

RECHERCHE D'UN MILIEU OPTIMAL POUR LA PRODUCTION DE LA β -GLUCOSIDASE CHEZ *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) MUTANT *albino*

Reçu le 17/02/2002 – Accepté le 14/03/2004

Résumé

Aspergillus fumigatus (Fresenius) mutant *albino*, isolé dans notre laboratoire et qui a déjà fait l'objet d'une étude sur la production des enzymes cellulolytiques et xylanolytiques, s'est distingué par son hyperproduction en β -glucosidase (enzyme majeure du système cellulolytique). La production de cette dernière, sur différents milieux, a montré qu'il est possible d'améliorer de 8 à 10 fois les rendements en jouant sur la composition en différents éléments nutritifs. Les caractéristiques mises en évidence peuvent ouvrir une application potentielle dans le processus d'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique.

La fermentation est réalisée en milieu liquide sous agitation rotative à 150 tours/min, à +45°C sur des résidus lignocellulosiques variés : *A. fumigatus* (Fresenius) mutant *albino* présente d'excellentes activités enzymatiques en présence de 4% d'alfa, avec comme source d'azote optimale, le sulfate d'ammonium à 0.8%, sans adjonction d'éléments minéraux autre que le Mg⁺ (MgCl₂) à 0.1%. La production en milieu optimisé est de 8972 U/ml, correspondant à une amélioration du rendement de 10 fois par rapport au milieu de base (820 U/ml).

Mots clés: Cellulases, β -glucosidase, *Aspergillus fumigatus ssp albino*, culture agitée, prétraitements, substrats lignocellulosiques, milieu optimal.

Abstract

Aspergillus fumigatus (Fresenius) *albino* mutant, a thermophilic mold strain isolated in a previous work, has a capacity of producing large amounts of β -glucosidase (major cellulolytic component), is used in this present work to maximize the production of this enzyme including chemical treatments of the raw lignocellulosic substrates. This enzyme, because of its particular limitation in other fungi strains, can have a potential application in industrial hydrolytic processes. In this work, we obtained the maximum activities and growth with 4% of alfa, a lignocellulosic carbon source, ammonium sulfate at 0.8% as the optimal nitrogen source and combined treatment of the substrate (alfa) with acetic acid and hydrogen peroxide, in a simple medium containing MgCl₂ as lonely mineral ion. In these conditions, the enzyme showed a maximum titer after 120 hours cultivations at +45°C: the activities obtained were 10 fold greater than those in the basal liquid medium tested.

Keywords: Cellulase, β -glucosidase, submerged culture, chemical treatments, optimal medium, lignocellulosic materials, *Aspergillus fumigatus albino mutant strain*.

N. SARADOUNI¹
M. PENNINGCKX²
O. MOHAND-OUSSAID¹
S. BENALLAOUA³

¹Laboratoire de Microbiologie & Bioconversions URBAF
Faculté des Sciences Biologiques & Agronomiques
Université M. Mammeri
Tizi-Ouzou 15 000 (Algérie)
²UPEM c/o Institut Pasteur du Brabant, 642, Rue Engeland, 1180 Brussels (Belgique)
³Laboratoire de Biochimie
Université A. Mira
06000 Béjaïa (Algérie)

ملخص

استعمل فطور *A.fumigatus ssp albino* في هذه الدراسة بين أنه منتج كبير لأنزيم β -Glucosidase عنصر أساسي فعال في تفكيك مادة السيليلوز الطبيعية. وفي هذا السياق تم تهيئة وسط غذائي يمكن مضاعفة الإنتاجية بحوالي عشر مرات مقارنة بالوسط المستعمل في البداية، وهذا بفضل تبديل وتعديل المواد الغذائية الأولية (Eléments nutritifs) التي تدخل في تركيب هذا الوسط. وقد برهننا أن الهيدروليز الكيميائي الجزئي لمادة اللينوسليلوز (Lignocellulose) قد يزيد في هذا الإنتاجية، لإكمال الانفعال البيوكيميائي. وصلنا لإنتاج 8972 وحدة أنزيم/مل بدلا من 820 وحدة/مل في الأول.

الكلمات المفتاحية: أنزيم β -Glucosidase، إنتاجية، سيلولاز، لينوسليلوز، فطور دقيق.

La β -glucosidase ou β -D-glucoside glucohydrolase (EC 3.2.1.21) est l'enzyme clé dans l'efficacité de la biodégradation de la cellulose. Cette dernière représente le polysaccharide le plus abondant du règne végétal (30% de la matière sèche). Les moisissures cellulolytiques sont nombreuses mais peu (les cellulolytiques vrais) sont capables de s'attaquer aux 3 composants de la paroi végétale (lignine, cellulose et hémicellulose), avec des rendements d'hydrolyse élevés. Ce sont principalement des basidiomycètes et des ascomycètes [1]. La β -glucosidase fait partie du complexe cellulolytique majeur chez un grand nombre de ces micro-organismes. Elle est l'enzyme dont le taux de synthèse reste le plus limité chez *Trichoderma reesei* (réputée pour sa grande activité sur cellulose), et bien d'autres souches, qui limite considérablement le processus d'hydrolyse [2, 3]. Le genre *Aspergillus* abrite des souches capables d'excréter de grandes quantités en cette enzyme [2, 24].

La β -glucosidase catalyse l'hydrolyse du cellobiose, des alkyls, aryls D-glucosides liés en β -(1,4) pour libérer le glucose. Les cellooligosaccharides (C₃, C₄, C₅,...) sont en général hydrolysés à un taux qui décroît avec l'augmentation du degré de polymérisation. Plusieurs travaux ont montré que cette enzyme n'est pas seulement spécifique des

liaisons β -(1,4). Des liaisons β -(1,3), β -(1,6) et β -(1,2) (selon la source de l'enzyme) peuvent être hydrolysées à un degré moindre [11, 5, 6,3,26].

Plusieurs travaux ont été consacrés à la β -glucosidase des fungi du point de vue production, purification et détermination de ses propriétés cinétiques, physico-chimiques de même des études sur son mécanisme d'action. Ainsi, chez les moisissures, un certain nombre de souches a été caractérisé du point de vue pH, et température d'activité et de stabilité, Km, nombre de sous unités, pourcentage en carbohydrates et PM [3,4,6-12]. On peut noter que la β -glucosidase isolée chez *Aspergillus fumigatus* présente un PM allant de 41 kDa [13] à 380 kDa [8]. Le PM pour la β -glucosidase de notre souche est de 250 kDa, estimé par gel filtration sur Sepharose CL-6B (résultats non rapportés).

L'intérêt manifesté pour cette enzyme réside surtout dans le souci de surmonter un certain nombre de contraintes, qui limiteraient la biodégradation de la cellulose :

-Enzyme fortement soumise à la répression catabolique par le glucose [7],

-Inactivation thermique chez beaucoup de souches [Goldstein, 1980 ; cité par 7],

-Présence en qualité faible notamment chez *Trichoderma reesei* réputé pour être le plus grand producteur de cellulase [2].

Le présent travail vise la recherche d'un milieu optimal permettant d'augmenter les rendements en β -glucosidase chez *Aspergillus fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino*, isolé localement. Cette souche thermophile se caractérise par son hyperproduction en activité β -glucosidase après 5 jours de culture agitée en fioles d'ermen. Les essais effectués avec différents milieux de base, divers substrats lignocellulosiques, des sources d'azote, des oligo-éléments et action d'agents chimiques sur le substrat carboné, ont permis d'atteindre des rendements en enzymes élevés et, *a priori*, une meilleure hydrolyse de la lignocellulose : une activité de 8970 U/ml est obtenue sur milieu optimisé, ce qui représente une valeur de 10.9 fois celle obtenue sur milieu de départ (820 U/ml).

MATERIELS ET METHODES

* **Micro-organisme:** *Aspergillus fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino* est une souche isolée en 1992 dans notre laboratoire et identifiée au niveau du laboratoire du Professeur Hennebert à la Mycothèque de l'Université de Louvain (Belgique).

* **Conditions de culture:** Trois milieux de base ayant servi pour la culture des moisissures ont été utilisés.

- Milieu Mandels et Weber (M.W), dont la composition est (g/l) : KH_2PO_4 , 2.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.4 ; urée, 0.3 ; CaCl_2 , 0.3 ; Extrait de levure, 0.005, et en mg/l : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.0 ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.6 ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 ; CoCl_2 , 2.0.

- Milieu Czapeck (CZ) en g/l : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 ; KH_2PO_4 , 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; KCl, 0.5, et en mg/l : $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.6 ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.0; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.6; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.4.

- Milieu utilisé par Günata et Vallier (G.V) en g/l : $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3.0 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8.0 ; KH_2PO_4 , 1.0 ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.0 ; Tween 80, 1,5.

A ces milieux est rajoutée une source de carbone sous forme de substrat lignocellulosique (paille de blé, d'orge, alfa, grignon brut et épuisé, tige de maïs, cellulose en poudre à raison de 3% (p/v). La source de carbone est stérilisée par autoclavage séparément puis rajoutée dans le milieu liquide aseptiquement. L'urée est stérilisée par filtration.

Inoculum

L'inoculum est réalisé aseptiquement avec 0.1g de matière fraîche (mycélium+conidies)/200 ml de milieu de culture pour permettre à la souche de se développer plus rapidement. L'inoculum provient d'une culture de 48 heures en pente de la souche sur Czapeck Dox Agar. Le milieuensemencé est réparti dans des fioles de 500 ml (volume de travail, 200 ml), et soumis à agitation rotative d'environ 150 tours/ min à + 45°C, pendant 5 jours. Des prélèvements sont effectués chaque 24 heures. Le filtrat obtenu (ou surnageant de culture) est utilisé pour l'estimation de l'activité β -glucosidase de la biomasse mycélienne et des protéines extracellulaires.

Dosage des constituants pariétaux

La méthode de dosage adoptée est la méthode de Chesson (1978) [14], relativement simple et rapide. Elle consiste en une hydrolyse acide sélective des constituants pariétaux des substrats lignocellulosiques.

1g de substrat déshuilé est soumis à une extraction à reflux d'abord par l'eau distillée à 100°C, pendant 2 heures pour l'obtention des oligosaccharides. Après filtration et séchage, le résidu sec (R1) est soumis à extraction à reflux par l'acide sulfurique 0.5M, pendant 2 heures à 100°C pour l'extraction des hémicelluloses. Après filtration et séchage, le résidu R2 est repris dans sulfurique à 72% sous reflux pendant 2 heures, pendant l'obtention de la cellulose. Le résidu R3 subit une minéralisation à 450°C pendant 4 heures pour l'obtention de la lignine.

Prétraitement du substrat lignocellulosique sélectionné

L'alfa est soumise à une broyage (broyeur à couteaux) et réduite sous forme de particules de 0.2 mm de diamètre, avant de subir des traitements chimiques, acides (H_3PO_4), alcalins (NaOH) et mixte ($\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}_2$) par trempage en vue d'augmenter le rendement d'hydrolyse.

Les concentrations utilisées sont : NaOH (% p/v) : 0.5, 1.0, 2.0 et 3.0 ; H_3PO_4 (% v/v) : 5,10 et 20 ; CH_3COOH concentré + H_2O_2 à 30% (v/v): 16/16/68; 33/33/34; 50/50/0.0 Notons que le 3^{ème} chiffre représente le volume de H_2O utilisé pour la dilution du mélange.

10g de substrat lignocellulosique (alfa) sont mélangés à 100 ml de solution de prétraitement, pendant 30 min à température ambiante. Le produit obtenu est lavé à l'eau distillée jusqu'à pH 6.5-7.0, puis séché pendant 48 heures à 105°C.

Dosage de l'activité β -glucosidase

L'activité β -glucosidase est mesurée dans un mélange réactionnel de 1.2 ml contenant 1 ml de p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (p-NPG) à 0.15% dans le tampon acétate 0.1 M, pH 4.8 (p-NPG Sigma) et 0.2 ml de la solution

enzymatique ou de sa dilution appropriée. Le mélange est incubé à +50°C pendant 30 min. La réaction est arrêtée par addition de 4 ml de tampon Glycine-NaOH pH 10.8. L'ion p-nitrophénol libéré (PNP) est mesuré par absorbance au spectrophotomètre à 430 nm contre le blanc [15]. L'activité enzymatique est calculée en se référant à une courbe PNP étalon. La solution mère PNP est à 0.35%.

Une unité (U.I) enzymatique est définie comme étant la quantité de β -glucosidase nécessaire à la libération de 1 μ Mole de PNP par minute.

Estimation des protéines extracellulaires

Les protéines dans le surnageant de culture sont estimées par la méthode de Lowry (1951) [16]. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 660 nm contre le blanc.

La teneur en protéines (mg/ml) est calculée en se référant à une courbe étalon tracée avec la sérum albumine bovine (BSA). La solution mère de BSA est de 0.1%.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Composition chimique des différents résidus agricoles. Influence sur les activités enzymatiques

Analyse de la variance (TEST DE NEWMANN-KEULS, SAS SYSTEM) :

Le tableau 1, montre que la nature du résidu ou son origine a un effet hautement significatif sur la composition en composés pariétaux obtenue. En effet, R^2 , qui détermine la part de la variabilité totale, expliquée par l'origine, est très important. Il explique 98% de la variabilité totale pour la cellulose à 99.3% pour les oligosaccharides.

Il ressort du tableau 2, que le grignon d'olive est le plus riche en cellulose ($43.86\% \pm 1.20$); ensuite, vient l'alfa, les pailles de blé et d'orge dont les teneurs ne sont pas significativement différentes pour les deux dernières, et enfin, les tiges de maïs avec la teneur la plus faible ($24.50\% \pm 1.32$).

La teneur en hémicellulose est statistiquement identique pour la paille de blé et les tiges de maïs. Le résidu le plus riche en ce composant est la paille d'orge ($36.66\% \pm 2.08$), suivi de la paille de blé.

Le résidu le plus lignifié s'avère être le grignon d'olive ($25.0\% \pm 0.50$); cela confirme les valeurs relevées par Nefsouli *et al.* [17]. L'alfa et les tiges de maïs sont les résidus agricoles les plus pauvres en ligne : leur teneur sont statistiquement identiques. Pour les oligosaccharides, il ressort du test que ce sont les tiges de maïs qui en présentent la plus forte teneur ($38.60\% \pm 0.3$), ce qui *a priori*

peut être un bon inducteur de la croissance fongique avant la synthèse des enzymes lignocellulolytiques.

Le grignon d'olive et l'alfa sont les moins riches en oligosaccharides et sont statistiquement identiques.

La recherche du milieu optimal a mis en évidence l'alfa comme meilleur inducteur de l'activité enzymatique (Fig.1). Cela peut être dû à sa richesse en fibres cellulose courtes et sa faible teneur en lignine. En effet, l'alfa est largement utilisé dans les pays du Maghreb depuis des années dans la fabrication de la pâte à papier.

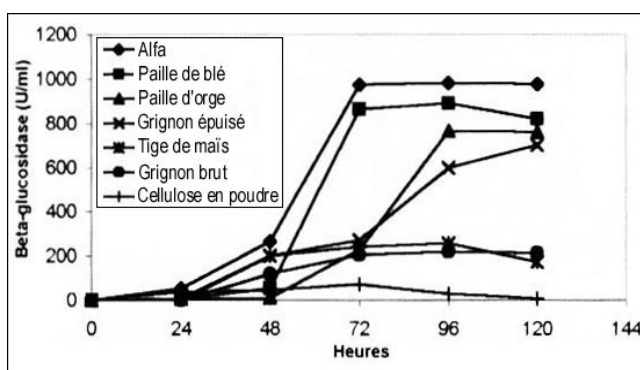


Figure 1: Influence de la nature du substrat lignocellulosique sur l'induction et la production de la β -glucosidase par *A. fumigatus* (Fresenius) mutant albino, en culture agitée à +45°C.

Influence de la composition du milieu de culture

Le suivi des activités β -glucosidase durant 120 heures de culture sur 3 milieux différents (Fig.2) montre que le milieu G.V est le plus stimulateur de la production enzymatique en raison d'une meilleure croissance (après 48 heures) et l'obtention des activités les plus élevées en fin de

	SCE _T	SCE _M	DDL	Erreur Résiduelle	R ²	F
Cellulose	821.31	805.08	14	1.62	0.98	123.99***
Hémicellulose	976.03	964.53	14	1.15	0.988	209.56***
Lignine	740.36	733.17	14	0.72	0.99	254.57***
Oligosaccharides	939.33	933.48	14	0.58	0.993	398.70***

Tableau 1: Effet de l'origine du résidu sur la composition.

SCE_T : Somme des carrés des écarts types totale,

SCE_M : Somme des carrés des écarts moyens du modèle,

DDL : Degré de liberté,

R² : Coefficient de corrélation carré,

F : Test de Fisher.

Composant Résidu	Cellulose	Hémicellulose	Lignine	Oligosaccharides
Paille de blé	30.60 ^c ± 0.20	29.90 ^b ± 0.78	11.16 ^b ± 0.76	26.00 ^c ± 1.32
Paille d'orge	28.30 ^c ± 0.88	36.66 ^a ± 2.08	9.43 ^c ± 0.60	30.73 ^b ± 0.20
Tiges de maïs	24.50 ^d ± 1.32	29.20 ^b ± 0.60	7.00 ^d ± 1.32	38.60 ^a ± 0.53
Grignon d'olive	43.86 ^a ± 1.20	12.40 ^d ± 0.40	25.50 ^a ± 0.50	18.20 ^d ± 0.72
Alfa	40.16 ^b ± 2.02	25.60 ^c ± 0.53	6.53 ^d ± 0.80	17.66 ^d ± 0.57

Tableau 2: Composition des différents résidus agricoles : comparaison des moyennes deux à deux d'après le test de Newmann-Keuls, au seuil $\alpha = 0.05$.

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, d'après le test de Newmann-Keuls, au seuils de 5%.

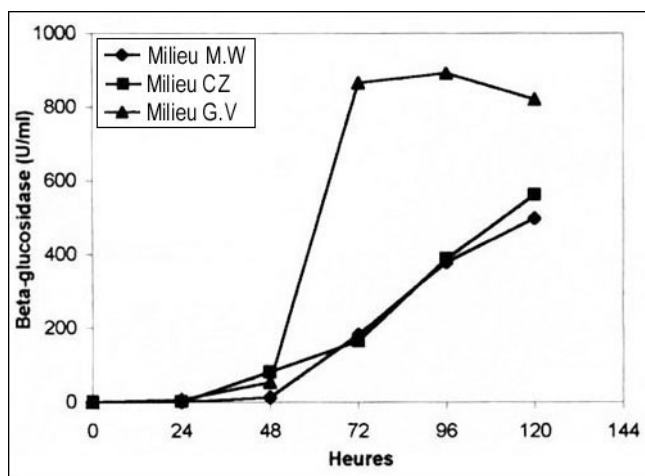


Figure 2: Effet de la nature du milieu de culture sur la production de la β-glucosidase par *A. fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino*, en culture agitée à +45°C.

culture (820 U/ml). Cette valeur est 1.4 fois plus élevée que sur milieu CZ, et 1.6 fois que sur milieu M.W. Cela peut être expliqué par la présence d'agents tensio-actifs comme le Tween 80 dans le milieu G.V qui faciliterait la sécrétion de la β-glucosidase par modification de la perméabilité membranaire et le contact entre le mycélium et le cellulases en général. Cela a été confirmé par certains auteurs dans leurs études sur les β-glucosidases fongiques et en particulier chez *Aspergillus* [2,12,31]. En effet, ce composé est capable de doubler la production de l'enzyme, ce que nous avons obtenu comparativement à la première étude sur *Aspergillus fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino*, sur paille d'avoine [18].

Par ailleurs, le milieu G.V s'avère être de composition plus simple, donc plus apte à une utilisation à grande échelle.

Effet de la nature de la source de carbone (substrat lignocellulosique)

Six substrats lignocellulosiques sous forme de résidus d'origine agricole, et une cellulose purifiée, ont été testés en vue de déterminer la source de carbone optimal à la production de la β-glucosidase. Tous sont inducteurs, mais à des degrés différents (Fig.1). La présence de l'enzyme a été détectée après 24 heures de culture, sauf avec le grignon où elle ne s'est révélée d'après 48 heures. Tous les substrats sont capables d'induire la production de la β-glucosidase chez *Aspergillus fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino* d'une façon exponentielle jusqu'à la fin de la culture à + 45°C, sauf la cellulose en poudre où une inhibition s'opère après 72 heures et durant lesquelles peu d'activités sont produites (valeur maximale, 72 U/ml). Le substrat le plus inducteur est l'alfa avec lequel des valeurs très élevées ont été enregistrées : 984 U/ml à 96 heures et 977 U/ml à 120 heures. Cette dernière est d'environ 1,2 fois et 1,3 fois plus élevée qu'avec

la paille de blé et d'orge respectivement, qui sont aussi de bons inducteurs des cellulases.

Effet de la concentration en alfa

Dans le but de déterminer la concentration optimale ne substrat carboné, les teneur en alfa ont été augmentées de 1 à 6%. Le tableau 3 donne un aperçu des activités obtenues sur milieu G.V. Il apparaît que la concentration optimale se situe à 4% d'alfa, ce qui a permis d'atteindre des activités de l'ordre de 1341 U/ml ± 48.04 (ou 328 U/mg ± 48.04), avec un pH final de 4.0. Au-delà de cette concentration, la production de l'enzyme est sensiblement ralentie, ce qui laisse présager une chute dans le rendement d'hydrolyse de la lignocellulose, pouvant être causé par un augmentation de la viscosité, rendant difficile l'aération du milieu et/ou un effet inhibiteur par adsorption irréversible au substrat cellulosique, observé chez beaucoup de souches fongiques étudiées au-delà de 3% [19,20,18].

Les concentrations de 1, 2 et 6% ne donnent pas des activités significativement différentes, d'après le test de Newmann-Keuls, au seuil de 5%.

Alfa (%)	Activité (U/ml)	Activité Spécifique (U/mg)	pH final
1	0.20 ^d ± 0.13	0.20 ^d ± 0.13	5.1
2	1.43 ^d ± 0.60	3.33 ^d ± 0.60	4.1
3	1067 ^b ± 132.34	261 ^b ± 132.34	4.0
4	1341 ^a ± 48.04	328 ^a ± 48.04	4.0
5	157 ^c ± 11.93	40.33 ^c ± 11.93	5.0
6	27 ^d ± 1.52	8.50 ^d ± 1.52	5.0

Tableau 3: Effet de la concentration en alfa sur les activités enzymatiques produites par *A. fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino*, en culture agitée pendant 120 heures à + 45°C sur milieu G.V. Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, d'après le test de Newmann-Keuls, au seuil α = 0.05.

Effet de la nature et de la concentration de la source azotée

Un certain nombre de substances azotées minérales de faible coût employées à 1.0% (w/v) sont testées. Les rendements en β-glucosidase (exprimée en activité enzymatique) après 120 heures de culture, sont comparés au milieu témoin contenant du sulfate d'ammonium comme source d'azote minérale (Tab. 4). A l'exception du sulfate d'ammonium qui permet d'atteindre une activité de 1115 U/ml ± 13.22, les autres sources : phosphate d'ammonium,

Source d'azote (1%)	Activité (U/ml)	Protéines extracellulaires (mg/ml)	Activité (U/mg)	pH final
(NH ₄) ₂ SO ₄	1115 ^a ± 13.22	2.11 ^a ± 0.02	524 ^a ± 5.50	3.8
(NH ₄) ₂ HPO ₄	550 ^b ± 45.36	1.52 ^c ± 0.13	360 ^b ± 3.05	4.1
CO(NH ₂) ₂	104 ^c ± 6.42	1.96 ^a ± 0.12	53.16 ^c ± 1.04	8.0
NaNO ₃	420 ^c ± 22.30	1.39 ^c ± 0.03	301 ^c ± 10.81	7.5
NH ₄ NO ₃	233 ^d ± 757	1.70 ^b ± 0.08	136 ^d ± 3.21	6.5

Tableau 4: Effet de la source d'azote sur la production de la β-glucosidase pour *A. fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino*, en culture agitée, pendant 120 heures à 45°C, sur milieu G.V. Les valeurs suivies de la même lettre (a, b, c, d), ne sont pas significativement différentes d'après le test de Newmann-Kzeuls, au seuil α = 0.05.

nitrate d'ammonium et de sodium, ainsi que l'urée, sont moins stimulatrices de l'activité enzymatique chez *Aspergillus fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino*.

Le sulfate d'ammonium est donc mieux indiqué comme source azotée pour des cultures en grands volumes. Des résultats similaires ont été obtenus avec la même espèce où l'ammoniac est plus stimulateur de la production cellulosique que le nitrate [19]. Le phénomène inverse est signalé avec *Aspergillus terreus* [25]. Par ailleurs, l'acidification du milieu pourrait jouer favorablement sur l'action des enzymes excrétées par la souche sachant que chez les champignons l'activité est plus élevée à pH acide. Ce dernier stabiliserait, la catalyse, contrairement à l'alcalinisation du milieu provoquée par la forme nitrate et l'urée [19,32].

Quant à la teneur en protéines produites, il n'y a pas de différences significatives entre l'utilisation du sulfate d'ammonium et l'urée, de même entre le phosphate d'ammonium et le nitrate de sodium.

Les activités spécifiques obtenues sont plus élevées dans le milieu contenant du sulfate d'ammonium comme unique source d'azote (524 U/mg \pm 5.50).

La figure 3 montre que parmi les différentes concentrations en sulfate d'ammonium testées, 0.8% permet d'augmenter plus les rendements en β -glucosidase. Ce résultat concorde avec celui obtenu avec *Aspergillus fumigatus* NRC 272 [21], pour lequel des concentrations allant de 0.2 à 0.8%, en présence de 2% de paille de blé, augmente la production des cellulases.

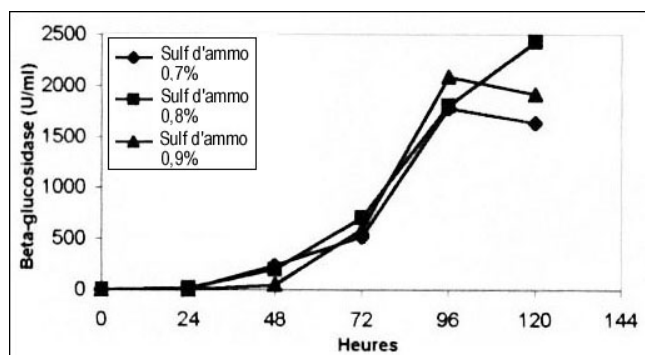


Figure 3: Effet de la concentration en sulfate d'ammonium sur la production de la β -glucosidase par *A. fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino*, après 120 heures de culture sur milieu G.V, en présence de 4% d'alfa.

Effet de quelques ions métalliques (cations)

Parmi les cations testés, l'ion Mg^{2+} entraîne une plus importante production de la β -glucosidase chez *Aspergillus fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino*. La forme chlorure est plus inductrice que la forme sulfate (Tab. 5). En effet, avec $MgCl_2$, l'activité est 1.3 fois plus élevée que dans le milieu témoin (sans addition d'ions métalliques). L'ion Ca^{2+} a également un effet inducteur. L'activation par Mg^{2+} et Ca^{2+} indique qu'ils sont nécessaires à une étape donnée de la synthèse de la β -glucosidase ou au niveau de son action catalytique. Des effets similaires sont obtenus avec la β -xylanase d'*Aspergillus sydowii* MG 49 [27]. L'ion Na^+ peut être considéré comme sans effet, à l'opposé de K^+ et

Ion (5 mM)	% d'activité relative	Croissance	pH final
Sans addition	100	+	6,0
Mg^{2+} ($MgCl_2 \cdot 7H_2O$)	131,4	+	4,6
Mg^{2+} ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	120,6	+	4,8
Ca^{2+} ($CaCl_2$)	105,7	+	4,5
Na^+ ($NaCl$)	98	+	3,9
Mn^{2+} ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	93,7	+	5,4
K^+ (KCl)	43,7	++	4,3
Cu^{2+} ($CuSO_4$)	12,4	++	5,3
Fe^{2+} ($FeSO_4 \cdot H_2O$)	0	+++	3,4
Zn^{2+} ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0	++	4,8
Co^{2+} ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0	-	5,0
Ag^+ ($AgNO_3$)	0	-	5,3

Tableau 5: Effet des éléments minéraux (ions métalliques) sur la production de la β -glucosidase par *A. Fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino*, après 120 heures de culture agitée (150 tours/min), à + 45°C.

de Cu^{2+} qui sont des inhibiteurs partiels. Aucune activité enzymatique n'est enregistrée dans les milieux additionnés de Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} et Ag^+ qui sont à ce titre des inhibiteurs forts. On peut remarquer aussi que l'effet des ions métalliques sur la production des cellulases contenues dans les surnageants de culture ou après purification, est variable selon les souches. En effet, il a été démontré que pour la β -glucosidase d'*Aspergillus ornatus*, Cu^{2+} , Mg^{2+} et Co^{2+} employés aussi à 5 mM, sont sans effet [9], alors que pour la β -glucosidase d'*Aspergillus niger*, les ions Ag^+ et Fe^{2+} se sont montrés inhibiteurs partiels [22]. La β -glucosidase d'*Aspergillus oryzae* est fortement inhibée par Ag^+ , Cu^{2+} et Fe^{2+} , et activée par les ions Mn^{2+} [5].

Tous les ions ont pour effet de rabaisser le pH du milieu. Cet abaissement est plus prononcé dans la cas de Na^+ . La zone des pH acides (3.5 à 5.0) est généralement plus favorable à la production des enzymes cellulolytiques par notre souche.

Effet des prétraitements chimiques

Il a été démontré que les traitements chimiques de la biomasse lignocellulosique ont un impact favorable sur les rendements de la cellulolyse (déstructuration du complexe, solubilisation partielle de la lignine et de l'hémicellulose), permettant la libération de sites d'attaque pour les enzymes lignocellulolytiques [23,28-30].

Dans le cas de l'alfa (Tab. 6), le traitement acide (H_3PO_4) à 5%, augmente l'activité de la β -glucosidase (U/ml) de 1.5 fois par rapport au milieu témoin. A des concentrations plus élevées, il se produit le phénomène inverse. Ce traitement a plus d'impact sur les hémicelluloses (libération des sucres en C_5) que sur la cellulose qui est plus résistante. Le meilleur rendement pour le traitement alcalin est obtenu avec 0.5% NaOH. A cette concentration, nous avons également augmenté la production enzymatique de l'endoglucanase (CMC-ase, 5 fois), de l'exoglucanase (Avicelase, 1.5 fois) et de la β -xylanase (5.5 fois) (résultats non rapportés). Le traitement par NaOH aboutit au gonflement des fibres de cellulose en rompant les liaisons hydrogène, et une solubilisation partielle des hémicelluloses et de la lignine [28].

Type de prétraitement	Activité (U/ml)	Protéines extracellulaires (mg/ml)	Activité (U/mg)
Témoin	3379	2.70	1251.4
Traitement acide (%H ₃ PO ₄)			
5	5098	2.57	1983.6
10	1172	2.05	571.7
20	622	1.78	349.4
Traitement alcalin (%NaOH)			
0,5	5047	2.42	2085.5
1	457	0.65	703
2	87.7	0.12	730.8
3	160	0.46	347.8
Traitement mixte (A+B)			
16ml A+16ml B+68ml H ₂ O	7494	2.55	2938.8
33ml A+33ml B+34ml H ₂ O	6930	2.48	2794.3
50ml A + 50ml B	6420	2.77	2317.6

Tableau 6: Effet des prétraitements sur l'alfa dans l'amélioration des rendements en β -glucosidase, produite par *A. Fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino* en culture agitée à 150 tours/min, pendant 120 heures à +45°C.

A : CH₃COOH - B : H₂O₂

Le traitement mixte (H₂O₂ + CH₃COOH) dilué, est celui qui rehausse le plus cette productivité pour les différentes concentrations employées, et particulièrement dans les proportions 16/16/68 (v/v/v) qui permet d'atteindre 7494 U/ml (2938 U/mg), ce qui représente une augmentation de 2,2 fois par rapport au témoin. Ce type de traitement pourrait avoir un impact plus important sur la solubilisation des hémicelluloses et des lignines [29,30].

Rendement sur milieu optimisé

Après 120 heures de culture sur milieu G.V optimisé (Fig.4) où la source de carbone est l'alfa à 4% et ayant été soumise à un traitement mixte, la source d'azote est sous forme minérale (sulfate d'ammonium à 0.8%) et sous les conditions de culture prédéfinies, *Aspergillus fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino* est capable de produire dans le surnageant de culture des β -glucosidases 10 fois plus actives que dans le milieu non optimisé, avec une meilleure croissance utilisant mieux le résidu lignocellulosique.

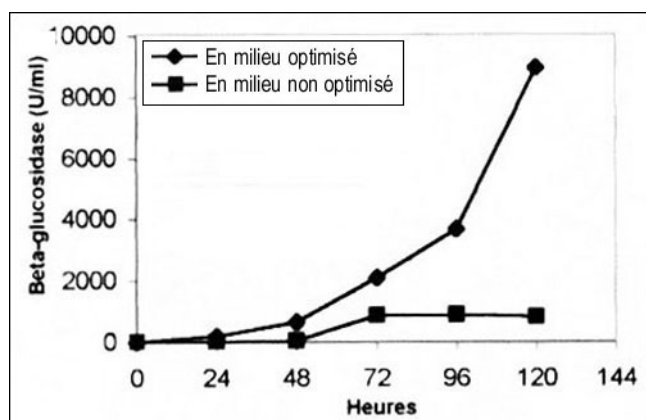


Figure 4: Evolution des activités β -glucosidase produites par *A. fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino*, sur milieu G.V optimisé en présence de 4% d'alfa, à +45°C.

CONCLUSION

Il existe plusieurs voies permettant d'augmenter les rendements d'hydrolyse de la lignocellulose ainsi que celle des enzymes qui y sont impliquées, pour une meilleure utilisation de cette biomasse revalorisable. Elles font appel aussi bien à la sélection de souches microbiennes, aux techniques d'amélioration du génie génétique ou de la mutagenèse et également à l'optimisation aussi bien de la composition des milieux de culture que des conditions de croissance. C'est avec cette dernière voie que nous avons pu passer d'une production en fioles d'Erlen, de 820 U/ml, en seulement 5 jours de fermentation et à +45°C avec *Aspergillus fumigatus* (*Fresenius*) mutant *albino*.

Le prétraitement mixte doux est le plus approprié pour ce qui est de l'alfa à 4%. Ce substrat a permis d'obtenir une bonne croissance mycélienne nécessaire à une saccharification plus exhaustive de la cellulose. De plus, le milieu sélectionné est simple, sans addition d'oligo-éléments (excepté MgCl₂), ce qui réduit les coûts du processus fermentaire envisageable à plus grande échelle.

En outre, ce travail peut ouvrir des perspectives à l'exploitation de la souche en cultures mixtes, notamment avec *Trichoderma reesei* ou autre souche thermophile produisant peu d'activité β -glucosidase. Par ailleurs, l'adjonction exogène de cette enzyme permettait de lever les phénomènes de rétroinhibition des autres cellulases par le cellobiose. Ce qui permettra une meilleure utilisation de la biomasse lignocellulosique par *Trichoderma reesei* et produire des substances d'intérêt (glucose, xylose, éthanol,...).

REFERENCES

- [1]- Odier E. et Rouau X, "Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine", *In* Hydrolases et Dépolymérases-Enzymes d'intérêt industriel, Collection Biochimie appliquée; pp.199-237, Ed. Gauthier Villars.
- [2]- Woodward J. et Wiseman A., "Fungal and other β -D-glucosidases- their properties and applications", *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 4 (1982).
- [3]- Yamanobe T. and Mitsuishi Y., "Purification and properties of a β -glucosidase from fungal strain Y-94", *Agric. Biol. Chem.*, vol.53 (12) (1989), pp.3359-3360.
- [4]- Anand L. and Vithayathil P.-J., "Purification and properties of β -glucosidase from a thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol.67, N°6 (1989), pp.380-386.
- [5]- Riou C., Salmon J.-M., Vallier M.-J., Gïnata Z. and Barre P., "Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol.64 (1998), pp.3607-3614.
- [6]- Kimura I., Yoshioka N. and Tajima S., "Purification and characterization of a β -glucosidase with β -xylosidase from *Aspergillus sojae*", *J. of Bioscience and Bioengineering*, vol. 87, N°4 (1999), pp.538-541.
- [7]- Woodward J. and Wiseman A., "Fungal and other β -D-glucosidases- Their properties and applications", *Enzyme Microb. Technol.*, V4 (1982), pp.73-79.
- [8]- Kitpreechavanich V., Hayashi M. and Nagai S., "Purification and characterization of extracellular β -xylosidase and β -

- glucosidase from *Aspergillus fumigatus*", *Agric. Biol. Chem.*, 50 (1986), pp.1703-1711.
- [9]- Yeoh H.H., Tan T.K. and Koh S.K., ".Kinetic properties of β -glucosidase from *Aspergillus ornatus*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25 (1986), pp.25-28.
- [10]- Gaikward J.S. and Maheshwari R., "Localisation and release of β -glucosidase in the thermophilic and cellulolytic fungus, *Sporotrichum thermophile*", *Experimental Mycology*, 18 (1994), pp.300-310.
- [11]- Gueguen Y., Chemardin P., Anand A. and Galzy P., "Comparative study of extracellular and intracellular β -glucosidase of a new strain of *Zygosaccharomyces bailii*, isolated from fermenting agave juice", *J. of Applied Bacteriology*, 78 (1995), pp.270-280.
- [12]- Günata Z. et Vallier M.J.V., "Production of highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidase by three *Aspergillus* strains", *Biotechnology letters*, Vol. 21 (1999), pp.219-223.
- [13]- Rudick M.J. and Elbein A.D., "Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus fumigatus*: Purification and properties of β -glucosidase", *J. Biol. Chem.*, 248 (1973), pp.6505-6513.
- [14]- Chesson A., "Maceration of linen flax under anaerobic conditions", *J. of Applied Bacteriology*, 45(2) (1978), pp.219-230.
- [15]- Wood T.M. et Bhat T.M., "Methods for measuring cellulase activities", In *Methods in Enzymology*, vol.160, pp.87-112, Ed. W.A. Wood and S.T. Kellogs, Academic Press Inc., USA (1988).
- [16]- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., "Protein measurement with the phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, 193 (1951), pp.265-275.
- [17]- Nefsaoui et Vanbelle M., "Utilisation des grignons d'olive en alimentation animale dans le bassin méditerranéen", Université Catholique de Louvain, Faculté des Sciences Agronomiques, Belgique, Publication N°38 (1984).
- [18]- Saradouni N., Penninckx J.M. and Salhi O., "High level production of thermostable β -xylanase, CMC-ase and β -glucosidase by an *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) albino mutant strain, *Sciences & Technologie*, Univ. Constantine, Algérie, N° 12 (1999), pp. 65-70.
- [19]- Stewart J.C. and Parry J.B., "Factors influencing the production of cellulase by *Aspergillus fumigatus* (Fresenius)", *J. of General Microbiology*, 125 (1981), pp.33-39.
- [20]- Szczodrak J., "Production of cellulases and xylanases by *Trichoderma reesei* F-522 on pretreated wheat straw", *Acta. Biotechnol.*, 8 (1988), pp.509-515.
- [21]- Shaker H.M., Farid M.A. and El-Diwany A., "Optimization of the composition medium for cellulase and protein biosynthesis by thermophilic *Aspergillus fumigatus* NRC 272", *Enzyme Microb. Technol.*, vol.6 (1984), pp.212-216.
- [22]- Okada G., "Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*", *Agric. Biol. Chem.*, 49 (1985), pp. 1257-1265.
- [23]- Shin C.S., Lee J.P., Lee J.S. and Park S.C., "Enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 on various lignocellulosic substrates", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol.84-86 (2000), pp. 237-245.
- [24]- DeVries R.P. and Visser J., *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 65, N°2 (2001), pp. 497-522.
- [25]- Pushalkar S., Rao K.K. and Menon K., "Production of β -glucosidase by *Aspergillus terreus*", *Curr. Microbiol.*, 30 (1995), pp.255-258.
- [26]- Faure D., Henrissat B., Ptacek D., Bekri M.A. and Vanderleyden J., The cel Agene, encoding a glycosyl hydrolase family 3 β -glucosidase in *Azospirillum irakense*, is required for optimal growth on cellobiosides", *Applied and Environmental Microbiology*, vol.67, N°5 (2001), pp.2380-2383.
- [27]- Ghosh M., Das A., Mishra A.K. and Nanda G., "*Aspergillus sydowii* MG 49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes", *Enzyme Microb. Technol.*, V15 (1993), pp.703-709.
- [28]- Sun R.C., Tomkinson J., MA.P.L et Liang S.F., "Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments", *Carbohydrates Polymers*, 42 (2000 a), pp.111-122.
- [29]- Sun R.C., Tomkinson J., Geng Z.C. and Wang N.J., "Comparative studies of hemicelluloses solubilized during the treatments of maize stems with peracetic acid and hydrogen peroxide", *Holzforschung*, 54(5) (2000 b), pp.492-496.
- [30]- Sun R.C., Tomkinson J., Mao F.C. and Sun F., "Physico-chemical characterization of lignins from rice straw by hydrogen peroxide treatment", *J. of Applied Polymer Science*, 79 (2001) pp.719-732.
- [31]- Esterbauer N., Steiner W., Labuda I., Hermann A. and Hayn M., "Production of *Trichoderma* cellulases in laboratory and pilot scale", *Bioresource Technology*, 36 (1991), pp.51-65.
- [32]- Deacon J.W., "Introduction to modern mycology", vol.7, 2nd Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh (1984). □