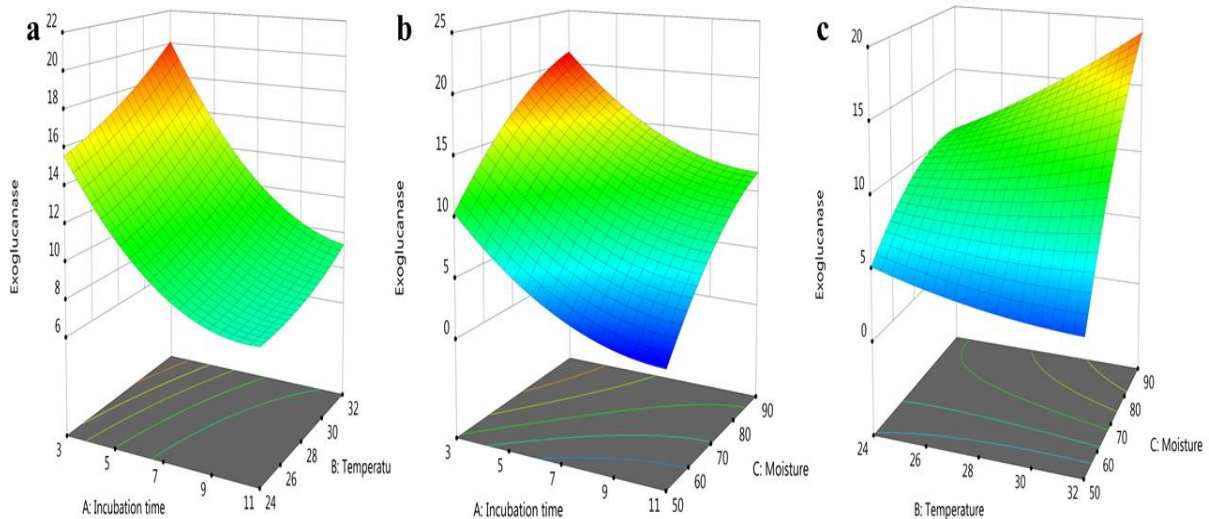


Figure 12 : Analyse des surfaces des réponses pour la production d'exoglucanase par temps d'incubation et la température d'incubation (a), temps d'incubation et l'effet de l'humidité (b), la température d'incubation et l'effet de l'humidité (c).

La figure 12, montre différentes zones de production d'exoglucanase. Ou La zone orange représente une activité enzymatique optimale à une humidité de 90% et une température de 28°C, idéale pour la fermentation sur milieu solide.

L'interaction entre la température et l'humidité (BC) est significative avec une valeur de 0,0008, cela indique qu'il existe une relation significative entre la température, l'humidité et la production d'exoglucanase.

La température est un facteur très important dans le processus de fermentation. Une température basse ou élevée peut entraîner une réduction de la croissance microbienne et par conséquent une faible production de l'enzyme. (Behnam et al. (2016)) ont signalé que l'interaction de la température et du temps n'était pas significatif dans l'optimisation de la production de xylanase en fermentation solide par la souche *Mucor indicus*. Selon les études menées par (Yegin et al. (2016); dos Santos et al. (2017); Pathania, et al., (2017)), une interaction entre le temps d'incubation et la température a un impact sur la production maximale de xylanases par *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 ; *Aspergillus niger* ; et *Rhizopus delemar* F2,

Lorsque le pourcentage d'humidité atteint un niveau élevé, l'activité exoglucanase augmente avec la variation de temps. En outre, nous supposons que ce développement le plus important sur la SSF a été démontré lorsque le taux d'humidité est très élevé, l'espace vide est

occupé par l'eau et l'air se concentre, ce qui crée une certaine anaérobiose (**Rodríguez de Olmos et al., 2014**)

➤ **B-glucoSIDase (R₃)**

Les interactions entre le temps d'incubation vs la température (AB) l'interaction entre la température et l'humidité(BC) sont non significative pour la production de B-glucoSIDase avec des *p*-values sont respectivement de 0.181, 0.682, par contre l'interaction et le temps d'incubation vs l'humidité (BC) est significative avec un *p*-value de 0.021.

La figure 13 a-c illustre les différentes zones de production de la B-glucoSIDase. La zone rouge représente une activité enzymatique optimale, observée à une humidité de 90% et une période de 9 à 11 jours.

Les interactions entre les deux variables : AB, AC, BC sont représentées dans la Figure 13 a-c par la surface de réponse définissant l'interaction entre les deux facteurs. La zone en bleu-vert représente l'intervalle où l'on retrouve les zones d'activités faibles, cet intervalle se situe à des niveaux bas. La zone en jaune-orange représente la zone d'activité la plus importante.

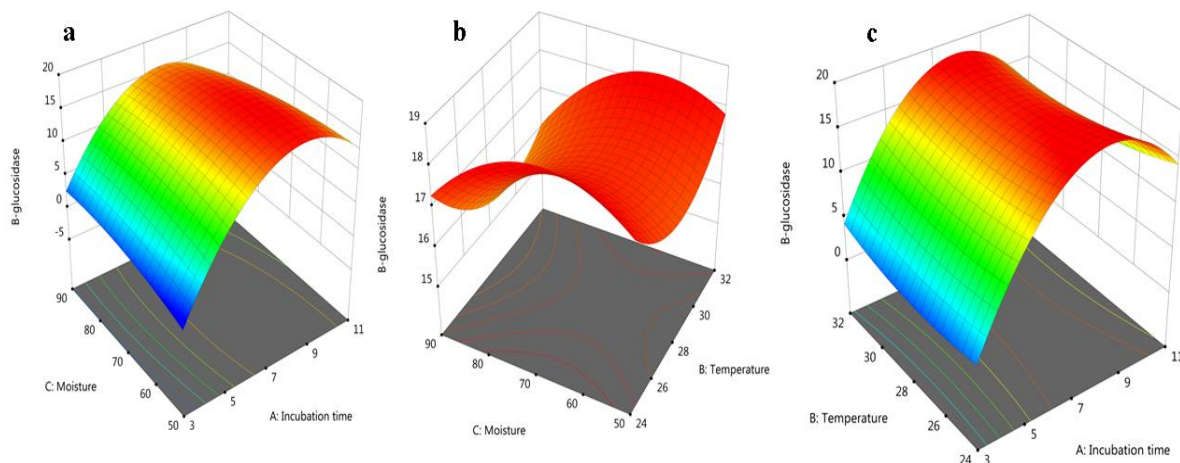


Figure 13: Analyse des surfaces des réponses pour la production de b-glucoSIDase par temps d'incubation et la température d'incubation (a), temps d'incubation et l'effet de l'humidité (b), la température d'incubation et l'effet de l'humidité (c).

Yadav (1988), a rapporté que la teneur en humidité et la température étaient considérées comme pertinentes pour le processus de SSF et qu'elles étaient les principaux paramètres liés à une meilleure production de β -glucoSIDase dans la SSF utilisant des champignons

Behnam et al., (2019), ont rapporté que l'interaction entre le taux d'humidité et le temps d'incubation était significative dans la production de xylanases par *Mucor indicus*. Par contre, selon **Almeida Antunes Ferraz et al., (2020)**, il n'as pas été significatif dans la production en SSF à base de son de blé de xylanases et de cellulases par *Mucor hiemalis* et *R. oryza*.)

➤ **Endoxylanase (R₄) et B-xylosidase (R₅)**

Les interactions (AB) et (AC) ont des valeurs de p significatives de 0,02 et 0,0001 (Figure 14–a-b), ce qui suggère qu'il existe une interaction significative entre ces paires de paramètres et la réponse endoxylanase, alors qu'une interaction significative a été enregistré avec les facteurs de temps d'incubation et l'humidité pour la réponse B-xylosidase (Figure 14-c).

Concernant l'interaction entre le temps d'incubation et la température (AB) et l'interaction entre la température et l'humidité (BC) sont non significatives pour les réponses B-xylosidase et l'activité endoxylanase respectivement.

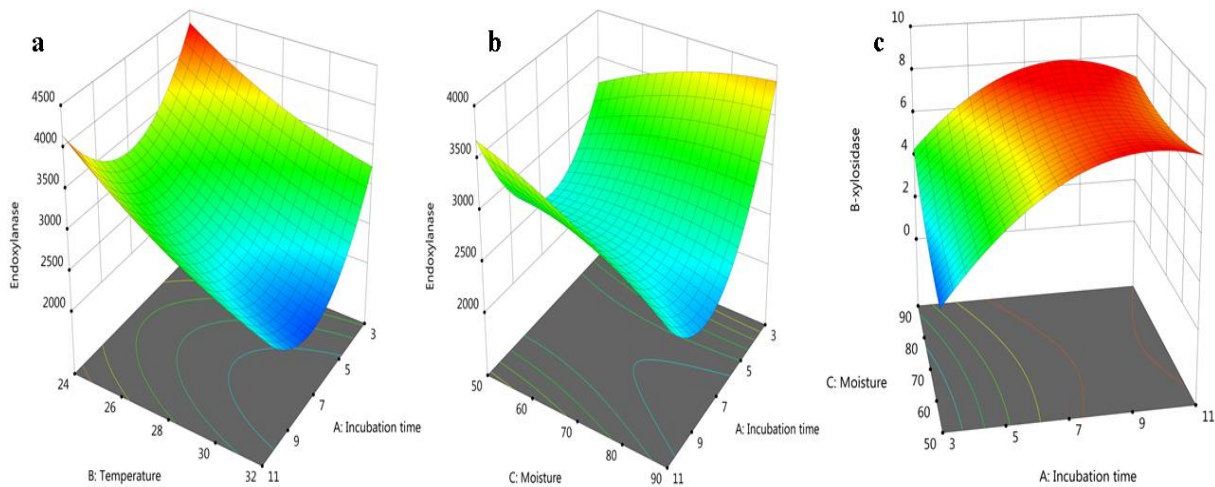


Figure n°14. Diagramme de surface des réponses endoxylanase et B-xylosidase pour les modèles de l'intersection entre : le temps d'incubation et la température d'incubation (a), temps d'incubation et l'effet de l'humidité (b), pour la réponse d'endoxylanase et l'interaction entre temps d'incubation et l'effet de l'humidité (c) pour la réponse B-xylosidase.

La disponibilité des nutriments peut influencer la production de xylanases en variant le niveau d'humidité (**da Silva Menezes et al., 2018; Singh et al., 2009**). 43% et 83% étaient les niveaux d'humidité optima pour la production de xylanases, rapportés pour les souches *Aspergillus niger* et *Paecilomyces thermophila* respectivement (**Kheng & Omar, 2005; Yang et al., 2006**).

En outre, nous supposons que ce développement le plus important sur la SSF a été démontré lorsque le taux d'humidité est très élevé, l'espace vide est occupé par l'eau et l'air se concentre, ce qui crée une certaine anaérobiose (**Rodríguez de Olmos et al., 2014**).

Dans les études menées par **Nishio, Tai, and Nagai (1979)**, la durée de la fermentation et la teneur en humidité varient généralement entre 35 et 75 % et peuvent changer en fonction de l'évaporation et de l'activité métabolique.

Pour la durée de fermentation, le niveau élevé du taux d'humidité diminue la porosité et la dispersion de l'oxygène, tandis qu'une faible humidité peut influencer négativement la croissance des micro-organismes en raison de la diminution de la solubilité des nutriments causée par une rapide évaporation de l'eau. De plus, la température d'incubation influence la formation du produit, la croissance des micro-organismes et la germination des spores (**Handa et al., 2014; Lonsane, 1992**).

Behnam et al. (2016) ont signalé que l'interaction de la température et du temps n'était pas significatif dans l'optimisation de la production de xylanase en fermentation solide par la souche *Mucor indicus*. Selon les études menées par **Yegin et al. (2016); dos Santos et al. (2017); Pathania, et al., (2017)**, une interaction entre le temps d'incubation et la température a un impact sur la production maximale de xylanases par *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 ; *Aspergillus niger* ; et *Rhizopus delemar* F2,

2. Validation du modèle

A partir de bases de données générées avec le logiciel Design Expert 11.6.0, les valeurs optimales des variables ont été déterminées. La validation des modèles statistiques et des équations de régression ont été effectuées à partir des conditions optimales proposées en exécutant les 04 essais de chaque réponse créée avec l'optimisation numérique dans les modèles (tableau 6). Les résultats des valeurs réelles et les valeurs prédites sont présentés dans le tableau 2.

Une corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales après optimisation confirme la validité des modèles et l'existence de valeurs optimales à l'essai n°1 pour les enzymes lignocellulolytiques.

Les conditions optimales révèlent pour un taux de production d'endoglucanases, exoglucanases, B-glucosidase, endoxylanase, B-xylosidase de de **324,28 U/ml. 11,799U/ml. 15,290 U/ml. 3361,10 U/ml** et 6,059U/ml respectivement. Les paramètres révélés sont, un

temps d'incubation de 6 jours, un taux d'humidité de 90%, et une température d'incubation de 24°C.

Tableau 6. Valeurs prédites et expérimentales de la production d'endo-exo-glucanase, B-glucosidase, endoxylanase et B-xylosidase dans des conditions optimales

Essais	Incubation time	Température	Humidité	Endoglucanase		Exoglucanase		B-glucosidase		Endoxylanase		B-xylosidase						
				Valeurs réelles	Valeurs prédites	Valeurs réelles	Valeurs prédites	Valeurs réelles	Valeurs prédites	Valeurs réelles	Valeurs prédites							
1	6	24,00	90,000	324,28	293,48	25,118	11,799	9,713	0,684	15,290	4,757	1,071	3361,10	3198,48	51,770	6,059	1,3861	0,422
2	5,793	24,00	89,999	324,32	468,33	25,127	11,813	12,14	0,685	15,265	4,25526	1,072	3363,78	3374,43	51,789	6,052	1,3355	0,422
3	5,806	24,01	89,997	324,07	407,62	25,040	11,807	10,40	0,682	15,290	4,33815	1,068	3357,17	2815,17	51,610	6,068	1,2388	0,421
4	6,660	24,00	76,189	316,08	389,58	18,080	10,417	7,979	0,493	18,147	4,28289	0,771	3320,33	3016,25	37,265	5,584	1,1973	0,304

III. Saccharification de la biomasse lignocellulosique

3. Prétraitement de la biomasse

La saccharification des substrats lignocellulosique nécessite des cocktails d'enzymes et des prétraitements les plus efficaces, en fonction de chaque matière première. La bagasse, la paille et le son de blé sont les résidus agricoles les plus importants au monde. Le prétraitement est utilisé pour éliminer une grande partie de la lignine, et pour rendre la cellulose de cette biomasse plus accessible. Le prétraitement alcalin avec NaOH améliore la digestibilité de la cellulose en réduisant fortement la teneur en lignine (**van Munster et al., 2014**) qui est solubilisée puis éliminée, laissant ainsi une fraction solide enrichie en polysaccharides.

Il a été signalé que la lignine pouvait déclencher une inactivation irréversible de la cellulase, même lorsque la biomasse lignocellulosique est prétraitée. Ceci est possible soit en formant une barrière physique qui empêche l'accès aux enzymes ou en liant de manière non productive les enzymes cellulolytiques (**Chaabouni et al., 1994; Méndez-Líter et al., 2020**). La liaison non productive des enzymes à la lignine est reconnue comme un problème à surmonter pour améliorer l'efficacité de la saccharification de la biomasse lignocellulosique prétraitée.

4. Saccharification de chêne de liège

La capacité du complexe enzymatique lignocellulolytique produit par la souche *A. niger* lors de la fermentation solide du chêne-liège a été évaluée et appliquée avec succès à la saccharification des matières lignocellulosique, à savoir la conversion du chêne-liège en monosaccharides.

La cinétique de saccharification a été réalisée pour tester l'efficacité de l'extrait enzymatique produit, à la fois sur des échantillons de chêne-liège non traités et traités. Les prélèvements ont été effectués à des intervalles de temps de 30 minutes, puis toutes les heures jusqu'à 8h, 24h, 48h et 72h.

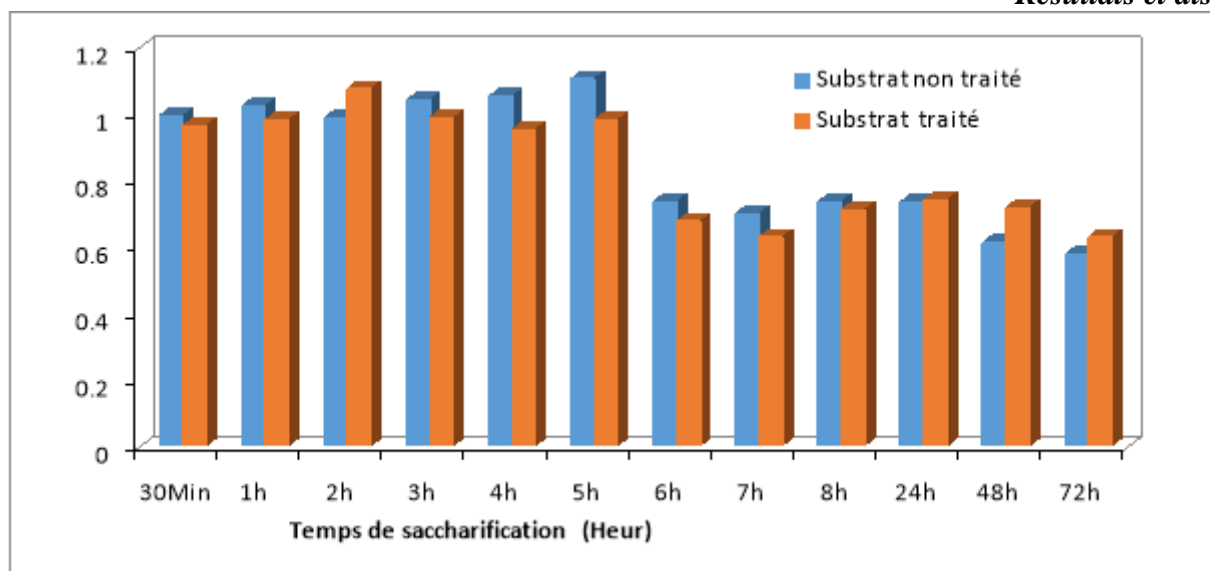


Figure 15 : Rendement de saccharification du chêne de liège non traité et chêne de liège traité par l'ajout des extraits enzymatiques produite par fermentation solide de chêne de liège

La cinétique d'hydrolyse révèle une augmentation progressive du taux de sucre réducteur libéré à partir de 3 heures, on remarque une diminution à partir de 6h jusqu'à 8h qui est probablement dû à une contamination par un microorganisme qui dégrade les unités de sucre libéré, puis une stabilisation au-delà de 12 heures. Ce phénomène est observé à la fois pour les substrats traités et non traités (Figure 15).

Par conséquent, ces résultats suggèrent que les enzymes produits par *A.niger* BG pourrait être de protéine appropriée dans le processus de valorisation de la biomasse lignocellulosique, représentant une alternative efficace et bon marché pour la saccharification de la biomasse lignocellulosique.

CONCLUSION
GENERALE
ET
PERSPECTIVES

Les biotechnologies industrielles font partie des technologies essentielles pour le développement économique de demain. Elles exploitent les micro-organismes et les enzymes, pour fabriquer divers produits.

L'objectif de cette étude était de développer des biocatalyseurs lignocellulolytiques naturelles par fermentation fongique sur substrats solides pour convertir le chêne de liège en sucres fermentescibles. Pour cela, une amélioration de la production d'enzymes de type cellulases et xylanases à partir de la fermentation solide de chêne du liège a été effectuée par optimisation des paramètres de fermentation par la méthode de RSM.

Dans la première étape de ce travail, des productions de xylanases et cellulases par *A. niger* strain BG, et *T. afroharzianum* TH ont été réalisées par fermentation solide avec le chêne-liège, pin, sapin et l'eucalyptus comme seule source de carbone pour évaluer et comparer leur production de CMCases et de xylanases. Puis elles ont été optimisées statistiquement en utilisant une approche RSM avec le substrat chêne-liège, confirmant que les rendements enzymatiques dépendent fortement de temps d'incubation, de l'humidité, et de la température d'incubation. L'importance de l'optimisation est liée à la valorisation de la production de xylanases et cellulases avec la souche d'*A. niger* strain BG en utilisant des sources de carbone économiques tel que le chêne-liège comme substrat de fermentation, et l'augmentation de la production de ces enzymes en économisant le temps de fermentation.

Les résultats obtenus après 7 jours de fermentation des différents substrats avec les deux souches BG et TH indiquent que la souche *Aspergillus niger* (BG) présente un potentiel enzymatique plus élevé que la souche de *Trichoderma afroharzianum* (TH) sur le substrat de chêne de liège

L'optimisation de la production d'enzymes lignocellulolytiques par *Aspergillus niger* a été réalisée à l'aide de la méthode de surface de réponse (RSM), en étudiant les variables telles que le temps d'incubation, la température et l'humidité.

Les résultats de l'optimisation sur BDD confirment que les modèles sont significatifs avec des valeurs réelles qui sont très proches de celles prédites. Les activités endoglucanase, exoglucanase, B-glucosidase, endoxylanase et B-xylosidase sont de 293,4891208 U/ml, 9,713587922 U/mL 4,757236842 U/ml, 3198,485841 U/ml et 1,386184211 U/ml respectivement avec les valeurs optimales des facteurs établis par le plan expérimental étaient de 6 jours d'incubation, une température de 24°C, avec une humidité de 90%.

Une fois l'extrait enzymatique obtenu avec les conditions optimales, la saccharification a été réalisée avec une synergie entre les complexes cellulases de types endo-exo-glucanase et B-glucosidase et xylanase de type endoxylanase et B-xylosidase, des cinétiques de saccharification ont été réalisées afin d'évaluer la production des oligosaccharides et des sucres fermentescibles par saccharification de chêne de liège traité et non traité. Ces résultats suggèrent que les enzymes pourraient être intéressantes pour les processus biotechnologiques.

Enfin, les résultats prometteurs de cette étude ouvrent de nombreuses perspectives.

- Amélioration de l'efficacité des processus de conversion de la biomasse lignocellulosique,
- L'utilisation de fermentations mixtes dans la production d'enzymes offre la possibilité d'obtenir des mélanges enzymatiques plus complexes.
- L'amélioration de l'accessibilité du substrat constitue une étape fondamentale dans le processus de saccharification,
- La production de biocarburants, de produits chimiques biosourcés et d'autres produits à valeur ajoutée grâce à la saccharification de la biomasse lignocellulosique.
- Optimisation des paramètres de saccharification dans un fermenteur pour le suivi de la stabilité des enzymes et son impact sur le rendement.
- Le procédé SFS (saccharification et fermentation simultanées)

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

A

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, *101*(13), 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Ang, S. K., Yahya, A., Aziz, S. A., & Salleh, M. (2015). Isolation , Screening , and Identification of Potential Cellulolytic and Xylanolytic Producers for Biodegradation of Untreated Oil Palm Trunk and Its Application in Saccharification of Lemongrass Leaves. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *45*(3), 279–305. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.923443>
- Argyropoulos, D. S., & Menachem, S. B. (1998). Lignin. In *Biopolymers from Renewable Resources* (pp. 292–322). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03680-8_12
- Asgher, M., Ijaz, A., & Bilal, M. (2016). *Lignocellulose-degrading enzyme production by Pleurotus sapidus WC 529 and its application in lignin degradation*. *41*(1), 26–36. <https://doi.org/10.1515/tjb-2016-0005>
- Azzouz, Z., Bettache, A., Boucherba, N., Amghar, Z., & Benallaoua, S. (2020). OPTIMIZATION OF XYLANASE PRODUCTION BY NEWLY ISOLATED STRAIN *TRICHODERMA AFROHARZIANUM* ISOLATE AZ 12 IN SOLID STATE FERMENTATION USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. *CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY Cellulose Chem. Technol*, *54*(6), 451–462. <https://doi.org/10.35812/CelluloseChemTechnol.2020.54.46>
- Azzouz, Z., Bettache, A., Boucherba, N., Prieto, A., Martinez, M. J., Benallaoua, S., & de Eugenio, L. I. (2021). Optimization of β -1,4-endoxylanase production by an *Aspergillus niger* strain growing on wheat straw and application in xylooligosaccharides production. *Molecules*, *26*(9), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules26092527>
- Azzouz, Z., Bettache, A., Djinni, I., Boucherba, N., & Benallaoua, S. (2020). Biotechnological production and statistical optimization of fungal xylanase by bioconversion of the lignocellulosic biomass residues in solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01018-z>
- Azzouz, Z., Bettache, A., Djinni, I., Boucherba, N., & Benallaoua, S. (2022a). Biotechnological production and statistical optimization of fungal xylanase by bioconversion of the lignocellulosic biomass residues in solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *12*(12), 5923–5935. <https://doi.org/10.1007/S13399-020-01018-Z/FIGURES/6>
- Azzouz, Z., Bettache, A., Djinni, I., Boucherba, N., & Benallaoua, S. (2022b). Biotechnological production and statistical optimization of fungal xylanase by bioconversion of the lignocellulosic biomass residues in solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *12*(12), 5923–5935. <https://doi.org/10.1007/S13399-020-01018-Z/FIGURES/6>

B

- Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I., Shouche, Y., & Ninnekar, H. Z. (2016). Xylanase production from *Penicillium citrinum* isolate HZN13 using response surface methodology and characterization of immobilized xylanase on glutaraldehyde-activated calcium-alginate

- beads. *3 Biotech*, 6(2), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0484-9>
- Bailey, M. J., Biely, P., Kaisa, P., Bailey, J. M., Biely, P., Poutanen, K., Bailey, M. J., Biely, P., & Kaisa, P. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23, 257–270.
- Bano, S., Ali, S., Qader, U., Aman, A., Noman, M., & Durrani, K. (2013). High production of cellulose degrading endo-1, 4- β -D-glucanase using bagasse as a substrate from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS 8. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 300–304. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.022>
- Behnam, S., Karimi, K., & Khanahmadi, M. (2019). Cellulase Production Under Solid-State Fermentation by Ethanolic Zygomycetes Fungi: Application of Response Surface Methodology. *Nutrition and Food Sciences Research*, 6(1), 27–34. <https://doi.org/10.29252/nfsr.6.1.27>
- Behnam, S., Karimi, K., Khanahmadi, M., Agriculture, I., Resources, N., & Salimian, Z. (2016). Optimization of xylanase production by *Mucor indicus*, *Mucor hiemalis*, and *Rhizopus oryzae* through solid state fermentation. *Biological Journal of Microorganism*, 4(16), 1–10.
- BERLIOZ, S. (2007). *UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1 DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER Etude de l'estérification de la cellulose par une synthèse sans solvant. Application aux matériaux nanocomposites.*
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008a). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008b). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2008.05.019>
- Binod, P., Janu, K. U., Sindhu, R., & Pandey, A. (2011). Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, 229–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00010-3>
- Braaksma, M., Martens-Uzunova, E. S., Punt, P. J., & Schaap, P. J. (2010). An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining in silico predictions with shotgun proteomics data. *BMC Genomics*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-584>
- Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Rahmanpour, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. In *Natural Product Reports* (Vol. 28, Issue 12, pp. 1883–1896). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c1np00042j>

C

- Chaabouni, S. E., Hadj-Taieb, N., Mosrati, R., & Ellouz, R. (1994). Preliminary assessment of *Penicillium occitanis* cellulase: A further useful system. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(6), 538–542. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90027-2)
- Chastel, C. F. (2020). *Exploration de sécrétomes d'Aspergillus spp. en vue de la complémentation du cocktail cellulolytique de Trichoderma reesei.*

- Chen, H. (2013). *Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice* (Springer D). Springer Dordrecht Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1>
- Chen, H., Han, Y., & Xu, J. (2008). Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. *Process Biochemistry*, 43(12), 1462–1466. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.07.003>
- Chen, L. L., Zhang, M., Zhang, D. H., Chen, X. L., Sun, C. Y., Zhou, B. C., & Zhang, Y. Z. (2009). Purification and enzymatic characterization of two β -endoxylanases from *Trichoderma sp.* K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. *Bioresource Technology*, 100(21), 5230–5236. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.038>
- Chen, W., Wang, W.-P., Zhang, H.-S., & Huang, Q. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis mycelia* using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 614–619. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.029>
- Chen, Y., Stevens, M. A., Zhu, Y., Holmes, J., & Xu, H. (2015). Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Fuel Production from Non-Food Biomass: Corn Stover*, 131–153. <https://doi.org/10.1201/b18437>
- Cragg, S. M., Beckham, G. T., Bruce, N. C., Bugg, T. D. H., Distel, D. L., Dupree, P., Etxabe, A. G., Goodell, B. S., Jellison, J., McGeehan, J. E., McQueen-Mason, S. J., Schnorr, K., Walton, P. H., Watts, J. E. M., & Zimmer, M. (2015). Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 29, pp. 108–119). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.018>

D

- da Silva Menezes, B., Rossi, D. M., Squina, F., & Marco, A. Z. A. (2018). Comparative production of xylanase and the liberation of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass by *Aspergillus brasiliensis* BLf1 and recombinant *Aspergillus nidulans* XynC. *International Journal of Food Sciences and Technology*, 53(9), 2110–2118. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13798>
- Dai, X., Liu, M., Jin, H., & Jing, M. (2011). Optimisation of Solid-state Fermentation of *Aspergillus niger* JL-15 for Xylanase Production and Xylooligosaccharides Preparation. *Czech J. Food Sci*, 29(5), 557–567. <https://doi.org/10.17221/103/2010-CJFS>
- Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009). *Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues ; Opportunities & Perspectives*. 5(6), 578–595.
- de Almeida Antunes Ferraz, J. L., Oliveira Souza, L., Gustavo de Araújo Fernandes, A., Luiz Ferreira Oliveira, M., de Oliveira, J. R., & Franco, M. (2020). Optimization of the solid-state fermentation conditions and characterization of xylanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 using yellow mombin residue (*Spondias mombin* L.). *Chemical Engineering Communications*, 207(1), 31–42. <https://doi.org/10.1080/00986445.2019.1572000>
- de Gonzalo, G., Colpa, D. I., Habib, M. H. M., & Fraaije, M. W. (2016). Bacterial enzymes involved in lignin degradation. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 236, pp. 110–119). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.011>
- Dhepe, P. L., & Fukuoka, A. (2008). Cellulose conversion under heterogeneous catalysis. In *ChemSusChem* (Vol. 1, Issue 12, pp. 969–975). John Wiley & Sons, Ltd.

<https://doi.org/10.1002/cssc.200800129>

dos Santos, T. C., dos Santos Reis, N., Silva, T. P., Bonomo, R. C. F., Aguiar-Oliveira, E., de Oliveira, J. R., & Franco, M. (2017). Production , Optimisation and Partial Characterisation of Enzymes from Filamentous Fungi Using Dried Forage Cactus Pear as Substrate. *Waste and Biomass Valorization*, 9(4), 571–579. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9810-z>

Duchiron, F., & Copinet, E. (2011). Fermentation en milieu solide (FMS). In *Document (Doc. BIO 620)*.

Dumon, C., Song, L., Bozonnet, S., Fauré, R., & O'Donohue, M. J. (2012). Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. In *Process Biochemistry* (Vol. 47, Issue 3, pp. 346–357). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.06.017>

E

Eloutassi, N., Louaste, B., Boudine, L., & Remmal, E. A. (2014). Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération. *Revue Des Energies Renouvelables*, 17, 4–600.

G

Gallage, N. J., Hansen, E. H., Kannangara, R., Olsen, C. E., Motawia, M. S., Jørgensen, K., Holme, I., Hebelstrup, K., Grisoni, M., & Møller, B. L. (2014). Vanillin formation from ferulic acid in *Vanilla planifolia* is catalysed by a single enzyme. *Nature Communications*, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms5037>

Gao, D., Chundawat, S. P. S., Sethi, A., Balan, V., Gnanakaran, S., & Dale, B. E. (2013). *Increased enzyme binding to substrate is not necessary for more efficient cellulose hydrolysis.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1213426110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1213426110>

Goldbeck, R., Ramos, M. M., Pereira, G. A. G., & Maugeri-filho, F. (2013). Bioresource Technology Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. *Bioresource Technology*, 128, 797–803. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.034>

Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(4), 435–448. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90184-I](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90184-I)

Grootaert, C., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. (2007). Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 18, Issue 2, pp. 64–71). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.08.004>

Guo, H., Chang, Y., & Lee, D. J. (2018). Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses. *Bioresource Technology*, 252, 198–215. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.12.062>

H

H. Isikgor, F., & Remzi Becer, C. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 6(25), 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>

Références bibliographique

- Handa, C. L., Couto, U. R., Vicensoti, A. H., Georgetti, S. R., & Ida, E. I. (2014). Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. *Food Chemistry*, *152*, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.101>
- He, X. ling, Song, C., Li, Y. yuan, Wang, N., Xu, L., Han, X., & Wei, D. sheng. (2018a). Efficient degradation of Azo dyes by a newly isolated fungus *Trichoderma tomentosum* under non-sterile conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *150*, 232–239. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2017.12.043>
- He, X., Song, C., Li, Y., Wang, N., Xu, L., Han, X., & Wei, D. (2018b). Efficient degradation of Azo dyes by a newly isolated fungus *Trichoderma tomentosum* under non-sterile conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *150*(December 2017), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.043>
- Himmel, M. E. (2009). Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy. In *Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*. <https://doi.org/10.1002/9781444305418>
- Ho, U. (2005). *Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages ?* 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.006>
- Horbury, M. D., Baker, L. A., Quan, W. D., Greenough, S. E., & Stavros, V. G. (2016). Photodynamics of potent antioxidants: Ferulic and caffeic acids. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *18*(26), 17691–17697. <https://doi.org/10.1039/c6cp01595f>

K

- Kamm, B., & Kamm, M. (2004). Principles of biorefineries. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 64, Issue 2, pp. 137–145). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1537-7>
- Kane, A. O., Pellergini, V. O. A., Espirito Santo, M. C., Ngom, B. D., García, J. M., Acevedo, A., Erazzú, L. E., & Polikarpov, I. (2022). Evaluating the Potential of Culms from Sugarcane and Energy Cane Varieties Grown in Argentina for Second-Generation Ethanol Production. *Waste and Biomass Valorization*, *13*(1), 329–343. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01528-5>
- KAYSER, E. (1921). La fermentation lactique. *Le Lait*, *1*(4), 184–191. <https://doi.org/10.1051/lait:1921413>
- KHELFA, A. (2009). *Etude des étapes primaires de la dégradation thermique de la biomasse lignocellulosique*.
- Kheng, P. P., & Omar, I. C. (2005). Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. *J. Sci. Technol*, *27*(2), 325–336.
- Khusro, A., Kaliyan, B. K., Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., & Agastian, P. (2016). Statistical optimization of thermo-alkali stable xylanase production from *Bacillus tequilensis* strain ARMATI. *Electronic Journal of Biotechnology*, *22*, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.04.002>

L

- Lonsane, B. K. (1992). *Trichoderma harzianum* IN. 6(5), 429–432.
- López-Mondéjar, R., Algora, C., & Baldrian, P. (2019). Lignocellulolytic systems of soil bacteria: A vast and diverse toolbox for biotechnological conversion processes. In *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Issue 6, p. 107374). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.013>

M

- Mahmoud, K. A., Male, K. B., Hrapovic, S., & Luong, J. H. T. (2009). Cellulose nanocrystal/gold nanoparticle composite as a matrix for enzyme immobilization. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 1(7), 1383–1386. <https://doi.org/10.1021/am900331d>
- Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M., & Guimarães, V. ria M. (2015). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, 1(1), 44–49. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2014.10.001>
- Makut, M. D., & Godiya, E. M. (2010). *A survey of cellulolytic mesophilic fungi in the soil environment of Keffi Metropolis , Nasarawa State , Nigeria*. 4(21), 2191–2195.
- Malherbe, S., & Cloete, T. E. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 1, Issue 2, pp. 105–114). Springer. <https://doi.org/10.1023/A:1020858910646>
- Mandels, M., & Weber, J. (1969, June). The Production of Cellulases. *Food Microbiology*.
- Méndez-Líter, J. A., Nieto-Domínguez, M., Fernández De Toro, B., González Santana, A., Prieto, A., Asensio, J. L., Cañada, F. J., De Eugenio, L. I., & Martínez, M. J. (2020). A glucotolerant β -glucosidase from the fungus *Talaromyces amestolkiae* and its conversion into a glycosynthase for glycosylation of phenolic compounds. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01386-1>
- Menezes, S., Misturini, D., Marco, R., & Záchia, A. (2017). Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk , soybean hull , and spent malt as substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2226-5>
- Miller, G.-L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. P. J. (2011). *21st Century Guidebook to Fungi Fungi* (Cambridge). United States of America by Cambridge University Press, New York.
- Mussatto Solange.I, Ballesteros Lina F, Martins Silvia, & Teixeira J.H. (2012). Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. *Industrial Waste*, 274.

N

- Nadia, B.-B., & M. (2016). *Optimisation de la synthèse enzymatique d'esters de sucres par la méthodologie des plans d'expériences*.
- Narra, M., Dixit, G., Divecha, J., Kumar, K., Madamwar, D., & Shah, A. R. (2014).

Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 150–161. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2013.12.016>

Navarro, D., Couturier, M., Silva, G. G. D. da, Berrin, J.-G., Rouau, X., Asther, M., & Bignon, C. (2010). Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass. *Microbial Cell Factories* 2010 9:1, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-58>

Nishio, N., Tai, K., & Nagai, S. (1979). Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 8(4), 263–270. <https://doi.org/10.1007/BF00508790>

Norkrans, B. (1957). Studies of β -glucoside- and Cellulose Splitting Enzymes from *Polyporusannosus* Fr. *Physiologia Plantarum*, 10(1), 198–214. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1957.TB07621.X>

O

Ogier, J., Ballerini, D., Leygue, J., & Pourquié, L. R. J. (1999). Production d' éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Science And Technology*, 54(1), 67–94.

P

Pandey, A. (2003). *Solid-state fermentation*. 13(July 2002), 81–84.

Passos, D. de F., Pereira, N., & Castro, A. M. de. (2018). A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 60–66. <https://doi.org/10.1016/J.COGSC.2018.06.003>

Pathania, S., Sharma, N., & Handa, S. (2017). Optimization of culture conditions using response surface methodology for synergism production of cellulase, xylanase and pectinase by *Rhizopus delemar* F2 under solid state fermentation. *Journale of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 1872–1878.

Patten, S. B., & Streiner, D. L. (2021). P Values and Confidence Intervals. *Canadian Journal of Psychiatry*, 66(4), 421–422. <https://doi.org/10.1177/0706743720962277>

Percival Zhang, Y. H., Himmel, M. E., & Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. In *Biotechnology Advances* (Vol. 24, Issue 5, pp. 452–481). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>

Polizeli, M. lourdes T. . (n.d.). *Fungal Enzymes*. Retrieved June 18, 2023, from https://books.google.co.in/books?hl=en&lr=&id=LnfSBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA280&dq=related:es7IWTVSUYQJ:scholar.google.com/&ots=Pk41dd09AG&sig=76WMgAPCnS0q3E3FVh-gNT7wZiE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Pollegioni, L., Tonin, F., & Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. In *FEBS Journal* (Vol. 282, Issue 7, pp. 1190–1213). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.13224>

R

Rahardjo, Y. S. P., Tramper, J., & Rinzema, A. (2006). *Modeling conversion and transport*

phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. 24, 161–179.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.002>

Rodríguez de Olmos, A., Bru, E., Garro, M. S., de Olmos, R., Bru, E., & Garro, M. S. (2014). Optimization of fermentation parameters to study the behavior of selected lactic cultures on soy solid state fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 16–23.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.030>

S

Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., & Wu, Y. V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, 40(12), 3693–3700. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2005.04.006>

Sandhu, S. K., Oberoi, H. S., Babbar, N., Miglani, K., Chadha, B. S., & Nanda, D. K. (2013). Two-Stage Statistical Medium Optimization for Augmented Cellulase Production via Solid-State Fermentation by Newly Isolated *Aspergillus niger*HN-1 and Application of Crude Cellulase Consortium in Hydrolysis of Rice Straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(51), 12653–12661. <https://doi.org/10.1021/JF403083G>

Sanga Pachuau, L. (2015). A Mini Review on Plant-based Nanocellulose: Production, Sources, Modifications and Its Potential in Drug Delivery Applications. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 15(10), 543–552.

Silva, V. F. N., Arruda, P. V., Felipe, M. G. A., Gonçalves, A. R., & Rocha, G. J. M. (2011). Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(7), 809–817. <https://doi.org/10.1007/S10295-010-0815-5>

Silvério, S. (2013). SUSTAINABLE DEGRADATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS - TECHNIQUES , APPLICATIONS AND Edited by Anuj K. Chandel and Silvio Silvério da Silva. In *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass - Techniques, applications and commercialization*. <https://doi.org/10.5772/1490>

Singh, S., Tyagi, C. H., Dutt, D., & Upadhyaya, J. S. (2009). Production of high level of cellulase-poor xylanases by wild strains of white-rot fungus *Coprinellus disseminatus* in solid-state fermentation. *New Biotechnology*, 26(October), 4–9.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.09.004>

Soni, R., Nazir, A., & Chadha, B. S. (2010). Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus fresenius* strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. 31, 277–283.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.007>

Souza, W. R. De. (2013). *Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass*.

Srivastava, A., Singh, V., Haque, S., Pandey, S., Mishra, M., Jawed, A., Shukla, P. K., Singh, P. K., & Tripathi, C. K. M. (2018). Response Surface Methodology-Genetic Algorithm Based Medium Optimization, Purification, and Characterization of Cholesterol Oxidase from *Streptomyces rimosus*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-29241-9>

Sumiati, T., Suryadi, H., & Sutriyo, H. (2022). Isolation of White Rot Fungi from Rotten Wood from Bogor Botanical Garden in Indonesia and its Ligninolytic Enzymes Activity.

Pharmacognosy Journal, 14(1), 68–75. <https://doi.org/10.5530/pj.2022.14.10>

T

TAO, Y.-M., ZHU, X.-Z., HUANG, J.-Z., MA, S.-J., WU, X.-B., MIN-NAN, L., & QING-XI, C. (2010). Purification and Properties of Endoglucanase from a Sugar Cane Bagasse Hydrolyzing Strain, *Aspergillus glaucus* XC9. *J? Agric. Food Chem*, 58, 6126–6130. <https://doi.org/10.1021/jf1003896>

V

Vaillé, J., & Goupy, J. (2006). *Construire et interpréter un Plan d ' expériences factoriel complet*. 1–5.

van Munster, J. M., Daly, P., Delmas, S., Pullan, S. T., Blythe, M. J., Malla, S., Kokolski, M., Noltorp, E. C. M. M., Wennberg, K., Fetherston, R., Beniston, R., Yu, X., Dupree, P., Archer, D. B., Munster, J. M. Van, Daly, P., Delmas, S., Pullan, S. T., Blythe, M. J., ... Archer, D. B. (2014). The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.04.006>

W

Wahid, Z., & Nadir, N. (2013). *Improvement of One Factor at a Time Through Design of Experiments 1. 21*, 56–61. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.21.mae.99919>

Wertz, J.-L., Richel, A., & Gérin, P. (2015). Molécules issues de la valorisation de la lignine. *ValBiom, Mars*(1), 1–37. <http://hdl.handle.net/2268/182162>

Westphal, K. R., Heidelbach, S., Zeuner, E. J., Riisgaard-Jensen, M., Nielsen, M. E., Vestergaard, S. Z., Bekker, N. S., Skovmark, J., Olesen, C. K., Thomsen, K. H., Niebling, S. K., Sørensen, J. L., & Sondergaard, T. E. (2021). The effects of different potato dextrose agar media on secondary metabolite production in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 347. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2021.109171>

X

Xie, Y., Hu, P., Zhu, N., Lei, F., Xing, L., & Xu, L. (2020). Collaborative optimization of ground source heat pump-radiant ceiling air conditioning system based on response surface method and NSGA-II. *Renewable Energy*, 147, 249–264. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.109>

Y

Yadav, J. S. (1988). SSF of Wheat Straw with *Alcaliphilic Coprinus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(5), 414–417.

Yang, S. Q., Yan, Q. J., Jiang, Z. Q., Li, L. T., Tian, H. M., & Wang, Y. Z. (2006). High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 97, 1794–1800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.09.007>

Yanto, D. H. Y., Auliana, N., Anita, S. H., & Watanabe, T. (2019). Decolorization of synthetic textile dyes by laccase from newly isolated *Trametes hirsuta* EDN084 mediated by violuric acid. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 374(1), 0–7.

<https://doi.org/10.1088/1755-1315/374/1/012005>

Yegin, S., Oguz, A., Sayit, B., & Yekta, S. (2016). Exploitation of Agricultural Wastes and By-Products for Production of *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 Xylanase : Screening , Bioprocess Optimization and Scale Up. *Waste Biomass Valor*, 8(3), 999–1010. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9646-6>

Z

Zahra, M. A. (2016). *Production de cellulases et de xylanases fongiques par fermentation solide et liquide à base de paille et de son de blé Soutenu.*

Zhang, X., Qin, W., Paice, M. G., & Saddler, J. N. (2009). High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. *Bioresource Technology*, 100(23), 5890–5897. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.06.082>

ANNEXES

Milieux de culture**1. Milieux PDA (agar pomme de terre-dextrose)(Saint-Germain, 2013)**

Composant	Quantité
Pomme de terre	200g
Dextrose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 litre
Ph	5.0
Stérilisation	121°C /20 min

2. Milieux mendels et Weber (mandels and weber, 1969).

Composant	Quantité
KH ₂ PO ₄	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,7g
Urée	0,30g
MgSO ₄ 7H ₂ O ₂	0,30g
CaCl ₂	0,30g
FeSO ₄ +7H ₂ O ₂	5mg
MnSO ₄ +H ₂ O	1,6mg
ZnSO ₄ +7H ₂ O	1,4g
COCl ₂	2mg
Eau distillé	1L
pH	5

Réactif et tampon.**1. Tampon citrate de sodium (50mM, pH 5) (Zhang et al., 2009)**

Composant	Quantité	Concentration
Citrate de sodium déshydraté MM : 294,10 g/mol)	25,703g	0,0874 M
Acide citrique (MM : 192,12 g/mol)	2.421g	0,0126 M

Préparer 800 ml d'eau distillée dans un récipient approprié.

Ajouter 25,703 g de citrate de sodium dihydraté à la solution.

Ajouter 2,421 g d' acide citrique à la solution.

Ajuster la solution au pH final de 5 en utilisant HCl ou NaOH

Ajouter de l'eau distillée jusqu'à ce que le volume soit de 1 L.

2. Réactif DNS (Ghose, 1987)

Composant	Quantité
DNS	10g
NaOH	16g
Tartrate double de sodium et de potasium	300g
Eau distillé	1litre

Le tartrate est ajouté par petite quantité avec un léger chauffage (50°C) si nécessaire pour éviter la formation des grumeaux insolubles. La solution est préparée dans l'obscurité puis filtré et conserver à l'abri de la lumière dans un flacon couvert d'aluminium.

Courbes d'étalonnage.

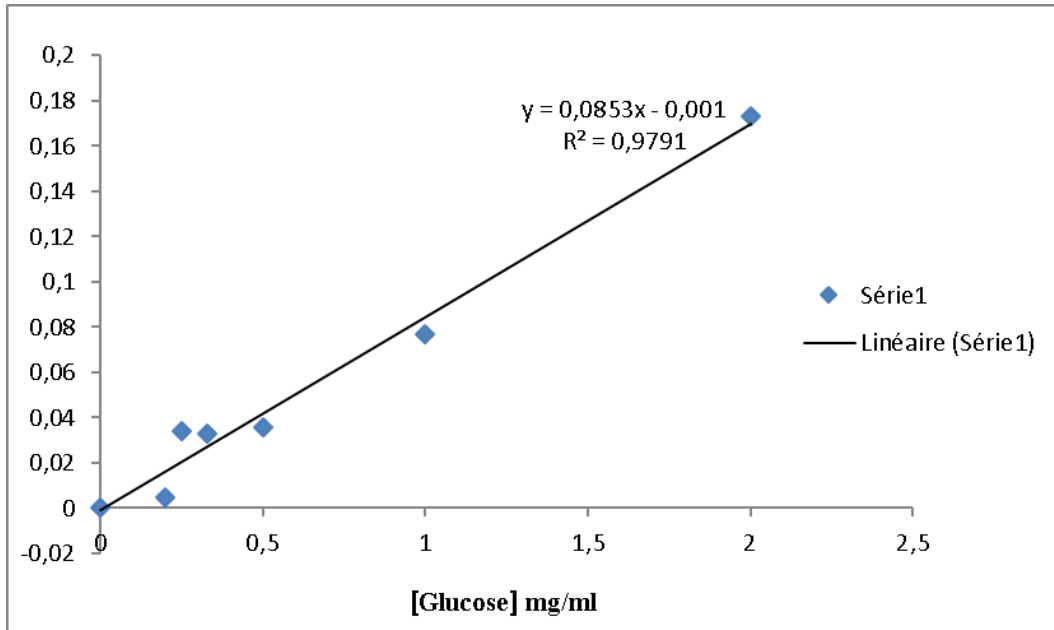


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de glucose à 2g/L.

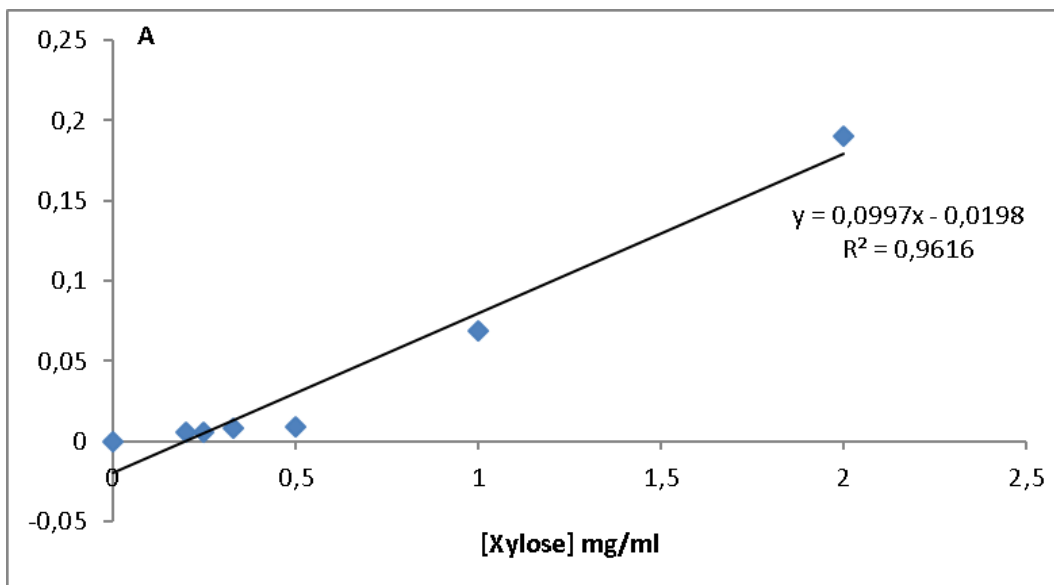


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de xylose.

Diagramme de surface de réponse

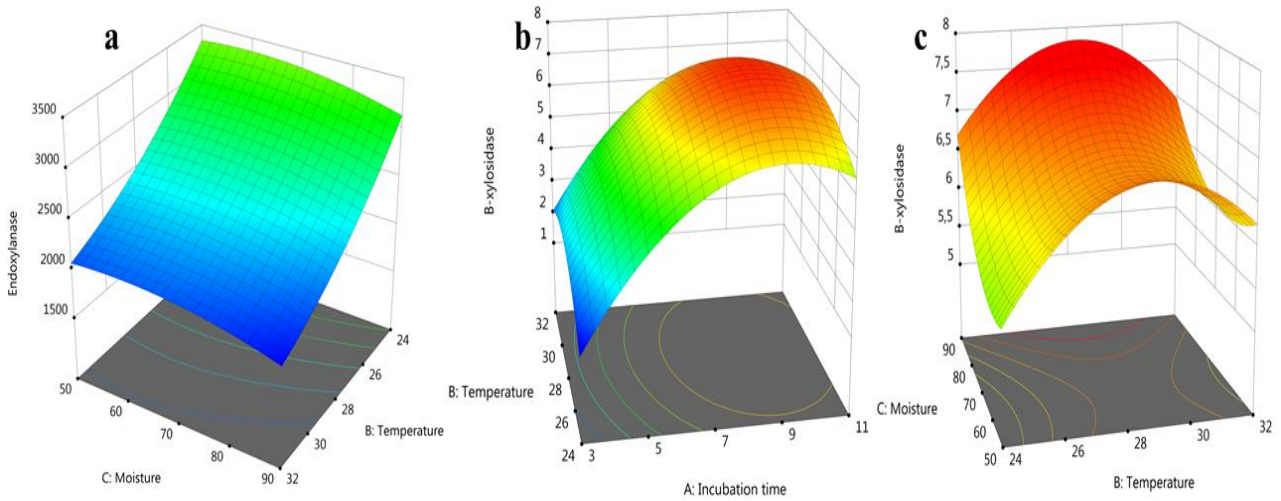


Figure 1. Diagramme de surface des réponses endoxylanase et B-xylosidase pour les modèles de l'interaction entre : l'humidité et la température (a) pour la réponse endoxylanase. Et l'interaction entre la température et le temps d'incubation (b), la température d'incubation et le taux d'humidité (c), pour la réponse B-xylosidase.

Résumé

La biomasse lignocellulosique est une ressource prometteuse pour la production de biocarburants, de produits chimiques biosourcés et d'enzymes fongiques, grâce à sa composition complexe riche en cellulose, hémicellulose et lignine. Les champignons filamenteux, jouent un rôle important dans la biodégradation de la biomasse lignocellulosique. En effet, la fermentation en milieu solide s'avère être une méthode innovante pour la croissance de ces champignons sur un support solide.

Ce travail est basé sur l'optimisation des paramètres influençant la production d'enzymes lignocellulolytiques par SSF, suite à la sélection de la souche *Aspergillus niger* et du substrat de chêne-liège en tant que meilleurs résultats. Au cours de ce travail, l'optimisation du processus de fermentation est effectuée à l'aide de la méthodologie de la surface de réponse (RSM) en utilisant le modèle de Box-Behnken (BBD). Les paramètres principaux au SSF, tels que la température, le temps d'incubation et l'humidité, ont été étudiés en vue d'obtenir une amélioration et une reproductibilité accrue des enzymes.

Des activités endoglucanase, exoglucanase, B-glucosidase, endoxylanase, B-xylosidase ont été atteintes après 6 jours de fermentation à 28°C, avec un taux d'humidité de 90%, respectivement 324.288U/ml, 11.799U/ml, 15.290U/ml, 3361.108U/ml, 6.059U/ml. Un extrait enzymatique obtenu a permis de réaliser une étude sur la saccharification du chêne-liège traité et non traité, qui a permis un suivi du taux de sucres réducteurs pour le chêne-liège non traité et pour le chêne-liège traité. Ce processus est crucial pour la production ultérieure de bioproduits tels que les biocarburants ou les produits chimiques biosourcés.

Mots Clés: Optimisation Cellulases, Xylanases, Fermentation, *Aspergillus niger*, Saccharification

Abstract

Lignocellulosic biomass is a promising resource for producing biofuels, biobased chemicals and fungal enzymes, due to its complex composition rich in cellulose, hemicellulose and lignin. Filamentous fungi have an important role in biodegradation of lignocellulosic biomass. In fact, solid-state fermentation is proving to be an innovative method for growing these fungi on a solid medium.

This study is based on the optimization of parameters influencing the production of lignocellulolytic enzymes using SSF, based on the selection of the *Aspergillus niger* strain and the cork oak substrate as the most suitable. Optimization of the fermentation process is carried out using response surface methodology (RSM) and the Box-Behnken Design (BBD). The main parameters at SSF, such as temperature, incubation time and humidity, were examined in order to achieve improved enzyme performance and reproducibility.

After 6 days of fermentation at 28°C and 90% humidity, the enzymes endoglucanase, exoglucanase, B-glucosidase, endoxylanase and B-xylosidase activities were respectively 324.288U/ml, 11.799U/ml, 15.290U/ml, 3361.108U/ml and 6.059U/ml. The resulting enzymatic extract was used to carry out a saccharification test on treated and untreated cork oak, which enabled us to monitor the level of reducing sugars in both untreated and treated cork oak. This process is crucial for the subsequent production of bioproducts such as biofuels or biobased chemicals.

Keywords: Optimization Cellulases, Xylanases, Fermentation, *Aspergillus niger*, Saccharification

المخلص

الكتلة الحيوية Lignocellulosic هي مورد واعد لإنتاج الوقود الحيوي والمواد الكيميائية الحيوية والإنزيمات الفطرية ، نظراً لتكوينها المعقد الغني بالسليولوز والهيميسليولوز واللجنين. الفطريات الخيطية لها دور مهم في التحلل البيولوجي للكتلة الحيوية lignocellulosic. في الواقع ، يثبت التخمر في الحالة الصلبة أنه طريقة مبتكرة لزراعة هذه الفطريات على وسط صلب.

تعتمد هذه الدراسة على تحسين المعلمات التي تؤثر على إنتاج الإنزيمات المحللة للخلايا الجذعية باستخدام SSF ، بناءً على اختيار سلالة *Aspergillus niger* وركيزة البلوط الفلين باعتبارها الأنسب. يتم تحسين عملية التخمر باستخدام منهجية سطح الاستجابة (RSM) وتصميم (BBD) Box-Behnken تم فحص المعلمات الرئيسية في SSF ، مثل درجة الحرارة ووقت الحضانة والرطوبة ، من أجل تحقيق أداء إنزيم محسن وقابلية للتكاثر.

بعد 6 أيام من التخمر عند 28 درجة مئوية و 90٪ رطوبة ، كانت أنشطة إنزيمات الإندوغلوكاناز ، إكسوجلوكاناز ، B-glucosidase ، إندوكسيلاناز و B-xylosidase على التوالي 324.288 U / ml ، 11.799U / ml ، 15.290U / ml ، 3361.108U / ml و 6.059 U / ml. تم استخدام المستخلص الأنزيمي الناتج لإجراء اختبار التكسير على بلوط الفلين المعالج وغير المعالج ، مما مكّننا من مراقبة مستوى السكريات المختزلة في كل من بلوط الفلين غير المعالج والمعالج. هذه العملية حاسمة للإنتاج اللاحق للمنتجات الحيوية مثل الوقود الحيوي أو المواد الكيميائية الحيوية.

الكلمات الرئيسية: التحسين السليولاز ، الزيلاينز ، التخمر *Aspergillus niger* ، التسكر